

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010 年度～2011 年度
課題番号：22791250
研究課題名：iPS 化 ADSC を用いた微小環境の再生・再構築による次世代型膵島移植法の研究開発
研究課題名：Hybrid transplantation of pancreatic islets and adipose tissue-derived stem cells enhances the survival and insulin-function of islet grafts in diabetic mice
研究代表者
大村 仁昭（OHMURA YOSHIAKI）
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90571349

研究成果の概要（和文）： 脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) と膵島とを同時に同部位に移植 (hybrid 膵島移植) することで、マウスにおける糖尿病治癒に必要な膵島を、400IEQ から 200IEQ にまで減量することが出来ることを見出した。そのメカニズムとして、血管新生効果、抗炎症効果、拒絶反応抑制効果が示された。また、長期観察を続けることで、ADSC の一部が血管内皮細胞に分化することは確認できたが、インスリン分泌細胞に分化する証拠は確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：Hybrid islet transplantation indicated to promote the survival and insulin function of the islet graft and reduce the islet mass required for reversal of diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合 計
22 年度	1, 700, 000	510, 000	2, 210, 000
23 年度	1, 000, 000	300, 000	1, 300, 000
年度			
年度			
年度			
総 計	2, 700, 000	810, 000	3, 510, 000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般
キーワード：移植外科学

1. 研究開始当初の背景
(1) 1型糖尿病根治療法として膵島移植が行われている。従来の膵島移植では『1 人のドナーより得られた膵島は、1 人のレシピエントに移植』されている。しかも移植膵島の生着率が低いため、インスリン離脱を目指すには3回の移植が必要である。これにより移植後1年でのインスリン離脱率は約80%に達するが、5年の遠隔期では約10%にまで低下するのが現状である。
移植膵島の生着率向上には、移植後早い段階での新生血管の誘導など、移植膵島周囲の環

境の構築が必須である。脂肪組織由来幹細胞 (adipose derived stem cells, 以下 ADSC) は、血管への分化と新生血管誘導作用をもち、さらに膵島細胞そのものへの分化も可能である。そこで膵島移植時に ADSC を併用移植 (Hybrid islet transplant) することで、ADSC 自身が足場であるニッチや膵内分泌細胞に分化し、治療成績の向上が期待できる。さらに、ADSC の Re-programing を行い iPS 化した ADSC (以下、iPS-ADSC) を樹立して多分化能を増強したうえで、α細胞やβ細胞に invitro に分化誘導し、膵内分泌組織を再構築したうえで、ドナー膵島と新鮮 ADSC に加えて

iPS-ADSC から再構築した膵内分泌組織を併用移植 (Hybrid islet transplant) することで、さらに治療成績の向上できるのではないかと考えた。本研究は、ADSC と iPS-ADSC を併用した次世代型の膵島移植の開発と臨床応用を目的とし、①膵島生着率の向上②移植膵島の必要組織量の減量③永続的なインスリン離脱の実現をめざすプロジェクトである。

(2) 自己免疫反応により膵内分泌細胞が破壊されている1型糖尿病では、インスリン強化療法が導入されるが、血糖コントロールは困難を極め重症低血糖発作により生命に危険が及ぶ治療抵抗性の難病である。この1型糖尿病根治療法として「膵島移植」が行われている。膵島移植はドナー膵臓より内分泌組織である膵島のみ分離し門脈内に点滴移植する方法で、レシピエントには低侵襲な「理想的な1型糖尿病根治療法」であり、「細胞移植治療」の有効に臨床化されている数少ない根治療法の1つである。近年、膵島分離技術、免疫抑制法が確立され徐々に広まりつつあるが、本邦の「極端なドナー不足」により膵島移植の恩恵に与る1型糖尿病患者は少ない。また移植後5年の遠隔成績では「インスリン離脱率が移植患者の約10%にまで低下」してしまうのが現状で (Ryan EA, *Diabetes*, 2005)、移植膵島生着率向上に向けた新たな戦略が必要とされている。

一方、再生・発生に関する細胞・分子生物学の飛躍的進歩により細胞移植療法に使えるインスリン分泌細胞を体外で分化・誘導する糖尿病再生医療に大きな期待が寄せられている。近年、生体内の多くの組織中に多分化能を有する細胞、いわゆる体性幹細胞が存在するとの報告があり、皮下脂肪組織中にも同様の幹細胞が存在することを Zuk らが報告した (Zuk PA, *Tissue Eng*, 2001)。現在、この幹細胞は脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) と呼ばれ、幹細胞としての潜在的能力は骨髄由来幹細胞との比較でも遜色ないことが証明されており神経、膵内分泌細胞、血管内皮細胞、心筋細胞など細胞系譜を超えて分化できることも示され (Planat-Benard V, *Circulation*, 2004)、さらに、ADSC に Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 を遺伝子導入することで Re-programing して、iPS-ADSC を作成することにも成功し (Ning Sun, *PNAS*, 2009)、糖尿病再生根治療法のドナー細胞として注目とされている。しかし、iPS-ADSC をただ移植するのみでは腫瘍化の危険を伴う。申請者は、レシピエント皮下脂肪より採取した ADSC を Re-programing により iPS 化し、PDX-1、Ngn3、NeuroD1 など α 細胞、 β 細胞など膵内分泌

細胞に分化誘導・混合して膵内分泌組織を in vitro で再構築したのち、その再構築組織と膵島、さらに ADSC と併用移植することで移植膵島の生着率を向上させることに着想した。

ADSC と iPS-ADSC 併用膵島移植では、併用移植した ADSC が血管分化と新生血管誘導を担い、iPS-ADSC より再生・再構築した膵内分泌組織が糖代謝補助すると予想される。これにより1回の移植膵島の必要量を減量することが可能となり、1人のドナー膵島を1人のレシピエントに移植することが実現でき、さらには1人のドナー膵島を2~3人のレシピエントに分割移植することも可能となり、より多くの1型糖尿病患者を救うことができる。また iPS-ADSC より膵内分泌組織の再生・再構築の効率が向上すれば、ADSC と iPS-ADSC 再構築組織の移植がメタボリックシンドロームへ適応拡大でき、「細胞・組織移植」と「再生医療」の長所を利用した次世代型根治療法となる。

本研究では1型糖尿病根治性を最も向上させる「安全な iPS-ADSC 併用膵島移植技術」の確立を目指す。自己 ADSC より作成した iPS-ADSC を併用した hybrid 膵島移植は1型糖尿病根治へのロードマップの中で最も臨床応用に近い次世代戦略である。

2. 研究の目的

(1) マウスをドナー・レシピエントとして、膵島分離、ADSC 採取、iPS-ADSC 樹立を行い、in vitro で iPS-ADSC を膵内分泌細胞に分化誘導したうえで、膵内分泌組織を再構築する。色々な組織量で混合した膵島+ADSC、再構築組織を糖尿病化したマウスの腎被膜下に移植し iPS-ADSC 併用膵島移植の有効性と optimal condition を確認する。

(2) 移植膵島、ADSC、iPS-ADSC を個別マーキングし、レシピエント体内に移植したのちの ADSC の血管への分化、新生血管誘導能を、iPS-ADSC の膵内分泌組織への分化再生を検証し iPS-ADSC 併用膵島移植の有効性メカニズムを解析する。

(3) マウス実験にて基礎研究にて optimal condition が決定されたのち、ヒト膵島とヒト ADSC、ヒト iPS-ADSC を用いて、臨床応用における有効性と安全性を確認する。

3. 研究の方法

(1) ADSC を用いた Hybrid 膵島移植の有効性の検定と optimal condition の決定

本課題の第一段階として、マウス同種膵島移植の系を用いて ADSC を用いた hybrid 膵島移植の効果、有効性、optimal condition を解析・検討し、その結果を踏まえてヒト膵島およびヒト ADSC を用いて、その有効性、再

現性を検証する。

野生型 C57BL/6 (B6, H-2^b)マウスをドナーとし膵島を分離する。レシピエントは野生型 BALB/C (B/C, H-2^d)マウスを用い、移植前 7 日前にストレプトゾトシン (STZ) 180mg/kg を腹腔内投与し糖尿病化 (血糖値 350mg/dl 以上) を確認する。レシピエントマウスより脂肪を摘出、低濃度コラゲナーゼ処理にて ADSC を採取する。同時に B6 ドナーマウスより膵島を分離し、上記の表-1 に示した割合 (細胞の pellet volume で表現する) で膵島と ADSC を混合し、レシピエントマウスの腎被膜下に移植、レシピエントマウスの血糖値、体重変化を追跡、膵島単独移植群 (コントロール群) および ADSC 単独細胞移植群 (コントロール群) と比較し、どの割合の hybrid 膵島移植が長期間糖代謝を改善でき有効性を発揮できるか検討する。

表-1 実験グループと膵島、ADSC、再構築組織の混合比

実験グループ	ドナー膵島、ADSC、再構築組織の混合比 (膵島:ADSC:再構築組織のpellet体積比)	実験目的
A 群 (コントロール群)	1:0:0	膵島単独移植 (従来の膵島移植)
B 群 (コントロール群)	0:1:0	ADSC の単独細胞移植
C 群 (コントロール群)	0:0:1	再構築組織の単独移植
D 群 (hybrid群)	1:1:0	One donor one recipientsが可能なか?
E 群 (hybrid群)	1:2:0	One donor two recipientsが可能なか?
F 群 (hybrid群)	1:1:1	One donor one recipientsが可能なか?
G 群 (hybrid群)	1:2:1	One donor two recipientsが可能なか?
H 群 (hybrid群)	0:1:1	ADSCと再構築組織のみの移植が可能なか?

また、マウス基礎実験で ADSC 併用 hybrid 膵島移植の有効性が確認できれば、アメリカよりヒト膵島を購入、到着日に合わせて Cytori Therapeutics 社製 Celution System を用いてヒト ADSC を採取し、ヒト膵島とヒト ADSC を混合し、ヌードラットまたは NOD/SCID マウスに移植しヒトのマテリアルでの有効性を検証する。

(2) iPS-ADSC を用いた Hybrid 膵島移植の有効性の検定と optimal condition の決定

本課題の第二段階として、マウス同種膵島移植の系を用いて iPS-ADSC を用いた hybrid 膵島移植の効果、有効性、optimal condition を解析・検討し、その結果を踏まえてヒト膵島およびヒト iPS-ADSC を用いて、その有効性、再現性を検証する。

レシピエントマウスより脂肪を摘出、低濃度コラゲナーゼ処理にて ADSC を採取し、遺伝子導入の技術を用いて Re-programing し iPS 化し、iPS-ADSC を PDX-1、Ngn3、NeuroD1 などの遺伝子導入により、 α 細胞や β 細胞の膵内分泌細胞に体外で分化誘導し、膵島組織を再構築しておく。研究課題 1 にて決定された移植膵島と ADSC の optimal condition に加えて、上記の表-1 に示した割合 (細胞の

pellet volume で表現する) で膵島と ADSC、iPS-ADSC を混合し、レシピエントマウスの腎被膜下に移植、レシピエントマウスの血糖値、体重変化を追跡、膵島単独移植群 (コントロール群) および iPS-ADSC 単独細胞移植群 (コントロール群) と比較し、どの割合の hybrid 膵島移植が長期間糖代謝を改善でき有効性を発揮できるか検討する。

また、マウス基礎実験で iPS-ADSC 併用 hybrid 膵島移植の有効性が確認できれば、アメリカよりヒト膵島を購入、到着日に合わせて Cytori Therapeutics 社製 Celution System を用いてヒト ADSC を採取し iPS-ADSC を作成し、ヒト膵島とヒト ADSC、iPS-ADSC を混合し、ヌードラットまたは NOD/SCID マウスに移植しヒトのマテリアルでの有効性を検証する。

(3) p53 ノックアウトマウス、Nanog-GFP マウスを用いて、micro RNA を解析し、効率的かつ安全な iPS-ADSC の作成法の確立

本課題では ADSC を p53 ノックアウトマウスや Nanog-GFP マウスの脂肪組織より採取し ADSC から iPS-ADSC の作成効率を改善するとともに、iPS-ADSC の腫瘍化の予防が可能性を検証する。p53 ノックアウトマウスや Nanog-GFP マウスの脂肪組織から採取した ADSC を、Re-programing の技術により iPS-ADSC を作成するとき、B6 マウスの脂肪組織から採取した ADSC からの iPS-ADSC の作成効率を、比較検討する。その後、その iPS-ADSC を膵内分泌細胞へ分化誘導し、腫瘍化の予防につながる新たな Re-programing 法と分化誘導法を研究・開発し、腫瘍化につながる micro RNA を解析することで、効率的かつ安全な hybrid 膵島移植法を確立する。

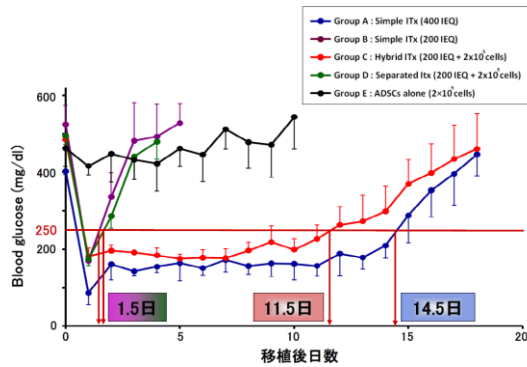
(4) 移植膵島、ADSC、iPS-ADSC 個別標識による分化同定と特性解析

本課題では、脂質挿入型膜標識剤 (Sigma) である PKH26GL (赤蛍光) を移植膵島に、PKH2PCL (緑蛍光) を ADSC、iPS-ADSC に用いて、膵島、ADSC、iPS-ADSC を個別に長期間標識し (100 日以上)、SCID mice の腎被膜下に hybrid 移植し、移植後 1 週、2 週、3 週、4 週、2 ヶ月、3 ヶ月でマウスを犠牲死させ、膵島生着の有無、ADSC の血管への分化、iPS-ADSC の膵内分泌細胞への分化などを免疫組織学的に検索し、hybrid 膵島移植の有効性メカニズムを検証する。

4. 研究成果

(1) ADSC を用いた Hybrid 膵島移植の有効性の検定と optimal condition の決定

移植膵島の生着期間

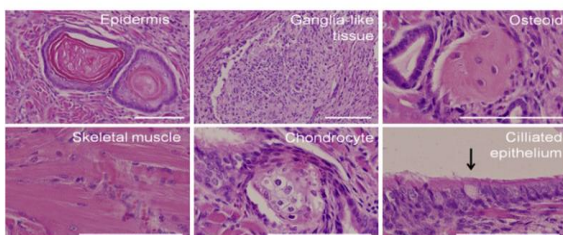
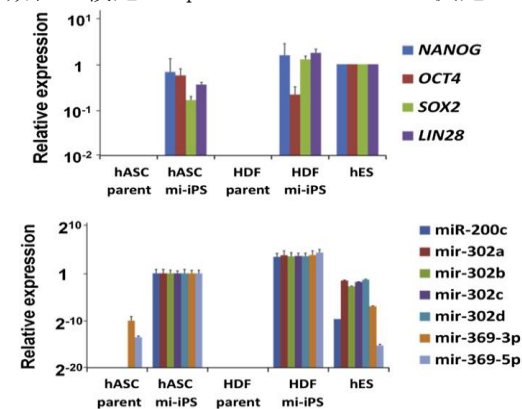


ADSC と allogeneic 膵島との Hybrid 移植では、血糖正常化に必要な移植膵島を 400 IEQ から 200 IEQ まで半減することができ、根治膵島移植群 (400 IEQ) と同等の耐糖能を獲得していた。

Hybrid 移植群では、インスリン陽性細胞を含んだ良好な移植膵島の生着を認め、ADSC は移植膵島の周囲で線維様組織へ変化していたと考えられ、新生血管が有意に多く、移植膵島維持の一助になっていることが示唆された。また、Hybrid 移植群では、CD4⁺ T cell、CD8⁺ T cell 及び CD68⁺ マクロファージの浸潤が抑制され、ADSC による移植膵島の拒絶反応制御の可能性が示唆された。

ADSC を用いた微小環境の再生・再構築による膵島移植法は、世界初の成果であり、2010 年バンクーバーにおける第 23 回国際移植学会 (International Congress of The Transplantation Society) で報告し、優秀研究として、学術雑誌 Transplantation2010 に掲載され、2011 年日本膵・膵島移植研究会においても、優秀研究賞を受賞した

(2) iPS-ADSC を用いた Hybrid 膵島移植の有効性の検定と optimal condition の決定

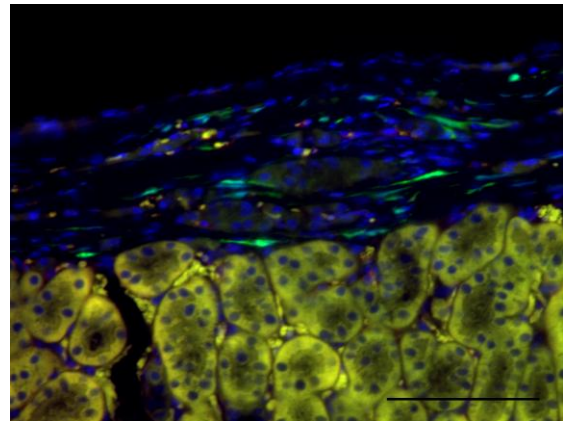


ADSC より iPS を作成することに成功し、hybrid 膵島移植とその評価、optimal condition の決定のため、マウスモデルにおける実験を継続中である。

(3) p53 ノックアウトマウス、Nanog-GFP マウスを用いて、micro RNA を解析し、効率的かつ安全な iPS-ADSC の作成法の確立

ADSC に micro RNA を導入し、効率的な iPS の作成法を確立した。

(4) 移植膵島、ADSC、iPS-ADSC 個別標識による分化同定と特性解析



ADSC を緑色蛍光に標識し、血管内皮細胞を赤色蛍光に標識して評価したところ、ADSC の一部が血管内皮細胞に分化していることが確認できたが、移植後 30 日目までの評価では、ADSC からインスリン分泌細胞への分化は確認されなかった。

現在、引き続き長期観察を継続しつつ、iPS-ADSC を用いた hybrid 膵島移植において、インスリン分泌細胞への分化を検証中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yoshiaki Ohmura, Masahiro Tanemura, Naomasa Kawaguchi, Tomohiko Machida, Tsukasa Tanida, Takashi Deguchi, Hiroshi Wada, Shogo Kobayashi, Shigeru Marubashi, Hidetoshi Eguchi, Yutaka Takeda, Nariaki Matsuura, Toshinori Ito, Hiroaki Nagano, Yuichiro Doki, and Masaki Mori, Combined transplantation of pancreatic islets and adipose tissue-derived stem cells enhances the survival and insulin-function of islet grafts in diabetic mice, Transplantation, 査読有, 90 巻, 12 号, (2010), 1366-1373

4. 研究成果

(1) ADSC を用いた Hybrid 膵島移植の有効性の検定と optimal condition の決定

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 大村仁昭、脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) を応用した次世代型膵島移植法の確立、第 38 回日本膵・膵島移植研究会、2011 年 3 月 5 日、奈良県新公会堂
- ② 大村仁昭、Hybrid islet transplantation with marginal islet mass and adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) can elicit long-term islet graft survival and support normoglycemia in diabetic mice、第 23 回国際移植学会 (International Congress of The Transplantation Society)、2010 年 8 月 16 日、バンクーバー・コンベンションセンター、カナダ

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

①

名称：脂肪組織由来幹細胞を用いた膵島移植

発明者：種村匡弘、大村仁昭、etc

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：K20090270

出願年月日：平成 21 年 12 月 10 日

国内外の別：国内

②

名称：マイクロ RNA を用いた多能性幹細胞の誘導

発明者：森正樹、石井秀始、三吉範克、土岐

祐一郎、種村匡弘、永井健一、星野宏光、大

村仁昭

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：K20090215

出願年月日：平成21年10月14日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 仁昭 (OHMURA YOSHIAKI)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90571349