

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791288

研究課題名（和文）：脂肪由来幹細胞を用いた新たな膵島再生法の開発

研究課題名（英文）：development of a novel beta-cell replacement therapy using the adipose-tissue derived stem cell (ADSC)

研究代表者：森 大樹 (MORI HIROKI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：70448330

研究成果の概要（和文）：1 型糖尿病の治療法として、再生医療を用いた  $\beta$ -cell replacement therapy に期待が寄せられている。今回、薬剤（Streptozotocin）誘導糖尿病ヌードマウスを用いて、ヒト脂肪由来幹細胞（human Adipose-tissue derived stem cell: hADSC）移植モデルを作成し、hADSC の機能的膵島様細胞への分化・誘導作用と傷害膵島への homing 作用を in vivo で検討するとともに、膵島保護作用を in vitro で検討した。膵実質へ移植された hADSC は機能的膵島様細胞に分化し、耐糖能異常を改善した。また、hADSC は細胞接触作用無く in vitro で膵島保護効果を有したが、in vivo での静脈投与による傷害膵島への homing 効果は乏しかった。

研究成果の概要（英文）： $\beta$ -cell replacement therapy using regeneration medicines is expected as a cure for type 1 diabetes. This time, after the human adipose-tissue derived stem cell (hADSC) transplant model using streptozotocin-induced diabetes nude mice will be created, we investigated the differentiated and derived impact of hADSC to the functional islet like cell in vivo, the homing effect of hADSC on injured islet cell in vivo and the cell protective effects of hADSC on injured islet cell in vitro. hADSC transplanted to pancreas itself was differentiated to functional islet like cell, and improved the abnormal glucose tolerance. Moreover, although, in vitro, hADSC had an islet cell protection effect without the cell-cell contact, in vivo, the homing effect on the injured islet cell by the intravenous injection was poor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：脂肪由来幹細胞・膵島移植・糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

全世界で糖尿病患者は約 2000 万人と推定され、うち 1 型糖尿病（Type 1 Diabetes

Mellitus: T1DM）は糖尿病患者の 2% を占めるとされる。治療法としては強化インシュリン療法、持続的インシュリンポンプ使用などが

行われるが、律動的インシュリンレベルの制御は未だ困難であり、欧米では膵島移植がβ-cell replacement therapy として臨床応用されている。しかし、膵島移植は5年後のインシュリン完全離脱率が低く（10%程度）、繰り返し移植を要する（multiple-donor one-recipient）など、問題点が指摘されているのも事実である（Diabetes 2005）。一方、近年急速にその研究が進んでいるのが全能性の幹細胞を用いた Cell replacement therapy（再生医療）であるが、その代表である ES 細胞は倫理的問題をクリアする必要がある点、iPS 細胞はその制御・誘導に応じた施設、設備が必要である点、DNA 操作を要するために細胞の transformation が排除できない点などの問題点がある。そこで倫理的問題も少なく、また DNA 移入などの細胞制御を要さない、脂肪由来幹細胞（human Adipose-tissue derived stem cell: hADSC）に着目し、これを用いたβ-cell replacement therapy を目指すことを着想した。

## 2. 研究の目的

膵島を薬剤（Streptozotocin: STZ）で破壊した薬剤誘導糖尿病ヌードマウスを用い、これに hADSC を投与し、その分化・誘導を解析することで、この傷害膵島へのホーミング効果について機序解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) in vivo におけるヒト由来脂肪幹細胞 hADSC の傷害膵島への影響の検証：hADSC 群として hADSC  $1.0 \times 10^5$  個を8週齢の STZ（STZ 180mg/kg を腹腔内投与）誘導糖尿病 nude mouse（STZ 投与後2日）の膵実質へ移植（hADSC 群）し、コントロール群として8週齢の nude mouse に STZ のみ投与し、血糖値の推移を比較し、また10-14日で犠死させ膵組織の免疫組織染色（ヒトインシュリン、HLA）を行い、形態学的評価を比較検討する。

(2) in vitro における hADSC の膵島保護効果の検証：ブタ膵島  $1.0 \times 10^5$  個を単培養した群（膵島単独群）、および  $1.0 \times 10^5$  個のブタ膵島と hADSC を共培養した群、またコントロールとして同数の hADSC 単独で培養した群（ADSC 単独群）を作成した。共培養群は、隔絶膜下に細胞接触が無い状態で培養した群と、ある状態で培養した群の2群に分け検討する。48時間後に膵島 recovery 率、viability、各群の培養液中のサイトカイン（IL-6、IL-8、VEGF）、インシュリンを測定する。

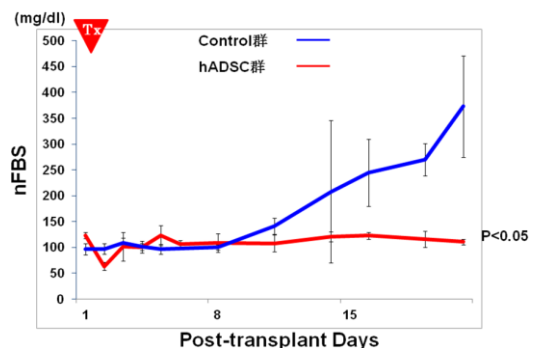
(3) in vivo における hADSC の傷害膵島への homing 効果の検証：5週齢 nude mouse に STZ（200mg/kg）を腹腔内投与し、糖尿病モデルマウスを作製。血糖が連続2日 400mg/dl 以上を示した時点で control、DM mouse の膵

組織を採取し、PCRにより SDF-1 の mRNA 発現を評価した。さらに、STZ 誘導糖尿病マウスに Xenolight DiR® で labeling した hADSC（ $1.0 \times 10^5$  個/0.2ml/匹）を尾静脈より静注し、IVIS® を用いて hADSC の体内動向を追跡（24時間後）する。さらに血糖の評価を経時的に行い、control マウスと比較検討する。

## 4. 研究成果

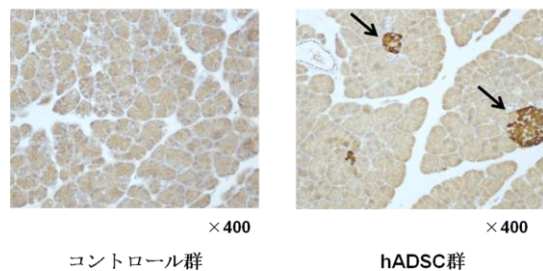
(1) 実験開始後14日目の hADSC 群ではコントロール群に比して膵実質の著明な増量を認めた。血糖値の推移については hADSC 群で血糖値が 110mg/dl までに保たれ、良好な応答を示した。糖負荷試験を施行すると hADSC 群は血糖値が 110mg/dl までに保たれ、良好な応答を示した。

### 血糖の推移

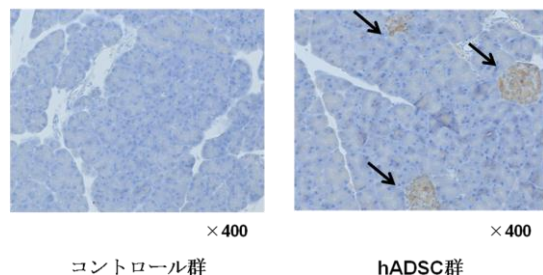


免疫組織染色では、ヒトインシュリン染色において、膵組織内に染色される膵島様細胞を認め、hADSC 群でこれが有意に増加していた。

### ヒトインシュリン抗体染色

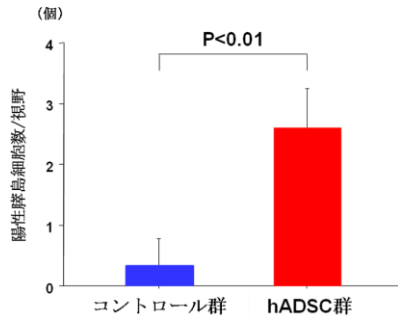


### HLA抗体染色

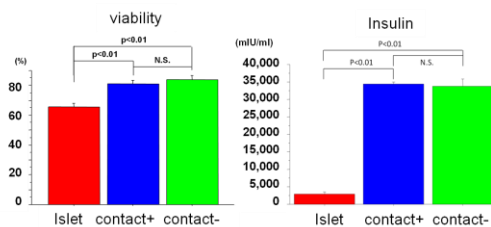


さらに hADSC 群では 2.6 個/HPF (high power field) の HLA 陽性インシュリン産生膵島様細胞を認め、hADRC 群で有意に増加していた。

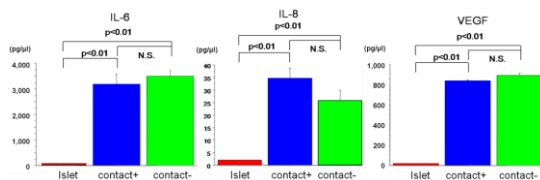
### HLA抗体陽性膵島数



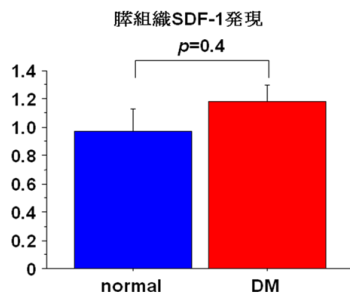
(2) 膵島 recovery 率や viability は膵島単独群に比べ共培養群で有意に良好であったが、細胞接触の有無では差を認めなかった。



また IL-6、IL-8、VEGF といったサイトカイン、インスリンも膵島単独群にくらべ共培養群で有意に高値であり、細胞接触の有無では差を認めなかった。



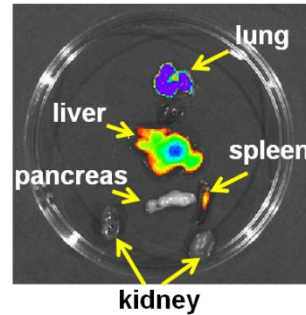
(3) 膵組織の SDF-1 発現は両群で差を認めなかった。



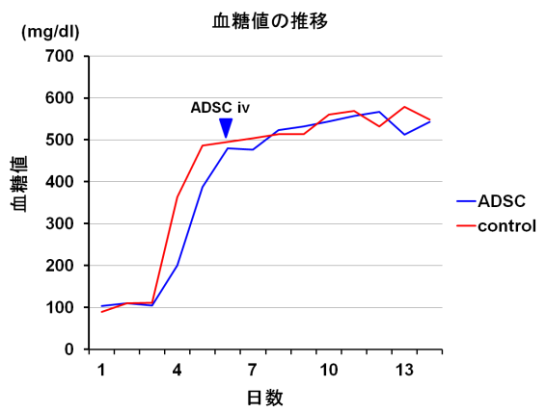
labeling した hADSC を静脈投与した 24 時間後では、hADSC はほとんど肺、肝にトラップ

され、傷害臓への集積は認めなかった。

### i.v.後24時間での各臓器への集積



また hADSC 投与群において血糖の改善は認めなかった。



今後の研究計画としては、糖尿病マウスに ADSC を膵局所に注射することで血糖値は改善するという結果を受け、Xenolight DiR® で labeling した ADSC を局注し血糖を測定するとともに、局注後の細胞運命を調べる。さらに STZ 誘導糖尿病マウスの膵臓では SDF-1 の発現上昇を認めなかったが、DPP-IV 阻害薬が局所の SDF-1 発現を増加させるという報告があり、糖尿マウスに sitagliptin (商品名：ジャヌビア) 5, 10, 50mg/kg を 2 日毎に 3 回経口投与した後、膵組織を採取し PCR にて SDF-1 発現を測定。SDF-1 発現上昇を確認できれば、ADSC を上記の量で尾静脈より投与し、同様に IVIS® を用いて ADSC の体内動態を追跡(24h 後)し、また血糖の評価を経時的に行う予定である。

### 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 2 件)

1. Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J, Iwashashi S, Saito Y, Iwaguro H. Human adipose-derived stem cells: potential clinical

applications in surgery. Surg Today. 2011;  
41(1): 18-23. (査読有り)  
DOI 10.1007/s00595-010-4415-9

2. Utsunomiya T, Shimada M, Imura S,  
Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J,  
Iwahashi S, Saito Y. Future Perspective of  
adipose-derived stem cell. Surg Today 2011;  
in press. (査読有り)  
未掲載のため DOI コード無し

[学会発表] (計 5 件)

1. 山田眞一郎, 島田光生, 宇都宮徹,  
森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 他 4 名 7 番目.  
ヒト脂肪由来幹細胞(ADRCs)の傷害膵島保  
護作用に関する検討.  
第 47 回 日本移植学会総会.  
仙台国際センター (仙台市)  
平成 23 年 10 月 4 日-6 日
2. Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T,  
Imura S, Morine Y, Ikemoto T, 他 6 名 7 番目.  
Cytoprotective effect of human adipose  
tissue  
derived stem cell on porcine islet cells.  
12<sup>th</sup> Congress of the Asian Society of  
Transplantation (CAST2011).  
COEX INTEARNATINAL CONVENTION  
CENTER (ソウル)  
2011 年 9 月 25 日-28 日
3. Asanoma M, Shimada M, Utsunomiya T,  
Imura S, Morine Y, Ikemoto T, 他 6 名 7 番目.  
Cytoprotective effect of human adipose tissue  
derived regenerative cell on porcine islet cells.  
European Society for Organ Transplantation  
(ESOT2011).  
Scottish Exhibition & Conference Center  
(グラスゴー)  
2011 年 9 月 4 日-7 日
4. 山田眞一郎, 島田光生, 宇都宮徹,  
森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 他 5 名 7 番目.  
脂肪由来幹細胞 (ADRCs) は液性因子による  
障害膵島保護作用を有する.  
第 95 回 日本消化器病学会四国支部例会.  
かがわ国際会議場 (高松市)  
平成 23 年 6 月 25 日-26 日
5. 山田眞一郎, 島田光生, 宇都宮徹,  
森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 他 5 名 7 番目.  
脂肪由来幹細胞(ADRCs)の傷害膵島保護作  
用に関する検討.  
第 111 回 日本外科学会定期学術集会  
震災のため紙面発表  
2011 年 5 月 26 日-5 月 28 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
森 大樹 (MORI HIROKI)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号 : 70448330

(2) 研究分担者  
( )  
研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )  
研究者番号 :