

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19557

研究課題名（和文）羊膜由来細胞の拒絶回避機構を利用した移植キャリアの開発

研究課題名（英文）Development of new carriers utilizing with transplantation rejection mechanism in amnion membrane derived cells

研究代表者

吉田 淑子（Yoshida, Toshiko）

富山大学・医学部・客員教授

研究者番号：00171421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：重篤な糖尿病の治療方法の一つに膵島移植がある。膵島を肝臓の門脈という血管から点滴投与することで、患者への侵襲が極めて低く、繰り返し移植が可能ことからインスリン療法からの離脱を図れる治療法として注目されている。近年、大変良好な免疫抑制剤が開発されたとはいうものの、同種他家移植であることから、拒絶反応を完全に否定することができない。羊膜由来細胞や絨毛膜由来細胞がもつ免疫寛容能（拒絶を起こさない性質）や抗炎症効果に着目し、メチルセルロース溶液に細胞を浮遊させた細胞懸濁液を利用して膵島を被覆した。拒絶を起こしがたい膵島片の作成により、移植効率の向上が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵島の生着率の向上。膵島移植が同種他家移植であるため、拒絶反応を完全に回避することは難しい。免疫抑制剤による全身性の抑制ではなく、局所において拒絶を誘導する要因を減弱させ、拒絶を回避する事は膵島の生着率を向上するだけでなくレシピエントのQOLをも著しく向上させる。

本方法が確立されれば、脳死あるいは心臓死からのドナーからだけでなく、将来的には3Dで培養することが可能となった「オルガノイド」を作成して、組織よりも臓器に近い構造体での移植を実施する事が可能となる。移植材料の不足を補填するだけでなく組織・臓器移植の技術革新となると考える。

研究成果の概要（英文）：Islet transplantation is one of the treatment options for severe diabetes. Islet transplantation is a very low invasive procedure that can be performed by intravenous administration of islets through a blood vessel called the portal vein of the liver. Although very good immunosuppressive agents have been developed in recent years, rejection cannot be completely ruled out because of the same species but a transplant from another person.

Focusing on the immunotolerance capacity (property of not causing rejection) and anti-inflammatory effect of amnion-derived and chorion-derived cells, we have coated islets using cell suspensions in which cells are suspended in methylcellulose solution. The objective was to create islet fragments that are resistant to rejection with the aim of improving transplantation efficiency.

研究分野：再生医療

キーワード：膵島 羊膜由来細胞 絨毛膜由来細胞 ヒト乾燥羊膜 免疫寛容 メチルセルロース スフェロイド形成 RNA seq解析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) **背景**：高齢化が進む日本では糖尿病に対する治療方法の改善は必須の課題である。特に、膵臓移植や膵島移植が不可欠な重篤な糖尿病の治療は、ドナーの確保が難しく、かつ移植後の拒絶が大きな問題である。2020年4月に1型糖尿病の患者さんを対象とした画期的な治療法として脳死もしくは心停止ドナーから提供していただいた膵臓から採取した膵島移植が保険収載された。臓器の移植と比較し、点滴投与で移植が可能なためにレシピエントへの侵襲が極めて低く、繰り返し移植が可能である。これにより、インスリン療法からの離脱をはかれる新たな治療法として着目されている。近年、大変良好な免疫抑制剤が開発されたものの、他の人からの組織移植であるため、拒絶を回避する為に長期にわたり免疫抑制剤の投与が必要である。

羊膜は胎児を育むという本来の機能から、拒絶を起こしがたく、抗炎症効果を持つと考えられている (Silini AR et al., 2015)。また、発生学的に見ると羊膜はES細胞の元である内細胞塊の胚盤葉上層から起こることから、多くの幹細胞を含有していると考えられる (Koike N., et al., 2022)。これらの事から、我々は羊膜由来細胞を新たな再生医療材料として研究、開発してきた。羊膜に存在する羊膜由来細胞の採取方法はすでに確立した (図A: Wei et al., 2003)。また羊膜の抗炎症作用の機序については、NK細胞や単球を介し抗炎症効果を示すことを明らかにした (Li et al., 2015)。

(2) **経緯**：羊膜由来細胞に抗炎症効果、多分化能があることから、軟骨損傷、骨欠損ラット、肝硬変、糖尿病、脊髄損傷モデルマウスやラットを用いて、治療に対する有効性を検討したところ、肝硬変では、線維化が減少すること、糖尿病では血糖値を下げることに、脊髄損傷モデルでは運動能が回復する事を明らかにしてきた。マウスやラットなど異種動物にヒトの羊膜由来細胞を移植しているにもかかわらず、いずれの実験モデルにおいても、拒絶を全く起こさなかった。この性質を拒絶回避、膵島の生着率向上に寄与できないかと考えるに至った。

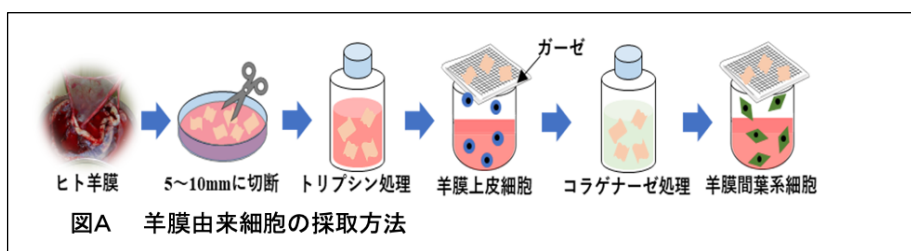
## 2. 研究の目的

日本では現在予備軍も合わせると約 2,000 万人の方々の方が糖尿病であると言われ、しかも日本だけでなく、世界的に見ても年々、患者数が増加する傾向にある。その中で、生活習慣が関わる2型糖尿病とは原因、治療が大きく異なる1型糖尿病は糖尿病全体の約5%に過ぎないが、若い方を中心に幅広い年齢で発症する疾患である。また、1型糖尿病では、インスリンを産生するB細胞の破壊が進行していくために生涯にわたり、インスリンを補う治療が必須である。その治療の一つに膵島移植があり、初回移植後、時間の経過とともに生着率が減少し、一旦インスリン離脱しても再度インスリン投与が必須となる例も稀ではない。近年、免疫抑制剤の開発により、インスリン離脱期間の延長が報告されているものの完全とはいえない。

本研究では、羊膜の免疫寛容能 (拒絶を起こさないという性質) に着目し、**本細胞を移植細胞の移植効率を上げるツールとして利用する方法を確立する事**を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) **羊膜細胞の採取**：富山大学倫理審査委員会の承認 (承認済み) のもと、附属病院および関連病院の協力を得て、インフォームドコンセントが得られた予定帝王切開の患者の胎盤から羊膜を剥離する。羊膜をPBSで洗浄し血液などをきれいに取った後で下記の図Aのように羊膜上皮細胞および羊膜間葉系細胞を採取する。



(2) **採取した羊膜由来細胞の特性**：羊膜由来細胞は HLA-DR(-), HLA-G(++), CD59(+)であることから、拒絶を起こしがたい細胞である。また、NK細胞と羊膜由来細胞を共培養すると羊膜由来細胞からのIL-10分泌が促進され、かつNK細胞の殺細胞能が抑制される。また、単球と共培養すると単球から

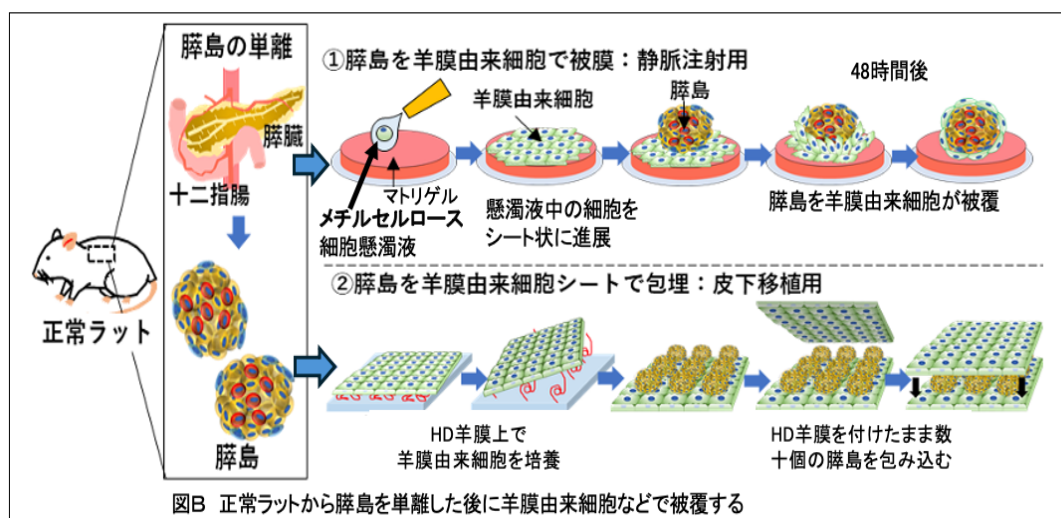
の TNF- $\alpha$  の分泌が抑制される。以上のように羊膜由来細胞は拒絶を起こしがたく、抗炎症効果を示す細胞である(Li et al., 2015)。

(3)拒絶を起こしにくい膵島片の作成: 正常ラットの膵臓より膵島を岡部ら(Okabe et al., 2003)の方に従い単離し、下記の様に2つの方法で膵島細胞を羊膜由来細胞で包み込み、拒絶を起こしがたい膵島片の作成を施行した。

①膵島を羊膜由来細胞で包み込む: マトリゲル上にメチルセルロース懸濁液中の羊膜由来細胞をシート状に進展した。その上に膵島をおき、48時間、培養液中で培養した。これにより、羊膜由来細胞が膵島をつつみこむ(図B ①)。

本実験に先立ち、ヒト線維芽細胞(HDFa)でスフェロイドを作成し、不死化羊膜由来上皮細胞(ihAE)により、HDFaを包み込むことが可能かどうか検討した。

②膵島を羊膜由来細胞で挟む: HD羊膜上で羊膜由来細胞をシート状に培養しその上に膵島を置き、他のデッシュで準備したHD羊膜シートを上にかぶせ、膵島を挟み込む(図B ②)。



図B 正常ラットから膵島を単離した後に羊膜由来細胞などで被覆する

(4) 播種する羊膜由来細胞および絨毛膜由来細胞の性質について、RNA seq で検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 羊膜由来細胞などで被覆した膵島片の作成を目指した。初期検討としてヒト皮膚線維芽細胞凝集塊(HDFaスフェロイド)を、羊膜由来上皮細胞(HAE)あるいは羊膜由来間葉系細胞(HAM)で被覆した膵島片を作成した。HDFaスフェロイドの径、被覆する細胞の種類、被覆する細胞数(細胞濃度)、細胞懸濁液の濃度(メチルセルロースの濃度)を検討することで移植に適した膵島片の作成を試みた。

①ラットの膵島の大きさが200–500  $\mu$ m程度であることから、試行に用いる細胞塊をHDFaで作成することとして、径200  $\mu$ mのスフェロイドを作成した。細胞数1250cells程度で良好なスフェロイドが作成できた。

②被覆する細胞として、不死化羊膜上皮細胞(iHAE)と不死化羊膜間葉系細胞(iHAM)のいずれが被覆に適した細胞か検討したところ、iHAMは懸濁液中で自身が独自にスフェロイドを形成してしまう傾向が強いため、iHAEを被覆用の細胞として利用することとした。

その結果、細胞濃度、2500cells/ml、細胞懸濁液1  $\mu$ lが良好であった。本条件下では、細胞は単層でスフェロイドを取り巻くが、細胞懸濁液に浮遊させる細胞数が多くなると、被覆する細胞が重層化および不均等となることが明らかとなった(図C)

③ラット膵島を包む細胞の種類、細胞懸濁液の濃度について検討した。

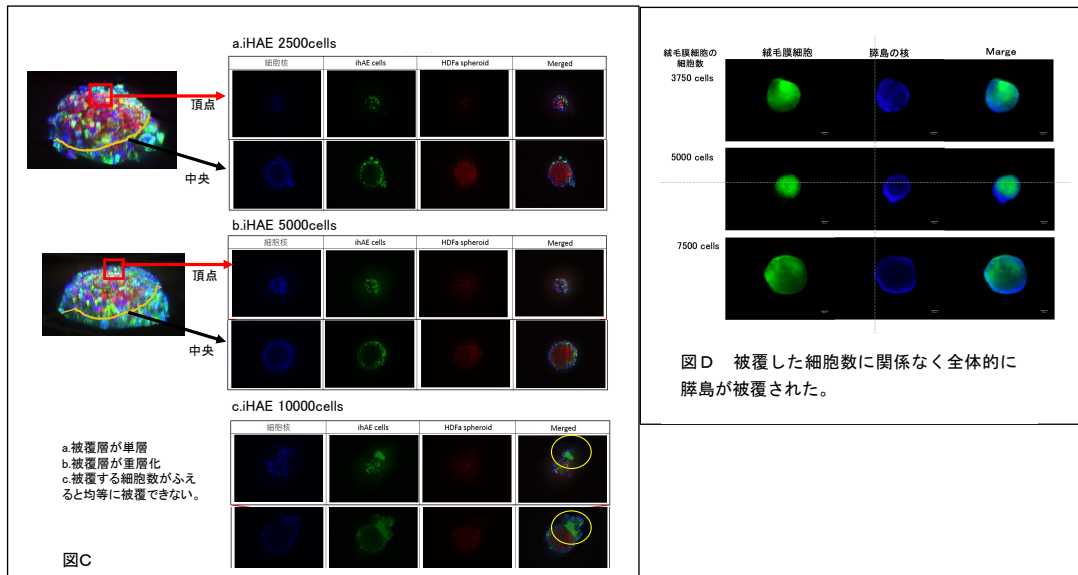
ラットから膵島を岡部らの手技に従って採取した。径200  $\mu$ mの膵島を選択し、細胞懸濁液にて被覆した。被覆する細胞は絨毛膜由来細胞を利用した。被覆細胞数、および懸濁液量を3750 cells $\cdot$ 3  $\mu$ l、5000 cells $\cdot$ 3  $\mu$ l、7500 cells $\cdot$ 3  $\mu$ lとして細胞被覆膵島を作成した。

その結果、絨毛膜由来細胞は細胞数に関係なく概ね均等に膵島を覆った(図D)。

(2) 移植用のシートについて

予定では、温度感受性のデッシュ上で羊膜細胞をシート状に播種し、その上に膵島を置き、サンドイッチ状として皮下組織に移植する予定であったが、単層に培養した細胞では、細胞間の連結が弱いために、シートとして取り扱うことが困難であったため、通常デッシュにHD羊膜(ハイパードライヒト乾燥羊膜)を置き、その上で細胞を培養し、シートにした上に膵島を載せることで、皮下移植用のサンドイッチ

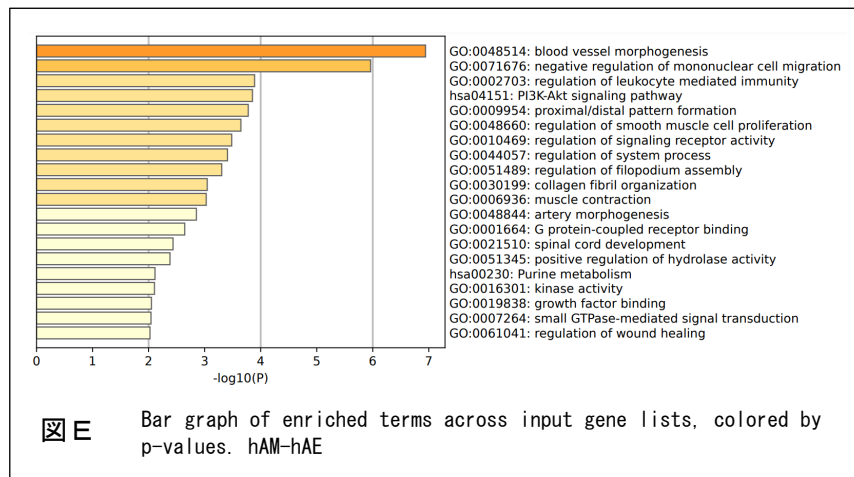
チ状膵島片を作成した。本方法により、膵島の保持、皮下組織への移植が容易となった。



### (3) 羊膜由来細胞に関する検討 (RNA-seq)

上記の実験1)①では、iHAEの細胞の方が膵島を被覆する細胞として適していることがあきらかとなったが、iHAEは不死化細胞であることから、ヒトへの移植に向け、膵島を被覆する細胞として羊膜由来上皮系細胞 (Human amniotic epithelium: HAE)、羊膜由来間葉系細胞 (Human amniotic mesenchymal cell: HAM) および絨毛膜由来間葉系細胞 (Chorion Derived Mesenchymal Cell: CMDC) について改めて、移植時の生着率向上に関係すると思われる抗炎症作用および血管新生作用などに関与する遺伝子の発現についてRNA seq解析(タカラバイオ株式会社)を実施した。

その結果、HAEが生着に不可欠な血管新生に関する遺伝子の発現が強いことが明らかとなった。さらに詳細については現在、解析を進めている。今後、それぞれの遺伝子発現の関連性をあきらかにすることで、HAEが移植膵島の被覆材として有効であることを明らかにするだけでなく、これらの細胞の拒絶を抑制する機能についても詳細について解明を進める。



### 〈引用文献〉

- ① Silini AR et al., The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol* 3: 162; 2015
- ② Koike N et al., Distribution of amniotic stem cells in human term amnion membrane. *Microscopy* 71(1):66-76; 2022
- ③ Wei JP et al., Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant.* 12:545-552; 2003
- ④ Li J et al., Human Amnion-Derived Stem Cells Have Immunosuppressive Properties on NK Cells and Monocytes. *Cell Transplantation* 24:2065-2076; 2015
- ⑤ Okabe M, Yoshida T, Yoshi R and Takaya K. Zinc detection in the Islet of Langerhans. *Appl Surf Sci.* 203-204:714-717; 2003

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Amano K, Okabe M, Yoshida T, Oba J, Yoshida S, Wakasugi M, Usui A, Nakata Y, Okudera H.	4. 巻 283
2. 論文標題 Hyperdry Human Amniotic Membrane as a Protective Dressing for Open Wounds with Exposed Bowel in Mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Surg Res	6. 最初と最後の頁 898-913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2022.09.028. Epub 2022 Dec 8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kenichi Arai, Motonori Okabe, Daisuke Kobashi, Kenji Ichimura, Moustafa Fathy, Jiro Oba, Etsuko Furuichi, Satoshi Yoshida, Toshiko Yoshida	4. 巻 44(1)
2. 論文標題 Importance of Housekeeping Gene Optimization for the Analysis of mRNA Expression During Wound Healing in a Third-Degree Burn Injury Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Burn Care Res	6. 最初と最後の頁 146-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jbcr/irac161.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荒井 健一  (Arai Kenichi)  (40752960)	秋田県立大学・生物資源科学部・助教    (13201)	
研究分担者	岡部 素典  (Okabe Motonori)  (60283066)	富山大学・学術研究部医学系・助教    (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小島 伸彦  (Kojima Nobuhiko)  (90342956)	横浜市立大学・理学部・准教授     (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関