

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23618012

研究課題名(和文) 組織工学的膵島再生 - 膵島単離移植後の遺残膵外分泌細胞を用いた膵島誘導法 -

研究課題名(英文) Regeneration of islets used tissue engineering

研究代表者

小玉 正太 (KODAMA, Shohta)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：90549338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン産生細胞に標識された遺伝子改変型マウスより、膵島を単離した。更に膵島細胞を single cell 化した後、生体マテリアルを用いてインスリン産生細胞を組織工学的膵島細胞として再生した。膵島細胞再編率は以前の30%に対し68%と改善するも、初期値膵島の100%を超えなかった。しかし、単位膵島DNA当たりのインスリン含有量(タンパク量)は約2倍量存在していた。

つぎに糖尿病マウスに、通常血糖正常化する膵島数の半数で、組織工学的膵島細胞を移植し改善効果を観察したところ、正常血糖化する下限膵島数200個より少ない100個で正常化する事が、マウスを用いた移植実験により明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Tissue engineered(TE) islets were reconstructed from dissociated islet cells originated from transgenic mice that expressed green fluorescence protein in mouse insulin promoter area. Although the reconstructive ratio of islets number was improved from 30% to 68%, it was not exceeded as primary number of native islets from one mouse. However, it was surprised that the content of insulin protein per DNA ratio was increased two fold up in TE islets.

Continuously, diabetic mice were transplanted TE islets under kidney capsule. TE islets ameliorated blood glucose levels using half number of islet cells to compare with native islets.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：再生医学・医療

キーワード：組織工学的膵島 膵島再生 組織工学 再生医学・再生医療 膵島移植 血管再生 生体材料 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究の包括する領域は広く、基礎研究結果のもたらす貢献は計り知れない。しかし、iPS 細胞の癌化や ES 細胞の倫理問題など、未だ解決しない難題は多い。しかも我々が以前成功した、幹細胞を誘導する膵島再生のアプローチでは、マウスの系で血糖を正常化する機能的膵島再生に 180 日間という長期を要している。

幹細胞から膵島細胞への分化誘導に、関連遺伝子の導入を念頭において研究を進めているが、癌化を示唆する point mutation や標的細胞への誘導効率など、新たな問題も生じて、研究成果は未だ臨床応用には程遠いのが現状である。

2. 研究の目的

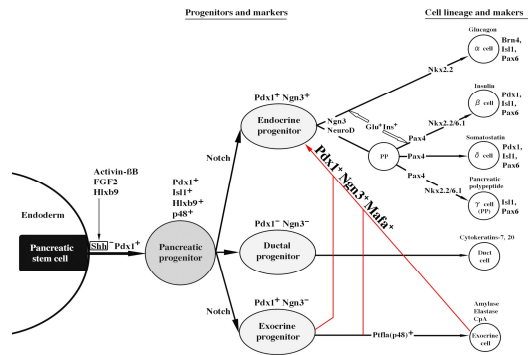
慢性的でかつ閉塞的なドナー不足の為、少ない臨床移植症例を確実にサポート出来る、新たな医療技術の完備が急務となっている。その有力な候補として、幹細胞移植や組織工学的なアプローチを含む再生医療が挙げられる。我々は近年機能的膵島を再生するプロトコルを樹立した。今回更に細胞収量の改良を目指した新たなプロトコルと、同一ドナーの遺残外分泌細胞を用いて、遺伝子導入法に組織工学的手法を加え、機能的膵島を再生するプロトコルを確立する。同一ドナーの外分泌細胞から誘導された、膵島細胞の移植が、レシピエントに引き続き可能となれば、今後有力な膵島細胞供給源と成り得る。

(Aim #1) 組織工学的な手法を用い、培養法や機能膵島の再生のアプローチを開始している。polyglycolic acid (PGA) の生体マテリアルと、温度感応性ゲルである thermoreversible gelatin polymer (TGP) で三次元培養を行い、無血清培地で膵島細胞から単細胞化した細胞を用いて、機能的膵島を再編するプロトコルを作成する事に成功した。未だ最終培養細胞数が初期単離細胞数を

超えていないため、以前注目した Serpine1 のリコンビナント蛋白を加え増殖した膵島由来細胞の培養を今回行う。再編率の低い場合、更に生体内吸収性マテリアルである格子状配向性コラゲーンゲルで 5 日間培養後、温度感応性ゲルで三次元培養を行い機能的膵島の再生を試みる。

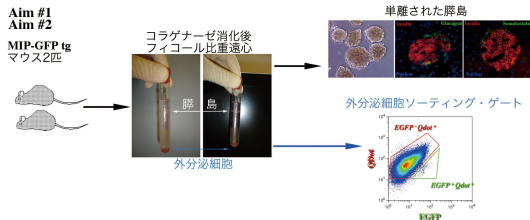
(Aim #2)

更に外分泌系細胞から膵島へ分化誘導可能であった、Pdx1 Ngn3 Mafa らの転写遺伝子(Melton D, et.al, Nature 455: 627-33, 2008)を、膵島単離後の遺残外分泌細胞に遺伝子導入後、Aim#1 同様に培養しインスリン産生細胞の創出を in vivo、in vitro で確認する。

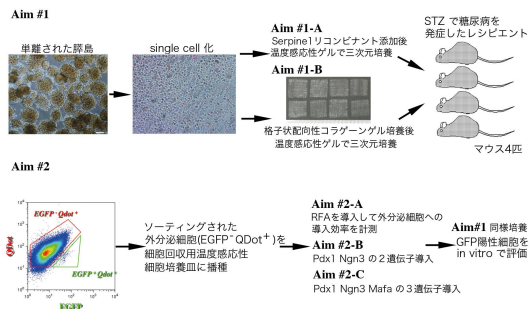


3. 研究の方法

インスリン産生細胞が Green Fluorescent Protein(GFP)で標識された、MIP-GFP Transgenic(Tg)マウスから膵島を単離する。膵島細胞と外分泌細胞を比重遠心で選別後、膵島細胞は single cell 化する。細胞回収用温度感応性細胞培養皿で継代培養を行い細胞数を増した後、引き続き Serpine1 のリコンビナント蛋白を加え増殖した膵島由来細胞を培養する。更に温度感応性ゲルで三次元培養を行い機能的膵島を再生する (Aim#1)。GFP 陽性の Beta 細胞以外の外分泌細胞は Cell Sorter で GFP 陰性細胞として回収後、リポフェクション法で Pdx1 Ngn3 Mafa らの転写遺伝子を導入し、組織工学的手法で Aim#1 同様の機能的膵島を再生する(Aim#2)。



Aim #1、Aim #2 とともに2匹の MIP-GFP Tg より、膵島および外分泌細胞をコラゲナーゼ消化後、フィコール比重遠心法により選別する。外分泌細胞はさらにセル・ソーティングで EGFP-QDot<sup>+</sup> 細胞として回収される。



#### 4. 研究成果

MIP-GFP Tg マウスから膵島を単離し、膵島細胞を single cell 化した細胞は、以前報告を行った膵島細胞再編率 30% に対し 68% と改善するも、残念ながら初期値膵島の 100% を超える事はなかった。しかし、驚くべき事に単位膵島 DNA 当たりのインスリン含有量(タンパク量)は約 2 倍量存在していた。つぎに糖尿病マウスに、通常血糖正常化する膵島数の半数で、再編された膵島を移植し、改善効果を観察したところ正常血糖化する下限膵島数量 200 個より少ない 100 個で正常化する事が、in vivo の実験により明らかとなった(Aim#1-A)。さらに新たに膵島細胞再編用の開発した生体内吸収性マテリアルで再編効果を調べたが、残念ながら現在初期値を超える結果を導けなかった(Aim#1-B)。つぎに膵外分泌細胞から内分泌細胞を誘導する系では、MIP-GFP Tg マウスから EGFP negative sort された細胞に Pdx1 Ngn3 Mafa の 3 遺伝子をリポフェクシ

ン法で遺伝子導入するも、導入されて後 EGFP を発現する細胞は 1% 未満となり、内分泌細胞を誘導する系として今後有効な臨床的な展開を期待する結果とならなかった(Aim#2-A,B,C)。

これらの結果をふまえ正常血糖化する下限膵島数量の閾値を下げるべく、以前報告した膵島再生を促す、脾臓に由来した遺伝子調節機構に注目し移植部位を腎被膜下から脾内移植へ変更したところ、1/4 の移植膵島個数で生着し、糖尿病マウスの血糖が正常化する事が明らかとなった。その為、現在これらグラフト生着現象の機能解析を継続中である。少ない移植膵島量で血糖正常化させる移植部位の発見は、臨床膵島移植においても意義が大きいため、Aim#1-C としてこの成果を追加した。

#### 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 8 件)

Khalili S., Faustman DL, Liu Y., Sumita Y., Blank D., Peterson A., \*Kodama S., \*Tran SD. (\*Equal Corresponding Authors)

Treating salivary gland hypofunction at both initial and advanced stages of Sjögren's like disease: a comparative study of bone marrow-versus spleen-cell therapy with a one-year monitoring period

*Cytotherapy* 査読有り (2014, 16: 412-23)

Mera T., Itoh T., Kita S., Kodama S. Kojima D., Nishinakamura H., Okamoto K., Ohkura M., Nakai J., Iyoda T., Iwamoto T., Matsuda T., Baba A., Omori K., Mullen Y., Ono L., Watari H., Taniguchi M., Yasunami T.

Pretreatment of donor islets with the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation

*Am J Transplant* 査読有り (2013, 13(8): 2154-60)

Kuwahara G., Nishinakamura H., Kojima D., Tashiro T., \*Kodama S. (\*Corresponding Author)

Vascular endothelial growth factor-C derived from CD11b<sup>+</sup> cells induces therapeutic improvements in a murine model of hind limb ischemia

*J Vasc Surg* 査読有り (2013, 57(4):1090-9)

Khalili S., Liu Y., Kornete M, Roescher N., Kodama S., Peterson A., Piccirillo CA., Tran SD.

Mesenchymal Stromal Cells Improve Salivary Function and Reduce Lymphocytic Infiltrates in Mice with Sjögren's-Like Disease

*PLoS ONE* 査読有り (2012, 7(6):e38615)

Kojima D., Mera T., Nishinakamura H., Itoh T., Ogata T., Matsuoka N., Kodama S., Yasunami Y.

Prevention of High-Mobility Group Box 1-Mediated Early Loss of Transplanted Mouse Islets in the Liver by Antithrombin III *Transplantation* 査読有り (2012, 93(10); 983-8)

Isoe Y., Kosaka T., Kuwahara G., Mikami H., Saku T., \*Kodama S. (\*Corresponding Author)

Oriented Collagen Scaffolds for Tissue Engineering

*Materials* 査読有り (2012, 5(3); 501-11)

Mikami H., Kuwahara G., Nakamura N., Yamato M., Tanaka M., \*Kodama S. (\*Corresponding Author)

Two-Layered Tissue-Engineered Urethra Using Oral Epithelial and Muscle-Derived Cells *J Urology* 査読有り (2012, 187(5):1882-9)

米良利之、小玉正太、安波洋一

移植早期膵島障害機序の解明と新規制御法開発

膵臓 査読なし (2011, 26: 183-9)

〔学会発表〕(計 8 件)

田中 智子、伊東 威、松本 征仁、小島 大望、米良 利之、西中村 瞳、小玉正太、小野 順子、柳瀬 敏彦、安波 洋一

脂肪組織由来間葉系幹細胞による移植膵島生着率改善と膵島量増加効果 第41回日本膵・膵島移植研究会 2014年03月08日(名古屋)

内藤 玲子、西中村 瞳、渡辺 俊明、中山 樹一郎、小玉 正太

糖尿病モデルマウスにおけるフリーラディカルスカベンジャー、エダラボンの創傷治癒促進効果 第13回日本再生医療学会総会

2014年03月05日(京都)

西中村 瞳、桑原 豪、小島 大望、田代 忠、小玉 正太

M-CSF・GM-CSF 培養 CD11b 陽性細胞投与によるマウス虚血肢モデルを用いた血流改善効果の検討 第13回日本再生医療学会総会

2014年03月05日(京都)

伊東 威、米良 利之、喜多 紗斗美、小島 大望、西中村 瞳、岩本 隆宏、小玉 正太、安波 洋一

単離ドナー膵島のNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体を標的とした移植前治療による肝内移植早期膵島障害の制御 第49回日本移植学会総会

2013年09月06日(京都)

小玉 正太

細胞移植治療の展望 -膵島再生・血管再生プロジェクトを中心に- 第6回糖尿病・血管代謝再生研究会(招待講演)

2013年07月12日(金沢)

小玉 正太

細胞移植治療 第36回烏帽子会北九州支部記念学術講演(招待講演)

2013年06月29日(小倉)

小島大望、米良利之、西中村瞳、伊東威、松岡信秀、小玉 正太、安波洋一  
トロンボモデュリンによる移植早期膵島障害の抑制 第39回日本膵・膵島移植研究会  
2012年3月10日(旭川)

Mikami H., Kuwahara G., Nakamura N., Yamato M., Tanaka M., \*Kodama S.  
Two-layered tissue-engineered urethra using oral epithelial and muscle-derived cells. *Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society(TERMIS)* June 07, 2011 (Granada, Spain)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：抗アポトーシス又は抗ネクロシス誘導方法

発明者：小玉 正太

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-553616(2013 年移行)  
(PCT 国際出願)・PCT/JP2012/000252

出願年月日：2013 年移行

国内外の別：国外

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

小玉 正太 (KODAMA, Shohta)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：9 0 5 4 9 3 3 8

(2)研究分担者

西中村 瞳 (NISHINAKAMURA, Hitomi)

福岡大学・膵島研究所・ポスドクター

研究者番号：9 0 5 9 7 6 9 2

(3)連携研究者

( )

研究者番号：