

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461944

研究課題名(和文) 次世代膵島移植を目指した幹細胞ニッチのカプセル化による膵島再生の研究

研究課題名(英文) The study of islet regeneration in the encapsulated pancreatic stem cell niche for development of the next-generation islet transplantation to cure diabetes.

研究代表者

岩永 康裕 (Iwanaga, Yasuhiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：80378661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：再生膵島によるドナー不足問題の解決と同時にマイクロカプセルによる免疫隔離で移植成績の向上も期待できる次世代の膵島移植の開発を試みた。

まず、マウス膵で膵幹細胞ニッチ組織全体をマイクロカプセル化する組織加工条件を確立した。マイクロカプセル内に分化誘導後の内胚葉系細胞群をスフェロイドの形で選択培養でき、そこでは再生におけるケモカイン受容体CXCR4陽性細胞を認めた。最終的に、マイクロカプセル化ニッチ組織から比較的純度の高い膵前駆体を培養する方法を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：We have shown that the ex vivo cultures of both duct and stellate cells proliferate together, and upon differentiation as a tissue complex with vascular endothelial cells, they generate spherical tissues containing pancreatic endocrine cells with a potential to cure diabetes. In this study, we tried that we would develop the next-generation islet transplantation that would solve the current problems of donor tissue shortage and immune rejections for the treatment of Type-1 diabetes. First of all, we established the microencapsulation method of the endothelial, epithelial and pancreatic progenitor cells. We could culture these endoderm cells as forms of spheroid in the capsules, and found C-X-C chemokine receptor-4 positive cells there. We established the regenerative method to expand higher purity of pancreatic progenitor cells from the encapsulated pancreatic stem cell niche.

研究分野：移植外科学

キーワード：膵島移植 膵幹細胞 マイクロカプセル化 膵島再生

1. 研究開始当初の背景

移植医療においてドナー不足は世界的に深刻な問題である。一人の患者に複数のドナーを必要とする膵島移植では特に重大な問題である。これを解決するため、私達は膵島分離後の廃棄組織から膵幹細胞を分離培養して、高いインスリン分泌機能を持つ再生膵島の増殖培養法を発明した。つまり、成体膵組織から分離した上皮細胞の培養法を用いて膵島の再生環境を作り、インスリン及びグルカゴン産生細胞の新しい増殖法を確立した (PCT/JP2011/001519)。特徴として、同じ臓器 (膵臓) 由来の間質細胞を培養系に取り入れ、膵幹細胞の増殖率を格段に増加させることができた。膵発生段階における幹細胞の維持を助ける微小環境 (幹細胞ニッチ) の存在が知られているが、特に内胚様由来の上皮組織である膵島への分化では、これに隣接する間質組織が幹細胞ニッチを形成し、細胞間作用が重要と考えられてきている。そこで我々は、「中心腺房細胞が幹細胞であり、これを取り囲む間質細胞と共に幹細胞ニッチを構成している」という仮説を提唱する。成体膵幹細胞の存在如何は、過去 20 年来議論的になってきたが、最近その実体が解明されてきた (Xu 2008 Cell 132:197)。その代表例が、中心腺房細胞という外分泌腺を形成する腺房細胞に取り囲まれている小さな細胞である。これは膵障害動物モデルにおいて幹細胞の働きをして、*in vitro* でもインスリン及びグルカゴン産生細胞へと分化することが報告されている (Rovira 2010, PNAS107:75)。そこには間質細胞が分泌する CXCL12、TNF、及び BMP 等液性因子の関与が指摘されてきた。

2. 研究の目的

申請者らが現在まで培ってきたヒト、ブタ、及びマウスの膵島分離技術を用いると、この中心腺房細胞を含む組織塊を、その中の幹細胞ニッチを破壊することなく、そのまま回収することができる。そこで本研究では、この組織塊をマイクロカプセル化し、膵障害・再生モデルにおいて、膵幹細胞の分化における上記液性因子の作用機序を解明する。そして、得られたデータを用いて間質細胞が形成する幹細胞ニッチをマイクロカプセル内で再現し、膵島を再生させるための研究を行う。

3. 研究の方法

申請者らは既にマウス膵幹細胞の増殖と膵内分泌細胞への分化促進を実現した。本研究ではこの培養法を基礎に、我々が培ってきたところの極めて完成度の高い膵島分離技術とマイクロカプセル化を融合することにより、以下の3点を解明する。そして、マイクロカプセル化ヒト再生膵島の分化培養法の確立を最終目的とする。

(1)膵幹細胞ニッチ組織のマイクロカプセル化と移植・摘出条件の解明

膵幹細胞である中心腺房細胞がニッチ組織内で生存し、膵島細胞への分化能を維持した状態で、ニッチ組織全体をマイクロカプセル化する組織加工条件を解明する。次に、これをマウス膵皮膜下に移植し、人工的に膵炎を起こし一定期間後に回収する摘出方法を確立する。

(2)マイクロカプセル化ニッチ組織の再生誘導シグナルの解明

移植したマウスに膵障害を与えた後に摘出したマイクロカプセル化ニッチ組織が、どのような膵内分泌組織の再生に関する細胞間シグナル授受を行っているかを解明する。つまり、マイクロカプセルを分化誘導因子の探索プローブとして用いて中心腺房細胞と間質細胞の細胞間シグナルを解析し、このデータを基に、同様の細胞間作用をもたらす薬剤をマイクロカプセル化ニッチ組織に添加し、膵内分泌組織の分化誘導法を確立する。

(3)再生膵島となったマイクロカプセル化ニッチ組織の移植による糖尿病治療法の確立

再生膵島へと誘導したマイクロカプセル化ニッチ組織を糖尿病モデルマウスに移植し、血糖値を安定化させる方法を確立する。次に、その糖尿病治療法を確立できたら、移植されたマイクロカプセル化ニッチ組織が、成体内で継続的に膵島組織を再生することのできる条件の解明にとりかかる。また、ヒト組織においても同様にマイクロカプセル化ニッチ組織を作成し、上記の糖尿病治療モデルで血糖値の安定性を評価する。

4. 研究成果

(1)膵島細胞へと分化する中心腺房細胞を取り囲む組織(ニッチ組織)を、そのままマイクロカプセル化する為の、組織加工条件の確立:

成体膵幹細胞含有していると考えられているマウス膵外分泌・膵管組織を、ドナー・マウスの膵臓をコラゲナーゼPで消化し、比重遠心膵島分離法で採取した。これらは数百~数千個の組織塊(直径 200-300 μm)として得られ、その約 400 個をゼラチンでカプセル化することに成功した。

(2)マイクロカプセル化ニッチ組織をマウスの膵臓に移植し、膵管を縛って膵障害を起してマイクロカプセル内で膵島細胞に再生を促した後、マイクロカプセル化組織を回収する移植・摘出条件を確立する:

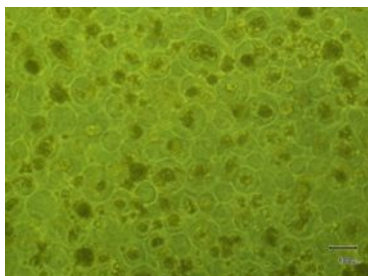
マイクロカプセル化膵島幹細胞 200 個を Nude マウス膵臓の主膵管領域の小葉内に 22G の注射針を用いて移植。膵管を結紮して炎症障害を与えた後、組織の回収を行った。しかしながら、回収検体がかなり少なく、マイクロカプセル化組織を確認できなかった。マイクロカプセル化膵島幹細胞の移植手技は確立できたが、十分な組織を回収できる程の移植・

摘出方法の確立には至らなかった。

(3) マイクロカプセル化ニッチ組織（膵外分泌・膵管組織）の膵島様細胞塊への増殖培養法の開発：

ゼラチンまたはマトリゲル（GF-reduced）でニッチ組織（膵外分泌・膵管組織）をマイクロカプセル化し、Advanced DMEM/F12 培地内で3週間浮遊培養した。その結果、ゼラチンカプセルでは、最初の1 - 2週間はカプセル内組織の増殖が認められ、カプセル内に留まって成長した。しかし、2週を過ぎる頃からカプセル内に留まった組織は萎縮し、一方その他の組織の多くはカプセル外に排出され、お互いに接着し合うことなく膵島様組織を形成した。一方、マトリゲルカプセルでは、マトリゲルと絡まった状態で、3週間分化誘導培地内で、ほぼ一定の組織増殖を認めた（図1）。

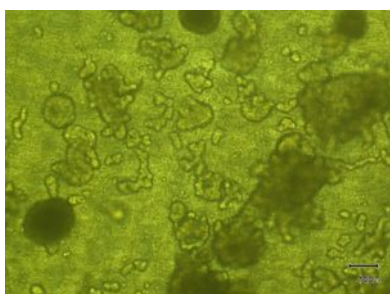
図1



(4) マイクロカプセル化ニッチ組織（膵外分泌・膵管組織）の分化培養：

カプセル化膵島幹細胞を移植して膵炎を起こした後に十分な組織を回収するという移植・摘出方法を確立できなかったため、上記の増殖培養したマトリゲルマイクロカプセル化ニッチ組織に、分化誘導シグナル候補と考えられたアクチビン、BMP4 を外から添加して継続培養するという実験を選択した。すると、2週間後に細胞塊から budding out してきていると考えられるスフェロイドの存在を認めた。つまり、マイクロカプセル内に分化誘導後の内胚葉系細胞群をスフェロイドの形で選択培養できることが示された（図2）。

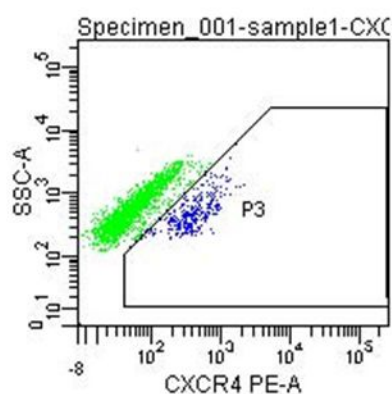
図2



(5) サイトメトリーによる細胞解析：

これらの細胞塊を酵素 Accutase でシングルセル化し、抗 CXCR 抗体で染色し、FACS AriaII で解析したところ、再生におけるケモカイン受容体 CXCR4+ 細胞を約1割認めた（図3）。このことから、培養・分化の方法をさらに最適化することで、より純度の高い膵島様細胞の前駆体を培養できる可能性が示唆された。

図3



(6) 遺伝子解析：

マイクロカプセル化ニッチ組織を分化培養したサンプルからは、*Pdx1*, *Sox9* の発現を認め、一時的な *Ngn3* も検出でき、マイクロカプセル化ニッチ組織から比較的純度の高い膵前駆体を培養する方法を確立した。しかしながら、これらを糖尿病モデルマウスに移植し、血糖値の安定化を得ることはできなかった。

マイクロカプセル化のまま高機能の再生膵島を分化誘導する培養法を確立できたので、今後さらに移植実験系で糖尿病を治すことが出来れば、ドナー不足問題の解決と同時にマイクロカプセルによる免疫隔離で移植成績の向上も期待できる次世代の膵島移植を開発出来ると考えている。

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)

岩永康裕、新しい免疫抑制剤プロトコールでの脳死ドナー膵島移植、DIABETES UPDATE、査読無、4巻、2015、43-44

Jun Kanamune, Chongmun Kim, Yasuhiro Iwanaga, et al. Tissue Complex of Adult Pancreatic Duct and Vascular Endothelial Cells Promotes In Vitro Differentiation into Insulin-Producing Cells. J Stem Cell Res Dev. 査読有、Vol 2(1)、2015

〔学会発表〕(計 11 件)

金宗潤、岩永康裕 他、再生膵島移植の臨床応用を目指した培養ヒト膵管上皮細胞のインスリン産生細胞への可塑性と癌原性の解析、第 49 回日本移植学会、2013 年 9 月 7 日

岩永康裕、膵・膵島移植：Up to Date、第 50 回日本糖尿病学会近畿地方会、招待講演、2013 年 11 月 23 日

岩永康裕 他、脳死下膵島提供 2 例の経験、第 41 回日本膵・膵島移植研究会、2014 年 3 月 7 日

田中友加里、岩永康裕 他、膵島移植臨床試験におけるレシピエントコーディネーターの役割、第 41 回日本膵・膵島移植研究会、2014 年 3 月 7 日

井山なおみ、岩永康裕 他、脳死ドナーからの膵島移植のための臓器提供におけるコーディネーションについての検討、第 41 回日本膵・膵島移植研究会、2014 年 3 月 7 日

豊田健太郎、岩永康裕 他、先進医療として脳死ドナーからの膵島移植を実施した 1 型糖尿病の一例、第 41 回日本膵・膵島移植研究会、2014 年 3 月 8 日

岩永康裕、新しい免疫抑制剤プロトコルでの脳死ドナー膵島移植、第 29 回日本糖尿病合併症学会、2014 年 10 月 4 日

岩永康裕、膵島移植の現況、第 10 回移植治療研究会、招待講演、2014 年 9 月 6 日

Yasuhiro Iwanaga, et al. A case report of a type 1 diabetes patient maintaining C-peptide secretion for ten years after islet transplantation using donation after cardiocirculatory death (DCD) donors. International Pancreas and Islet Transplant Association 2015 Nov, 17

穴澤貴行、岩永康裕 他、膵島移植の課題と克服：臨床試験実施から見えてきたもの、第 43 回日本膵・膵島移植研究会、2016 年 3 月 4 日

中村聡宏、岩永康裕 他、当院で初回膵島移植後 10 年間以上経過をフォローアップし得た 5 例の検討、第 43 回日本膵・膵島移植研究会、2016 年 3 月 5 日

〔図書〕(計 1 件)

岩永康裕、黒田嘉和、丸善、日本移植学会 50 周年記念誌、2014、632

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩永康裕 (IWANAGA, Yasuhiro)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号：80378661

(2) 研究分担者

岩田 博夫 (IWATA, Hiroo)
京都大学・再生医科学研究所・名誉教授
研究者番号：30160120

(3) 連携研究者

川口 義弥 (KAWAGUCHI, Yoshiya)
京都大学・iPS 細胞研究所・教授
研究者番号：60359792