

平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

ふりがな		すみ しょういちろう					
研究代表者氏名		角 昭一郎				所属研究機関・部局・職 京都大学・再生医科学研究所・助教授	
研究課題名	和文	ステムセルバイオロジーによる膵島再生治療の開発					
	英文	Development of islet regeneration therapy by stem cell biology					
研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計	
	19,700	15,200	19,000	0	0	53,900	
研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職		現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
角 昭一郎	京都大学・再生医科学研究所・助教授		外科学・再生医療	H15 年度研究代表者・H14 年度研究分担者、再生膵島治療法開発・臨床応用			
井上 一知	京都大学・再生医科学研究所・教授（H15 年 5 月以後係争中）		外科学・再生医療	H13・14 年度研究代表者、再生膵島治療法開発・臨床応用			
宮崎 純一	大阪大学・医学系研究科・教授		発生工学・糖尿病学	研究分担者、膵島幹細胞の分離・同定			
田畑 泰彦	京都大学・再生医科学研究所・教授		生体材料学	研究分担者、バイオ人工膵開発			
中辻 憲夫	京都大学・再生医科学研究所・教授（所長）		発生生物学	H13・14 年度研究分担者、ES 細胞からの膵島細胞分化誘導			
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>1. 幹細胞の分化誘導による移植用膵島およびインスリン産生細胞の開発。生体組織内由来膵幹細胞の同定・分離、インスリン産生細胞もしくは膵島への分化誘導をはかり、並行して、ES 細胞（マウス・ヒト）からのインスリン産生細胞誘導に関する検討を行う。</p> <p>2. 皮下移植型バイオ人工膵デバイスの作製および改良を行う。</p> <p>3. 皮下移植前処置としての血管新生誘導デバイスの作製および改良を行う。</p> <p>4. 前臨床段階糖尿病モデルにおける皮下移植型バイオ人工膵の移植システムの確立。糖尿病モデル動物への移植システム確立。特に、ヒトへの移植を前提とした大動物モデルによる検討を中心に移植システムの有効性の評価を行う。以上の検討から、本研究における膵島再生治療法の有効性が確認された後、ヒトへの移植治療応用準備へ移行する予定である。</p>							

研究成果の概要（研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。）

当初の研究目的に準じて、項目ごとに成果の概要を記載した。

1. 幹細胞の膵島様細胞への分化誘導

マウス胎性幹細胞（ES 細胞）の分化誘導を試み、独自の方法で、従来報告されていない優れた機能を有する膵島様細胞塊（ICC, islet-like cell cluster）を作製し、電子顕微鏡を用いてインスリン分泌顆粒を確認した。また、その過程における膵特異的遺伝子発現を確認するとともに、マウス糖尿病モデルに移植して2週間程度の血糖低下を観察し、一定の血糖調節機能を有することを確認した。さらに、その分化過程をより詳細に検討する目的で、分化の各段階におけるマイクロアレイ解析により各遺伝子発現の変化を網羅的に解析する実験を推進した。

これとは別に、本来は際限なく分裂・増殖するインスリノーマ細胞である MIN6 細胞を、培養条件の操作により、増殖能が弱くブドウ糖濃度に応じたインスリン分泌反応を示す細胞塊に変化させ、これをバイオ人工膵に加工することで、少なくとも一ヶ月間 *in vitro* で良好な形態と機能を維持させることに成功した。また、体性幹細胞からの膵島細胞分化誘導では、臨床的にも比較的に使いやすい骨髄中の細胞が *in vivo* で膵組織へ組み込まれる可能性、および、*in vitro* の培養によってインスリン産生細胞を誘導し得る可能性について GFP マウスを用いた実験を行った。

2. バイオ人工膵開発

各種の免疫隔離膜の組成や形態の詳細に関して最適化を図るべく試行した。その中で、ラット膵島あるいはブタ膵内分泌細胞を分離精製して抗補体作用ポリマーを含む高分子ゲルに包埋することでマクロデバイスを作製し、下記血管誘導前処置を施した皮下組織内へこれを移植することで、マウス糖尿病モデルの血糖を長期間にわたり正常化することに成功した。さらに、糖尿病モデルとして膵全摘犬を作製し、腹腔内に上記のブタ膵内分泌細胞を組み込んだマクロデバイスを移植し、血糖を測定すると共に、ブタ C-ペプチド特異的アッセイ系を用いて移植した細胞の機能を検討したが、このデバイスは大型化に問題があり、さらなる最適化が必要である可能性が示唆された。

大型化と臨床応用を視野に置いて、安全性と生体親和性に優れたポリビニルアルコール(PVA)を材料とし、膵島細胞凍結保存技術を応用した全く新しい作製方法を考案した。この方法で作成したバイオ人工膵にラット膵島を組み込み、*in vitro* の評価や糖尿病マウスへの移植実験を行なって有効性を確認した。さらに、バイオ人工膵の糖尿病合併症に対する効果を検討するため、糖尿病マウスにこの PVA デバイスを移植し、約2ヶ月にわたり血液・尿・腎組織所見を検討して、その糖尿病性腎障害に対する有効性を確認した。また、ラット培養膵島に対するヒト新鮮血漿による組織障害を検討し、これに対して上記 PVA デバイス化が有効であることを確認した。この新規 PVA デバイスは、従来のチューブ型やバッグ型と異なり、作製法が容易で大型化にも充分対応できる点で大きな利点と可能性を有している。今後は、このデバイスの最適化によって、将来的な臨床応用を目指すスイヌ糖尿病モデル治療実験において飛躍的な成績向上が期待される。

3. 皮下血管新生誘導

塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor)を徐放性に遊離するデバイスを作製し、膵島の同種皮下移植および異種バイオ人工膵皮下移植における有用性を小動物（マウス・ラット）において確認した。また、従来用いていたコラーゲンスポンジに代えてコラーゲン被覆した PVA デバイスを用いても、良好な血管誘導が可能であることを示した。さらに、血管新生誘導技術の向上と応用可能性を探るため、ラット背部の虚血性皮膚壊死（皮弁）モデルや、新規の方法で作成した比較的長期間にわたり虚血状態を持続するラット下肢モデルを用いて、血管新生デバイスや各種薬剤投与の効果を検討した。

4. 前臨床段階糖尿病モデルにおける検討

小動物における上記の研究により、本研究の目的の一部である、糖尿病モデル動物におけるバイオ人工膵皮下移植システムの有効性が、小動物においてはほぼ確立し得たものと考えられる。しかし、膵全摘犬を用いたバイオ人工膵移植実験では、十分な効果を確認するに至っておらず、この点については、今後のさらなる検討が必要である。

特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

今回、バイオ人工膵デバイスの大型化と臨床応用を視野に置いて、安全性と生体親和性に優れたポリビニルアルコール(PVA)を材料とし、全く新たな方法で作成したデバイスは、バイオ人工膵以外の内分泌組織移植や、その他の組織・細胞移植にも応用可能性が高く、特記するに値する新技術である。

PVAのゲル化には従来化学的処理が行われていたが、この処理は細胞の生存に適さず、細胞を組み込んだ状態でのゲル化は不可能と考えられてきた。しかし、近年、凍結処理によるPVAのゲル化(crystallization)が報告されている。今回我々はこの点に注目し、従来から行われてきた膵島細胞の凍結保存技術を応用してPVA中に血清やdimethylsulfoxide(DMSO)を混入して膵島凍結・再解凍に適した条件を作り、解凍時にも膵島細胞の機能を温存する新たな処置を組み合わせることで、全く新しい作製方法により移植時に適切な膵島機能を発揮するバイオ人工膵を作製することに成功した。また、物理的な強度を保つために、従来から我々が用いてきたメッシュによる補強を組み合わせた。

この方法で作成したバイオ人工膵にラット膵島を組み込み、in vitroの評価や糖尿病マウスへの異種移植実験を行なって血糖制御における有効性を確認し、糖尿病マウスにこのPVAデバイスを移植して糖尿病性腎障害に対する有効性を確認した。また、ラット培養膵島に対するヒト新鮮血漿による組織障害に対してこのPVAデバイス化が有効であることを確認した。以上の結果から、今回開発したPVAバイオ人工膵デバイスは、細胞性免疫に対して主として物理的な防御効果を有するのみならず、液性因子による膵島破壊に対しても一定の防御作用を有することが確認された。

この新規PVAデバイスは、従来のチューブ型やバッグ型のPVAデバイスと異なり、作製法が容易で大型化にも充分対応できる点で大きな利点と可能性を有している。即ち、従来のPVAデバイスは、バッグ状あるいはチューブ状の膜を作製した後でなければ膵島を組み込むことが困難であり、任意の形態のデバイスを作製することが容易でなく、デバイス内に膵島を組み込むために技術を要した。しかし、今回の新規PVAデバイスは、技術的にはどのような形態のデバイスでも容易に作製可能であり、大きさにも特に制限はない。さらに、膵島細胞の機能や生存率を向上させる各種の物質を混入できる可能性もあり、今後は、このデバイスの最適化によって、将来的な臨床応用を目指すインスリン糖尿病モデル治療実験等において飛躍的な成績向上が期待される。

さらにこの方法は、凍結・再解凍が可能なあらゆる組織・細胞に応用可能であり、糖尿病以外の各種内分泌疾患や代謝疾患に応用できる可能性があり、非常に幅広い潜在的応用範囲を有する方法であると考えられる。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

- 1 Kawakami Y, Iwata H, Gu Y, Miyamoto M, Murakami Y, Balamurugan AN, Imamura M, Inoue K. Successful subcutaneous pancreatic islet transplantation using angiogenic growth factor releasing device. *Pancreas* 23: 375-378, 2001
 - 2 Xu BY, Iwata H, Gu Y, Balamurugan AN, Murakami Y, Cui WX, Imamura M, Inoue K. Functional comparison of the agarose microbeads and the developed three layer agarose microbeads as the bioartificial pancreas : An in vitro study. *Cell Transplant* 10: 403-408, 2001
 - 3 Xu BY, Gu YJ, Miyamoto M, Balamurugan AN, Cui WX, Imamura M, Iwata H, Inoue K. The influence of anticomplement synthetic sulfonic polymers on function of pancreatic islets: an in vitro study. *Cell Transplant* 10: 413-417, 2001
 - 4 Nagata N, Gu Y, Hori H, Balamurugan AN, Toma M, Kawakami Y, Wang WJ, Satake A, Misawa Y, Baba T, Miyamoto M, Nozawa M, Tabata Y, Inoue K. Evaluation of insulin secretion of isolated rat islets cultured in extracellular matrix. *Cell Transplant* 10: 447-451, 2001
 - 5 Gu Y, Tabata Y, Kawakami Y, Balamurugan AN, Hori H, Nagata N, Satake A, Cui WX, Qi M, Misawa Y, Toma M, Miyamoto M, Nozawa M, Inoue K. Development of a new method to induce angiogenesis at subcutaneous site of streptozotocin-induced diabetic rats for islet transplantation. *Cell Transplant* 10: 453-457, 2001
 - 6 Hori H, Gu Y, Nagata N, Balamurugan AN, Satake A, Morimoto Y, Wang WJ, Misawa Y, Nozawa Y, Nembai T, Miyamoto M, Nozawa M, Inoue K. Isolation, culture and characterization of endocrine cells from six-months-old porcine pancreas. *Cell Transplant* 10: 459-464, 2001
 - 7 Wang WJ, Gu Y, Miyamoto M, Hori H, Nagata N, Balamurugan AN, Inoue K. Effect of basic fibroblast growth factor on insulin secretion from micro-encapsulated pancreatic islets; An in vitro study. *Cell Transplant* 10: 465-471, 2001
 - 8 Kinoshita N, Echigo Y, Shinohara S, Gu Y, Miyazaki J, Inoue K, Imamura M. Regulation of cell proliferation using tissue engineering in MIN6 cells. *Cell Transplant* 10: 473-477, 2001
 - 9 Wang WJ, Gu Y, Tabata Y, Miyamoto M, Hori H, Nagata N, Toma M, Balamurugan AN, Kawakami Y, Nozawa M, Inoue K. Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* 73: 122-129, 2002
 - 10 Wang WJ, Gu Y, Hori H, Sakurai T, Hiura A, Sumi S, Inoue K. Subcutaneous transplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine cells normalizes hyperglycemia in diabetic mice. *Transplantation* 76: 290-296, 2003
 - 11 Balamurugan AN, Gu YJ, Tabata Y, Miyamoto M, Cui WX, Hori H, Satake A, Nagata N, Wang WJ, Inoue K. Bioartificial pancreas transplantation at prevascularized intermuscular space: Effect of angiogenesis induction on islet survival. *Pancreas* 26: 279-285, 2003
 - 12 Kim DH, Ishii M, Fujimiya M, Qi MG, Nakamura N, Yoshikawa T, Sumi S, Inoue K. In vivo functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell. *Pancreas* 27: e34-e41, 2003
 - 13 Sakurai S, Satake A, Nagata N, Gu Y, Hiura A, Kim DH, Hori H, Tabata Y, Sumi S, Inoue K. The development of new immunoisolatory devices possessing the ability to induce neovascularization. *Cell Transplantation* 12: 527-535, 2003
 - 14 Qi MG, Gu Y, Sakata N, Kim DH, Shirouzu Y, Yamamoto C, Hiura A, Sumi S, Inoue K. PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas. *Biomaterials* (in press)
 - 15 堀 洋、顧 元駿、井上 一知：6人工臓器 ハイブリッド型人工臓器の現状。外科 63: 311-317, 2001
 - 16 顧 元駿、堀 洋、井上 一知：再生医学における膵細胞の分離・移植法。Surgery Frontier 8: 316-322, 2001
 - 17 堀 洋、井上 一知：再生膵島細胞移植の現状と展望。日本再生医療学会誌 1: 69-77, 2002
 - 19 金 度勲、顧 元駿、井上 一知：幹細胞と糖尿病治療。細胞 34: 25-27, 2002
 - 21 角 昭一郎、顧 元駿、日裏 彰人、井上 一知：総説 幹細胞・ES細胞—膵臓。再生医療 2: 71-76, 2003
 - 23 角 昭一郎、日裏 彰人、顧 元駿、井上 一知：再生医療の膵島移植への応用。移植 38: 133-136, 2003
- 学会報告
 American Pancreatic Association (2001.11.2, Chicago)
 Satake A, Wang WJ, Gu YJ, Hiura A, Satake K, Inoue K. Xenotransplantation of encapsulated islets into prevascularized subcutaneous site.
- 6th International Conference on Tissue Engineering for Therapeutic Use (2001.11.25, Osaka)
 Gu YJ, Hiura A, Hori H, Inoue K. Regenerative islet therapy for diabetes mellitus.
- 5th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (2002.4.27 Tokyo)
 Hiura A. Symposium 14 "Stem cell biology and bioengineering" Regenerative islet therapy for diabetes mellitus.
- 29th Annual Meeting and Exposition of Controlled Release Society (2002. 7.22 Seoul)
 Hiura A, Inoue K. Mini-Symposia "Drug Delivery for Diabetic Disease Treatment" Subcutaneous implantation therapy of macroencapsulated islets for diabetes mellitus.
- 7th International Xenotransplantation Congress 2003 (2003.10.1 Glasgow)
 Kim DH, Inden M, Gu Y, Kitamura Y, Sumi S, Inoue K, Shimohara S. Induction of dopamine neurons from embryonic stem cells for Parkinson's disease.
- American Pancreatic Association 2003 (2003.11.6 Chicago)
 Sakata N, Gu Y, Qi MG, Yamamoto C, Sumi S, Inoue K. Can bio-artificial pancreas prevent diabetic nephropathy?—an experiment of islet xenotransplantation in mice—.