

サブテーマ名：ES細胞からの内胚葉系細胞の分化誘導技術の確立

小テーマ名：インスリン分泌細胞の移植前修飾システムの開発

テーマリーダー：(財)先端医療振興財団、客員研究員、黒田 嘉和

研究従事者：(財)先端医療振興財団、客員研究員、堀 裕一

● 研究の概要

膵臓・膵島移植に代わる糖尿病の再生医療を確立するために、ES細胞、膵前駆細胞や他の組織幹細胞からインスリン分泌細胞を効率よく分化誘導する方法を確立する。また、その臨床応用には、細胞移植とその生着、さらには免疫拒絶反応をクリアする必要がある。特に、移植細胞が生体内で高血糖に反応してインスリンを分泌するためには、まず、移植細胞が効率よくレシピエントの体内で生着しなければならない。そのために、移植細胞の viability を可及的に高めた上で移植することが必須である。本研究では主に膵島を用いてこの検討を行い、インスリン産生細胞がES細胞や他の細胞から確立され次第、これを応用、解析していくことを目的とする。また、臨床応用へ向けた取り組みとして Cell processing center (CPC) を利用した膵島移植手技の確立を行う。

1. フェーズ I

(1) 研究の目標

- 1) マウス ES 細胞や他の組織幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導技術を確立する。
- 2) 2 層単純浸漬法を含む臓器保存法が組織のアポトーシスに与える影響を検討する。
- 3) 臨床膵島移植の実施に向けての準備を行う。

(2) 実施内容および成果

- 1) マウス ES 細胞を McKay らの方法に準じて分化させ、PI3 kinase inhibitor を用いることにより、より多くのインスリンを産生する細胞を誘導した。

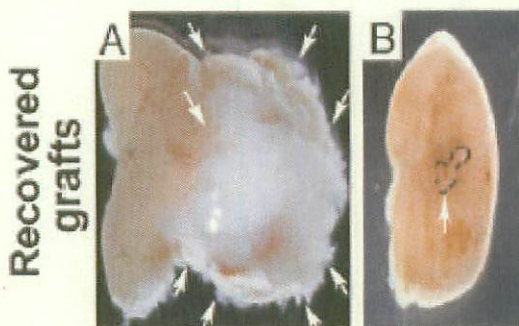


図 1

この細胞はグルコースの濃度依存性にインスリンを分泌することが判明した。この細胞を糖尿病誘発マウスの腎臓被膜下に移植すると、コントロール群では図 1A のように腫瘍形成を認めたが、分化したインスリン産生細胞移植群では明らかな腫瘍を認めなかった(図 1B)。また、コントロール群に比べて有意に生存率を改善した(図 2A)。また、血糖値を正常に戻すことはで

きななかったが、コントロール群と比べて有意に減少を認め(図 2B)、グルコース負荷による耐糖能の改善も認めた。(Hori et al. 2002)

- 2) 次に膵島分離前の膵の 2 層単純浸漬保存がアポトーシスに与える効果をラットで解析した。アポトーシスの評価として、TUNEL 法や annexinV assay さらに、アポトーシスが誘導される経路を評

価するため i) caspase3, 8, 9 活性測定、ii) リン酸化 c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) と p38 の immunoblot を検討した。その結果、膵島分離前の膵の 2 層単純浸漬保存はミトコンドリア経路を介したアポトーシスを有意に抑制することが明らかになった。しかし、2 層単純浸漬保存でさえ、分離後膵島の JNK を活性化することも明らかになった。(Matsuda et al. 2003)

次に、膵島分離後に膵島を 2 層単純浸漬保存で培養するモデルでラット膵島の生存率や機能に与える影響を検討した。その結果、下の表のように分離直後の膵島に比べて 2 層法で培養した群で膵島の機能が改善していることが明らかになった。

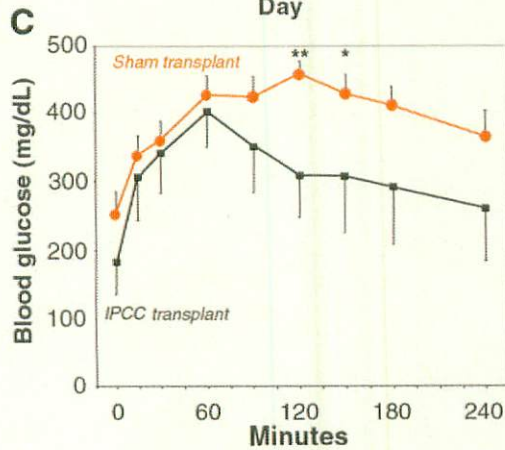
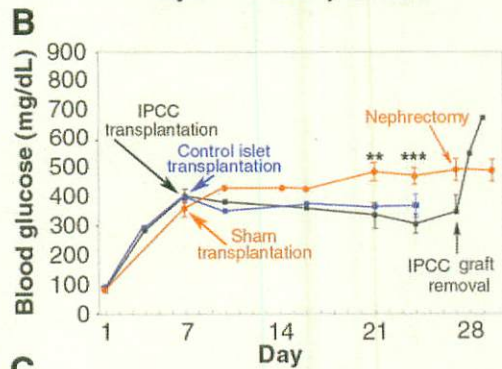
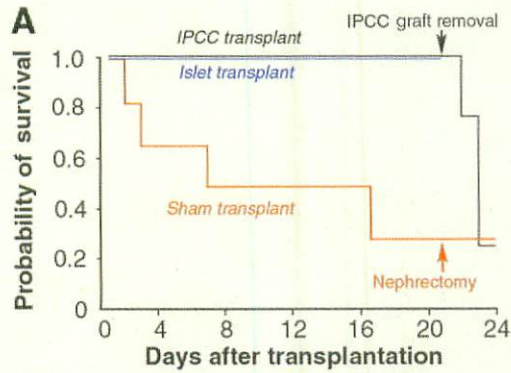


図 2

Insulin release against glucose stimuli

Group	Insulin release		SI
	60mg/dl	300mg/dl	
保存なし	11.0±10	13.0±10	1.3±0.2
RPMI	6.2±3.0	14.0±4.	2.6±0.6
RPMI/2層法	3.6±1.6	2.0±2.	3.7±2.5
		0	* : p<0.05

さらに、生存率を評価するために、次の検討を行った。図 3 のように、生細胞を fluorescein diacetate で緑色に、死細胞を propidium iodide で赤色に染色して、生細胞の割合を各群で比較した。統計学的有意差は認めなかったが、2 層法で培養した群では生細胞が多い傾向にあった。(Takahashi et al. In press)

以上より、2 層法による膵島分離前の膵保存や分離後の 2 層法による膵島培養は共にアポトーシスを改善し、膵島の生存率やインスリン分泌機能の維持に効果があることが明らかとなった。

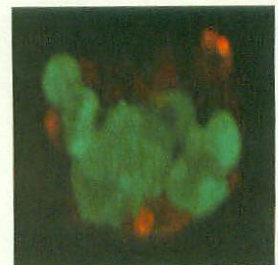


図 3

## 2. フェーズII

### (1) 研究の目標

- 1) ヒト神経幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導技術を確立する。
- 2) 新しい組織グラフトの評価法を確立し、動物実験でその有用性を検討する。
- 3) 臨床膵島移植の実施に向けての準備を行う。

### (2) 実施内容および成果

1) 膵臓のインスリン産生細胞であるβ細胞と神経とは転写因子などの遺伝子発現がきわめて類似しており、発生過程での共通性が示唆されている。そこで、米国 Stem Cells Inc. の内田博士が樹立したヒト胎児由来神経幹細胞を用いてインスリン産生細胞の分化誘導を試みた。図4に示すように、4段階の分化を誘導することにより、インスリン産生細胞の出現を認めた。

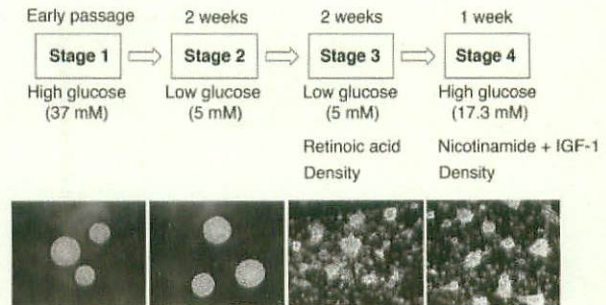


図4

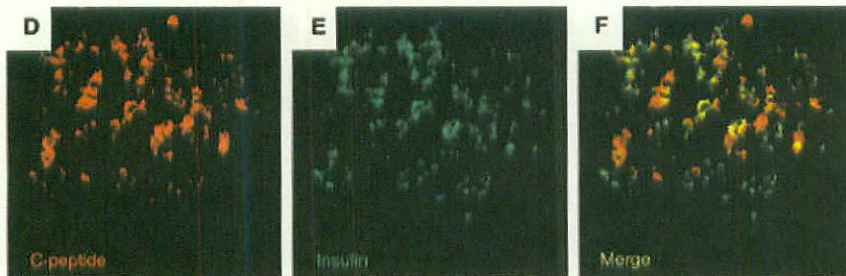


図5

免疫染色の結果、この細胞はC-peptideも発現しており、機能的にも成熟したインスリン産生細胞であることが判明した(図5)。

この細胞をマウスの腎被膜下に移植すると、グルコース負荷により血中ヒトC-peptideの上昇を認めた(図6)。(Hori et al. 2005)

2) 移植グラフトのviabilityを無侵襲で評価することはin vivoにおけるイメージングと共に膵島やインスリン産生細胞の生着率を上げるうえで非常に重要である。我々は<sup>31</sup>P-Nuclear Magnetic Resonance (NMR)を用いて移植した膵臓のviabilityを評価する方法を動物実験で確立した。(Yoshikawa et al. 2004)

また、この評価法でも2層単純浸漬保存の有用性が証明された。

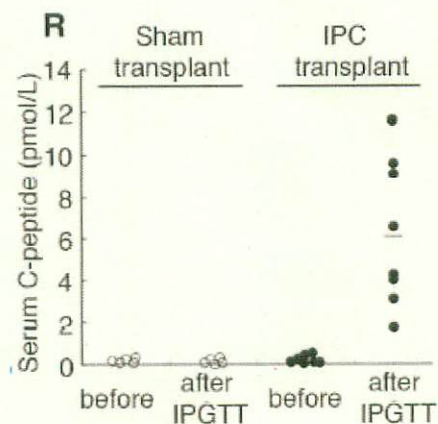


図6

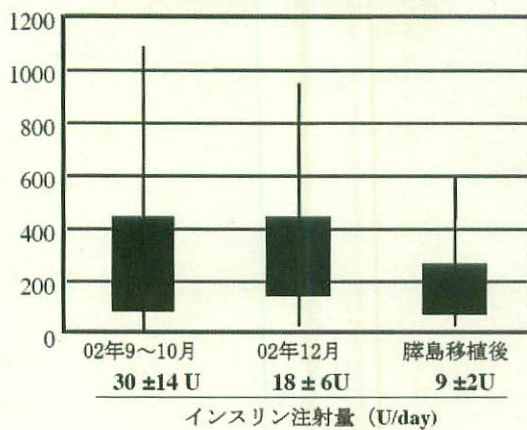
3) 実験レベルでの2層単純浸漬保存の有用性を臨床応用するために、臨床膵島移植の準備をすすめていたが、2004年11月にこの機会を得た。患者は30歳で8年前に1型糖尿病を発症し、

最近は糖尿病専門医による血糖コントロールも不良な症例だった。2層法保存によりドナー膵を搬送し、膵島分離を行った。



その結果、移植に十分な膵島を回収することができ（写真左）、透視下経門脈的に移植をおこなった（写真中・右）。術後の経過は良好で、下のグラフからも明らかのように、血糖の変動は劇的に改善しており、低血糖などの自覚症状も消失した。

移植前後の血糖値の変動



その後、Cell processing center を学外に確保し、ドナーから提供された膵臓より 2005 年には 2 度、膵島を分離する機会を得た。

### 3. 今後の展望

ES 細胞や他の組織幹細胞からインスリン産生細胞を誘導することには成功したが、未だその quality から移植可能な細胞には至っていない。今後はより細胞系譜に則った分化誘導の技術を確認すべきである。

我々は ES 細胞から definitive endoderm への分化を誘導する系を確認する予定である。また、実際の臨床応用を考えた場合、膵臓の組織幹細胞やインスリン前駆細胞の分離・培養にも着手する必要がある。このため、cell sorter を用いてインスリン前駆細胞を分離・培養する系を確認する予定である。2 層単純浸漬法による移植前修飾法では臨床的にも基礎的にもその有用性が証明されたので、今後は移植可能なインスリン産生細胞を誘導することに焦点を絞って研究を継続する予定である。