

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 細胞移植用免疫寛容空間構築デバイスの開発
(英語) Development of a device to construct immune tolerance spaces for cell transplantation

研究開発実施期間: 2018年9月1日~2020年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 穴澤 貴行
(英語) Takayuki Anazawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 京都大学医学研究科 肝胆膵・移植外科学 助教
(英語) Division of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery and Transplantation
Department of Surgery, Graduate School of Medicine Kyoto University

II 研究開発の概要

(和文)

1 型糖尿病の根本治療として実施されている膵島細胞移植は、現行薬物治療では再現できない忠実な血糖値反応性インスリン分泌による優れた治療効果が確認されている。この医療技術を広く提供することを可能にするための問題として、①ドナー不足により必要な膵島が確保できない、②免疫抑制剤の副作用への懸念、③肝内門脈へ移植することによる安全性の懸念、がある。①の問題は多能性幹細胞である ES/iPS 細胞からのインスリン分泌細胞への分化誘導法の開発やブタ膵島による異種移植により解決が目指されている。しかし、これらの細胞を現行の方法である肝内門脈に移植することは、安全性の面で強い懸念が有されており、移植には、門脈以外の場所、特に観察や除去が可能な皮下への移植の実現が期待されている。さらに免疫抑制剤を不要とする皮下移植が確立できれば、糖尿病細胞治療にブレイクスルーを起こすことが可能となる。

これらの背景から、免疫抑制剤不要皮下細胞移植を実現するため、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)を、生体吸収性材料からなるデバイス(ゼラチン/ヒアルロン酸シート等)に担持させ、レシピエント皮下に血管誘導および免疫寛容空間形成が可能であることを大動物(イヌ)膵島細胞移植モデルで実証し、免疫抑制剤不要細胞移植の基本デバイスを開発することを目的とした。大動物において、免疫抑制剤不使用下で移植膵島の30日以上長期生着(血糖値正常化)を可能とするデバイスの仕様の策定と、制御性T細胞誘導因子または制御性T細胞自体

の追加投与の必要性を明らかにすることを具体的達成目標とし、以下の開発研究を行った。

1) 生体吸収性免疫寛容空間構築デバイスの試作

候補材料（ゼラチンシート、ヒアルロン酸 - 酸化セルロースシート、ヒアルロン酸、キトサン）、候補薬物（SEK-1005、塩基性繊維芽細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子）等を適宜組み合わせて免疫寛容空間構築デバイスを試作し、小動物（ラット）を用いた *in vivo* 機能評価（血糖制御能）により、各素材の優先順位付けを行った。その結果に基づき、大動物（イヌ）モデルで試作大動物用デバイスをイヌに埋め込み、毛細血管密度また局所的免疫寛容の程度の評価を行った。その結果、 $10\text{--}14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の bFGF を生体吸収材性材料であるコラーゲン使用人工皮膚に添加することが最も効果的であることを明らかにした。

2) 大動物モデルを用いた免疫寛容空間構築デバイスの機能評価

最適移植環境条件を設定するために、まずマウスによる検討を先行させた。マウスの皮下に bFGF を担持させたアガロースロッドを留置し、血管床を誘導した。Streptozotocin を用いて糖尿病化し、血管床を誘導した皮下に同系統のマウス膵島を 500 個移植した。マウスは Th1-dominant である C57BL/6 と Th2-dominant である Balb/c の 2 種類を用いた。アガロースロッド留置期間は 7 日間もしくは 14 日間とした。C57BL/6 マウスはアガロース留置期間が長いほど血糖正常化率は向上した（7 日間:67%、14 日間:83%）。Balb/c マウスはアガロース留置期間に関わらず早期に生着した。デバイス留置後に形成される至適移植空間の条件として、炎症所見の消退、特に好中球浸潤の消退が得られていることが必要不可欠であった。

これらの結果を受け、イヌ皮下への bFGF を担持させたデバイスの埋め込み実験を行った。複数の条件で検討したところ、イヌ皮下においては留置後 1 週間で血管の誘導は確認され、一方で高度の炎症細胞浸潤を示さず、膵島移植の実施は可能であると思われた。また、異物反応により皮下にデバイスのサイズに応じた空間が形成され、皮下膵島移植が容易に実施しうることも明らかとなった。本移植方法の移植効率を確認するために、イヌの膵全摘を行い糖尿病化したあと、全摘した膵から膵島分離を行い、複数の群に分けて自家膵島を皮下移植した。処置なく皮下移植した場合は血糖値の低下は確認されず、また門脈内に移植した場合は血糖値の低下が確認された。本デバイスで皮下血管誘導処置をした場合には血糖値の低下が認められ、処置群の組織学的所見では、処置をしない場合に比べて明らかに血管新生が豊富に認められた。一方、デバイス留置部位の免疫関連細胞の解析から皮下における内因性制御性 T 細胞の誘導は、Allograft の拒絶反応を制御するには十分ではないことも明らかとなった。

3) 生体吸収性免疫寛容空間構築デバイスの最適化と制御性 T 細胞の活用

免疫寛容空間構築の条件設定のため、マウスを用いた検討を追加した。本デバイスによる免疫寛容移植部位作成により、レシピエントが “Low responder” である場合は免疫抑制剤フリーでの生着が確認できたが、レシピエントが “High responder” である場合には、免疫抑制剤フリーでの生着は困難で、拒絶されることが確認された。その要因は、本デバイスによる移植部位作成に反応して誘導される内在性 Treg が、“High responder” である場合は炎症所見の消退につれて減弱することであることを突き止めた。

このため、Treg は追加投与が必要であると判断し、セットアップ企業であるレグセル社プロトコールにて作成した抗原特異的 iTreg を追加投与に用いることとした。本研究期間内では、マウス皮下膵島移植モデルでの確実な効果は確認できていないが、経門脈膵島移植モデルでは、iTreg 投与による免疫寛容誘導効果が確認されている。今後、Treg 投与量に応じた評価、Treg 投与経路による評価（全身投与、膵島との共移植）、Treg 投与タイミングの検討（移植前投与、移植時投与、および移植後投与のそれぞれの必要性）、T cell depleting antibody 等の投与による前処置の必要性等の検討を行い、最適な投与方法を確立する必要があると思われ、イヌ皮下移植での免疫寛容誘導達成には至らなかった。

総括：

(1) 生体吸収性デバイスによる膵島内へ血管の進入とその半永久的な維持：血管誘導因子を除放するデバイスにより皮下に血管網を誘導しその部位に膵島を移植し長期間生着させた。デバイスからの増殖因子の供給がなくなれば誘導された血管網は退縮してしまう可能性があると思われたが、移植膵島内にレシピエントの毛細血管が進入し半永久的に血管が維持され血流が保たれていた。このデバイスの優位性は、血管誘導因子が移植部位から急速に流れ出ないように投与されることに加え、生体吸収性材料であるためデバイスを抜去することなく血管網が密な組織に取り囲まれた空間（ポケット）が形成され、この部位へ細胞を容易に移植できる点が挙げられる。

(2) 免疫寛容の可能性：本法では、レシピエントが“Low responder”であれば、皮下へ移植された同種膵島は拒絶されることなく生着した。皮下移植した膵島が免疫抑制剤を一切使用しない条件下でも同種膵島が拒絶されず半永久的に生着する可能性を示すものであったが、今回、このデバイス留置のみでは、“High responder”に対しては十分な免疫寛容を誘導することは困難であった。生体内に存在する内在性 Treg のみでは、抗原特異性の制限や細胞数の十分な確保が困難であることが要因であると思われた。経門脈膵島移植モデルでは、誘導性 Treg の投与により免疫抑制剤フリーでの長期生着が達成されうることから、Treg 製剤の開発により免疫寛容誘導達成の展望が開かれるものと思われるが、本研究開発により、一つの方法論として新規性のある可能性の提示ができたと思われる。

これまで免疫抑制剤をもちない細胞移植のアプローチは、マイクロカプセル、あるいはマクロカプセルに封入して移植することが開発の主流であり、これらが競合技術となるが、細胞を封入することで、細胞の生存率の低下や、細胞の機能すなわちインスリン分泌能や血糖応答性が阻害されることが問題であった。本法で用いるデバイスは移植前に空間を作成することに用いるのみで移植する細胞の機能を阻害することはなく、また移植部位への血管誘導を行うため、細胞の生存率を上げることが可能である。このようにデバイスを細胞の封入ではなく、移植部位の作成に用いるという発想に独創性がある。また、移植細胞の機能を阻害せず細胞生存率を改善するという利点を有する本法は、大量の細胞を必要とするカプセル化細胞移植より、必要な細胞数が少なく済む可能性が高いという点で優位である可能性を有しており、再生医療の実現に大きく寄与する可能性を有している。

(英文)

Pancreatic islet cell transplantation has an excellent therapeutic effect. Problems that need to be addressed include (1) insufficient islets due to the lack of donors, (2) concerns about the side effects of immunosuppressants, and (3) safety concerns due to islet transplantation into the intrahepatic portal vein. Problem (1) requires intensive worldwide efforts to develop pluripotent stem (ES/iPS) cell-derived islets and xenografts of porcine islets. However, transplanting these cells into the intrahepatic portal vein is a major concern in terms of safety. If subcutaneous transplantation, which does not require immunosuppressants, can be established, a breakthrough in diabetic cell therapy is possible.

To realize subcutaneous cell transplantation without immunosuppressants, basic fibroblast growth factor is supported on a device made of bioabsorbable material to induce blood vessels in the recipient subcutaneously. The purpose of this study was to demonstrate the possibility of forming a tolerance space in a large animal (dog) pancreatic islet cell transplantation model and develop a basic device for cell transplantation that does not require immunosuppressive agents. The formulation of a device that enables the long-term engraftment of transplanted islets for 30 days or more in large animals without the use of immunosuppressive agents and control T-cell inducer or the control T-cell itself. The following developmental studies were

conducted with the specific goal of clarifying the need for additional administration.

(1) Angiogenesis into the pancreatic islets by a bioabsorbable device and its semi-permanent maintenance: A vascular network was subcutaneously induced by a device that releases a vascular inducer, and the pancreatic islets were transplanted to that site for engraftment. It seems that the induced vascular network may be regressed if the supply of growth factors from the device is lost, but the recipient's capillaries enter the transplanted islets and the blood vessels are maintained semipermanently. The flow was kept. The advantage of this device is that the vascular inducer is administered so that it does not flow out rapidly from the implantation site, and because it is a bioabsorbable material, the vascular network is surrounded by dense tissue without removing the device. A point is that a space (pocket) is formed and cells can be easily transplanted to this site.

(2) Possibility of immunological tolerance: In this method, if the recipient was a "low responder," the allogeneic islets that were transplanted subcutaneously survived without being rejected. The subcutaneously transplanted islets showed the possibility that allogeneic islets could be rejected semipermanently even under the condition that no immunosuppressive drug was used. However, it was difficult to induce sufficient immune tolerance. It seems that it is difficult to limit the antigen specificity and secure sufficient cell numbers only with the endogenous Tregs present in the living body. In the transportal islet transplantation model, the administration of inducible Tregs may achieve long-term engraftment without immunosuppressants, so the development of Treg formulations may open up the prospect of achieving immune tolerance induction. It is considered that this research and development has successfully presented the possibility of novelty as a methodology.

Until now, the main approach for cell transplantation without immunosuppressants was encapsulation in microcapsules or macrocapsules for transplantation. However, the encapsulation of cells reduces the survival rate of cells. The problem is that cell functions, that is, insulin secretory ability and blood glucose responsiveness, may be inhibited. The device used in this method does not interfere with the function of the cells to be transplanted only by creating space before transplantation, and as it guides blood vessels to the transplant site, it is possible to increase the survival rate of cells. This method, which has the advantage of improving cell viability without inhibiting the function of transplanted cells, is likely to require fewer cells compared to encapsulated cell transplantation, which requires large numbers of cells. This method is superior and has the potential to contribute significantly to the realization of regenerative medicine.

III 事後評価総合所見

膵島移植の実用化に向けた新しいアイデアのもと、挑戦的な目標に対して研究開発を進めました。その結果、当初計画の最終目標には届かなかったものの、臨床使用可能な生体吸収デバイスを用い動物試験等を通じて、臨床応用に必要な課題を明らかにしました。

しかしながら、免疫寛容空間構築という概念の普遍性を明確化するには至らず、現状では必ずしも実現可能性が高いとは言えません。

免疫寛容空間という概念が物理的な空間と、制御性T細胞による免疫抑制領域の双方向が混在検討されており、今後は、「膵島細胞移植と制御性T細胞」と「膵島細胞移植と免疫寛容空間デバイス」という2つの方向で、まずはそれぞれ単独で効果が得られるものを確立することが望まれます。