

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 (移植医療技術開発研究分野)  
(英語) Practical Research Project for Allergic Diseases and Immunology  
(Research on Technology of Medical Transplantation)

研究開発課題名 : (日本語) 安全かつ有効な膵島細胞/間葉系幹細胞複合シートの皮下パッチ技術の  
開発  
(英語) Innovation of the new procedure for islet cell transplantation;  
subcutaneous transplantation of islet/ mesenchymal stem cell sheet.

研究開発担当者 (日本語) 臨床研究センター 外科治療研究部長 黒木 保  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Surgery, Chief Surgeon, National Nagasaki Medical  
Center, Tamotsu Kuroki

実施期間 : 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) I型糖尿病モデルの作製、及び膵島細胞/間葉系幹細胞複合シート移植評  
価・術後管理  
開発課題名 : (英語) Innovation of the new procedure for islet cell transplantation;  
subcutaneous transplantation of islet/ mesenchymal stem cell sheet.

研究開発分担者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授 江口 晋  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Surgery, Nagasaki University Graduate School of  
Biomedical Sciences, professor, Susumu Eguchi.

研究開発分担者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教 足立 智彦  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Surgery, Nagasaki University Graduate School of  
Biomedical Sciences, Assistant professor, Tomohiko Adachi.

分担研究 (日本語) 膵島細胞/間葉系幹細胞複合シートの作製条件検討・機能評価・品質管理  
開発課題名 : (英語) Evaluation and quality control of the islet/ mesenchymal stem cell  
sheet.

研究開発分担者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教 堺 裕輔  
所属 役職 氏名: (英語) Department of Surgery, Nagasaki University Graduate School of  
Biomedical Sciences, Assistant professor, Yusuke Sakai.

分担研究 (日本語) 検討項目の設定・データの統計解析  
開発課題名: (英語) Statistical analysis

研究開発分担者 (日本語) 長崎大学病院臨床研究センター・助教 佐藤 俊太郎  
所属 役職 氏名: (英語) Clinical Research Center, Nagasaki University Hospital

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### ・ 研究開発代表者による報告の場合

和文:

今回の研究に関して、段階的に必要なことは、①血糖高値を呈する大動物モデルの作成、②膵島/間葉系幹細胞シートの作成、③大動物モデルに対する皮下シート移植となる。我々は、まず移植の受け手となる大動物モデル作成に着手、ブタを対象動物とした。血糖高値を呈するには、薬剤 (Streptozotocin) を使用し膵島炎を惹起する方法もあるが、血糖高値をより完全に到達させる目的から、煩雑ではあるがブタ膵全摘出を該当することとした。膵全摘出施行後は 300mg/dl 以上の血糖上昇を全例(n=7)で認めるとともに、少なくとも無処置でも約 2 週の生存期間は確保できたことから、膵島/間葉系幹細胞シート移植した際の効果検討が可能となる動物モデルであることを確認した。

次いで、膵島/間葉系幹細胞シート作成に着手。当初はシート作成用の膵島は、上記膵全摘ブタの膵島を用いる計画であったが、軽量ブタからの膵島分離では分量の膵島収量が望めない状況であったため、より大きな他ブタからの膵島採取に変更、Allotransplantation としての実験系で継続とした。シートの基盤となる間葉系幹細胞は、これまでの齧歯類を用いての実験データ(Hirabaru et al. Tissue Eng Part C Methods. 2015 Dec;21(12):1205-15, Matsushima et al. Cell Transplant. 2016;25(8):1525-37, Imamura et al. submitted.)をふまえ、脂肪幹細胞(ADSC)を選択、レシピエントブタより脂肪組織を予め採取、遠心分離により ADSC を収集したうえで、温度応答性培地シート (UPCell<sup>®</sup>) 上に播種、約 48-72 時間後に confluent となった状況で、シート上に分離膵島を播種、膵島/ADSC シートを作成する。現状ではより効率の良いシート作成条件に重点を充て検討を進めている。具体的には、シート作成用 35mm 径培地に最適な ADSC の量、あるいは 100mm 径培地に必要な量、シート上に播種する膵島量等の至適条件を検討し、今後そのシートを用いて移植実験を行う。現状の膵島分離を踏まえると、実験系は allotransplantation となり、レシピエントブタには免疫抑制剤投与が必要となるが、まずは移植実験系の確立のため免疫抑制剤投与なしでの開始予定としている。

英文：

Planned experiment to obtain the final goal in this research is as follows. Firstly, development of pig transplant recipient model whose blood glucose level is continuously high, secondly, development of islet/ mesenchymal stem cell sheet and finally, transplantation the islet/ mesenchymal stem cell sheet into the subcutaneous space of the recipient pig to achieve the better control of blood glucose level.

In terms of making the recipient model, though drug (Streptozotocin) induced hyper glucosemia would be possible by inducing insulinitis, however it would often be reported that drug induced hyper glucosemia is fragile. Therefore total pancreatectomy was employed as a potential procedure to achieve the more stable high blood glucose level though operative procedure itself was complicated. After total pancreatectomy, continuous high glucose level was acquired and survival at least two weeks were obtained so that this pig model was confirmed to be suitable for evaluation of safety and efficacy of subcutaneous islet/ mesenchymal stem cell sheet transplantation.

Secondly, development of islet/ mesenchymal stem cell sheet was demonstrated. Due to the less islet quantity from the recipient pig small pancreas obtained from total pancreatectomy as an autotransplantation model, the pig for islet isolation was converted to big one. This conversion made this project to change slightly as a model of allotransplantation. As a cell source of making cell sheet, Adipose derived stem cells (ADSCs) were employed as a source of the mesenchymal stem cell sheet based on the previous our study (Hirabaru et al. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Dec;21(12):1205-15, Matsushima et al. *Cell Transplant*. 2016;25(8):1525-37, Imamura et al. submitted.). These ADSCs were isolated from the fat tissue on recipient pig in advance, disseminated onto the temperature responsive culture medium (UPcell<sup>®</sup>). After 48-72 hours with confluent, islets are disseminated onto the sheet of ADSCs to make the islet/ mesenchymal stem cell sheet. Recent experiment is proceeded focusing on the establishment of condition for making more effective islet/ mesenchymal stem cell sheet. Specifically, the evaluation of the ideal quantity of ADSCs as using 35mm or 100mm dish respectively or ideal quantity of islets to disseminate onto ADSCs sheet. Based on the these fundamental results sheet, transplantaion experiment will be performed soon.

### Ⅲ. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

現状未

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

現状未

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

現状未

- (4) 特許出願

なし