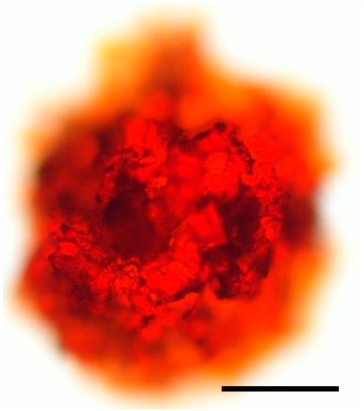
57　脂肪組織から作製したインスリン産生細胞自家移植	池本　哲也

【目的】I 型糖尿病は機序不明な自己免疫反応による膵島破壊によって生じた体内のインスリン絶対的枯渇を主体とし、根治的治療の登場が待たれる疾患である。欧米では膵島移植が I 型糖尿病の根治的治療のオプションであるものの、絶対的ドナー不足に悩む我が国においては、新たな cell source の開拓が急務である。この問題点の解決策として、我々がこれまでに研究を行ってきた脂肪由来幹細胞（adipose-derived stem cell : ADSC）がある。我々は再生医療技術を用いて、臨床応用可能なレベルのインスリン産生細胞（insulin-producing cell : IPC）を ADSC より効果的に分化誘導することに成功した。そこで、「I 型糖尿病患者自身の少量の脂肪から IPC を分化誘導し、これを自家移植する」という治療戦略を計画中であるが、実際に臨床応用を考慮するにあたり、「I 型糖尿病患者の脂肪から ADSC を分離し、機能的 IPC を作製できるのか」「自家移植した IPC は自己免疫による破壊を受けないで生着するのか」という科学的疑問を追求する必要がある。

【方法】1. I 型糖尿病自然発症モデルである NOD マウスを用いた。糖尿病を自然発症したマウス皮下脂肪からコラゲナーゼ遠心分離法で ADSC を分離精製・培養し、我々の protocol で IPC を分化誘導、作製した。H.E.および Dithizone 染色、インスリン蛍光免疫染色、mRNA（Ins1,MAFA）を評価した。また、手術時廃棄される脂肪のうち、I 型糖尿病患者から得られたもので同様の検討を行った。STZ 誘導糖尿ヌードマウスの腎被膜下に 2.0×10^6個の IPC を移植し、全身状態・血糖および犠死後の組織を検討した。2. NOD マウスの糖尿病を自然発症したものをドナーおよびレシピエントとして、ドナーの脂肪組織より 1 の方法で IPC を分化誘導し、レシピエントの腎被膜下に 2.0×10^6個の IPC を移植し、「I 型糖尿病の IPC 自家移植モデル」を確立した。血糖変動および組織（リンパ球浸潤・IPC の破壊度・抗 GAD 抗体、PDL1 抗体、ZnT8）を評価した。

【結果】本 protocol から作製された IPC は I 型糖尿病患者の脂肪組織から作製された IPC であっても *in vitro／in vivo* ともに十分な機能を発揮することが証明された。また、I 型糖尿病モデルマウスである NOD マウスを用いて、I 型糖尿病発症後の IPC 自家移植モデルを確立し、糖尿発症後の脂肪組織から分化誘導した IPC を移植すると、少なくとも 30 日まで血糖値が正常化すること、および IPC が移植早期では自然免疫および自己免疫により破壊を受けないことを証明した。

I 型糖尿病患者の脂肪より作製された IPC



100 μ m

57. 脂肪組織から作製したインスリン産生細胞自家移植

池本　哲也

徳島大学病院 安全管理部

Key words：インスリン産生細胞，脂肪由来幹細胞，再生医療，I 型糖尿病，細胞移植

緒　言

I 型糖尿病は機序不明な自己免疫反応による膵島破壊によって生じた体内のインスリン絶対的枯渇を主体とし、血糖コントロールの困難さ、また、無自覚の低血糖発作・腎不全・心血管系イベントなどを生じ、若年発症が多いことから、様々なライフイベントとも重なり、大きく患者の人生を左右しかねない状況を招来することも多々ある。このため根治的治療の登場が待たれる疾患である。膵島移植が欧米では I 型糖尿病の根治的治療のオプションである［1］ものの、絶対的ドナー不足に悩む我が国においては、新たな cell source の開拓が急務である。この問題点を解決する方策の一つとして、我々がこれまでに研究を行ってきた脂肪由来幹細胞（adipose-derived stem cell：ADSC）がある。

我々は種々の検討から、ADSC を cell source として、再生医療技術を用いた insulin-producing cell（IPC）作製の簡便で効果的な protocol を樹立し［2］、更に本 protocol を臨床応用に向け、使用薬剤を xeno-antigen free とし、また RCP ピースを用いた 3 次元培養の protocol を開発した（特許出願済み）。同 protocol は *in vitro*／*in vivo* で極めて機能的な IPC 作製が証明された［3，4］。また、手術時に破棄される不要な脂肪組織から実際にヒト ADSC を分離・精製し、その ADSC を用いて同様に IPC を作製し検討を行ったが、マウス移植実験で良好な血糖正常化の移植成績を得た（徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会 No.3090/UMIN＃000035546、［5］）。従って、「I 型糖尿病患者の皮下脂肪から作製された IPC が *in vivo* で機能的にインスリンを分泌するか否か」、「I 型糖尿病患者の体内に自家移植された際に自己免疫によって完全な破壊を受けるか否か」という scientific questions が実証・解決されれば、本 protocol によって作製された IPC 自家移植は極めて早期に臨床応用可能であると考えられるため、その questions に沿って研究を行った。その結果、本 protocol から作製された IPC は新鮮な状態での移植が望ましく［6］、また、I 型糖尿病患者の脂肪組織から作製された IPC であっても *in vitro*／*in vivo* ともに十分な機能を発揮することが証明された［7］。また、I 型糖尿病モデルマウスである NOD マウスを用いて、I 型糖尿病発症後の IPC 自家移植モデルを確立し、自家移植において移植免疫および自然免疫に影響されず、また、少なくとも移植後早期では自己免疫によって排除されることはなく、血糖値が正常化することを証明した［8］。

方　法

1. I 型糖尿病患者の皮下脂肪から作製された IPC が *in vivo* で機能的にインスリンを分泌可能か否か

I 型糖尿病自然発症モデルである雌性 NOD マウスを用いた。自己免疫学的膵島破壊による糖尿病を発症したマウス鼠径部皮下から脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ遠心分離法［9］で ADSC を分離精製・培養し、上述した我々の protocol で分化誘導を行って IPC を作製した。H.E.および Dithizone 染色、インスリン蛍光免疫染色で cell quality を評価し、糖濃度に応じて自律的にインスリンを分泌可能かの評価（Stimulation index：細胞を 2.2 mM のグルコースで 1 時間培養した際と、22 mM のグルコースで 1 時間培養した際のインスリン放出量の比。自律的インスリン分泌能の指標として用いられる）の計測および mRNA の評価（Ins1、MAFA など β 細胞の成熟のマーカー）および Western blotting（PDX-1、NGN3、INS1 等の測定）を行った。また、手術時廃棄される脂肪のうち、I 型糖尿病患者から得られたもので同様の検討を行い（徳島大学病院 IRB 承認番号 3090、UMIN＃000035546）、完成した IPC 2.0×10^6 個を STZ

誘導糖尿病ヌードマウスの腎被膜下に移植し、*in vivo* 機能試験を行った。

2. Ⅰ型糖尿病患者の体内に自己脂肪から作製された IPC を自家移植した際に自己免疫によって完全な破壊を受けるか否か

Ⅰ型糖尿病自然発症モデルである雌性 NOD マウスを 6 週令より飼育し、糖尿病を自然発症したものをドナーおよびレシピエントとして、ドナーの脂肪組織より上記 1.の方法で IPC を分化誘導し、レシピエントの腎被膜下に 2.0×10^6 個の IPC を移植する「Ⅰ型糖尿病発症後の IPC 自家移植モデル」を確立した。全身状態・体重・血糖変動を経時的に観察した。血糖の正常化が得られたレシピエントに対しては、担 IPC 腎を摘出し、摘出後の血糖の変動を観察するとともに、腎被膜下の IPC につき、リンパ球浸潤・IPC の破壊度・自己免疫（抗 GAD 抗体、PDL1 抗体、ZnT8）の評価を行い、自然発症した NOD マウスから分離・精製した膵島と比較検討を行った。

結　果

1. 糖尿自然発症 NOD マウス皮下脂肪から作製した IPC は良好な cell quality を示した

糖尿病自然発症した NOD マウス鼠径部皮下脂肪からコラゲナーゼ遠心分離法を用いて ADSC が分離精製され（図 1）、FACS 解析にて表面マーカーの解析を行ったところ、$CD90^-CD105^-CD31^+CD34^+CD45^+CD146^+$であった。トリパンブルー染色によってカウントすると生細胞が 96.3%であった。この ADSC を 3 passage 後に 3 次元培養を行ったところ、24 時間で細胞集塊を形成し、培養中 IPC 完成までその形態が保持された。培養終了時の Dithizon 染色および insulin 抗体染色はともに強陽性であり、Image J で解析すると、その saturation は 241 であった（参考値：ヒト新鮮分離膵島 saturation＝253［3］）。Insulin、MAFA の mRNA を解析すると、ADSC と比して有意に上昇していた（$P<0.05$, Mann–Whitney U test）（図 2）。Stimulation index（SI）は 3.5 と良好であった［8］。

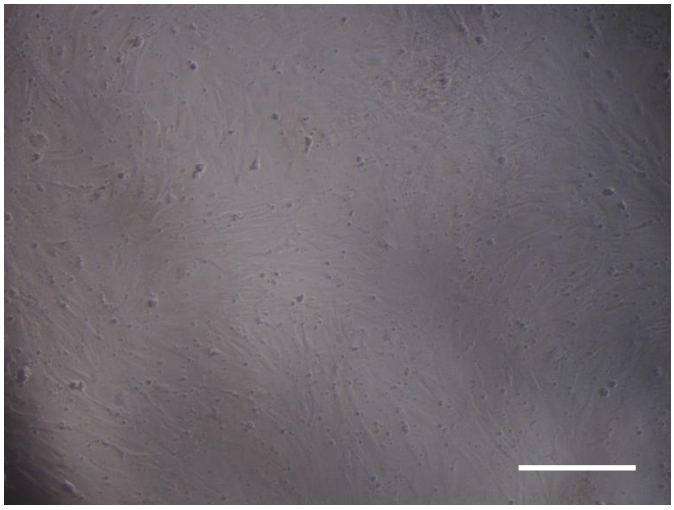


図 1. NOD マウスよりコラゲナーゼ遠心分離法で精製された ADSC
ADSCの形態をもった紡錘形の細胞を多数認める（スケールバー：1μm）。

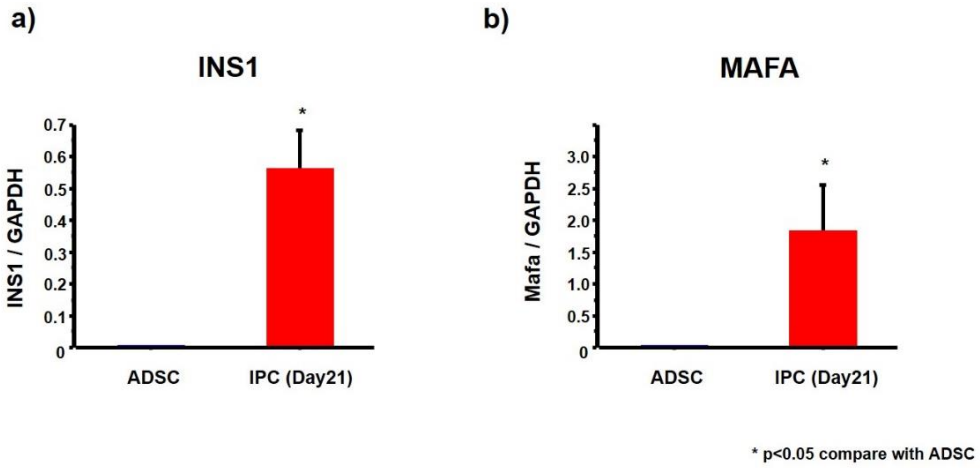


図 2. NOD-IPC の mRNA 解析（ELISA 法）

a）ADSCと比較したIPCのINS1発現。P＜0.05（Mann–Whitney U test）。

b）ADSCと比較したIPCのMAFA発現。P＜0.05（Mann-Whitney U test）。

2. I 型糖尿病患者皮下脂肪より分離した ADSC から作製した IPC は in vivo で血糖正常化能を発揮した

廃棄される皮下脂肪組織より分離精製された ADSC はトリパンブルー染色によってカウントすると生細胞が 95.3%であり、FACS 解析による表面マーカー解析では $CD90^{-}CD105^{-}CD31^{+}CD34^{+}CD45^{+}CD146^{+}$であった。これまでの protocol に沿い、3 passage 後に IPC へ分化誘導を行った。完成した IPC は SI を計測すると 4.2 と良好であった。Streptozotocin (STZ) 200 mg/Kg を腹腔内投与され、完全に糖尿化した（随時血糖が 400 mg/dl 以上単回もしくは 350 mg/dl 連続 2 回記録したもの）ヌードマウスの腎被膜下にこの IPC 2.0×10^{6}個を移植すると、8 日目で血糖値が正常化し、この正常血糖は 30 日まで維持された（図 3）。一方、生食を投与された群（コントロール）は血糖上昇が継続し、多飲多尿は改善されず、血糖の正常化は見られず高血糖で死亡に至った［7］。

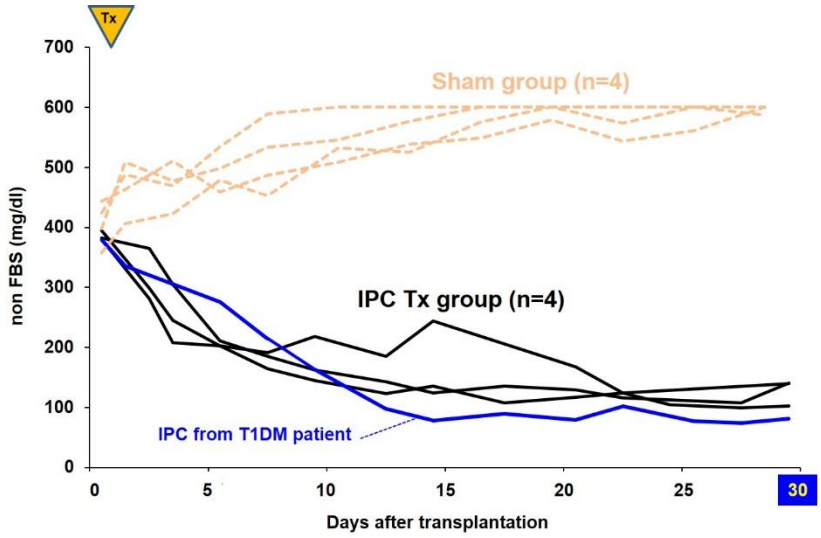


図 3. I 型糖尿病手術患者より得た皮下脂肪から作製された IPC の移植後血糖推移

STZ誘導（200 mg/Kg i.p.）糖尿ヌードマウスの腎被膜下に、術中廃棄される脂肪組織から分離精製したADSCをIPCに分化誘導し、移植を行ったのちのヌードマウスの非空腹時血糖値変動。コントロール（sham）群は生理食塩水を同部位に注入した。青線がI型糖尿病患者の脂肪組織から作製したIPC移植マウスの血糖。

Tx：移植、non FBS：非空腹時血糖。

3. 糖尿病自然発症した NOD マウス皮下脂肪より作製された IPC は 30 日に亘り糖尿病自然発症した NOD マウスの血糖を正常化した

上記 1 の *in vitro* 実験で証明された NOD マウスの IPC を用いて、2 と同様の手技を用いて糖尿病を自然発症した NOD マウスの腎被膜下に 2.0×10^6個を移植した（I 型糖尿病患者から作製した IPC を自家移植するモデル)。完成した IPC の SI は 3.7 と良好であった。血糖値は移植後比較的速やかに 200 mg/dl 以下へ降下し、その後 30 日に亘り、ほぼ 200 mg/dl 以下を維持し（図 4)、多飲多尿は消失し、良好な体重増加が得られた。低血糖に基づくと考えられる異常は出現しなかった。30 日目に担 IPC 腎の摘出を行ったところ、血糖が速やかに再上昇した。腎被膜下には移植された IPC が確認され、血管新生を認めた。また、移植された IPC は ICA 陽性、ZnT8 陽性であったが、抗 GAD 抗体には染色されなかった（図 5）[8]。

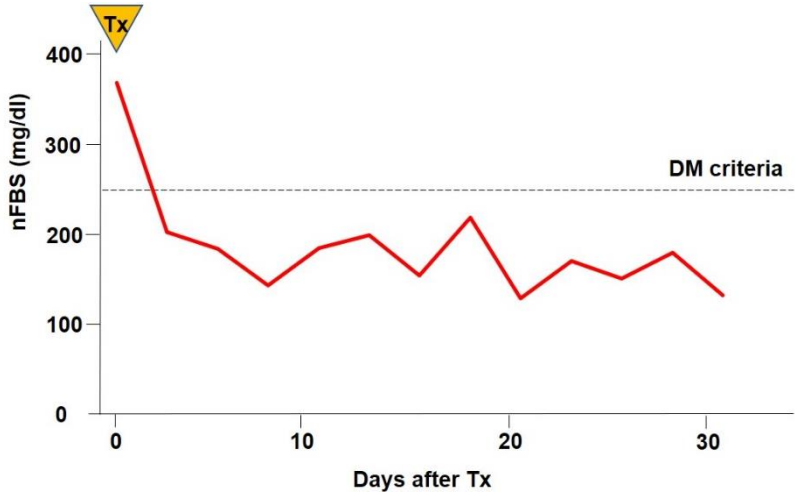


図 4. 糖尿自然発症した NOD マウス皮下脂肪から作製された IPC の糖尿自然発症した NOD マウスへの移植後血糖推移

糖尿病の条件を満たした糖尿自然発症 NOD マウスの皮下脂肪から ADSC を分離精製し、IPC を分化誘導した。別の糖尿病自然発症 NOD マウスの腎被膜下に 2.0×10^6個移植を行ったのちの血糖値変動。移植後速やかに血糖値は 200 mg/dl 以下に降下し、その後 30 日間は 250 mg/dl を下回る血糖値で推移した。Tx：移植、DM criteria：糖尿病と規定される条件（クライテリア）、non FBS：非空腹時血糖。

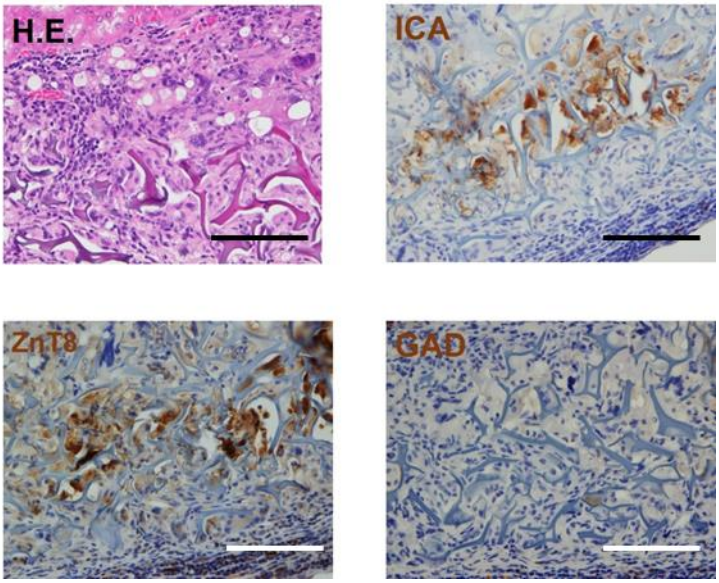


図 5. 30 日目に摘出した腎の組織像

30 日目に NOD マウスレシピエントの担 IPC 腎を摘出した。H.E.染色では IPC が腎被膜下に証明され、抗 ICA 抗体陽性（右上）、抗 ZnT8 抗体陽性（左下）、抗 GAD 抗体陰性（右下）であった（すべて×400）。H.E.: ヘマトキシリン-エオジン染色、ICA：膵島細胞質抗体、ZnT8：亜鉛トランスポーター 8、GAD：グルタミン酸脱炭酸酵素。スケールバーはいずれも 50 μ m。

考　察

膵島移植は極めて低侵襲の細胞移植医療であり、インスリンの絶対的枯渇が原因である I 型糖尿病に対する根治的治療のオプションとして欧米では認知されている。しかし、移植に際して大量の膵島を必要とするほか、インスリン完全離脱には複数回の移植が必要という報告もあり、絶対的ドナー不足に悩む我が国においては、新たな cell source の開拓が急務である。これまでに我々は、脂肪由来幹細胞（adipose-derived stem cell : ADSC）を用いて、糖濃度に応じて自律的にインスリンを分泌するインスリン産生細胞（insulin producing cell : IPC）を迅速かつ簡便に分化誘導する protocol を確立した。ただし、実際に臨床応用を考慮するにあたっては、機能的に未だインスリン応答能が低いこと、また、均一な細胞作製、多種の他動物由来成分を含む溶液・試薬を要することが課題であった。我々はこの問題点に関し、3 次元培養・xeno-antigen free の protocol を樹立し、より臨床応用可能なレベルの IPC の創出に成功した。そこで、膵島移植の抱える諸問題（脳死ドナーが少なく、また膵臓移植とのアロケーションシステムも確立されていないため、膵島移植に供される膵臓は極端に少ないこと・アロ移植であるため、一生涯に亘る免疫抑制が必要であること・移植のタイミングが脳死ドナーの出現に依存しているので極めて突然であることなど）を解決するために、我々は、「I 型糖尿病患者自身の皮下脂肪から ADSC を分離精製し、我々の樹立した protocol で IPC を分化誘導し、これを低侵襲な腹腔鏡下に自家移植する」という戦略を立て、臨床応用を目指している。

しかし、ここで問題となるのは、「インスリン分泌能のない I 型糖尿病患者の脂肪から分離精製された ADSC を分化誘導した際に、インスリンを分泌できるインスリン産生細胞を作製できるのか」という点と、「I 型糖尿病患者へ移植された IPC は、もともと膵島をターゲットとしている I 型糖尿病患者の自己免疫によって破壊されないのか」という科学的問いである。

前者に関しては、I 型糖尿病患者の体内で破壊されているのは膵島（β 細胞）であり、また、ADSC は多能性（分化能）を保持しているため、恐らく問題ないと予想された。ただし、I 型糖尿病患者の脂肪をコマーシャルに得るのは困難であったため、I 型糖尿モデルマウスである NOD マウスを用いて基礎的実験を進めつつ、我々の教室（徳島大学・

消化器・移植外科）で手術時に廃棄される脂肪組織から ADSC 分離精製の実験を重ねた。偶然、I 型糖尿病患者が手術を受ける機会があり、その際の廃棄された脂肪を用いて、同様の検討を行った。その結果、糖尿病発症したマウスおよびヒトの皮下脂肪から分離精製された ADSC から IPC を分化誘導しても、*in vitro*／*in vivo* ともに機能的であることが証明された。

一方、後者に関しては、自家移植であるために、移植された IPC は移植免疫によって排除されることはないが、I 型糖尿病は自己免疫疾患であり、その自己免疫によって破壊される可能性が高いと予想された。しかしながら、IPC は生来存在している細胞ではなく、新たに作製されたものであり、自己免疫系に抗原として認知されるか否かも含め、その詳細は不明である。これは、そもそも I 型糖尿病の自己免疫のターゲットは近年急速に研究が進んでいるものの、いまだ不明であるために、IPC が自己免疫抗原として認知されず、破壊を受けない可能性も 0 ではないことを示唆している。さらに、新たに作製された細胞であるため、自然免疫による排除を受けるか否かも検討する必要がある。このため、この検討結果は、我々の戦略を臨床応用するに当たり非常に興味深い示唆を与えるのみならず、I 型糖尿病の発症機序自体に迫る科学的研究、および今後の再生医療技術を応用した細胞治療に関する知見として非常に興味深いと考えられた。今回の我々の検討結果においては、作製された IPC は少なくとも移植後 30 日間において、自然免疫・自己免疫の攻撃を受けて機能を失うことはなかった。しかしながら、そもそも I 型糖尿病は、膵臓に存在する膵β細胞の 70～90%以上が破壊されて初めて糖尿病が顕性するという報告もあり、我々の IPC も単に移植細胞数が大量であったために 30 日までに糖尿を発症（再発）する数の破壊を受けなかった、と考えることも可能である。事実、preliminary な結果ながら、この「I 型糖尿病発症後の IPC 自家移植モデル」につき、100 日まで長期観察を行うとやはり糖尿再発を見る個体を確認しており、今後の詳細な検討が待たれる（未発表データ）。しかしながら、自己免疫学的な破壊を長期には受けるとしても、IPC を移植すると、少なくとも短期においては I 型糖尿病における高血糖を正常化させることが出来るのは事実であり、今後、十分な IPC 数を移植すれば一生涯糖尿発症を見ないのか（cell fate の検討）、また、破壊を受けるのであれば移植 IPC をいかに保護するのか（細胞のコーティングや自己免疫調整方法）、破壊を遅延させるか（長期機能を保持するには自己免疫による IPC 破壊を防御するのではなく、その作用を遅延させればよいという考え方もある）といった対策を検討することで、IPC 単回移植の戦略や、繰り返し移植の可能性などの研究を発展させていくことが可能であると考えられた。

いずれにせよ、今回に検討においては、「インスリン分泌能のない I 型糖尿病患者の脂肪から分離精製された ADSC を分化誘導しインスリン産生細胞を作製できるのか」という点に関しては「機能的に十分なインスリン産生細胞が作製可能である」、また、「I 型糖尿病患者へ移植された IPC は、もともと膵β細胞をターゲットとしている I 型糖尿病患者の自己免疫によって破壊されないのか」という点に関しては「少なくとも移植後短期間は破壊されることはない」という回答が得られた。我々の戦略を臨床応用するに当たって、Go／No-go 判断の観点からこれらの結果を考察すると、十分に promising な結果であると言うことが出来るため、今後も我々の本戦略に関して充分に科学的検討を重ねたうえで、可及的速やかに医師主導治験へ繋げていくことを目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学医歯薬学研究部消化器・移植外科の島田光生教授、徳島大学糖尿病臨床・研究開発センターの松久宗英教授である。この場をお借りし両教授に厚く御礼申し上げます。

文　献

1） Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med. 2000 Jul 27;343(4):230-8. doi: 10.1056/NEJM200007273430401. PMID: 10911004.

2) Ikemoto T, Feng R, Shimada M, Saito Y, Iwahashi S, Morine Y, Imura S. A new established 2-step acceleration protocol with HDAC inhibitor for generating insulin-producing cells from adipose derived mesenchymal stem cells. Pancreas. 2018 Apr;47(4):477-481. doi: 10.1097/MPA.0000000000001017. PMID: 29517636

3) Ikemoto T, Feng R, Iwahashi SI, Yamada S, Saito Y, Morine Y, Imura S, Matsuhisa M, Shimada M. In vitro and in vivo effects of insulin-producing cells generated by xeno-antigen free 3D culture with RCP piece. Sci Rep. 2019 Jul 24;9(1):10759. doi: 10.1038/s41598-019-47257-7. PMID: 31341242; PMCID: PMC6656749.

4) Ohta S, Ikemoto T, Wada Y, Saito Y, Yamada S, Imura S, Morine Y, Shimada M. A change in the zinc ion concentration reflects the maturation of insulin-producing cells generated from adipose-derived mesenchymal stem cells. Sci Rep. 2019 Dec 10;9(1):18731. doi: 10.1038/s41598-019-55172-0. PMID: 31822724; PMCID: PMC6904733.

5) Wada Y, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Saito Y, Yamada S, Shimada M. The Differences in the Characteristics of Insulin-producing Cells Using Human Adipose-tissue Derived Mesenchymal Stem Cells from Subcutaneous and Visceral Tissues. Sci Rep. 2019 Sep 13;9(1):13204. doi: 10.1038/s41598-019-49701-0. PMID: 31519950; PMCID: PMC6744430.

6) Tokuda K, Ikemoto T, Saito Y, Miyazaki K, Yamashita S, Yamada S, Imura S, Morine Y, Shimada M. The Fragility of Cryopreserved Insulin-producing Cells Differentiated from Adipose-tissue-derived Stem Cells. Cell Transplant. 2020 Jan-Dec;29:963689720954798. doi: 10.1177/0963689720954798. PMID: 32878465; PMCID: PMC7784513.

7) Ikemoto T, Tokuda K, Wada Y, Gao L, Miyazaki K, Yamada S, Saito Y, Imura S, Morine Y, Shimada M. Adipose Tissue From Type 1 Diabetes Mellitus Patients Can Be Used to Generate Insulin-Producing Cells. Pancreas. 2020 Oct;49(9):1225-1231. doi: 10.1097/MPA.0000000000001663. PMID: 32898009.

8) Tokuda K, Ikemoto T, Yamashita S, Miyazaki K, Okikawa S, Yamada S,Saito Y, Imura S, Morine Y, Shimada M.Autotransplanted insulin-producing cells differentiated from adipose-tissue-derived stem cells of non-obese diabetic mouse show resistance to autoimmunity (under review).

9) Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C et al. A Comparison of the Preservation of Mouse Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Using the University of Wisconsin Solution and Hank's Balanced Salt Solution. Stem Cells Int. 2018;6:2018:1625464