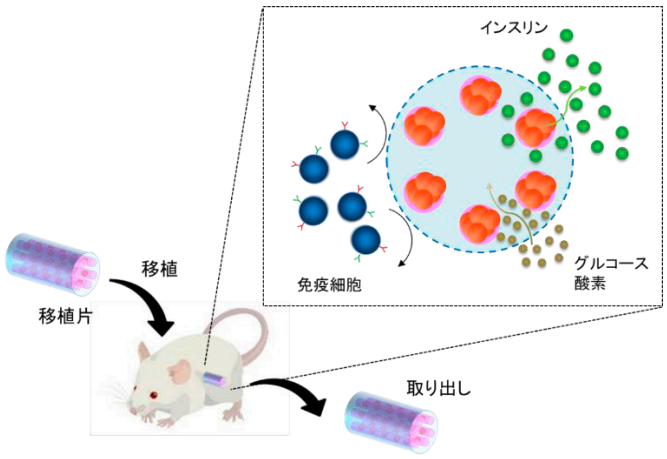
| 87　糖尿病治療のための取り出し可能な膵島移植片の開発 | 竹内　昌治 |
|---|---|

**【目的】**糖尿病の治療法として、ドナーから得た膵島を糖尿病患者に移植することによって、糖尿病患者の血糖値を正常化する細胞移植療法が世界中で盛んに研究されている。特に近年、ヒト iPS 細胞から分化によって膵島の細胞を調整する方法が進展し、ドナーに依存しない移植療法の可能性が高まり、さまざまな移植方法が開発されている。ヒト iPS 細胞由来の膵島を移植する際は、異物反応から細胞を保護し体内で長期間維持するだけでなく、未分化細胞混入のリスクなどから患者の安全性を確保し、緊急時には移植した細胞を取り出しできることが重要だと考える。これまでの研究で、ハイドロゲルなどを用いて細胞を保護して移植する方法が開発されているが、ヒト iPS 細胞由来膵島とホスト間の強い異物反応を抑制し、かつ完全に取り出すことができる移植片の実現は困難であった。本研究では、マイクロ流体技術を応用して、糖尿病治療のための取り出し可能な膵島移植片を開発した（下図）。膵島はヒト iPS 細胞から分化誘導して調製したものを使用し、直径 6 mm のハイドロゲル内にレンコン状構造にカプセル化することで取り出しに必要な強度とカプセル化した細胞機能の維持が可能となった。

**【方法】**まず、ハイドロゲル内のどの位置に細胞を配置するかを調べるために、直径 6 mm のハイドロゲルにランダムに細胞をカプセル化した移植片を作製し、細胞の生存率を評価した。次に、レンコン状構造に細胞を配置するためのデバイスを作製し、それを用いてヒト iPS 細胞由来膵島をレンコン状にカプセル化した移植片を作製した。作製した直径 6 mm の移植片と既存の直径 1 mm の移植片を、免疫系をもつマウスに移植し、強度と異物反応による細胞の付着度合いを比較した。さらに、直径 6 mm の移植片を、糖尿病モデルマウスに移植し、随時血糖値を測定し血糖値の制御を行った。移植片は適宜、マウス体内から取り出すことで、高血糖の再発および移植片の取り出し性能を確認した。

**【結果】**ハイドロゲル内のどの位置まで細胞が生存しているかを調べたところ、ハイドロゲルのエッジから 1 mm 以内にある細胞は十分に生存していることを確認した。そこでエッジから 1 mm 以内に細胞が配置されるようなレンコン状構造をもつ移植片を作製した。作製した移植片を、免疫系を持つマウスの腹腔に移植したところ、既存の 1 mm 移植片に比べ、異物反応による線維化が抑制され、また移植後 1 年の長期にわたり移植片の形態を保つことが確認できた。この移植片を、糖尿病モデル免疫不全マウスの腹腔に移植したところ、移植後最大半年以上という長期での血糖値正常化を達成した。移植したマウスには、癒着や腫瘍形成などは起こらず安全性も確認でき、適宜体内から移植片を取り出すことにも成功した。

ヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化したレンコン状構造の移植片の模式図



# 87. 糖尿病治療のための取り出し可能な膵島移植片の開発

竹内　昌治

東京大学 大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻

Key words：糖尿病，膵島移植，細胞カプセル化，ハイドロゲル

## 緒　言

糖尿病の治療法として、インスリン療法がある。しかしこの治療法では、患者の QOL の低下を招くだけでなく、食事や運動などで大きく変動する血糖値を制御することが困難である。一方で、より重篤な糖尿病患者に対する画期的な治療法として、膵島移植がある。しかしこの治療法の欠点として、絶対的なドナー不足が挙げられる。また、インスリンからの離脱までに複数回の移植を必要とし、長期インスリン離脱が困難であることや継続的な免疫抑制剤を必要とするなどの制限もある。

近年では、膵島移植の問題点であるドナー不足を解決するために、異種の膵島細胞や、多能性幹細胞由来の膵島細胞を使った移植も研究されている［1，2］。このような場合は、安全性を向上させかつホストの免疫反応から移植細胞を保護するため、ハイドロゲルビーズ［3，4］または半透膜のバッグ［5］に細胞をカプセル化して移植することが望ましい。しかし、半透膜バッグを用いた手法はバッグ内の容量が数十マイクロリットル程度であるという制限があり、人間の血糖値を正常化するために十分な細胞数を投入するには大幅な容量のスケールアップが必須となるが、透析バッグの容量を増大させると、過剰な細胞同士の凝集による壊死や機能低下が起こりうるため、現状のシステムではスケールアップが困難である。一方、 ブタの膵島細胞やヒト初代膵島およびヒト ES 細胞由来膵島をアルギン酸ハイドロゲルにビーズ状にカプセル化した方法では、これらの移植片が球状のビーズであり、移植後は体内で分散するため、細胞に問題が生じた場合は、回収できない欠点がある。

本研究では、直径 6 mm のハイドロゲルファイバーにヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化したレンコン状構造の移植片を開発した（図 1）。開発した移植片はビーズと異なり単一の移植片として扱える利点があり、これを糖尿病モデルマウスに移植し、血糖値制御や移植片の取り出し、交換が可能であることを実証した［6］。

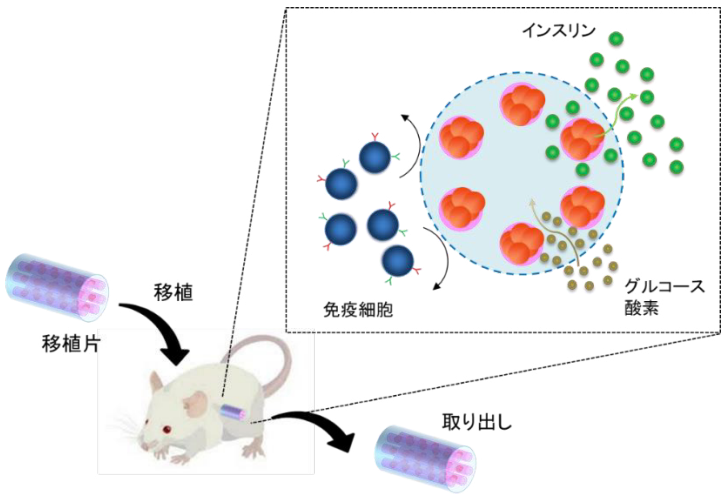



図 1.　ヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化したレンコン状構造の移植片の模式図

## 方法および結果

### 1. レンコン状構造の移植片の作製

通常、移植片の直径が大きくなると細胞に対する酸素や栄養供給の問題から細胞の生存率を保つことが難しい。そこでまず、ハイドロゲル内のどの位置に細胞を配置するかを調べるために、直径 6 mm のハイドロゲルにランダムに細胞をカプセル化した移植片を作製し、細胞の生存率を評価した。その結果、図 2a に示す通り、ハイドロゲルのエッジから 1 ミリメートル以内にある細胞は十分に生存していることが示唆された。

この結果をもとに、マイクロ流体デバイスを用いてエッジから 1 ミリメートル以内に細胞が配置されるようなレンコン状構造をもつ移植片を作製した（図 2b～d）。作製した移植片の細胞に対し、蛍光染色による Live/Dead アッセイを行ったところ、図 2e に示す通り、カプセル化したほとんどの細胞が生存していることが確認できた。

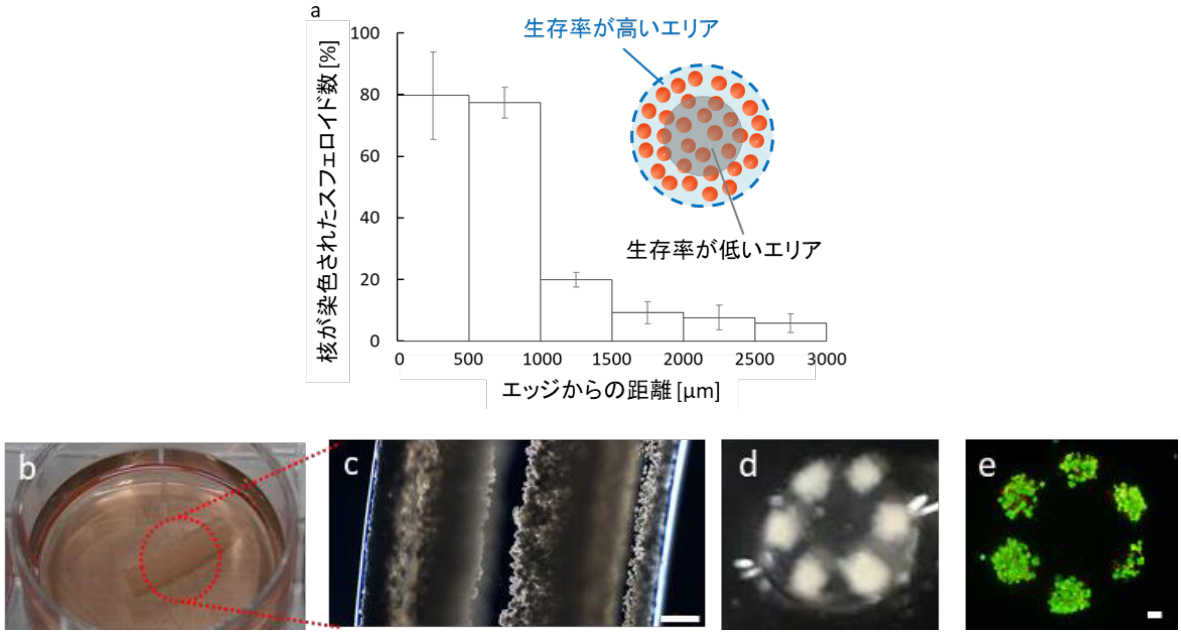



図 2. レンコン状構造の移植片の作製

a) 6 mm のハイドロゲル内でのヒト iPS 細胞由来膵島の生存率。

b, c) 作製したヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化したレンコン状構造の移植片（b）およびその拡大図（c）。

d, e) レンコン状構造の移植片の断面の写真（d）およびその蛍光画像（e）。

スケールバー：500 μm（c、e）。

### 2. 既存のファイバー状移植片との比較

我々の研究室では、これまでファイバー状の移植片［7］はビーズ状の移植片に比べて、取り出しが可能であるという利点に着目して研究を進めてきた。特に、先行研究において、直径 1 mm のハイドロゲルは μm スケールのハイドロゲルと比べて異物反応が抑制される傾向にあることを示した［8］。しかし、ハイドロゲル内にヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化した場合は、細胞種や種差の影響から、ホストから受ける異物反応が強くなってしまう。また、ヒトへの移植を見据えた際に、長期移植に耐えうる強度を有しているかも重要である。

そこで、既存の直径 1 mm のファイバーと直径 6 mm のレンコン状構造の移植片にそれぞれヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化し、それぞれを C57BL/6 マウスの腹腔内に移植した。移植後 4 か月に、開腹し移植片を回収し、異物反応により付着した細胞層の厚さを比較した（図 3a）。既存の直径 1 mm のファイバーは、移植片が線維化し体内に癒着しており、厚い細胞層ができていた。それに対し、直径 6 mm のレンコン状構造の移植片は、体内に癒着しておらず、細胞層も一部薄くできているにとどまった。

次に、長期移植に耐えうる強度を有しているかを確認するために、それぞれの移植片を移植前、移植後 2 カ月、4 カ月、1 年時における機械的強度を測定した（図 3b）。その結果、既存の直径 1 mm のファイバーは、移植前は貯蔵弾性率が損失弾性率より大きかったが、移植後 2 カ月で貯蔵弾性率と損失弾性率がほぼ同じくらいになり、移植後 4 カ月では貯蔵弾性率が損失弾性率より小さくなってしまった。この結果、移植片の構造が不安定であることが示唆され、実際に移植後 1 年までは形状を保つことができなかった。一方、直径 6 mm のレンコン状構造の移植片は、移植前移植後ともに、貯蔵弾性率が損失弾性率より大きい状態を保っており、1 年の長期移植において形状を保っていた。

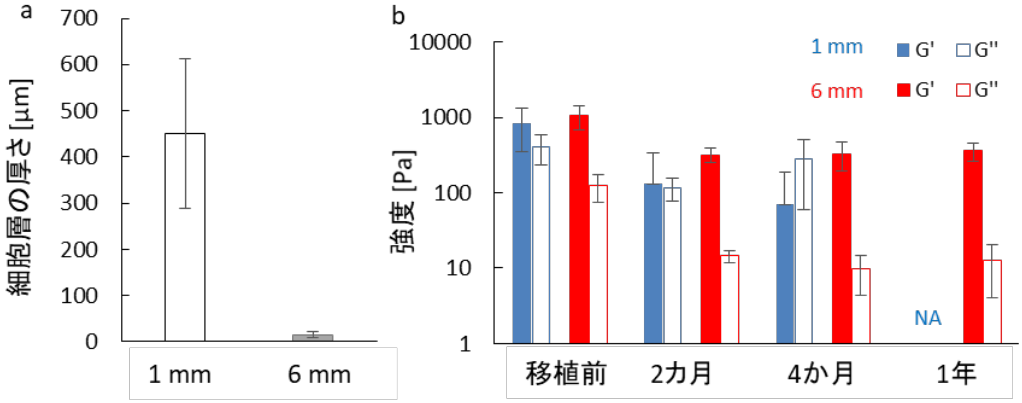



図 3. ヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化した直径が 1 mm の移植片と直径が 6 mm の移植片の比較

a） 移植後 4 カ月の異物反応により付着した細胞層の比較。

b） 移植片の機械的強度の比較。

### 3. 糖尿病モデルマウスへの移植

最後に、糖尿病への治療効果を確認するために、糖尿病モデルマウスを準備し、直径 6 mm のレンコン状構造の移植片のマウス腹腔内への移植を行った。

まず、NOD-Scid マウスにストレプトゾシン（STZ）を投与することにより、STZ 誘発糖尿病モデルマウスを作製した。投与後 3 日以降に血糖値を測定し血糖値が 350 mg/dL 以上を 2 日以上連続したものを糖尿病発症とした。

次に、$6\times10^6$cells のヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化した直径 6 mm のレンコン状構造の移植片を作製し、糖尿病モデルマウスの腹腔内に移植した。移植群／非移植群それぞれのマウスの随時血糖値を測定し経過を観察したところ、非移植群のマウスは血糖値に変化がなかったのに対し、移植群のマウスは移植後最大半年以上という長期での血糖値正常化を達成した（図 4）。移植したマウスには、癒着や腫瘍形成などは起こらず安全性も確認でき、適宜体内から移植片を取り出すことも可能であった。移植片を取り出したマウスは、数日して高血糖症状を再発したことから、移植片によって血糖値が制御できていることが示された。

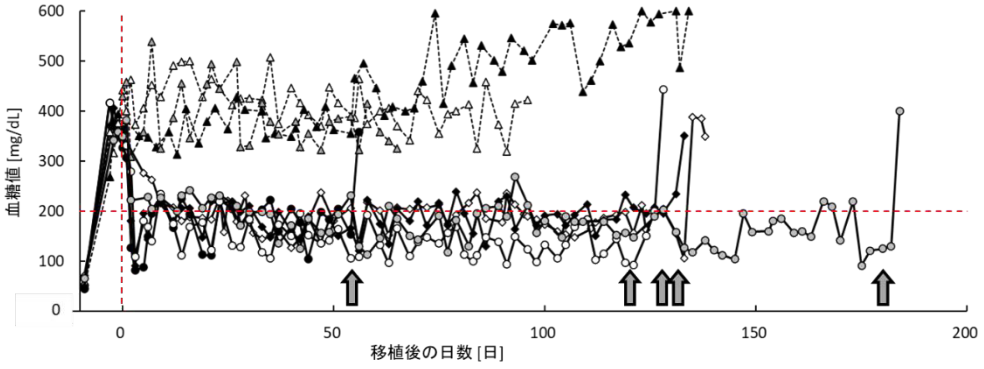



図 4. 直径が 6 mm のヒト iPS 細胞由来膵島移植片を移植した後の、長期にわたる血糖値の変化

移植後最大半年という長期での血糖値正常化を達成した。矢印の時点で移植片を回収し、高血糖の再発を確認した（実線：移植あり、点線：移植なし）。

## 考　察

直径 6 mm の移植片においてエッジから 1 mm 以内の距離にある細胞の生存率が高かった。これは拡散により、エッジから 1 mm 以内においては酸素や栄養素の供給が十分に行われていることを示唆している。この点を踏まえ、移植片の構造をレンコン状にすることで、移植片のサイズを大きくしても、カプセル化された細胞の機能を保つことが可能となった。また、直径 1 mm 以上のハイドロゲルカプセルが異物反応を軽減する傾向があることが報告されている［3, 8］。しかし、ヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化した場合においては、直径 1 mm の移植片をマウスに移植すると、移植片は強い異物反応を示した。この結果は、おそらくマウスとヒトの種差によるもので、ヒト iPS 細胞由来膵島はラットの初代膵島などよりも重度の炎症を誘発すると考えられる。直径 6 mm の移植片は、ヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化した場合でも異物反応を軽減する傾向があることがわかった。より大きな移植片が異物反応を軽減するメカニズムは解明できなかったが、移植片のサイズとマクロファージの機能が関与していると考えられる［4］。さらに、直径 6 mm の移植片は、直径 1 mm の移植片よりも機械的強度が優れている。細い移植片は曲がりやすく、移植後に最終的に絡まってしまうことがある。これは、移植片の表面への細胞沈着を促進する可能性がある。対照的に、直径 6 mm の移植片は、機械的強度が増加しているため、生体内で曲がらず、これによって細胞の沈着が軽減されると考えられる。

ヒト iPS 細胞由来膵島をはじめとした幹細胞を用いた細胞治療では、長期的な移植機能に加えて治療の安全性を考慮する必要がある。直径 6 mm のレンコン状構造の移植片は、異物反応を緩和し、また腫瘍形成を起こさずかつ緊急時に取り出しも可能であることが期待されることから、ヒト iPS 細胞由来膵島をはじめとしたヒト iPS 細胞由来分化細胞を安全に移植することができると考えている。今後は移植片の構造や使用しているハイドロゲルの最適化により、様々なヒト臨床応用を検討したい。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学生産技術研究所の小沢文智、東京医科歯科大学総合研究機構の長田翔伍である。ヒト iPS 細胞由来膵島は、国立国際医療研究センターの大河内仁志先生、矢部茂治先生より提供していただいた。本研究は、上原記念生命科学財団の研究助成金（2020 年度）の支援を受けて推進された。

## 文献

1） Rezania A. *et al.*, Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. Nature Biotechnology. 2014, 32: 1121-1133, DOI: 10.1038/nbt.3033

2） Yabe S. G. *et al.*, Induction of functional islet-like cells from human iPS cells by suspension culture. Regenerative Therapy. 2019, 10: 69-76, DOI: 10.1016/j.reth.2018.11.003

3） Veiseh O. *et al.*, Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. Nat Mat. 2015, 14: 643-652, DOI: 10.1038/nmat4290

4） Vegas A. J. *et al.*, Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. Nat. Med. 2016, 22: 306-311, DOI: 10.1038/nm.4030

5） Agulnick A. D. *et al.*, Insulin-Producing Endocrine Cells Differentiated In Vitro From Human Embryonic Stem Cells Function in Macroencapsulation Devices In Vivo. Stem Cell Translational Medicine 2015, 4: 1214-1222, DOI: 10.5966/sctm.2015-0079

6） Ozawa F. *et al.*, Lotus-root-shaped cell-encapsulated construct as a retrieval graft for long-term transplantation of human iPSC-derived β-cells. iScience 2021, 24: 102309, DOI: 10.1016/j.isci.2021.102309

7) Onoe H. *et al.*, Metre-long cell-laden microfibers exhibit tissue morphologies and functions. Nat. Mater. 2013, 12: 584-590, DOI: 10.1038/nmat3606
8) Watanabe T. *et al.*, Millimeter-thick xenoislet-laden fibers as retrievable grafts mitigate foreign body reactions for long-term glycemic control in mice. Biomaterials 2020, 225: 120162, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120162