

Title	Combined Transplantation of Pancreatic Islets and Adipose Tissue-Derived Stem Cells Enhances the Survival and Insulin Function of Islet Grafts in Diabetic Mice
Author(s)	大村, 仁昭
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59821">https://hdl.handle.net/11094/59821</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#"></a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	おおむらよしあき 大村仁昭
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第25597号
学位授与年月日	平成24年8月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Combined Transplantation of Pancreatic Islets and Adipose Tissue-Derived Stem Cells Enhances the Survival and Insulin Function of Islet Grafts in Diabetic Mice (脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)を応用した次世代型膵島移植法の確立)
論文審査委員	(主査) 教授 土岐 祐一郎 (副査) 教授 高原 史郎 教授 澤 芳樹

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

膵島移植は、ドナー膵臓から膵島を分離・純化し1型糖尿病患者の門脈内に移植膵島を投与する組織移植で、臓器移植である膵臓移植に比べて、手術侵襲が低く、安全性の点でも優れている。しかし、1型糖尿病患者をインスリン療法より離脱させるためには平均2.6人のドナーが必要であり、インスリン離脱が得られたとしても、5年後にはインスリン離脱率は7.5%にまで低下し、その長期成績は不良である。したがって膵島移植の成績改善には移植膵島の生着率向上が必須であり、そのためには移植後早期からの移植膵島への新生血管の誘導など移植膵島周囲の微小環境再構築が必要と考えられる。さて近年、体性幹細胞の一つである脂肪組織由来幹細胞(adipose tissue-derived stem cells, 以下ADSCs)が再生医療の細胞源として注目されている。ADSCsは、血管新生能や抗炎症効果、多分化能を持ち、また臨床応用に有利な採取の容易さを兼ね備えていることが報告されている。そこで我々は、膵島移植にADSCsを併用したCombined膵島移植を考案し、それによる膵島移植成績向上の可能性について検討した。

## 〔方法〕

ADSCsはレシピエント由来であることを想定して、12週齢オスのC57BL/6Jマウスから皮下脂肪を採取し、脂肪組織を消化酵素で処理したのち、培養・増殖してADSCs単離した。そのADSCsをBALB/cAマウスの膵臓から分離した膵島と以下のグループで、糖尿病化したC57BL/6Jマウスの腎被膜下に同種異系モデルで膵島移植した。

移植グループをAからIまでの9グループに分け、グループAからCは膵島だけを、グループDからHは膵島とADSCsとを、グループIはADSCsだけを移植した。グループAは限界治療量の膵島の半量の100 Islet equivalents (IEQ)だけを、グループBは限界治療量の膵島200 IEQだけを、グループCは根治量の膵島400 IEQだけを移植した。グループDはグループAと同量の膵島100 IEQを同体積分のADSCs  $1 \times 10^5$ 個とCombined移植し、グループEからGはグループBと同量の限界治療量の膵島200 IEQをADSCs  $1 \times 10^5$ 個、 $2 \times 10^5$ 個、 $4 \times 10^5$ 個とCombined移植した。グループHはグループFと同量の膵島200 IEQとADSCs  $2 \times 10^5$ 個を、それぞれを左右別々の腎被膜下に移植した。最後に、グループIは、ADSCs  $2 \times 10^5$ 個だけを腎被膜下に移植した。

移植後は、連日非空腹時血糖を測定し、血糖値が2日連続で250mg/dl以上となった時点で拒絶とした。移植後7日目にブドウ糖負荷試験IPGTTで耐糖能を評価したうえで、移植部位の腎臓を摘出し、組織学的評価を行った。HE染色とインスリン染色で、移植グラフトの残存を確認したのちに、新生血管をvon Willebrand factorで染色し、陽性細胞数を計測した。また、その新生血管の由来をADSCsのMHC class IIであるH-2Kbで染色し確認した。最後にADSCsの抗炎症効果を確認するため、CD4+ T cell、CD8+ T cell、CD68+ マクロファージの膵島周囲への浸潤の程度を検討した。

## 〔成績〕

移植後の非空腹時血糖推移評価では、グループC(根治量膵島400 IEQ)からグループB(限界治療量膵島200 IEQ)に変更すると、移植後1日しか血糖は正常化しなかった( $p < 0.01$ )が、膵島200 IEQにADSCsをCombined移植したグループFでは、根治量膵島400 IEQを移植したグループCと同等まで血糖正常期間が延長した(膵島400 IEQ vs 膵島200 IEQ+ADSC:  $13.6 \pm 1.7$ 日 vs  $13.0 \pm 5.5$ 日,  $p = 0.82$ )。また、非空腹時血糖が正常化したグループにおいては、耐糖能も正常化していることが確認された。

各群のマウスから移植7日目に移植部位の腎臓を摘出して組織学的評価を行った。Controlの膵島400 IEQだけを移植したグループCと、膵島200 IEQとADSCs  $2 \times 10^5$ 個をCombined移植したグループFでは、移植後7日目にも膵島が腎被膜下に残存していたが、膵島200 IEQだけを移植したグループBでは残存する膵島は見出されなかった。

血管新生効果について、von Willebrand factor陽性細胞数を5視野平均して計測して評価したところ、膵島400 IEQだけのグループCでは4.2個であったが、combined移植のグループFでは6.8個と有意に多いことが確認された( $p = 0.03$ )。また、その新生血管の一部がADSCs由来であることが、H-2Kb染色陽性であることより確認された。

最後に、抗炎症効果をCD4、CD8、CD68染色で確認したところ、ControlのグループCに比べて、Combined移植のグループFでは、明らかに浸潤するT cellとマクロファージが少ないことが確認された。

〔 総括 〕

レシピエント由来の ADSCs 投与を応用した Combined 膵島移植を行うことで、糖尿病治癒に必要な移植膵島が半量まで減量が可能となり、膵島移植の理想である One-donor One-recipient 膵島移植による 1 型糖尿病根治の可能性が示された。そのメカニズムとして、ADSCs の血管新生効果と抗炎症効果による、膵島の生着率と生存率が改善したと考えられる。今後は、臨床膵島移植と同様に門脈内移植モデルでも生着延長効果が得られるかを解析する予定である。

#### 論文審査の結果の要旨

【背景・目的】膵島移植の長期成績の改善には、移植膵島の生着率向上が必須である。そのためには移植後早期からの新生血管の誘導など、移植膵島周囲の微小環境再構築が必要と考える。そこで、体性幹細胞の一つである脂肪組織由来幹細胞 (adipose tissue derived stem cells, 以下ADSCs) が、多分化能を持ち、血管分化・誘導作用や免疫抑制効果を有することに注目した。【方法・成績】異系モデルで膵島をADSCsと同時移植(combined膵島移植)したところ、マウス膵島移植における糖尿病根治量である膵島400個から200個に半減しても、移植膵島は良好に生着し、血糖を正常化でき、さらに耐糖能も膵島400個移植と同等のレベルまで正常化できた。組織学的解析では、combined膵島移植後では移植膵島は腎被膜下に形態を保って残存し、移植膵島周囲への新生血管が有意に増加し、浸潤するT cell、マクロファージが減少した。【結語】ADSCsを応用したcombined膵島移植により、移植膵島の減量が可能となり、膵島移植の理想であるone-donor one-recipient膵島移植による1型糖尿病根治の可能性が示された。

以上の功績は、博士 (医学) の学位授与に値する。