



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	https://hdl.handle.net/11094/59821
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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 2 5 5 9 7 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 1×10⁵ 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 1×10⁵ 個、2×10⁵ 個、4×10⁵ 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 2×10⁵ 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 2×10⁵ 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±1.7 日 vs13.0±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 2×10⁵ 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 〕

レシビエント由来の 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。