

Title	Layer-by-layer cell coating technique using extracellular matrix facilitates rapid fabrication and function of pancreatic β -cell spheroids
Author(s)	福田, 泰也
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72537
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 福田 泰也

	(職)	氏名
論文審査担当者	主査	大阪大学教授 土岐 祐一 郎
	副査	大阪大学教授 蘭池 章
	副査	大阪大学教授 下村 伸一 郎

論文審査の結果の要旨

本研究では、マウス由来膵β細胞株を用いて、膵β細胞スフェロイドの作製過程における交互積層細胞コート法併用の有用性を検証した。交互積層細胞コート法は、単一細胞の周囲に2種類の細胞外マトリックスによるナノ薄膜を形成させる組織工学技術である。交互積層細胞コート法の併用は、間接的な細胞間接着を増強し、早期から細胞密度の高い膵β細胞スフェロイドの構築を可能とし、グルコース反応性インスリン分泌能を向上させた。さらに、機能向上が得られた一要因として、交互積層細胞コート法がギャップジャンクション分子であるコネキシン36の発現を促進することを示した。また、同種同系糖尿病マウスを用いた動物実験では、交互積層細胞コート法を併用して作製した膵β細胞スフェロイドを移植したマウスにおいて、併用なしで作製したスフェロイドを移植したマウスよりも早期から随時血糖値の低下を認め、耐糖能の改善を示した。

以上、本論文は、膵β細胞の組織構築において交互積層細胞コート法という将来有望な組織工学技術の有用性を明らかにしたことから、再生医療分野の発展に寄与するものとして高く評価される。よって、審査の結果、本論文の筆者は、博士(医学)の学位授与に値する。

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	福田 泰也
論文題名 Title	Layer-by-layer cell coating technique using extracellular matrix facilitates rapid fabrication and function of pancreatic β -cell spheroids (細胞外マトリックスを用いた交互積層細胞コート法は膵ベータ細胞スフェロイドの早期構築を促進し機能を向上させる)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>膵島移植は、強化インスリン療法によっても血糖コントロールが不安定で生活の質が著しく低下した重症1型糖尿病患者に対する、生活の質の向上を目指した組織移植療法である。しかし、膵島移植は、臓器移植としての膵臓移植と比較して低侵襲であるものの、長期生着が難しい上に、インスリン離脱の獲得には同一患者に複数回の移植を要するため、絶対的ドナー不足が深刻な問題となっている。このため、近年では移植用細胞の供給源になりうる幹細胞を用いた再生医療、および生体内の微小環境を模倣した組織工学技術の応用に期待が高まっている。</p> <p>組織工学技術のうちスフェロイドは、膵島細胞に類似した構造をもち、構築した組織を容易に体内に注入することが可能であることから汎用性が高いとされるが、組織構築に時間を要し、構築組織が脆弱で機能性が不十分であるなどの問題がある。そこで我々は、大阪大学大学院生命機能研究科 明石 満教授らにより開発された細胞外マトリックスを用いた交互積層細胞コート法(layer-by-layer cell coating technique; LbL細胞コート法)に着目した。これは細胞外マトリックスの構成成分であるフィブロネクチンとゼラチン(コラーゲン変性体)からなるナノ薄膜を単細胞レベルで細胞表面へ形成させる、細胞膜修飾技術の一つである。ナノ薄膜が細胞間接着を促し、細胞配置を自由に制御できるとともに、細胞間相互作用を高めることが可能であり、この技術を用いることで、より迅速に機能性の高い膵β細胞スフェロイドの構築が期待できる。</p> <p>本研究では、臨床応用可能な膵β細胞の三次元構造体を開発することを目的として、スフェロイド技術にLbL細胞コート法を併用して作成した膵β細胞スフェロイドの有用性について検討した。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>MIN6(C57BL/6マウス由来膵β細胞株)のスフェロイド作成過程において、LbL細胞コート法の有無による形態的、機能的な違いを<i>in vitro</i>で比較検証した。機能評価として、培養3日目にグルコース刺激試験(低グルコース: 3.3mM, 高グルコース: 20.0mMの刺激)を行い、培養上清中のインスリン濃度をenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法で測定した。また、quantitative real-time PCR(qRT-PCR)を用いてインスリン分泌に関わるinsulin 1/2およびglucose transporter 2(GLUT2)の遺伝子発現を比較した。また、細胞間相互作用に着目した機能解析では、gap junctionに関わるconnexin 36(Cx36)の発現についてqRT-PCRおよび蛍光免疫染色法、ウェスタンブロット法を用いて比較した。その結果、LbL細胞コート法を併用することにより、培養1, 3日目いずれにおいても密度が高い、構造的に安定した細胞凝集塊が作成可能であった。機能評価では、LbL細胞コート法併用群で有意に高いstimulation index(高グルコース刺激下インスリン濃度/低グルコース刺激下インスリン濃度)を示した。さらに、LbL細胞コート法併用群において、insulin 1/2およびGLUT2の遺伝子発現上昇を認めるとともに、Cx36の発現がLbL細胞コート法併用群で高く、機能向上の一要因であると考えられた。</p> <p>次に、LbL細胞コート法を併用して作成した膵β細胞スフェロイドの有用性を<i>in vivo</i>で検証した。レシピエントにはC57BL/6マウスにストレプトゾシンを投与して作成した同種同系糖尿病マウスを用いて、腎被膜下移植を行った。随時血糖値の推移、腹腔内グルコース負荷試験(intraperitoneal glucose tolerance test; IPGTT)による耐糖能およびインスリン分泌能の違いをLbL細胞コート法の併用の有無で比較検討した。その結果、LbL細胞コート法併用群ではより早期から血糖値の低下を認めた。移植7日目に行ったIPGTTでは、LbL細胞コート法併用群でグルコース投与15分、30分後の血糖値の上昇が有意に抑えられ、マウス血清中のinsulin濃度(ELISA法で測定)も併用群で有意に高値であった。また、移植7日目において、移植組織内Cx36の発現(蛍光免疫染色法で評価)がLbL細胞コート法併用群で高値を維持していた。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>細胞外マトリックスによる交互積層細胞コート法を用いることで、形態的、機能的に優れた膵β細胞スフェロイドの構築が可能であった。本手法は幹細胞を用いた再生医療にも発展可能かつ臨床応用可能な組織工学技術であると考えられた。</p>	