

マトリゲル基底膜マトリックスを用いたマウス単離膵島の 移植法と生体内培養系の確立

比 企 能 人¹ 佐々木 敬¹ 嶋 田 耕 育²
藤 本 啓¹ 根 本 昌 実³ 宇都宮 一 典¹

¹ 東京慈恵会医科大学内科学講座 糖尿病・代謝・内分泌内科

² 東京慈恵会医科大学解剖学講座

³ 東京慈恵会医科大学附属青戸病院総合内科

(受付 平成 23 年 12 月 15 日)

ESTABLISHMENT OF A NOVEL TRANSPLANTATION METHOD FOR MURINE ISLETS EMBEDDED IN RECONSTITUTED BASEMENT MEMBRANE MATRIX

Yoshito HIKI¹, Takashi SASAKI¹, Kousuke SHIMADA²
Kei FUJIMOTO¹, Masami NEMOTO³, Kazunori UTSUNOMIYA¹

¹ *Division of Diabetes, Metabolism and Endocrinology, Department of Internal Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

² *Department of Anatomy, The Jikei University School of Medicine*

³ *Department of General Internal Medicine, The Jikei University Aoto Hospital*

To restore the function of pancreatic islet cells and to achieve radical cure in diabetes mellitus, the development of an experimental system to treat affected islets at the molecular level is an important step. In this study, we aimed to develop a technique with which isolated murine islets can be treated for maintenance of its high-dimensional structure by means of isogeneic transplantation. Islets isolated from Balb/c mice were embedded *in vitro* in a murine extracellular matrix gel and were transplanted subcutaneously to mice of the same strain. The rate of graft survival 24 hours after transplantation was high ($86.5 \pm 8.4\%$, mean \pm SEM). After 10 days, the shape of most islets had changed to the lobulated form with satellite endocrine-cell clusters. Each islet, however, still had the same percentages of endocrine components as did physiological islets *in vivo*: β cells, $74.3\% \pm 4.6\%$; α cells, $17.6\% \pm 3.1\%$; and δ cells, $6.8\% \pm 1.7\%$. Examination with the rhodamine isothiocyanate-labeled gelatin method revealed vessels still present within islets but had no blood flow. We next examined cell-cell interaction by means of the expression of E-cadherin, an intercellular adhesion molecule. At 24 hours, E-cadherin expression was increased near center of islets, but at 10 days expression had reverted to the diffuse pattern seen in islets *in vivo*. Parallel with this change in E-cadherin expression, the percentage of cells positive for proliferating-cell nuclear antigen had markedly increased to $8.5\% \pm 6.3\%$ at 24 hours but then decreased to $0.6\% \pm 0.1\%$, as observed in islets *in vivo*. We also tried to transduce to express an exogenous gene in isolated islets using an adeno-associated virus (AAV) 8 vector, so that the humanized Renilla green fluorescent protein (hrGFP) gene would be expressed under the cytomegalovirus promoter. After exposure to the AAV8 viral vector, islets were transplanted to murine subcutaneous tissue. At 10 days, expression of hrGFP was consistently observed but was confined to the periphery of the islets.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2012;127:49-61)

Key words: islet transplantation, basement membrane matrix, gene therapy, adeno-associated viral vector

I. 諸 言

ホルモン欠乏症のうち、インスリン分泌の絶対的不足または相対的不足を特徴とする疾患がある。そのうち何らかの原因、多くは自己免疫により絶対的なインスリン欠乏となる病型は1型糖尿病、一方、肥満等によりインスリン作用の需要が高まり、かつ緩徐にインスリン欠乏が進行する相対的なインスリン不足の病型は2型糖尿病として知られる。糖尿病治療の目標は、血糖コントロールを是正し糖尿病合併症の発症および進展を阻止することである。Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)¹⁾、UK Prospective Diabetes Study (UKPDS)²⁾、Kumamoto Study³⁾の報告からも血糖コントロールの改善が糖尿病合併症の発症および進展予防につながることは実証されている。よって、糖尿病の発症原因や病型にかかわらず、治療目的は血糖値を可能な限り正常な状態に近づけることにある。そのためには、膵島機能の正常化するすなわちブドウ糖応答性インスリン分泌能の保たれた膵β細胞が必要十分な細胞量として確保されていることが治療上もっとも重要である。しかし既報によると、糖尿病発症時にはすでにインスリン分泌能は健常者の約半分程度にまで低下しており、発症後は治療的介入がなされるにも拘らず年々低下してゆく症例が多いことが知られている⁴⁾。また、インスリン分泌能の低下と膵β細胞量の関係については十分解明されていないが、2型糖尿病患者の剖検膵を解析した結果では、2型糖尿病患者の膵β細胞量は健常人の40～60%程度に低下していることが示されている⁵⁾。

減少したインスリンの補充を目的とした現行の治療法として、インスリン皮下注射療法ならびに膵島/全膵移植療法がある。しかしながら現在までのインスリン治療は、たとえポンプ療法によったとしても、オンデマンド型のシステムではないため低血糖の危険性が常に存在し、さらに過剰なインスリン補充により肥満を助長すること、現行の薬物治療では食後高血糖の是正等きめ細やかなコントロールが実現できないこと、など解決すべき課題が残っている。つまり現行の治療法では、内因性の膵島機能や膵β細胞量が補完されないために健常者と同様の正常な血糖状態を達成するこ

とが困難な状況である。一方、同種移植療法には免疫抑制療法の副作用に加えて倫理的な問題とともにドナーが圧倒的に不足している。また、膵島移植時には大量の膵島や免疫抑制療法を必要とする上、移植後は膵島細胞量が増加せず約5年で多くの症例は移植前のインスリン治療に戻ってしまう現状にある。

これらの状況に対して、近年、膵内分泌の再生医療が未来の治療法として大いに期待されている。最終的な治療目的は、膵β細胞の機能障害を改善し細胞量の補完することにより膵β細胞異常を根治することである。遺伝子導入等の治療的介入により恒常的に制御されたインスリン分泌能を有する膵β細胞ができれば、限られた膵島をもとに治療が可能だからである。

膵島は、膵臓内で内分泌細胞、神経および血管から成る多細胞器官であり、特異な三次元構造により、その統合された機能を発揮している。β細胞を含む5種類の内分泌細胞から構成される膵島は、単なる多細胞体ではなく糖代謝恒常性を維持する高次に統合された機能単位である。すなわち、膵島として多細胞体を構築することが、膵β細胞のブドウ糖応答性インスリン分泌能の発現において重要である⁶⁾。しかしながら、膵島の基本構築や機能を維持したまま、インスリン分泌機能を有する単離膵島を得ることは技術的に容易ではない。単離した膵島は培養条件を整えたとしても、通常の単層培養用の条件では膵島の構造が変化し、線維芽細胞様の成分が単層に広がって増殖し、ホルモン産生細胞は消失して行くことが知られている。これにより24時間以内に膵島としての各内分泌細胞の構成比率も大きく変化する。このため、膵島単位における機能、とくにブドウ糖応答性インスリン分泌能の制御の解析は困難である。また、膵島細胞への遺伝子導入などの介入操作、遺伝子の導入を行った後の膵島機能の評価も不可能である。以上より、膵β細胞異常を対象とした再生医療の検討においては、単一の前駆細胞に基づく*in vitro*培養系ではなく、膵島単位での多くの幹細胞が関与し三次元的な基本構築を維持しながら、膵島細胞を評価しうる実験系の確立が必須と考えられる。

近年、膵β細胞異常に対する新規治療法として

遺伝子治療を用いた再生医療が期待されており、膵島細胞に対する高効率な遺伝子導入法を確立する必要がある。臨床応用可能な遺伝子治療を目的とした場合、安全性が高く、膵β細胞のような非分裂細胞にも効率的に遺伝子導入が可能で、さらに導入遺伝子が長期間安定して発現する特性が求められる。アデノ随伴ウイルスベクター（以下AAV）が上記の条件を満たしており、その高い安全性により、米国を中心に海外における遺伝子治療においてすでに臨床応用されている⁷⁾。

このような背景から、今回われわれは、とくに2型糖尿病における膵β細胞異常に対する治療的介入研究の推進をめざして基礎的検討を行った。本研究では膵島移植に際し、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含むEngelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜調製品であるBD Matrigel™ 基底膜マトリックス（以下マトリゲル）を用いた⁸⁾。マトリゲルの性質として、0～4℃前後では液状であり、8～10℃でゲル化が一部始まり、22～35℃にすると速やかにゲル化する特徴がある。この特徴を応用しマトリゲルを用いてマウス膵島を包埋し、同種皮下移植により生体内培養を行った。本研究の目的は、膵島の三次元構造を維持しながら膵島細胞を評価する実験系を新規に確立することとした。

また、遺伝子導入の方法として、8型アデノ随伴ウイルスベクター（以下AAV8）を用いて単離膵島に対する*ex vivo* 遺伝子導入を行い、単離膵島に対する遺伝子治療の可能性を本実験系において検討した。

II. 対象と方法

1. 実験対象

本研究におけるすべての動物実験は、研究機関における実験等の実施に関する基本指針（文部科学省）を遵守し、東京慈恵会医科大学動物実験委員会により承認された計画にしたがって行った（承認番号：19-024）。単離膵島の移植実験のためにドナー、およびレシピエントとして10週齢の雄性Balb/c野生型マウス（CLEA Japan, Inc.）（ドナー：n=8, レシピエント：n=8）を実験対象とした（以下A群）。また、単離膵島に対する*ex*

vivo 遺伝子導入法の検討のためにドナー、およびレシピエントとして10週齢の雄性Balb/c野生型マウス（CLEA Japan, Inc.）（ドナー：n=8, レシピエント：n=8）を実験対象とした（以下B群）。

2. 実験方法

1) 膵島単離法

Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS)にコラゲナーゼ（*Clostridium histolyticum*由来：C9263, SIGMA）を溶解し、コラゲナーゼ溶液（1.0 mg/ml）を調整し37℃の恒温槽に準備した。マウスを頸椎脱臼法による犠死の後に、腹部を切開した。

つぎに、マウスの十二指腸を同定し、総胆管を確認した。これを尾側にたどりファーター乳頭部を確認した。ファーター乳頭部を完全にクランプした後、マウスの向きを頭尾反対方向にして、左右の胆管から総胆管となった直下（頭側の胆管）で絹糸を通してカニューレション後の固定のための準備を行った。胆管であることを確認するため、マイクロ尖刀で総肝管を切開して胆汁が出てくることを確認し、マウス総胆管とほぼ同径のポリエチレンチューブを半分ほど挿入して先の絹糸で固定した。その後、固定したチューブからコラゲナーゼ溶液を注入し（3 ml/body）、コラゲナーゼが膵尾部にまで十分入っていること、および脾臓全体が膨化していることを確認した。再度、マウスの体位を頭尾反対にして、膵臓の摘出を開始した。膵臓を周囲組織（大腸、小腸、脾臓、胃、十二指腸および後腹膜）から剥離し摘出した。

HBSSに摘出した膵臓を浸し、37℃で緩やかに振盪しながらコラゲナーゼによる消化を20分間行った。その後、10% FBSを加えた冷HBSSに置換してコラゲナーゼを不活性化し消化を停止させた。引き続き、フィコール・コンレイ比重法により単離膵島を分離回収した。

2) 単離膵島の*in vitro* 培養法

単離膵島を、BD Falcon™ 6-well Multiwell Plate（# 353224, BD Biosciences）に10個/wellずつ静置し、10% FBSを添加したRPMI 1640（Roswell Park Memorial Institute）培養液を加えて（3 ml/well）、37℃の5% CO₂インキュベーターで平板培養を行った。24時間毎に培地交換を行った。培養開始時、3日後、9日後の膵島の形態変化を

光学顕微鏡にて観察した。

3) ウイルスベクターの作製法と濃縮精製法

本研究でのウイルスベクターの取り扱いに関しては、東京慈恵会医科大学病原体等安全管理規定に基づき、病原体等安全管理委員会によって、承認された計画にしたがって行った（承認番号：II-20-11）。また、遺伝子組み換えに関しては、東京慈恵会医科大学における遺伝子組換え生物等の使用に関する安全規約に基づき、遺伝子組換え実験安全対策委員会によって承認された計画にしたがって行った（承認番号：20-55）。

単離膵島を対象とした *ex vivo* 遺伝子導入の検討を行うため、AAV8をウイルスベクターとして用いた。安全性が高く、高力価のウイルスを作製するために AAV Helper-Free System (Strata-gene, Agilent, Dublin) を用いて行った⁹⁾。発現ベクターは、サイトメガロウイルスプロモーター下に標識遺伝子である humanized renilla Green Fluorescent Protein (hrGFP) を発現する構築とした。これに加えて、AAV8粒子を作製するのに必要な rep, cap DNA複製タンパク質をコードしている pAAV-2/8 ベクター、アデノウイルスの遺伝子をコードしている pHelper ベクターとともに、AAV-293細胞（#240073, Strata-gene, Agilent, Dublin）へ3つのプラスミドベクターを、同時に燐酸カルシウム法により形質導入を行った。形質導入60時間後、全細胞を回収し、凍結・融解を急速に3回反復することにより細胞を溶解し、細胞可溶化液とともに、核内に存在する組み換えウイルスベクターである AAV8-CMV-hrGFP を回収した。これに対し、飽和硫酸アンモニウムを用いて分離精製した後、Iodixanol密度勾配超遠心法により最終的な濃縮精製を行った。AAV8-CMV-hrGFPのウイルス力価は、Slot-blot hybridization法により測定し、濃縮精製後の最終力価は、 8.0×10^{11} vg/mlであった (Fig. 1)。

4) MIN6細胞への *in vitro* 遺伝子導入法

マウス膵β細胞由来の細胞株であるMIN6細胞（大阪大学大学院医学系研究科病態制御医学専攻分子治療学講座幹細胞制御学分野 宮崎純一教授より分与）を用いて、AAV8-CMV-hrGFPによる *in vitro* 遺伝子導入法について検討した。MIN6細胞を、BD Falcon™ 6-well Multiwell Plate（#353224, BD

Biosciences）に 1×10^5 cells/wellの細胞濃度で播種し、10% FBSを加えたダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）で培養した。播種した24時間後に、培養液3 mlに対し、濃縮精製後のAAV8-CMV-hrGFPを200 μl添加することにより、遺伝子導入を行った。その後37℃の5% CO₂インキュベーターで培養し、ウイルス添加6時間後に遺伝子導入を終了し、ウイルスを含まないDMEM培地に交換した。遺伝子導入10日後にhrGFPの発現を共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡（LSM510 META, Carl Zeiss, Germany）を用いて観察した。

5) 単離膵島への *ex vivo* 遺伝子導入法

両群の単離膵島は、10% FBSを添加したRPMI 1640培養液中に静置し、37℃の5% CO₂インキュベーターで1時間の培養を行った。B群は培養液4 mlに対し、濃縮精製後のAAV8-CMV-hrGFPを200 μl添加することにより、*ex vivo* 遺伝子導入を行った。その後37℃の5% CO₂インキュベーターで培養し、ウイルス添加6時間後に遺伝子導入を終了した。つぎに両群とも、以下のマトリゲル包埋法により膵島の同種皮下移植を行った。

6) 単離膵島のマトリゲルを用いた皮下移植法

凍結保存中のマトリゲル（#354234, BD Biosciences）を一晩の氷上で静置し液状に解凍した後、実験に用いた。単離膵島30個を、マトリゲル200 μlに混和しシリンジに充填した。ジエチルエーテルを用いて吸入麻酔を行った10週齢の雄性Balb/c野生型マウスに対し、マトリゲルと混和した単離膵島を、21G針にて背部皮下に移植した。移植後間もなく移植部位が軽度の膨隆を認め、皮下でマトリゲルがゲル化したことを確認した。計16匹に同様に皮下移植を行った。

7) 組織標本作成法

A群の4匹は、皮下移植24時間後、頸椎脱臼法による犠死のあとに移植片を摘出し、残り4匹は、移植10日後に同様に移植片を摘出した。B群では、移植10日後にすべての移植片を同様に摘出した。摘出した移植片を、4%ホルムアルデヒド溶液により4℃で一晩固定した後、パラフィン包埋により組織標本作製した。

8) 組織染色

HE染色と、以下の各種抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

(1) 1次抗体

・ Insulin (1 : 500 ; DAKO Cytomation Co, Ltd. A0564, Polyclonal Guinea Pig) ・ Glucagon (1 : 200; Cell Signaling, # 2760, Polyclonal Rabbit) (1 : 2000 ; SIGMA, G2654, Monoclonal Mouse) ・ Somatostatin (1 : 1000 ; Millipore, AB5494, Polyclonal Rabbit) ・ E-Cadherin (1 : 1000 ; Abcam, ab11512, Monoclonal Rat) ・ PCNA (1 : 200 ; DAKO Cytomation Co, Ltd. M0879, Monoclonal Mouse)

(2) 2次抗体

蛍光染色用として、・ Alexa488, 555, 633 goat anti rabbit IgG (Molecular Probes, Invitrogen Corporation), ・ Alexa555 goat anti rat IgG (Molecular Probes, Invitrogen Corporation), ・ Alexa555 633 anti Streptavidin (Molecular Probes, Invitrogen Corporation), ・ M.O.M. biotinylated anti-mouse IgG reagent (Vector Laboratories, Inc.) を用いた。

DAB呈色用として、・ シンプルステインマウス MAX-PO, H0709 (ニチレイ), ・ Envision Kit/HRP (DAB), K3465 (DAKO Cytomation Co, Ltd.) を用

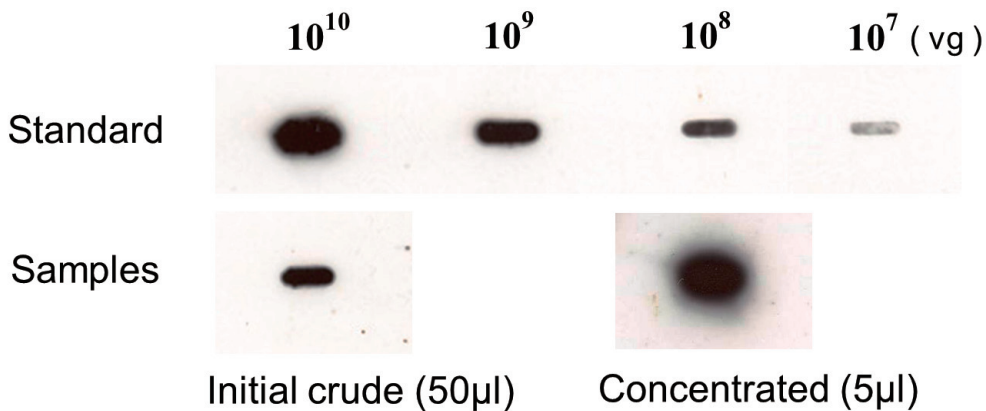


Fig.1. Slot-blot hybridization assay for the titration of AAV8-CMV-hrGFP

The titers of viral genome particles of each sample were determined by the standard slot-blot assay. This assay detects the packaged AAV genomes using DNA probes specific for the gene coding for green fluorescent protein. A positive signal in this assay indicates that AAV virions were produced, and quantitation yields a particle number in virions. The slot-blot assay showed that the viral titer of finally concentrated AAV8-CMV-hrGFP is 8.0×10^{11} viral genomes/ml.

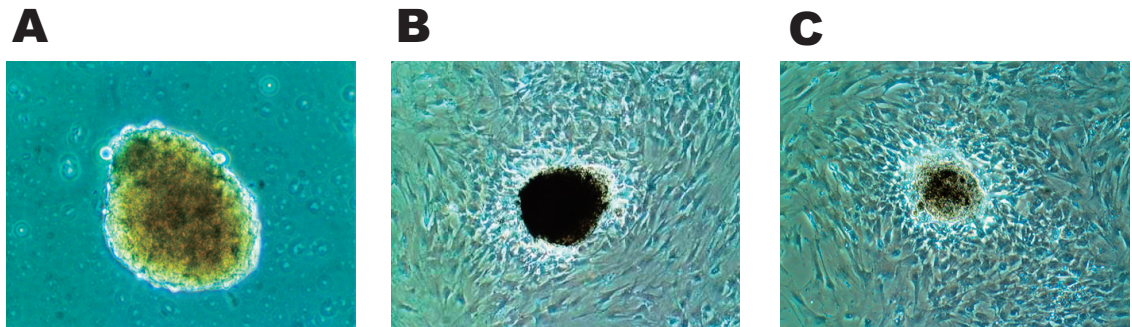


Fig.2. Morphologic observation of isolated pancreatic islets by the in vitro cultivating method

Morphologic observations of the cultured islets were shown by phase-contrast micrographs at day 1, day 3 and day 9 after isolation. Representative islets are shown. Original magnification, $100 \times$.

(A) Morphology of the islets was closely similar to native pancreatic islets of wild-type mice with well-retained three-dimensional structure at day 1.

(B) The in vitro cultivated islets adhere to the bottom of a culture dish, and spread in the shape of a concentric circle with monolayer formation, intermingled with fibroblastic cells at the 3 days.

(C) The great portion of three-dimensional structure of the islets collapsed at the 9 days.

いた。

(3) 核染色には、DAPI (DOJINDO, 340-07971) を用いた。

9) RITC標識ゼラチン法を用いた血液循環の評価

バルビツール系麻酔薬にて過麻酔し、頸部を鉗子にてクランプした。開腹、開胸し、右心耳を切開し、RITC標識ゼラチンを50 ml/匹にて左心室から注入し灌流した。灌流後のマウス全身を氷冷したブアン固定液に浸漬し、遮光した状態で20分間固定した。その後、各臓器を摘出しブアン固定液で再固定を行ったあとに組織標本とした。

10) 組織学的評価

共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM510 META, Carl Zeiss, Germany) を用いて、免疫組織化学染色像の評価を行った。また画像編集ソフト (Axio Vision 4.8, Carl Zeiss, Germany) を用いて、各種染色の陽性細胞数をカウントしその比率 (%) を算出した。

III. 結 果

1. 単離膵島の *in vitro* 培養法による形態学的観察

コラゲナーゼ法により、マウス膵島を単離・回収した。単離直後の膵島を鏡検すると、生体膵島と同様の形態を保持していた (Fig. 2A)。これを用いて平板培養を行ったところ、膵島は培養開始から24時間後には培養プレートの底面に付着し、3日後から線維芽細胞様の細胞成分とともに膵島細胞は単層に広がり (Fig. 2B)、9日後には膵島の高次構造の大部分は消失した (Fig. 2C)。

2. マトリゲル包埋法を応用した単離膵島の皮下移植

1) 移植膵島の生着確認

マトリゲル包埋法を用いた単離膵島の皮下移植に伴う膵島の生着状態を確認するため、24時間後に移植片を摘出しHE染色および各種の生体成分に対する免疫組織化学染色を行った。摘出した移植片における膵島 (以下、移植後膵島) は、膵島全体の構築を保持しており、HE染色像は生体膵島と同様であった (Fig. 3A, C)。また移植後膵島は、生体膵島と同様にインスリン染色陽性の膵β細胞が観察された (Fig. 3B, D)。

さらに、各移植片あたり20個の膵島を対象に

内分泌細胞の構成比率について検討した。インスリン、グルカゴンおよびソマトスタチンに対する多重免疫染色を行った結果、各内分泌細胞の分布局在や構成比率も生体膵島と同様であった (インスリン: $75.6 \pm 4.3\%$, グルカゴン: $16.2 \pm 2.6\%$ およびソマトスタチン: $6.9 \pm 1.8\%$) (mean \pm SEM) (Fig. 4A, C)。本法による移植膵島の生着率は、 86.5 ± 8.4 (mean \pm SEM) % と高効率であった。これらの結果から、本法により移植膵島は生体膵島の高次構造や細胞分布を保持したまま高効率に生着することが確認された。

2) 移植後膵島の経過観察

(1) 膵島の高次構造

移植10日後に移植片を摘出し、膵島の高次構造について組織学的な評価を行った。移植後膵島は、生体膵島のように一塊の球状構造ではなく膵島全体が分葉状に変化しているものを多く認めた (Fig. 3E)。さらに、このように形態の変化した膵島の近傍に小型の膵島や内分泌細胞集塊を認めた。

(2) 内分泌細胞の構成比率

移植10日後の移植片を組織標本とし各移植片あたり20個の膵島を対象に内分泌細胞の構成比率について検討した。膵島細胞の大部分は、インスリン、グルカゴンおよびソマトスタチンのいずれかに陽性であり、各内分泌細胞の構成比率 (インスリン: $74.3 \pm 4.6\%$, グルカゴン: $17.6 \pm 3.1\%$ およびソマトスタチン: $6.8 \pm 1.7\%$) (mean \pm SEM) は、生体膵島および移植1日後とほぼ同様であった (Fig. 4B, D)。これらの結果から、本法により移植10日後までの期間では、移植後膵島における内分泌細胞の構成比率は維持されていることが確認された。

(3) 膵島内外の血液循環

微細な血管の構築を可視化することのできるRITC標識ゼラチン法を用いて、移植後膵島の微小循環の変化を検討した。生体膵島では、膵島内部に毛細血管が構築されており、膵島内に微小循環機能が確認された (Fig. 5A)。一方、移植後膵島の内部には、HE染色で毛細血管の構築は確認されたが、移植1日後の膵島および移植片には、一切の血管系を認めず (Fig. 5B)、10日後では膵島外にわずかに血流を認めるものの、膵島内には

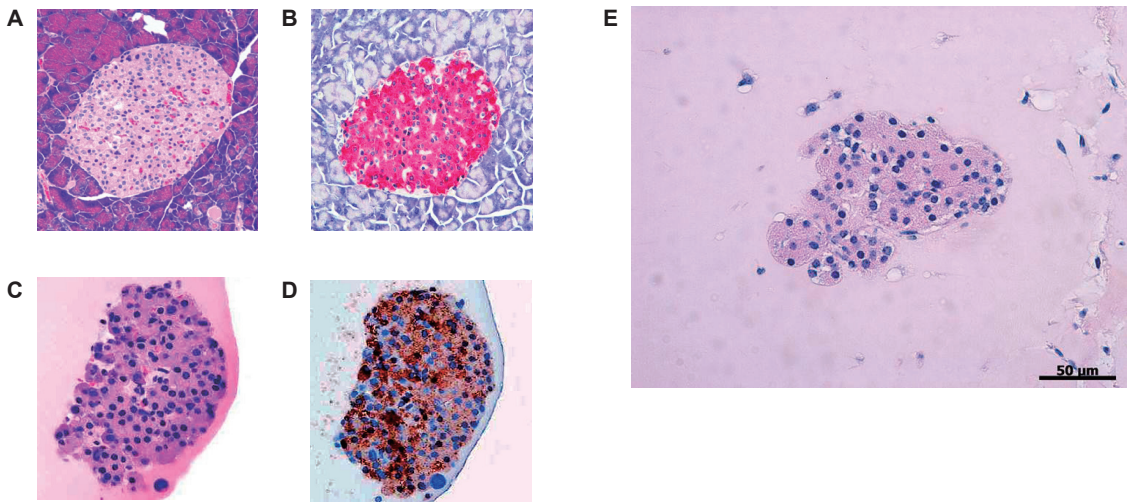


Fig.3. Histological analysis of the native pancreatic islets and the transplanted islets. Representative pancreatic islets are shown. Original magnification, $\times 200$.
 (A) H&E staining of the pancreatic sections from wild-type male Balb/c mice.
 (B) Immunostaining for insulin was carried out in the pancreatic sections from wild-type male Balb/c mice using anti-insulin antibodies.
 (C) Histological analysis of the transplanted islets with H&E staining at day 1 after transplantation. The transplanted islets were closely similar to the native pancreatic islets of wild-type mice.
 (D) Immunostaining for insulin was carried out in sections of the transplanted islets using anti-insulin antibodies at day1 after transplantation.
 (E) At the 10 days after transplantation, shape of vast majority of islets was changed to lobulated form with satellite islet-like clusters composed of pancreatic endocrine-cells.

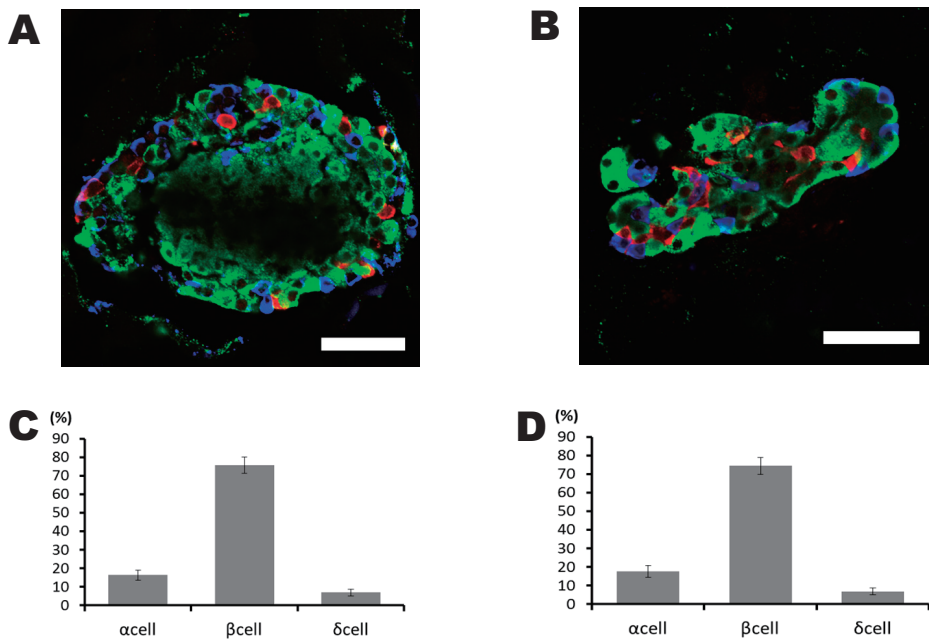


Fig.4. Endocrine cells and their construction after 24 hours and 10 days of the transplantation. The engrafted islets were excised from recipient mice and were subjected to multiple immune-fluorescent (IF) staining with anti-insulin (green), glucagon (blue) and somatostatin (red) in order to detect β , α and δ cell, respectively. construction of these endocrine cell types were almost comparable to that of islets in vivo: β 75.6 \pm 4.3%; α 16.2 \pm 2.6%; δ 6.9 \pm 1.8% at 24 hours (A, C). There was no reciprocal change in this endocrine construction after 10 days of the transplantation, β 74.3 \pm 4.6%; α 17.6 \pm 3.1%; δ 6.8 \pm 1.7% (B, D). Values represent mean \pm SEM. Representative pancreatic islets are shown. Scale bar, 50 μ m.

血液循環を認めなかった (Fig. 5C).

(4) E-カドヘリンの発現

移植後膵島細胞の分化や分化した内分泌機能の維持に関与すると考えられる細胞間接着分子、E-カドヘリンの発現動態を検討した。生体膵島では膵β細胞間において均一なE-カドヘリンの発現を認める (Fig. 6A), これに対し移植1日後の膵β細胞では、一部において、E-カドヘリンの消失ないしは凝集が同時に存在しているという著明な変化が観察された (Fig. 6B)。移植10日後の膵島では、全体の構築は分葉状の変化が認められるものの、E-カドヘリンの発現は生体膵島と同様に膵島全体に均一であり、その発現局在における消失や凝集は認めなかった (Fig. 6C)。

(5) 細胞増殖

移植後膵島細胞の増殖に関して、PCNAを用いた免疫組織化学染色によって検討を加えた。生体膵島細胞におけるPCNA陽性率は 0.5 ± 0.1 (mean \pm SEM) %であるが (Fig. 7A, D), 移植1日後の膵島細胞においては陽性率 18.5 ± 6.3 (mean \pm SEM) %と増加していた (Fig. 7B, D)。移植10日後には、 0.6 ± 0.1 (mean \pm SEM) %と生体膵島細胞と同様な頻度であった (Fig. 7C, D)。

3. MIN6細胞に対する*in vitro* 遺伝子導入

In vitro で膵β細胞に遺伝子導入を行い経過観

察することがマトリゲル移植法により可能であるかどうかについて検討するため、まず培養細胞であるMIN6細胞に対し濃縮精製後のAAV8-CMV-hrGFPを用いて*in vitro* 遺伝子導入を行った。その結果、遺伝子導入10日後にMIN6細胞の一部において標識遺伝子であるhrGFPの発現を認めた (Fig. 8)。本検討により今回作製したAAV8-CMV-hrGFPの膵β細胞に対する生物学的活性が確認された。

4. 単離膵島に対する*ex vivo* 遺伝子導入法

AAV8の遺伝子発現の評価には、短くとも7日間の観察期間が必要であることが知られている。本研究においてもMIN6細胞への遺伝子導入10日後にhrGFPの発現を認めた。しかしながら従来は、膵島の*in vitro* 培養条件下での遺伝子導入において、単離膵島の構造が変化し構成細胞の成分比率も大きく変化するため外来性の導入遺伝子の発現を評価することは不可能であった。そこで、今回確立したマトリゲル包埋移植法を応用し、単離膵島に対し*ex vivo* 遺伝子導入を行ったあとにマトリゲルに包埋して皮下移植し、10日後に移植片を摘出したものを組織標本として遺伝子導入率を評価した。HE染色 (Fig. 9A) および標識蛋白であるhrGFPに対する免疫組織化学染色を行った (Fig. 9B)。その結果、hrGFP陽性細胞を膵島

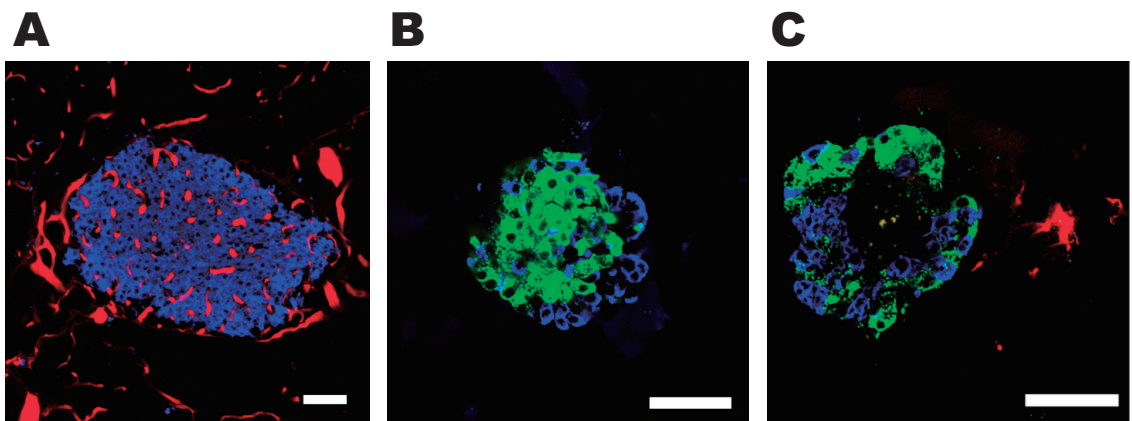


Fig. 5. Evaluation of blood streams in the engrafted islets by RITC-labeled gelatin method.

Blood streams within native islets *in vivo* were readily identified by the RITC labeling (A). Small vessels were still observed by H&E staining within the engrafted islets, indicating presence of residual vessel for the microcirculation of islets. However, RITC labeling was not detected at 24 hours (B), and was barely seen only around the engrafted islets and 10 days after the transplantation (C). In fig. 5a, blue, Insulin; red, RITC-labeled gelatin. In fig. 5b and c, blue, Glucagon; green, insulin; red, RITC-labeled gelatin. Representative pancreatic islets are shown. Scale bar, 50 μ m.

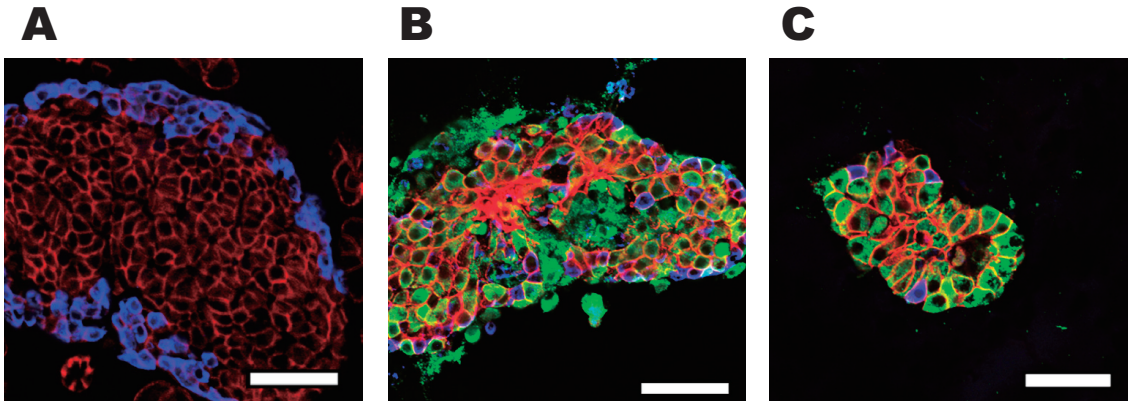


Fig.6. Epithelial (E-) cadherin expression in the islets at 24 hours and 10 days after the transplantation. E-cadherin was homogeneously expressed among endocrine cells of native islets *in vivo* (A). However in the engrafted islets of 24 hours after the transplantation, the expression of E-cadherin was decreased at β cells especially near margin of the islets, and was increased near the center of the islets (B). This marked characteristic change was restored at the 10 days of the transplantation to the homogeneous pattern seen in the native islets *in vivo* (C). Representative pancreatic islets are shown. Scale bar: 50 μ m.

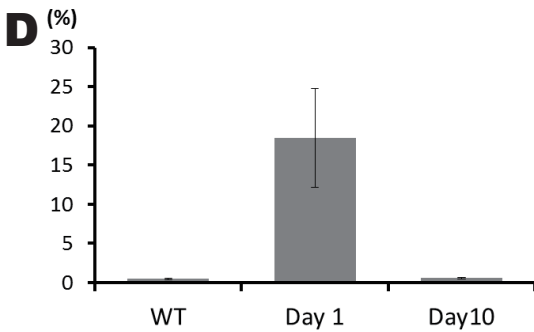
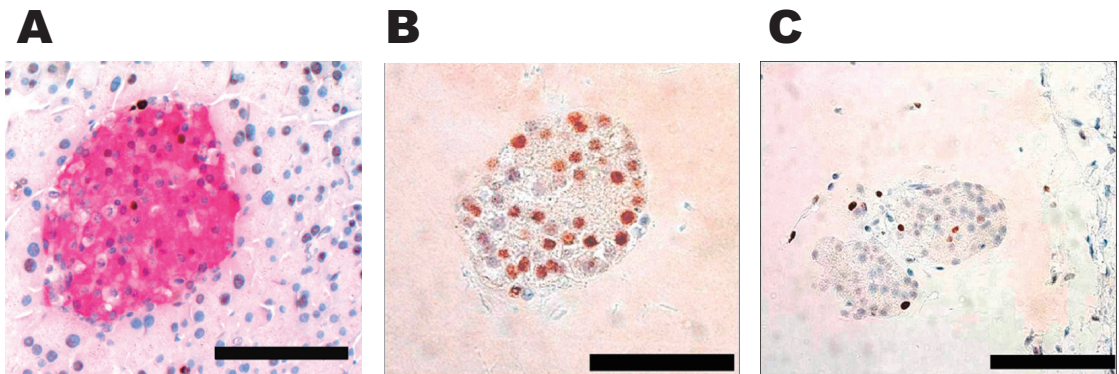


Fig.7. Detection of Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) in the islets after the transplantation. Rate of PCNA-positive cells in native islets *in vivo* is very low ($0.5 \pm 0.1\%$) (A, D). Drastic increase in the rate of PCNA-positive cells ($18.5 \pm 6.3\%$) was detected (B,D), but this change was restored to $0.6 \pm 0.1\%$ at the 10 days seen in native islets *in vivo* (C, D). Values represent mean \pm SEM. Representative pancreatic islets are shown. Scale bar: 100 μ m.

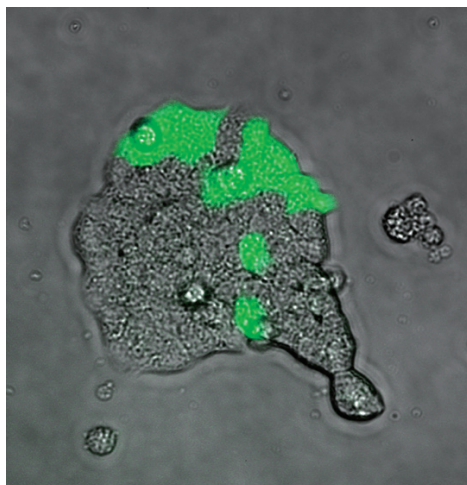


Fig. 8. Expression of the exogenous gene transduced into cultured MIN6 cells via AAV8-CMV-hrGFP viral vector. Merged image of the MIN6 cells, phase-contrast image and fluorescence micrograph. Observation was performed at 10 days of the infection for expression of hrGFP. Original magnification, $\times 200$.

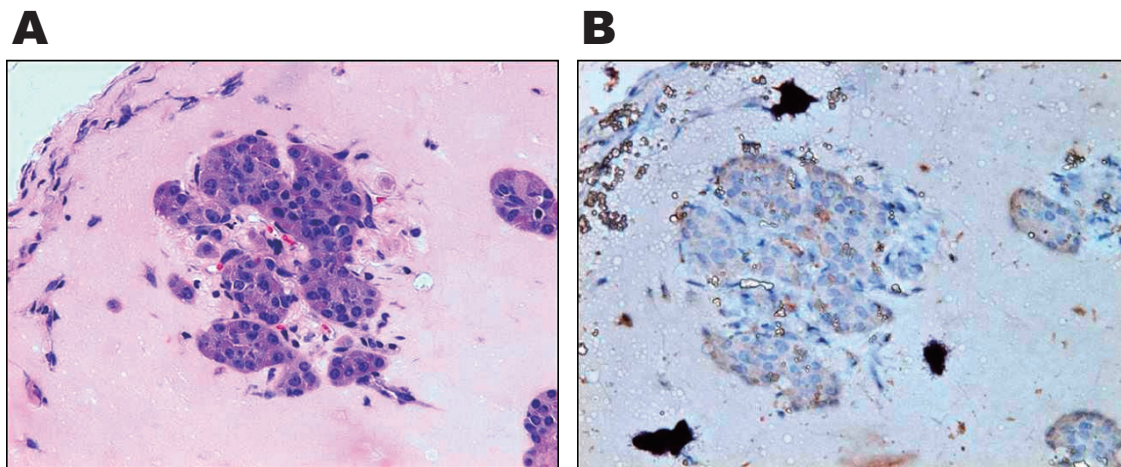


Fig.9. Expression of hrGFP in the islets at the 10 days after the *ex vivo* gene transduction.

Isolated murine islets were subjected to the *ex vivo* gene transduction via the AAV vector, were embedded by the extra-cellular matrix gel, and were transplanted to subcutaneous tissue of the same strain-mice. After 10 days of the transplantation, the excised graft was observed by H&E (A) and hrGFP (B) staining. Expression of hrGFP could be seen but limited to the periphery of the islets. Expression at the center region of the islets was very few. Total rate of GFP-positive cells was $6.3 \pm 2.1\%$. Values represent mean \pm SEM. Representative pancreatic islets are shown. Original magnification, $\times 200$.

辺縁部の一部に限局しており、膵島中心部分には発現を認めなかった。移植後の全膵島での遺伝子導入率は、 6.3 ± 2.1 (mean \pm SEM) %と低い結果であった。

IV. 考 察

本研究でも、通常の細胞培養条件下では、単離膵島は時間とともに細胞単位で遊走を示し (Fig. 2B, C)、高次構造を保持した状態で培養することは不可能であることを確認した。これまでMIN6細胞を用いた検討では、細胞群が膵島様構造を形成すると、単層培養の状態と比較し、インスリン分泌能が高まることが報告されている¹⁰⁾。また、高次構造を失った膵島は、生体膵島と異なり、膵島細胞のアポトーシスや脱分化により、各内分泌細胞の構成比率の変化やホルモン分泌機能の異常を来すものと考えられる。このため、膵島単位で高次構造を保持したまま培養し、適時に形態や機能を検討することのできる方法を確立する必要がある。その目的から、本研究ではマトリゲル包埋法を応用した単離膵島の皮下移植の検討を行った。

マトリゲル包埋状態の単離膵島は、移植24時間後には皮下に高効率に生着していた。今回観察した移植10日後における移植後膵島は、生体膵島のような一塊の球状構造と異なり膵島全体が分葉状に形態変化しているものを多く認めた。このように移植後膵島では経過とともに形態変化を認めるものの、大部分の膵島細胞はマトリゲル包埋下で生存を維持した (Fig. 3E)。また、インスリン、グルカゴンおよびソマトスタチン陽性細胞の比率に大きな変化を認めなかったことより、移植後膵島における各内分泌細胞が脱分化や分化転換を起こすことなく、最終分化した基本構築が維持されていると考えられた。

現在臨床において施行されているヒト膵島移植は、単離膵島を門脈注射により移植し肝内門脈に生着させる方法であるエンドモントンプロトコールが広く用いられている¹¹⁾。この方法は、循環血液との接触により凝固系との反応を惹起しその影響により生着率が低下する問題を抱えている。これに対しマトリゲル包埋法では、移植膵島がマトリ

ゲルに包埋されるため直接的に循環血液とは接触しない。移植に関する条件が異なるため直接の比較はできないが、門脈に注入された膵島と異なり、高い生着率を達成することが可能であると考えられた。

移植後膵島はマトリゲルに包埋されているため、生体膵島と異なる外部環境に接している。膵島への血流も単離・移植直後は遮断されており、生体膵島が本来持っている微小循環が破綻していることが懸念される。本研究では、RITC標識ゼラチン法の結果から、生体膵島では膵島内微小循環は全身の循環器系と連続しており膵島細胞の生存に必要な成分を供給していることを確認した (Fig. 5A)。一方、移植後膵島においては、膵島内に毛細血管の内皮細胞様の構築の残存は認めるものの、RITC標識ゼラチン法では標識されないことから、移植後膵島では既存の膵島内の微小循環は機能しておらず、今回の移植条件では新たな血管新生も認めることはできなかった (Fig. 5B, C)。このように、膵島内の微小循環の破綻した非生理的な状況下において、移植後膵島は高次構造における形態変化を生じている可能性が考えられた。その機序として、膵島内微小循環が破綻したことにより生体膵島のような大型の高次構造を維持できなくなり、小型の膵島や内分泌細胞集塊へと変化した可能性が考えられた。今後、再生医療などを目的に長期的な観察を必要とする実験系を確立するためには、血管構築の再生について併せて検討する必要があると考える。

E-カドヘリンは、細胞間接着と細胞分化の維持に、重要な役割を演じる分子である。生体膵島では、膵島細胞間にはE-カドヘリンが均一に発現することが確認された。一方、移植1日後の膵島では、E-カドヘリンの発現に凝集と消失という大きな変化が同時に認められた。この結果から、移植後まもなく膵島が分葉状に変化あるいは小型化する過程に、E-カドヘリンの発現変化が関与する可能性が考えられた。さらに、移植10日後にはE-カドヘリンの発現が再び均一に復することから、膵島の構築にかかわる細胞間接着において部分的な回復が得られた可能性が示唆された (Fig. 6C)。既報では、MIN6細胞が膵島様構造を形成するとE-カドヘリンなどの細胞接着分子の

発現が亢進し、細胞間の相互作用を介して細胞増殖やアポトーシスを制御し、膵島の大きさを維持している可能性が示唆されており、本研究の知見はこの報告と一致している¹²⁾。

移植膵島細胞において、1日後にPCNA陽性率が増加し、細胞の増殖をきたしていることが示唆された (Fig. 7B)。膵島構造の分葉化に伴い、一時的な細胞増殖が代償している可能性が考えられる。しかし、今回用いたマトリゲルの主成分はラミニン、コラーゲンIV、ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるが、この他にTGF- β 、インシュリン様成長因子、線維芽細胞増殖因子などEHS腫瘍に自然に産生される他の増殖因子も含んでいる。これらが膵島細胞に作用し、増殖を促進した可能性も否定できない。この状態が膵島の高次機能に与える影響については、これらの増殖因子を排したマトリックスを用い、必要と考えられる増殖因子のみを添加することなどの方法によって検討する必要があると考えられた。

今回、遺伝子導入に用いたAAVは、その高い安全性により、米国を中心に海外における遺伝子治療においてすでに臨床応用されている。我が国でもパーキンソン病を対象とした臨床研究が、平成18年に厚生労働省の承認を得ており、平成19年5月に第1例目の遺伝子治療が実施された。AAVの標的細胞としては、導入遺伝子の長期安定発現の観点から膵島細胞のような非分裂細胞が適していると考えられ、一回のベクター投与により数年間にわたり導入遺伝子の発現が持続することが示されつつある。

しかしながら、今回行った*ex vivo*遺伝子導入法は、膵 β 細胞に対する遺伝子導入率は低く、膵 β 細胞を対象とした遺伝子治療に用いる方法としては不適と考えられた。MIN6細胞への導入効率が良好であったことから (Fig. 8)、膵島への遺伝子導入が不十分に終わった原因として、膵島内の微小循環機能が途絶し、ウイルスベクターが膵島内部まで浸入せず、感染成立が不十分であった可能性が考えられた。これまで、単離膵島を対象に、アデノウイルスやレンチウイルスを用いた遺伝子導入が試みられてきたが、いずれも導入効率が低く、応用には至っていない。AAVを用いた検討では、ヒトとマウスの単離膵島を対象に一本

鎖DNAウイルスである2型AAV (ssAAV2) と、発現効率のより高いSelf-complementary AAV (scAAV2) の両者を用いて*in vitro*遺伝子導入を行ったところ、導入率においてssAAV2より、scAAV2の方が有意に高いものの、それでも発現は膵島辺縁部分に限局しており導入率は15%以下であった¹³⁾。このため今後は、膵島内微小循環が保持された*in vivo*での遺伝子導入法について検討する必要があると考えられた。

予備的ながら本研究から、単離膵島をマトリゲルに包埋し皮下移植する方法を応用し、適時に移植片を摘出し組織学的評価を行うことが可能となったと考えている。今後は本法を発展させ、膵島細胞間の接着分子と相互情報伝達や、膵島にかかわる血管や神経と膵島細胞との相互作用、膵島における幹前駆細胞の探索など、機能単位としての膵島を対象とした包括的検討を推進できると信じている。

V. 結 語

単離膵島をマトリゲルに包埋し皮下に移植する膵島移植法を新規に確立した。移植後膵島の生着率は高く、移植片を適時に摘出し組織学的評価を行うことが可能であった。移植後の膵島細胞においてE-カドヘリン依存性細胞接着の部分的消失と再構成が認められたことは大変興味深く、最終分化した膵島細胞においても膵島の高次構造の変化や再構築につながる可塑性を有する可能性を示唆するものと考えられた。今後、膵島の構造と機能の解析結果にもとづいた治療的介入研究に向けて、本法が応用されることを期待する。

謝 辞

本研究に関してご教授賜りました東京慈恵会医科大学内科学講座 糖尿病・代謝・内分泌内科 田嶋尚子名誉教授、同遺伝病(ライソゾーム病)研究講座 衛藤義勝名誉教授、同総合医科学研究センター DNA医学研究所 遺伝子治療研究部 大橋十也教授に深く感謝申し上げます。また、組織学的解析に関してご教授賜りました同病理学講座 羽野 寛教授、同解剖学講座 岡部正隆教授に深く感謝申し上げます。さらに、アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝

子導入に関してご教授賜りました日本医科大学 生化学第2講座 高度先端医療技術開発センター 遺伝子治療研究部門 島田 隆教授, 平井幸彦講師に深く感謝申し上げます。

なお本研究の一部は, 科学研究費補助金基盤研究 (C) (課題No. 17590948研究代表者 佐々木 敬)「遺伝子アブレーションと分子介入による膵島傷害の抑制と再生の促進」の助成によった。

文 献

- 1) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
- 2) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-53.
- 3) Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, et al. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 28: 103-17.
- 4) U.K. Prospective Diabetes Study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: A progressive disease. *Diabetes* 1995; 44:1249-58.
- 5) Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 102-10.
- 6) Kelly C, McClenaghan NH, Flatt PR. Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion. *Islets* 2011; 3: 41-7.
- 7) Mingozzi F, High KA. Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 341-55.
- 8) Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*. 1982; 23: 6188-93.
- 9) Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 1998; 72: 2224-32.
- 10) Kelly C, Guo H, McCluskey JT, Flatt PR, McClenaghan NH. Comparison of insulin release from MIN6 pseudoislets and pancreatic islets of Langerhans reveals importance of homotypic cell interactions. *Pancreas* 2010; 39: 1016-23.
- 11) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000; 343: 230-8.
- 12) Luther MJ, Davies E, Muller D, Harrison M, Bone AJ, Persaud SJ, et al. Cell-to-cell contact influences proliferative marker expression and apoptosis in MIN6 cells grown in islet-like structures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E502-9.
- 13) Rehman KK, Wang Z, Bottino R, Balamurugan AN, Trucco M, Li J, et al. Efficient gene delivery to human and rodent islets with double-stranded (ds) AAV-based vectors. *Gene Ther* 2005; 12: 1313-23.