

Yamaton P Project:

The Development of verification model of human derivative insulin-secreting cell for the treatment of diabetes

Eiji Kobayashi, M.D. Ph.D.

Department of Organ Fabrication
Keio University School of Medicine

Preface

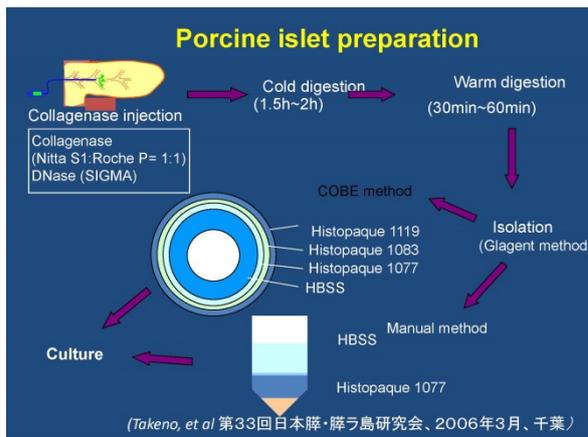
医療に用いる治療用製品として、医薬品ならびに医療用器機がある。前者が主に大手企業が手がけており、1.7万品目、8兆円規模の市場であるのに対し、後者は、80%以上が中小企業が手がけ、30万品目と製品数は多いものの2.2兆円規模であることが我が国の特徴と言われている（2008年資料）。また我が国の医療用器機は、そのほとんどが海外のものである。一方、再生医療等の製品は、医薬品としての治療用細胞と細胞を注入する医療用器機としての両面を併せ持つ。2014年11月再生医療等新法が施行され、細胞治療を主体とする再生医療製品についても規制が始まったが、糖尿病の治療の本体をなすヒト由来のインシュリン分泌細胞はまさに実用化が望まれる分野でもある。

著者は、人に移植可能な糖尿病治療製品の開発計画を Yamaton P 計画となづけ研究を続けてきた。ここで言う Yamato とは日本の古い名称、大和で、ton とは、日本語でブタの意味である。P とは Pancreas の頭文字である。これまでの背景を概説した上で、基本戦略プランを説明する。

Yamaton P 計画における細胞ソース

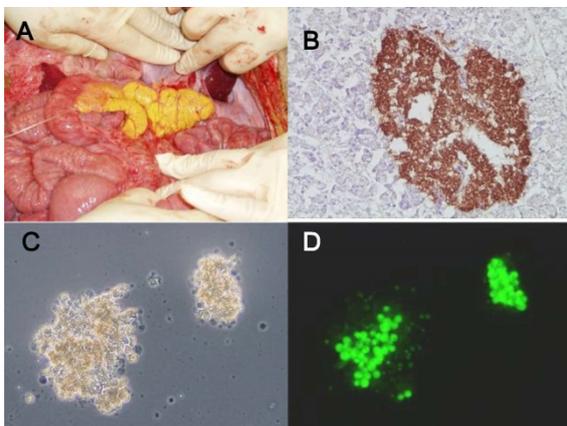
(1) ブタ膵臓からのラ島分離の研究

著者は、自治医大ピッグプロジェクト立ち上げの10年前より、実験終了ブタを用いて犠牲死時に膵臓を摘出して、ブタ膵ラ島分離を行なってきた。海外からのブタ膵ラ島分離の報告は、家畜豚によるものがほとんどであったため、実験専用ミニブタに関する情報を整理する必要があった。そこで自治医大ピッグセンターで、実験使用して犠牲死するミニブタ（メキシカンヘアーレス、クラウン、中国系）を用いて下記のプロトコールしたが分離し、回収率等検討した。



結果として、メキシカンヘアレスブタ (N=8)、クラウンミニブタ(N=8)、中国系ミニブタ(N=4)間には、回収率やその得られたラ島の生存率に差がなかった。本データをもとに、岡山大学小林直哉氏らとの共同研究を行ない国内の共同研究者への SHIPPING を検討した。一般のクール宅配便で 20 時間以上かけ搬送したが、移送 (保存) で劣化したブタラ島は、ヒト由来線維芽細胞との共培養で機能回復することがわかった (Miki A, et al. Cell Transplant 2006)。

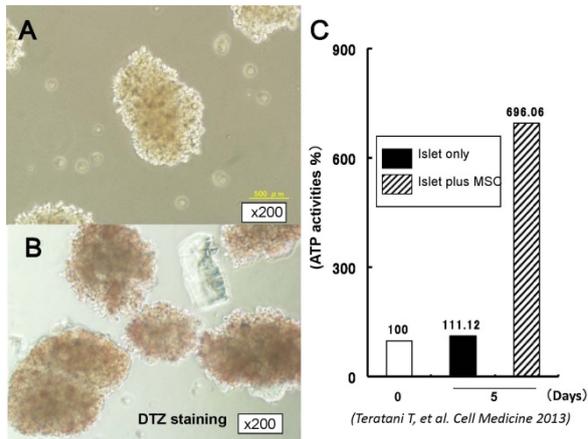
またラ島移植の際のイメージング研究として遺伝子マーカー (GFP) の導入された金華ブタからのラ島の分離も行なった (Kawarazaki A, et al. J Biomed Opt 2009)。



A : GFP Tg ブタのすい臓全景
C : 分離直後のラ島 (可視光)

B ; ラ島組織
D : 同 (励起光下)

さらに 2009 年より保存膵ラ島の劣化を MSC を用いて改善させる試みを始めた。



A：東北大学後藤らにより分離されたブタラ島 B：同DTZ染色
C：劣化ブタ膵ラ島のMSC共培養によるATP活性の回復

いずれにしてもブタ膵ラ島は、ラ島を包皮する被膜が極めて脆弱で、ヒトのそれよりもコラゲナーゼ処理により傷害を受けやすい。ブタ膵臓からのラ島分離は、技術的、コスト的にも高価である。将来的には、培養系で生産できる方向に動くべきであろうと判断した。

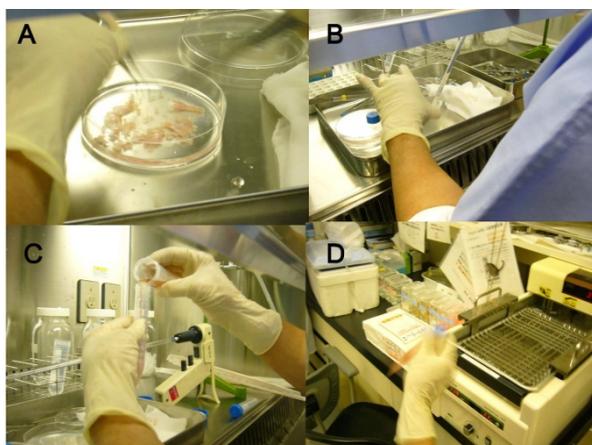
(2) ブタを用いた移植可能な培養ラ島作製への挑戦

Yoko Mullan は、ブタ胎児膵臓を取りだし、培養することでラ島細胞が機能を出すことを世界で初めて報告した(Tsunosa T, et al. Transplant Proc1989)。そして、本法により得られたブタ培養ラ島は、ヒトへの移植を念頭に置いたラ島として利用できる可能性を示した(Mullan Y. Xenotransplantation1995)。我々は、2008年Mullan博士の直接指導のもと、明治大学（長嶋教授）と共同で本手法の確立を試みた。



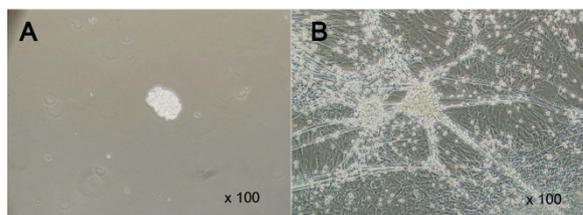
A：妊娠65日令の家畜豚（明治大学門井農場） B：摘出胎児ブタ

C : 直接指導する Mullan 博士 (2008 年 10 月 22 日、自治医科大学臓器置換研究室)



- A : 摘出膵臓をセッシでほぐす
B : 10cc チューブに回収、洗浄する
C : コラゲナーゼを加える
D : 5 分程度 37 度 C ウォーターバス内で加温し、震とうさせる。

その後、2-3 回洗浄し、10cm デッシュに、細胞密度を確認しながら培養を開始した。培養開始後 25 日前後から細胞集塊を認めた。さらに、同様の実験を繰り返した。



C



(Teratani T, et al. 2010 unpublished)

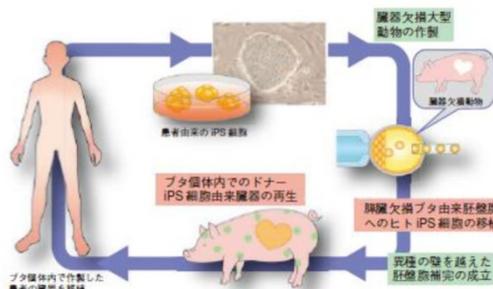
- A : 胎生 56 日の家畜豚から摘出した内分泌細胞 (培養初日)
B : 培養 24 日目
C : 同細胞の遺伝子発現 (2010 年 8 月 寺谷工、施行)

本法は、培養条件などをさらに改良することにより膵内分泌細胞の前駆体を取り、大量にラ島を作り出す可能性を示していた。

同じころ、胚盤胞補完法の原理を用いてヒトの膵臓を作れる可能性を Nakauchi らが小動物を用いて示した (Kobayashi T, et al. Cell 2010)。そして、その母体の可能性と成る膵

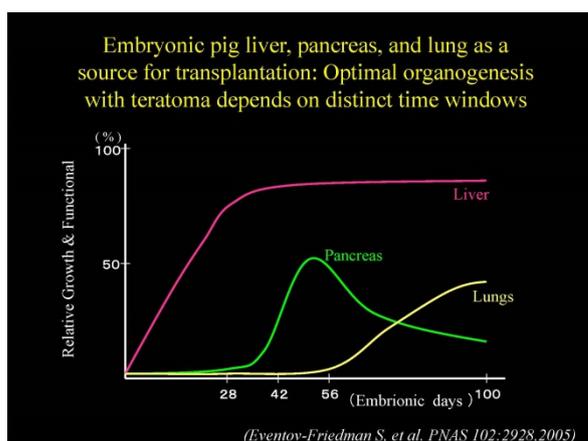
臓欠損ブタの作出に明治大学長嶋らと共同で成功した (Matsunari H, et al. PNAS2013)。

胚盤胞補完法を利用して多能性幹細胞から臓器を作る原理



(中内啓光 東京大学医科学研究所教授、メディカル・トーチ2013)

しかし、動物性集合胚を作る倫理的な問題の回避以外にヒト・ブタ間での胚盤胞補完法が可能かを調べる必要がある。著者は、上記課題の解決として Mullan らと開発を続けてきた、胎児期の膵臓原基を取りだしこれを培養する方法論を提案している (2014年3月、文部科学省)。



すなわち、仮に発生が始まったとしてもヒト・ブタキメラの生体を得ることなく胎児期 (8-9週令) に犠牲死し、膵臓を摘出し、培養するプロトコールである。膵臓の発生は、内分泌細胞と外分泌細胞が同時に増える。しかし、外分泌細胞は、通常の培養では増殖できないため、インスリン分泌に関わる内分泌系細胞が得られると期待される。

しかし、本手法で作製した細胞は、ブタの胎児の培養インスリン分泌細胞であろうが、ブタ体内で誘導したヒト由来のインスリン分泌細胞であろうが、異種移植におけるリスクを十分念頭に進める必要がある。

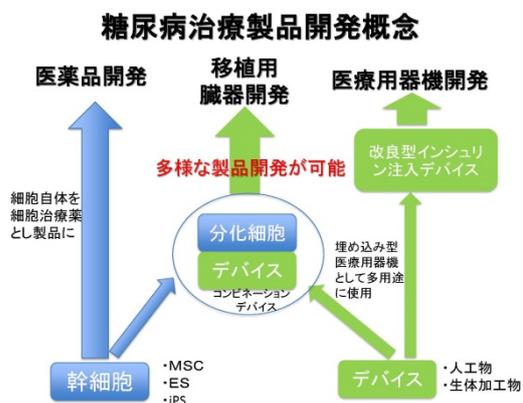
(3) 試験管内でのインスリン分泌細胞の誘導

長船らは、糖尿病に対する再生医療開発を目指し、ヒト iPS 細胞から移植用の膵細胞の作製を行っている。これまでに移植用の膵前駆細胞の作製法と糖尿病モデルマウスへの移植法を開発し、糖尿病モデルマウスにおいて血糖値を改善することに一部成功している(unpublished)。

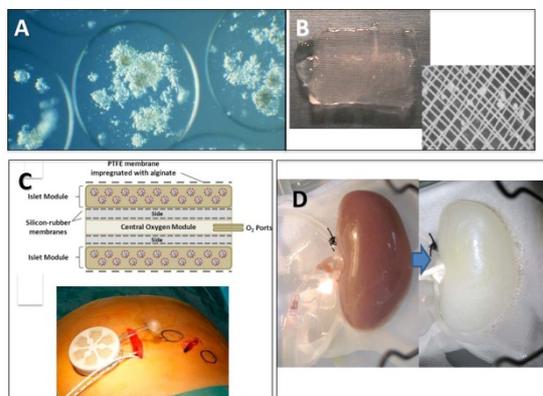
現在のところ、ヒト幹細胞から試験管内で誘導したインスリン分泌細胞は、その機能が十分とは言えない。しかし、生体内に移植することで次第に成熟することが想定され、今後の Yamaton P 計画は、ヒト由来ラ島の分化誘導と移植法の研究に焦点を絞る予定である。

糖尿病治療製品の多様性

先に再生医療における製品は、医薬品としての治療用細胞とその細胞を注入する医療用器機の相方の要素もつもとを述べた。すなわち



人への移植が可能なインスリン分泌細胞としての著者らの研究背景は、先に述べた通りである。一方、これらの細胞を注入するデバイスとしては、下記のもの上げられる。



A : ミクロカプセル化製品 : ニュージーランドの Living Cell Technology 社と日本の大塚製薬工場の合弁会社ダイアトランス大塚が新生児ブタのラ島を製品化して、ニュージーラ

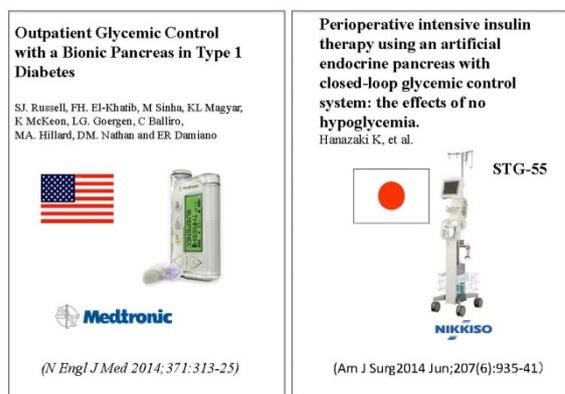
ンドと米国で治験を進めようとしている。腹クウ内移植のため取りだしは効かない。

B：マクロカプセル化製品：メッシュを内蔵してPVAを補強した製品で京都大学角らが研究開発を続けている。ブタラ島等が移植後分散しないため、緊急時に取りだしができるメリットをもつ。

C：チャンバー型製品：免疫隔離が目的で種々のメッシュ状のものとシリコン等の生体内の異物反応が少ない材質で作られている。写真は、Ludwing Bらにより報告されたチャンバー内へ酸素を送り込むことで移植されたラ島の低酸素を防ぐものである（PNAS 2013）。

D：脱細胞骨格製品：我々が取り組んでいる脱細胞したブタ臓器（この場合腎臓）を移植インシュリン分泌細胞の充填臓器として使うもの。A-Cの製品と異なり、免疫隔離性はない。

この移植用デバイス開発は、現在、ヒト由来細胞研究の進歩で大きな変化を必要とする。これまでこのようなチャンバーは、ブタラ島のような異種移植を想定して免疫隔離をもとめて開発が行なわれてきた。したがって、前臨床での有効性、安全性では、霊長類であるサル糖尿病モデルが必要であった。しかし、人為的に誘導したヒトラ島細胞の有効性、安全性は、サルモデルが必要であるか疑問視されている。さらに近年、血糖に反応してインシュリンを注入する医療用デバイスが急速に進歩している。



これらのデバイスは、むしろヒトと体サイズやインシュリンの相同性が高いブタモデルで検証されている。移植に用いる細胞とそれを注入するデバイスのベストの組み合わせを迅速にスクリーニングし、さらなる改良に続けることが、Double One (Only One, the best One) 製品につながると考えている。

新規製品の検証を画期的に行なう 膝全摘MMPモデル

前項で述べたが、ラ島移植の開発の歴史を見ると、前臨床の大型動物として、サル糖尿病モデルが使われてきた。ブタのラ島糖をヒトに応用する前臨床試験とし異種免疫反応の制

御等を含め有効性と安全性を求める上で極めて重要である。しかし、ヒト由来インシュリン細胞の検証としては、どうであろうか？コスト面や実験動物の管理面などで極めて多大な労力を要する。一方、ブタ糖尿病モデルは、インスリンがブタとヒトの相同性が高く、インスリン注入デバイスなどの検証系として海外では汎用性が高かった。

糖尿病治療薬の開発領域では、ヒト由来インスリン分泌細胞の有効性の検証系としてブタモデルは極めて有望である。事実、ヨーロッパでは、実験専用ミニブタの膵臓全摘モデルが本領域の標準系として使われている。

Goettingen Minipigs (GMP): Comparison of Two Different Models for Inducing Diabetes

A Strauss, V Moskalenko, C Tiurbe, I Chodnevskaja, S Timm, V Wiegering, CT Germer and K Ulrichs



Table: Persons, qualifications and time needed to induce the two diabetes models in the Goettingen minipig and care for the diabetic animals prior to grafting the isolated islets of Langerhans.

Type of work	Number of persons and qualification	Work time
diabetes induction with STZ	1 scientist or surgeon 1 animal caretaker	3 hours
diabetes induction with PE	2 surgeons 1 medical assistant 2 anaesthesiologists	6 hours
management of the STZ diabetes	1 animal caretaker	2 × 30 minutes/day
management of the PE diabetes (early phase)	1 surgeon	Up to 4 hours/day
management of the PE diabetes (late phase)	1 animal caretaker	2 × 30 minutes/day

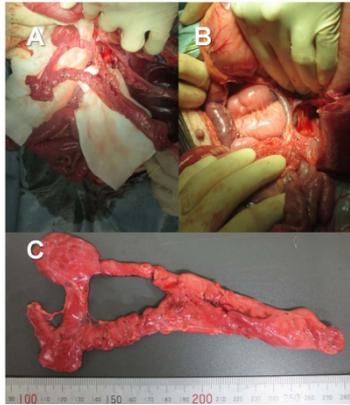
Abbreviations: STZ: streptozotocin; PE: pancreas explantation in the animal operation theatre

(Diabetology & Metabolic Syndrome 2012, 4:7)

しかし、ヒト細胞治療の検証系としてのミニブタは、家畜豚に比べれば小型化しているとは言え、犬、サルに比べ大型である。必然的に、テストするヒト細胞の数を多く必要とし、ヒトブタ間の移植後の免疫制御のために免疫抑制薬が大量になるため高コストとなる。我々は、実験専用ブタとして世界で最も小さいミニブタ（MMP）を用いて、膵全摘モデルの作成とその管理システムを作り上げた。



膵全摘は比較的容易な手術ではあるが、種々の製品を検証する系として再現性がよく安定したモデルとするためSOP化を行なった。

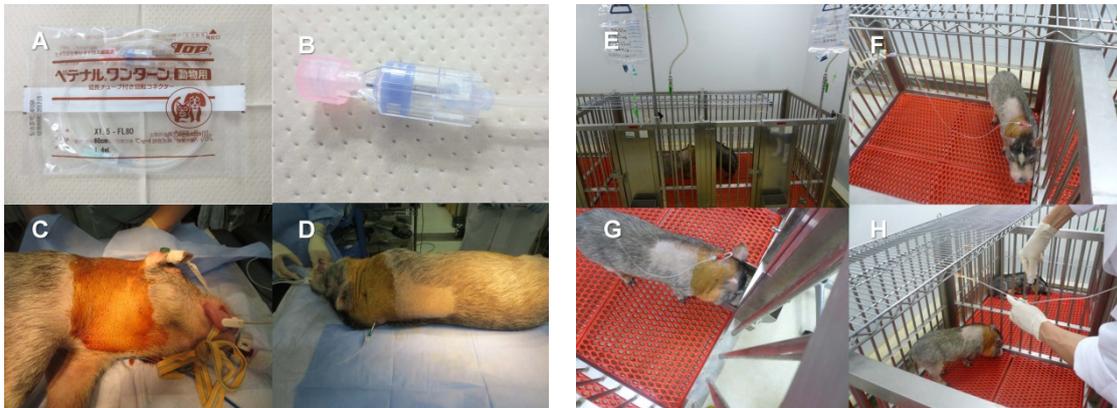


A：手術中写真；膵尾部、頭の順に周囲から電気メスを用いて剥離し、体部に流入する血管を結さつ切離する。

B：摘出後術野；十二指腸部の血流も良好に保たれている。

C：摘出した膵臓

さらに術後管理もきわめて重要である。フリームービングによる輸液ラインは、随時採血にも使用される。



A：フリームービングで使用するチューブ（ペテナルワンターン）

B：点滴チューブの回転部位

C：点滴チューブは頸部静脈に挿入

D：チューブは頸部背側より出す

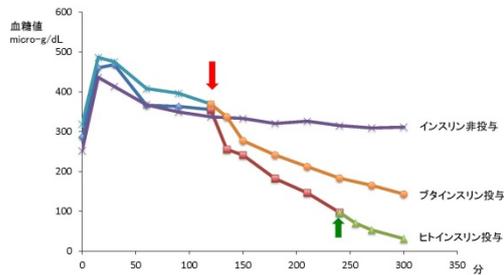
E：膵全摘後の点滴システム

F：フリームービングの様子

G：自由に食事が取れる

H：フリームービングチューブより採血が可能

本モデルを持ちいで下記の試験を行なった。



静脈内グルコース負荷試験 (IVGTT) は、0分時に 0.5g/kg (40%糖液を 18mL 前後) 急速静注した。豚全摘モデルは、その後の血糖値は 300 超を維持した。さらに、インスリン反応性試験として、グルコース静注 120 分後 (赤矢印) に 1unit/kg のヒト (ヒューマリン R (リリー) 速効型) またはブタインスリン (シグマ I 5523) を静注した。どちらも血糖低下作用を示したが、ブタに比べヒトのインスリンの効果が高く表れた。これについて試薬と薬剤の違い、すなわち薬剤は最大限の効き目をもたらすよう最適化されているためと考えられる。なお、ヒトインスリンを 240 分時に再投与したところ (緑矢印)、低血糖症状を来し、急遽 5%グルコース加生食を点滴した。

本評価システムにより、作製したヒトインスリン分泌細胞ならびにその細胞を注入するデバイスが、効率よく非臨床・臨床一体型で評価できる。