

いとりましょう。

(14時50分 休憩)

(15時03分 再開)

○田中 それでは、コーヒーでも飲みながら、安波先生も、急遽お願いしたところで、ほかの予定もあったんだけど、どうもありがとうございます。

○安波 田中先生が言われて、僕がよく覚えている言葉で、エドモンドの膵島移植を追随するだけでは絶対だめで、オリジナルを出さないかん。これは本当にそのとおりでありまして、心にしみわたっております。私も今その気持ちでやっております。きょうはそういうことで、膵島移植について今までやっていることとか、今後どうするかということと言えということですので、先ほど松本先生が言われましたけれども、今の膵島移植の状況というのは、移植すれば血糖値はよくなるけれども、1人のレシピエントをインスリン治療から離脱するのに2~3人のドナーが要るし、さらに長期に移植膵島機能が悪くなってしまふということがありまして、ここを実際の臨床で解決するには膵島の再生が必要ではないかなと私自身思っております。

どういう問題点があるかということでもありますけれども、この膵島のマスが減ってくるのが問題です。この解決法の一つは、こういう何らかの形で防ぐ方法を見出して、成績をよくしていく。もう一つは、移植した膵島の再生について、考慮しなければいけない。さらには、レシピエントのだめになった膵島からまた膵島が出てくる可能性があるわけでもありますから、そのことも考えなきゃいけない。

もう一つの大きなものは、このドナーのソースが限られて非常に少ない。ブタ膵島を使うかもしれない。これはヘーリングがブタの膵島を糖尿病サルに移植して、100日以上、もっと長い間免疫抑制剤を使用し血糖値がよくなったデータを出して、ブタ膵島を使用する感染症の問題を何らかの点でクリアすれば、もしかして彼らはやるかもしれないけれども、私自身はどうかなという気分があります。

さらに、このES細胞からの今の田中先生のところのiPS細胞があるわけですが、これが実際の使用に際しリスクあるところにはどういうふうなところをクリアしなければいけないかということも考えなきゃいけないわけです。

私自身は、まずこの近い将来、4、5年、一番思っていますのは、今の成績を少しでもよくする方法をやらなきゃいけないんじゃないかと思っているわけでもあります。

この移植膵島が喪失するのは、どういうメカニズムがあるのか。よく知られているのは、免疫抑制剤、FKにしてもサクイロスポリンにしても、カルシニューリンインヒビターが移植膵島細胞にトキシックであることは間違いありません。それから、さらに高血糖が続くと、膵島にトキシックであります。

先ほど言いましたけれども、余備力がないでかつかつの状態でいっていると、移植膵島がだんだんだめになってくるわけでもあります。そして、もちろん拒絶反応、同種移植さらに自己免疫拒絶反応も考えなければいけない。

私自身が最近、かなり力を入れてやっておりますのは、最初の段階です。early loss of islet grafts なんですけれども、移植して、例えば24時間以内に膵島がたくさん障害されてしまうということがあります。これは恐らく自然免疫という言葉がありますけれども、炎症とかそういうところで生着にかかわって、こういうもので膵島を先にドンとやられてしまう。これがどういうふうなメカニズムになっているか、これを防ぐ手だてはないかということでそれを解析しているわけでもあります。

ここをクリアできれば、恐らく先ほどの松本先生から興津先生の話もありましたが、最初のマスがかなり保たれば、かなりの問題が解決できるんじゃないか。臨床上解決できるんじゃないかというふうに思うわけでもあります。

そういうことを解析するために、マウスで実験を行っているわけでもあります。ストレプトゾシン糖尿病マウスの血糖値が400、500ありますけれども、これに膵島を400、この400というのは2匹のドナーからでありまして、これを経門脈的肝

内に移植する、そして血糖値が下がるわけですけれども、1匹分から200個入ると血糖が下がらない、そういう状況であります。組織を見てみますと、60日たった後ですけれども、ちゃんと着けば非常にいい膵島が肝臓の門脈の中にあるわけでありまして、血糖値の高いままでありますと、変性し脱顆粒した膵島が見られます。

次に、具体的に肝臓の中で何が起きているかというのを調べてみたわけですが、肝臓の中から単核球を単離してきまして、それでFACSで解析して、どういう細胞にどういう変化が起きているのか、膵島の壊れるのにどういう細胞がかかわっているのか、どういうサイトカインがかかわっているのかということ解析したのであります。そうしますと、我々が特に注目いたしましたのは、Gr-1、CD11b陽性細胞、これはここにあります好中球であります。これが移植してすぐから肝臓の中に集まってくるわけでありまして。これはFACS sortingした細胞の形態ですけれども、これはマウスの好中球であります。マーカーを見ておりますけれども、好中球が移植してすぐから肝臓に集まってくるということがわかったわけでありまして。

そうしますと、実際に形態を見てみるとどうかということでありまして。これは膵島移植後6時間の肝臓でありますけれども、この肝臓の中に膵島がここにあります。インスリン染色をしております。よく見ていただきますと、生きている細胞はここだけあります。後は核がピクノーティックになっており細胞は死んでおるわけでありまして。この切片ではすでに7割は死んでいるわけでありまして。この茶色に染まった細胞がGr-1陽性細胞、すなわち好中球であります。好中球が肝内に集積し、膵島の破壊にかかわっているということでありまして。

こういうことが防げればいいんじゃないかということでありまして。実際にサイトカインが出ているかどうかということでありましてけれども、今のGr-1陽性細胞、イントラサイトプラスミックサイトカインを調べてみますと、インターフェロンガンマーが出ていますし、TNFアルファも出る、非常に大量のサイトカインがこの浸潤細胞から出るわけでありまして。

そうしますと、こういう細胞が本当に膵島が壊れるのにかかわっているかどうかということでありましてから、通常では血糖が下がらない数の膵島を移植して、それからこのGr-1陽性細胞の抗体、移植時の1回だけ投与する、もしくはCD11bの抗体を移植時投与すると血糖が下がるわけでありまして。ということは、この陽性細胞が移植膵島破壊にかかわっているということを示しているわけでありまして。

さらに、サイトカインはどうかということでありましてけれども、この200個のコントロールでの移植後血糖はこうありますけれども、インターフェロンガンマーの抗体を1回だけ投与する。そうすると血糖は下がる。TNFアルファ抗体、IL-1β抗体も同じように下がる。ドナー膵島数をさらに半分に減らすということは、マウスで言えば、1匹から2匹に移植するということになります。1ドナー、2レシピエントですね。そうすると、インターフェロンガンマーだけではだめ、TNFアルファ、IL-1βだけではだめということになったら全部一緒にすると、これも全部下がってしまうということで、こういうふうなサイトカインがこういう膵島の破壊にかかわっておって、そのすべてを用いれば、1ドナーから2レシピエントまで行くというふうなことを示しているわけでありまして。これはマウスのお話であります。

そうしますと、その過程において、私たちはその前にNK T細胞ということに着目して研究しております、これはナチュラルキラーT細胞で、T細胞と全く違った細胞群でありまして、NKのマーカーとT細胞のマーカー両方を持つ細胞群です。これはJCIに掲載された我々の論文ですが移植免疫にレギュラトリー細胞として、NK T細胞がかかわっているということを初めて見出しました。

この細胞は、innate immune responseとそれからacquired immune response、両方にかかわっているわけでありまして。

私は、この細胞が今の膵島の壊れるところへどうもかかわっているんじゃないかと

ということで、研究を進めたわけでありまして。そうしますと、その答えが本当にストレートにイエスでありました。先ほど言いました400膵島を入れると血糖が下がる、200入れると下がらない、しかしこのNKT細胞がないノックアウトマウス、これは理研の谷口先生からいただいたマウスでありますけれども、こうしますと血糖が下がる。さらに、半分でもノックアウトマウスの血糖が下がるわけでありまして。

それをさらに裏打ちするために、細胞の移入実験をしているわけでありまして、NKTノックアウトマウスに膵島を200入れて血糖が下がって、これに肝臓の単核球 $5 \times 10^6$ 個を膵島を移植するときと一緒に移入するわけなんです。ワイルドタイプの細胞を入れると血糖が下がらない、しかしながらノックアウトマウスの細胞を入れると下がる。さらにこのNKT細胞が活性化するとインターフェロンガンマーを出すということがわかってはいますけれども、このインターフェロンガンマー、ノックアウトマウスの細胞を入れると血糖が下がる。組織を見てはいますけれども、血糖が下がれば非常にインタクトな膵島が、しかし血糖が高いままだと破壊されている、そういうふうな像が見られるわけでありまして。

すなわち、NKT細胞が膵島の破壊にかかわっているということを示しているわけでありまして。

じゃ、そのNKT細胞、ノックアウトマウスの肝臓ではサイトカインの産生はどうなるのかということでありましてけれども、これを見てみますとNKT細胞ノックアウトマウス肝臓では、インターフェロンガンマー産生は非常にダウンレギュレーションされているわけでありまして。こちらがコントロールでありまして、こういうふうにはインターフェロンガンマーがたくさん出て拒絶が起こる。しかしながらノックアウトマウスでは、好中球は肝臓に集積するんですけども、サイトカイン産生が少ない。このメカニズムは、次のスタディでかなり解析しております、大方わかってきております。

しかしながら、NKT細胞がないと好中球からサイトカインが出ないということがわかったわけでありまして。

そうすると、今度NKT細胞を、ターゲットにして拒絶を防ぐことができないかということでありまして。NKT細胞のリガンドのアルファガラクトセラミドというのがあります。特異的にNKT細胞を活性化いたします。そして大量のインターフェロンガンマーを出すわけでありまして。

例えばこのレシピエントの血糖値400以上というのが400個の膵島移植で下がるわけでありましてけれども、これにアルファガラクトセラミドをワンショット入れる、そうすると、好中球のガンマーインターフェロンは大量に出るわけなんです。そうしますと、通常では膵島移植後血糖は下がるけれども、これは下がらない、すなわち膵島が壊されているということでありまして。

しかしながら、繰り返してやると、これもパブリッシュのデータがあるわけでありましてけれども、繰り返してやると、インターフェロンガンマーが出なくなる。unresponsivenessと言いますか、そういう状況が生まれるわけでありまして。現象論的にそういうことがわかっております。

そうしますと、そういうことを移植する前にやってあげる、例えばマイナス15、11、7日にこのアルファガラクトセラミドを投与して移植すると、通常では下がらない血糖値がこういうことをすると下がるわけなんです。

ということは、NKT細胞を標的にして、こういうトリートメントをしますと、膵島が壊れるのを防ぐことができるということを示しているわけでありまして。同様に、先ほどと同じでありますけれども、ノックアウトマウスでは、先ほど申しましたインターフェロンガンマーは出ないわけでありましてけれども、先ほどの400個入れてアルファガラクトセラミドを入れると、通常よりさらに大量のインターフェロンガンマーが出る。この何回かすると、これがまた出なくなると、膵島が生着すると、そういう

ようなことがわかってきたわけでありませう。

これは、肝臓の中で、NK T細胞ディペンデントに好中球が活性化されて膵島が壊れるというメカニズムを初めて明らかにしたわけでありまして、JEM の表紙に採用されて、すぐにネイチャーレビューイムノロジーに紹介されました。といいますのは、こういうことがもしヒューマンに起これば、こういうことを制御できる可能性があつて、一気に臨床成績が上がる可能性があるということを彼らは認めたわけでありませう。

そうしますと、私の次のステップは、じゃ本当にヒトではどうかということでありませう。ヒトの肝臓でこういうふうなことが、同じようなことが起こっているかどうかということをお調べする必要があるわけでありませう。

次のストラテジーは、今やっていることは手術で切除した肝臓からリンパ球を採つてきて、*in vitro* の系で膵島が壊れるメカニズムで明らかにするということでありませう。最近松本先生のところから、ヒューマンのアイレットを送つていただいて見ておりますけれども、十分実験に使えるという状況だと思ひませう。ヒトの肝臓のリンパ球に関してある程度ペーパーがありますけれども、非常に少のうございませう。多分、材料の問題もあるのかもしれませう。

わかつておりますことは、CD 5 6、NK のマーカー、ここのところが一応NK T細胞であると思ひませう。非常にユニークなのは、肝臓の中にはCD 4 のT細胞が非常に少ない。ここはCD 8 でありませう。CD 4 がネガティブ。ところがこれは末梢血です。末梢血では、当然皆さんご存じのようにCD 8、ここのCD 4 の細胞とCD 8 の細胞両方あるわけです。肝臓は非常にユニークなところで、なぜこんなふうになっているのか、それから肝臓の中のNK T細胞はどういう動態を示しているのか。これは、ただ単にヒスリヒルの肝臓の細胞を見ておると、いろんな細胞がおりますけれども、今これをインテンシブに解析しているわけでありませう。どこの分画が、どういふサイトカインを出しているのかということでありませう。

ということで、私自身のストラテジーは、膵島の移植の成績をよくするにはどうしたらいいかということでありませうけれども、まずは今臨床に実際に使われているお薬で、新しく開発するんじゃなくて、今あるお薬でこの今言つたような細胞メカニズムで膵島の壊れるのを防ぐようなお薬はないかということで、マウスの系でスクリーニングしたわけでありませう。

そして、幾つか見つけました。一つは、昔の例えば、活性化プロテインC というのもありませう、HGF というのも昔発表しておりますけれども、つい最近抗 IL-6 受容体抗体、これは阪大の岸本先生が見つけられて、ずっと中外ロッシュが今開発して、既に日本でキャッスルマン病の治療薬として臨床に使われているわけでありませう。今年我国で末梢関節リウマチに承認される予定で実際患者さんに使うと非常に効果がある、きき目があるということでありませうけれども、このお薬に注目してあります。

それから、もう一つはアデノシンがあります。アデノシンは、検査薬で使われているし、アテツシンのトランスポーターインヒビター、それからディピリダモール、ベルサンチン、普通によく使われているお薬でありませう。こういうものが効果がないかどうかを見てみたわけでありませう。

このIL-6 に関しましてですけれども、このIL-6 というのは、メンブレインにIL-6 リセプターがあればg p 1 3 0 と共にシグナルが伝達する。細胞によってはリセプターがないのがあるわけでありませうけれども、そうすると、可溶性がIL-6 リセプターとくっついてこのg p 1 3 0 を介してシグナルが伝わるということで、ブロックするには抗体、それからg p 1 3 0 フェュージョンプロテインを用いるとこのシグナルがブロックできるわけです。

実際にIL-6 をこのマウスの実験で見てもみますと、非常に高く血中のIL-6 濃度が上がるわけでありませう。恐らくこのマウスの場合には、ヒトよりも極端に出るかと思ひませう。といいますのは、膵島の大きさというのは、マウスもヒトも同じでありませう。

す。0.2ミリ、血管はもちろんマウスは物すごく小さいわけでありませぬ。

そうしますと、マウスの方は、膵島は要するに大きい動物はたくさんあって、小さい動物は少ない、なぜそういうふうになっているか、非常に興味があるところでありませぬ。いずれにしても、マウスにこういうような細胞を入れると、かなり肝臓ネクローシスが起こり、そしてIL-6も上がります。それはすぐ戻ってくるということで、確かにIL-6はこういうふうにかかわっているんじゃないかということでありませぬ。

実際に、200個の膵島にコントロールアンティボディを入れると、全然だめですけどもIL-6リセプターの抗体を1回入れれば血糖は全部下がる。それに抗IL-6抗体でも下がる。さらにさっき言いましたgp130フュージョンプロテインでも下がるわけでありませぬ。

ということで、このパスウェイをブロックすれば、こういうふうな障害は防げるといふことでありませぬ。

実際に、このIL-6リセプターアンティボディを入れるときに、サイトカインの状況はどうなっているかということを見てみますと、先ほど申し上げたコントロールアンティボディでは、インターフェロガンマー、TNFアルファを産生するGr-1陽性細胞が非常にふえるわけでありませぬけれども、このIL-6リセプター抗体を投与するとサイトカインの産生がブロックされてくるわけでありませぬ。

次は、アデノシンでありますけれども、これは最近やっております、膵島移植研究で今度発表いたしますけれども、これも先ほど申しました、既に検査薬でどんどん使われていて、このベルサンチンなんていうのは、昔から使われているお薬であります。これはアデノシンのトランスポーターをブロックして細胞体アデノシンの濃度を上げるのではないかと思われませぬけれども、それがこういうのをやりますと、これは非常に半減期が短いんですけれども、一発だけやると血糖は下がるわけでありませぬ。このNBTIというのも下がりますし、ベルサンチンでも少し弱いですが、下がります。明らかにこういうものをやれば、効果があるということを示しているわけでありませぬ。

ということで、こういうのを今から見つけたのを、実際に先ほどの話じゃないですけども、治験と言いますか、既に使われているお薬ですから、ほとんど安全性に問題は無いわけで、1例1例やっていけば、本当のトランスレーショナルリサーチと言いますか、実際に臨床成績がよくなると思われませぬ。

臨床成績を向上して、それをステップに次のステップに行くということがまず重要じゃないかと思われませぬ。次はアイレットが実際に再生するかどうか、さらにホストの膵島が再生するかどうかということがあります。少しそれに言及したいと思われませぬ。

これは、マウスの話ですけども、allogeneic isletsの移植で、BACB/CからB6に移植して、拒絶反応を抑えて、それからずっと長くいて肝臓の中にアイレットを見ていく、そういう像であります。これは非常にユニークなのは、少しファイブローシスがあるということでありませぬけれども、この膵島がアルデハイドフクシン染色で染まっておりますから、ダクトのように見えるものがあるんです。これはすべてこうあるわけではありませぬ。こういうふうに見えるものがあって、明らかに通常の膵島と全く違います。非常にポラリティがある。極性があって、こういう膵島が出現することがよくわかると思われませぬけれども、こういうのがあります。

さらにもう一つ重要なことは、このシングルセルで膵島、この染色では、エラスティックファイバーも染まりますけれども血管の外にこういうふうなシングルで染まるインスリン細胞があるわけですね。僕自身の推測では、肝臓の何らかの細胞がアイレットの環境の中で、インスリンを再生する細胞ができた可能性もあるんじゃないか。これをもしはっきりどちらがかかったかということがわかれば、非常に意味があると思われませぬし、少ない膵島でそういうことを促せば、先ほどの話ではありませぬけれども、マスをふやすことも可能になるんじゃないかということが考えられます。

じゃ、残っている膵臓のところの再生はどうなっているかということでもあります。これはマウスで、こちらが頭ですけれども、右側にしっぽ、これは正常の膵臓がこういうふうにありますけれども、門脈がこちらできると7割ぐらいになります。さらに90%、これは非常にテクニック難しんですけれども、マイクロサージのやり方で細い血管を全部残して膵臓を採る。これは大きい膵島ですね。こういうふうにして残っている、この残ったところの膵島が再生するかどうか、これも非常に重要なことじゃないかと思います。技術的に非常に難しく、ここはまだ報告はないと思いますけれども、70%ということは、よく報告があります。

実際に、血糖を見てみます。これが70%を切ると、こういうふうに血糖がちょっと上がって、また戻ってきて正常になります。90%を切ると全部血糖が上がる、ずっとこのまま行ってしまうということでもあります。

その70%を切ったマウスにGTTをしているわけですね。14日目と60日目、そうすると、14日目では明らかに悪いわけです。それが60日たつとまたもとに戻る、同じマウスです。

その残った膵臓を見てみると、コントロール膵臓、こういうふうにアイレットがあるとすると、こういうふうに切った後の30日目は、非常に大きい膵島が見えてくる。このPCNA陽性細胞がたくさん出てくるということでもあります。

これは、東北大学の岡本先生は、昔よくラットでニコチンサンアミドで、非常に大きな膵島が出てくるという報告をしてありますけれども、どういうふうなメカニズムでこういうことになっているか。こういうことを促すことができないだろうかというのは、非常に重要な問題であると思います。

私には、もっと最近、今考えているところで言えますことは、9割切って血糖値が上がるわけですね、糖尿病になる。ここで膵島を移植してあげる。腎臓の皮膜に移植してあげる、そうすると血糖が下がるわけですね。ずっとして、この辺でまた腎臓を採る、そうすると血糖が上がる。動物はまた糖尿病になる。こっちでこのときにいろいろなことをしてあげて、腎臓を採って膵島グラフトを除いた時に、また血糖が下がれば、この残った膵臓の膵島が再生しているんじゃないか。そういうところを何か細胞が目に見える状況になれば、非常に有意義な情報を提供するんじゃないかと思っております。

ここでいろんなものをやる、要するに再生を通常でも何か修復再生期というのを働くわけですから、そういうことを、例えばこういうときに再生にどういうものがかかわってくるかということを見出すことができるんじゃないかと思います。

これは黒田先生のデータですね、大阪大学の。32歳の女性の人でIDDMで膵腎同時移植を受けた、1年11カ月後に腹壁癒痕ヘルニアの手術をして、そのときに膵臓の生検をもちろんインフォームドコンセントをして患者さんからやっているわけですね。糖尿の患者さんで膵腎同時移植した患者さんで、そうするとこれは膵島のグルカゴンも染まるけれども、インスリンはない。インスリンがあるのは、周囲のシングルセルのところに出てきているということで、恐らくはこれはやはりホストのもともとの膵臓からこういうインスリンが出てきているんじゃないか。これはソマトスタチンと同時に染まる細胞が出てきているということでもありますから、そういう正常では、そういう自己免疫、これは免疫抑制剤はずっと飲んでいきますから、自己免疫は防げているわけですから。

恐らくそういうことがあれば、ずっと入れかわると言いますか、新しくできる膵島もあるんじゃないかなということでもあります。

次に、ESセルと、iPS細胞でありますけれども、これは2006年になります、ノボの人がネイチャー・ジェネティクスにヒトのES細胞からインスリンができる細胞をつくったという報告が出ました。私も非常に驚きましたけれども、ただこのときは、まだグルコースにディペンデントのインスリンをリリースすることはまだないと

ということです。ところが、ついこの前、ペーパーが出まして、非常に驚きましたけれども、彼らはこういうふうに幾つか段階において、ヒトのES細胞を条件をかえて培養して、ここではパンクレアティックエンドダーム。このところで、これは大体6から9週間のヒューマンの膵臓に当たるんだそうですけれども、胎児ですね。

これを移植する、インビトロでそういう状況というのは非常に難しいかもしれない、分化するのは。だけど、インビボにしてあげれば、いい状況で置けば本当に通常の再生能力の方に行くんじゃないかということで、私は全く同感でありますけれども、彼らは、このペーパーを出しまして、データ、これは移植して78日目に Epididymal fat pad にこのメールマウスにスキットマウス、スキットのベージマウスで移植しているんですけれども、彼らはペーパーをとってきましたけれども、こういうふうなインスリンが出るし、c-peptide ですかね。グルコースの感受性もあるということで、ここが普通コントロールにアダルト、通常のアイレットを使って、これがヒューマンES細胞のアイレットの関係で移植したやつを見ると、ちゃんとグルコースディペンデントにインスリンが出ているというような報告が出ておりました。

こういうふうなES細胞にしても、もちろんiPS細胞は今から研究するんでしょうけれども、一番問題はやはりこの腫瘍ができないかどうかじゃないかというふうに思います。どの段階でどういう細胞を移植したらより安全かなということが非常に必要だなと。そういうことで私たちの膵島のグループというのが、もしそういうふうな先生方がどうなったかというのを、すぐ移植することもできますし、そういうことこの環境というのは非常にあるんじゃないかなと思います。

さらに、こういう細胞を使ったとしても、iPSって、自分の細胞を使っても、autoimmune rejection が起こるわけでありましてから、同じ免疫機序、あるいはそれに向かってこの膵島が壊れるわけでありましてから、何らかの免疫抑制と言いますか、トランス誘導が必要になってくる。

私たちも、ちょっと前でありまして、マウス胎児膵臓の移植というのをやっていたんです。通常胎児の移植をこれは糖尿病のマウスにこの胎児、産まれるちょっと前ですけれども、これから膵臓を腎皮膜に移植する、確かに血糖は下がります。ここで腎臓を採ると血糖は上がるわけです。こういうものを使う限り腫瘍はできないわけです。だからこういう段階をどこで見きわめるかというのが今から非常に重要になってくるんじゃないかなと。マルチポテンシイでいろいろ行くんじゃないかと、ある程度膵島に分化するということで使ってあげれば、非常に可能性が出てくるんじゃないかなと。

実際、組織を見てみますと、この移植時の胎児膵をインスリンで染めていますけれども、こういう膵島がまだなくてクラスターである。これはヒトでも同じ、ヒトでも大体産まれて1年以上たってから、もうちょっとたってから膵島になるわけです。クラスターです、ずっと。だんだんマチュレーションにしてアイレットになる。膵島を分離するときも、非常に若いときに難しいというのは、こういうところもあるのかもしれない。

ところが、実際に移植して30日目を見ると、こういうふうな膵島がちゃんとできているわけです。これは腎皮膜から血糖が下がったときに見ると、こういうふうな状況がある。例えばこういう状況があるところに、例えばiPS細胞なり、何か持ってくれば、それがこの環境に運命づけられて悪い方に行かなくて、膵島の方に向かうことも十分考えられるんじゃないかというふうに思うわけでございます。

実際、組織を見てみますと、14日目に見てみますと、これはサイトケラチン陽性で、これはインスリン陽性細胞、こういうふうに出ていますけれども、こういうところから出てくる、ちょっとダクトから出てくるわけです。後で谷口先生からのお話があるかもしれませんが、こういうふうなどの細胞がどういうふうになって、細胞ができていて、入れかわっているかというのは、非常に大切なことであると思いま

す。

これは最後のスライドですけれども、膵島のヒストリックバックグラウンドが書いています。考えてみますと、このレイミーとコスタアノブスキー、67年に初めて膵島をラットから採ったわけでありまして、このときから、既に彼らは採れたときから、これは糖尿病に使うんだということで、移植の実験を始めておったわけでありまして、73年にネイチャーに実際に膵島を移植すると糖尿の血糖が下がったという報告が出ております。その後、ずっと今まで臨床が進んできたわけですが、私自身は、ちょうどこのころ、レイシーのラボに留学いたしまして、セントルイスに行きまして、ブタとかウシとか、そういう動物、ヒトの臨床に向けて膵島を単離するかということをやっております。これは世界で初めてのイヌの単離膵島です。

そして、彼らが90年に初めて臨床膵島移植をいたしました。91年にIPITAができて、そして先ほどから言っているシャピロ、それから京都大学の移植、そして福岡大学は2006年に初めて実施。こうやってみますと、この最近のスピードというか、これは非常にすごいサイエンスの進みぐあいがあります。しかしながら私はこの領域は、先ほど申しましたけれども、我が国でこういうことを一歩一歩やっていけば、十分にリーダーシップがとれて行ける領域じゃないかというふうに思います。

この膵島の移植、まさにトランスレーショナルリサーチでありまして、実際にやったことを臨床にフィードバックして、そして臨床成績をよくしていくということでもあります。

私も、非常に多くのコラボレーターの方にお世話になっておりますけれども、この福岡大学のチーム、理研の谷口先生、それから千葉の中山先生、それから産業医科大学、それから鹿児島大学、丸山先生もいますし、ヘーリングのところにも人を送ったりしています。

最近松本先生からヒューマンのアイレットを送っていただき、今から精力的にやっていきたいと思っております。以上です。

○田中 ありがとうございます。それでは、どうぞ。

○松本 アデノシンですけれども、これはどこのメカニズムで。

○安波 エクストラセルラーのアデノシンというのが、どうもプロペクティブに働くみたいなんです。どうもNK細胞を抑制する。肝臓のリパーフェュージョンインジャリーにアデノシンリセプターのアゴニストがいいというのがJEMに出まして、僕たちのペーパーは2005年だった、2006年にそういうペーパーが出たわけなんです。これはNK細胞にかかわっているなということで、僕たちも使ってみたのがきっかけです。NK細胞をどういうふうに抑制するかというのはまだちょっとわかりません。

リパーフェュージョンインジャリーにNK細胞がかかわっている、それは論文があります。

○興津 膵島の評価をするときに、ピボのものですけどとかあるいは、もう一つはヌードマウスもあると思うんですけれども、スキッドでもスキッドノッドとノッド以外のものとだったら、NKがあるとかないとかで違いがあったりすると思うんです。

先生のお考えからいうと、例えばスキッドノッドを使うのとスキッドを使うのとは違うような感じがするんですけれども、そんなエビデンスとかは。

○安波 それは、そのマウスを使っていないから何とも言えないんですけれども、それはすぐ移植してみればわかるんじゃないですか、肝臓に。腎臓にまだだったら、それはある意味、拒絶反応が起こらなければ生着すると思います。

○興津 ヌードマウスのバックグラウンドというのは、NKとか、そういうのは。

○安波 多分あれば、intrathymic T細胞がある。通常着きますから。でもずっ



と見ていても、やはり細胞をインビトロで移植する前に伊ザキから言えば、刺激したらいいかどうかというのはわかる。それ以外今のところはないんやないかなという気はしますけどね。

○興津 先生は、もう一つ言えば、イントラティパティックもコンポータルの中に入れられた細胞で、中の方の核がインディジェネレートしているような図を示されていますけれども、あれを原因としては、先生は浸潤してくる細胞を目指すモグラか何かの影響というふうに考えているんですか。

○安波 そう思いますよ。

○興津 例えば、やはりセントラルに多いということで、セントラルにある細胞が受けやすい人、いわゆる栄養の不足であるとか、あるいはオキシゲンが少ないとか、そういうようなものというのは、どうなんでしょうか。

○安波 いや、それはわかりませんね。周りから壊れるのか、中から壊れるのか。

○興津 例えば、先生で中に入ってくるやつがない場合には、有意にそういった中でのディジェネレーションというは少なくなってくるんですか。NK Tがノックアウトされたマウスでも、イントラヘパティックに入れられた膵島を見ると、その中の中心に近い核というのは、結構保たれている。

○安波 そうです。

○南 膵島の細胞を分化させるのに、インビトロでは難しい。インビボにする方がいいということなんですけれども、移植する場所というのは、腎皮膜も使っておられましたけれども、膵臓じゃなくてもいいんですか。

○安波 そうですね。膵臓は多分できないと思います、技術的に。移植する場所はどこかというのは、きょうは言いませんでしたが、いっぱいあります。例えば、僕は大網に入れたことがあります。オメンタルパウチ。要するにインスリンがポータルサーキュレーションに先にいった方がいいんじゃないかという。要するに膵島をつくるために、血流とコンテナを利用して、限られたところにある一定量の血流が要る。そうしないと血糖は下がらない。例えば、腹腔内に膵島をバットばらまいたら、何千個の膵島が必要、血糖の下がるために。ただ、腎皮膜なんて、例えばマウスの場合200個、150個にすると下がるわけですね。限られたところで限られた場所に膵島を入れてあげると非常に効果がある。

○南 膵島そのものを入れる場合は、そうでしょうけれども、再生ということを考えてときに、何らかの未分化の細胞を分化させてやろうと思ったときにも、それは腎皮膜下でも構わないですか。

○安波 多分構わないと思いますね。それはちょっとわかりませんね。肝臓に入れるとどこに行っているかわかりませんから、大体どこもそれは非常に重要なことだと思うんです。先生がもしされて、僕たちがお手伝いできるときにやりますけれども、入れた細胞ともとの細胞の区別がつけば、十分それはできますよね。どういう状況にしてあげれば、場所が違えばもっといいところがあるかもしれない。分化したものですから、それは非常に大切なもの。

それからあと、移植場所としてテストイスするんですね。テストイスの中。それからあと筋肉の中もできるし、入れ方によっては。

多分コンテナができて血流あるところをつくってあげれば、どこでも機能する。

○田中 逆にそのことを言えば、まずサイトの問題は決着がついていないということ。

○安波 ついていません。僕の言った話は肝臓の話ですから、例えばこれがもしヒューマンで腎皮膜やって、全部つけばそっちに全部行っちゃうんです。ところが、昔から今みたいな方法にやって膵島が純粹に採れるようになって、昔はあったんですが、きたない外分泌がいっぱい入ったやつを腎皮膜でだめだったというのがあるんで

すけれども、今みたいな状況になって、例えば腎皮膜に入れて本当にどうかというのは、だれもサルでもやっていないんです。ぜひやらなきゃいけないと思っているんですが。

○田中　　この間、ついどれぐらい前か、例のハーバードの山田さんがやっている胸腺、それから腎皮膜ですね。それだと臨床的には腎皮膜でも今みたいに、鏡視下で入れることはできるけれども、サイトの問題はまだ決着ついていないと考えていいのかな。

○安波　　そうですね、臨床ではですね。

○田中　　僕の薄っぺらな知識では、ちょうど松本さんがやっているときに、クッパーセルどんな役割をするのかという話があったんですけども、この問題もまだ決着がついていませんね。

○安波　　それは、僕たちもほとんどわかりかけています。というのは、移植した後にクッパー細胞を活性化されてサイトカインが出るんです。IL-6, IL-12とか、そしてNK T細胞を活性化する。NK T細胞はさらに好中球を活性化します。サイトカインが出る。

○田中　　そうすると、逆にそれを言えば腎皮膜がいい組織をつくるというのはありますね。

○安波　　ありますね。だからエビデンスを示せば、それは全部一気にそっちに行ってワンドナーずっと行くかもしれませんね。

ただ、免疫抑制剤とか、そういうものは肝臓の方がいいわけです。先生の肝移植の方がトレランスになるわけです、移植部位としては。腎皮膜ずっと免疫抑制剤をやらなきゃいけない。

○興津　　先生、オメトタンパウチャーでよくヘリングなんかスライド、先生行って、オメトタンパウチャーというのは、ヒトに適用する場合には、結構大きなあれになるんですか、侵襲。

○安波　　ならないですよ、外科医ならおなかを開けてパッと見たら、腹膜があるじゃないですか。腹膜このぐらい採れますよ、採ろうと思ったら。

○興津　　それをどうする。

○安波　　それをまとめて中へオメンタムを埋めて入れて、もしあれなら、人工的にヘルニアをつくるみたいになるけれども、皮下に埋没する、そこに置いてあげたらいいかなと思ったりするんですが。でも、それは全身麻酔で、今のように針を刺して細胞をポッと入れればいいというものじゃないから、スーパーオリティーがないとできないです。今は全身麻酔でも機能がちゃんとできる、侵襲少なくてできるということであれば、僕はそっちにシフトします。

それはサルでやらないと、すぐできると思うんです。そこまでちょっとまだ手が回っていないので、臍島を採って、糖尿病のサルをつくって移植して、そのサルは確か昔マイアミのリコルディの前の先生がおりますよね。やはり肝臓に入れるとずっと時間とともにだめになってしまうというのは、昔からデータがあるんですよ。

○興津　　肝臓に、入れる装置。

○安波　　ダニエルミンツという人。マイアミの糖尿病の臍島の方の第一世代ですね。レイミーと同じ世代でそのぐらいの人がいて、昔そういう肝臓に入れるとだんだんだめになるという。

○興津　　オメンダムパウチャーって、オメンダムって、腹膜に、血管にもいずれはアクセスしないとイケないと思うんですけども、臍島の中にある血管が、腹膜でさえぎられるような感じがして、血流というのが難しいような感じがあるんですが、そんなことはないんですか。

○安波　　だから、逆に血管はリッチだから、そこの上に乗せることで新しい血管が出てくる、要するに血流をサプライヤーとしてオメントを使う、コンテナーとして

腹膜を使う。最初僕たちは中に入れて、アイレットコンテナで外から埋めたんですが、全然だめで、いろいろ試行錯誤してあるとき、中に入れるという単純なことでパウチの中にオメンタムを埋めて、その中に膵島を入れて上げたら血糖が下がったということです。要するに血流のサプライヤーとしてオメンタムを使う。

○興津 ヘリングも本気で考えているみたいです。

○安波 あれはブタの膵島を入れるんでしょう。本当に安全性の問題があるから、取り出さないといけないし、そういうことがあって、さっき言ったみたいに入れれば、追加して幾らでもふやせるし、のけようと思っただけですぐにのけられるからいいんじゃないですか。肝臓の中へちよっと。

○田中 それでは、谷口先生、谷口先生もちよっと突然で済みません。

○谷口 きょうは、このような機会を与えていただきまして、ありがとうございます。

これは、もう示すまでもございませぬけれども、膵島移植のための膵島をいかにつくり出すのかということが私どものテーマでありますし、恐らく再生医学、この領域で研究されている方の共通した目標だろうと思います。

ところが、これは一般的な問題といたしまして、先ほどから何度か出てきておりますけれども、幹細胞、ステムセルから作ろうとしますと、発生における器官形成過程を如何に再現するのかということが問題なわけですが、我々はここ数年間注目して研究してきたのは、膵臓の幹細胞、膵臓の中からステムセルを採り出して、それをインビトロで分析しようということを研究してきました。

結論を先に言いますと、実際可能なわけですし、フローサイトメトリーという装置を使って精度を高く幹細胞を分離し、それらのクローン解析をしていくというようなことは、バイオロジー研究としては、大変よくできるようになってきています。

ところが、実際、臨床に使うためのベータ細胞を大量に創出するという点に関しては、かなり大きな課題があるということで、現時点では相当なギャップがあるのではないかと思います。実際、必要なベータ細胞の量は、相当量が必要ですし、このような二次元の培養系で扱っているものとは相当に違うものが三次的なプロダクトとして必要だということで、これは大変大きなギャップであるということ非常に強く感じたわけでありませぬ。

そこで、実際の出口イメージが膵島移植でありますので、出口イメージ側からたどる研究も必要だろうということで、膵島スフェロイドを生体外で細胞からつくろうと考えたわけですね。それから、それらを大量につくる必要があろう。そしてその機能、特に治療効果を解析することを行わなくては行けないと考えました。

そして、実際に臨床で使われている生体から採り出した膵島と比べて、非常に良いものでなければ、臨床につながる技術としては認められないだろうということで、我々はこれらをさらに血管化することによって、高度化しようということ考えたわけですね。

我々がメインにやってきた研究は、幹細胞研究で幹細胞の同定と分化誘導ということをやっているわけなんですけど、これをこのままどっていけば、再生医療につながるのかというと、私はそれだけでは難しいだろうと考えておりましたので、全く別ルートの研究として工学的研究を入れなくちゃいけないと考えたわけですね。いわゆるエンジニアリング、技術開発です。このようなことで、今回発表させていただくような技術開発研究となったわけですね。

この技術開発は、膵島スフェロイドというものをベータ細胞からつくるための技術、そしてそれらを大量につくるための技術、そしてそれらを血管化するための技術、そして最終的には、ヒト細胞でそのような技術を再現していく、こういう流れで技術開発を行っています。

そして、最終的には、幹細胞研究と工学的研究を推進して行くうえでももちろん融合

するということを考えているわけでありませう。

このストラテジー、三次元的な膵島スフェロイドをつくる方法が幾つかあったわけでありませう。

一つは、微少重力環境を創出するような培養装置というのが既に幾つか開発されておりまして、三次元培養の新しい手法を使うということでありませう。それからもう一つは、このようなアタッチメントをしない培養ディッシュを使う方法で、これは三次元培養に一般的によく使われる方法です。近い手法として、ハンニグトロップ法というES細胞の培養もありますけれども、培養皿に細胞がアタッチメントしない材料で培養皿を作製して、細胞塊を作る方法です。あるいは、もう少し高度化されたものとして培養皿の一部を表面処理によって、細胞が付着するところとしないうところを制御すると、スフェロイドができるという方法もある。

それから、最近では、材料研究者がかなりこの領域に入ってきておりまして、いろんな高分子による細胞のアンカリングを操作することによって、強制的に三次元構造を素早くつくらせるということも研究されてきています。

我々は、スフェロイドを大量につくるということを目標としておりまして、この方法を採用して研究をしたわけだ。実際我々が使っておりましてのは、神戸の三菱重工さんが開発した装置ですが、これは「きぼう」という宇宙ステーションが上がっておりますけれども、その「きぼう」の地上対照実験用に地上で疑似微少動力環境をつくるために開発されたものであり、回転軸が二つありまして、2軸型にジャイロのように回すものです。そうすると、これはかなり詳細な軌道計算をコンピューター制御でしているんですけども、この回転の中心域に理論上、ベクトルが相殺される領域が生じて、その部分には疑似微少動力環境が発生しているということでありませう。

この装置自体は売っているものですが、私たちが開発したのは、この中に搭載しております細胞培養用の装置でありまして、このユニットの中で細胞培養液を環流して閉鎖系で細胞培養を長時間、長時間というのは30日ぐらいいはできるようにしよう。こういうものを独自に開発することにいたしました。

イメージとしましては、胎児の発生過程における形づくりは、羊水中で浮遊しながら行われるということが非常に重要でありまして、疑似微少動力環境は具体的に何が重要だかなかなか説明できないんですけども、細胞側の都合で三次元的な構造ができるためには、ニュートラルな環境が必要だろうということだ、三次元的な組織構築のために有利な環境ではなかろうかと考えたわけだ。

実際、こまごましたことはいろいろあるんですけども、最終的にはこの細胞培養ユニットと培地を環流するユニットを半透膜で隔離しまして、この部分で、これを横から見るとこうなるわけだ、半透膜を利用してその外側をゆっくりと培養液を環流させるというような装置を開発しました。

そうしますと、今日お示しできるのはベータ細胞株を使っている実験なんですけども、このようにスフェロイドと言われる細胞の固まりがたくさんできるということが、培養系で実現化できるということだ。

実際、膵島スフェロイドをどれだけ数をつくるかということなんですけども、この培養条件、例えば播種する細胞の密度、あるいは回転数、そういったものを幾つか条件設定いたしますと、例えばこの条件ですと、大きさが直径150マイクロから200マイクロという、これは生体中の膵島の大きさに近いものなんですけども、これをかなりの数作ることが可能です。

実際できてきたものをよく調べますと、これは生体中の膵島でありませう、それと非常に近い大きさのスフェロイドをつくと、それらはインスリンやC-ペプチドをきちんと発現しているというものでありませう。

これはちょっと余談なんですけども、MIN6を使った場合は、グルタゴンやスマスタチン等の発現レベルも遺伝子レベルでかなり上がってくるということが判って

きまして今我々はちょっと興味を持っています。

○南 グルカゴン陽性細胞は外側に存在するのですか。

○谷口 そうであればまさに生体内の膵島と同じなんです、そこはちょっと今は確認ができていません。

実際でき上がったものは、グルコース濃度を上げたことに俊敏に反応して、インスリンをリリースすることが実際に可能です。

MIN6というのは、阪大の宮崎先生がつくられた非常に有名なマウスのベータ細胞のセルラインで大変能力が高い細胞であります、これはスフェロイドの培養と二次元の培養を比較したグルコース負荷に対するインスリン分泌のレスポンスを見たものなんです、もともと非常に高いものなので、大きな差が出ていないのですが、トルブタミド刺激をすると、有意差を持ってスフェロイド、すなわち、三次元培養している方がインスリン分泌能が高いというデータがあります。

実際これを移植実験に使ってみるとということになるわけですが、STZで糖尿病を誘導したマウスへ移植実験を行いました。

そうしましたら、MIN6はセルラインで非常に増殖能力が高いですので、セルラインだけを腎皮膜下に移植しましたら血糖値は下がります。そしてむしろ低血糖になるわけです。

一方、膵島スフェロイドの場合は、我々の検討では25個を移植すると、治療域のレンジに血糖値が入ってきて、これぐらいの期間ですと低血糖になることなく血糖コントロールができるということで、移植側の腎臓を切除すると高血糖状態に戻りますので、移植した膵島スフェロイドは機能しているだろうということがわかります。

これは腎皮膜下における移植した膵島スフェロイドの組織像ですが、中に血管構造が侵入しているのがわかります。スフェロイドの中に血管が侵入してきています。それからインスリンやC-ペプチドの免疫染色でそれらの発現を継続していることがわかります。

○興津 それは25個の移植で治療が出来るということですか？

○谷口 そうです、我々の検討では25個の移植で高血糖の改善が認められています。

○南 MIN6は移植しても増殖しますよね、きっと。

○谷口 ええ、増殖していると思います。今日お示ししていますのは、MIN6と呼ばれるベータ細胞株を使っていますので、移植後の細胞増殖が間違いなくあると思います。

○興津 スフェロイドを形成してしまうと、それほど増殖能が余り上がらないというふうな面も聞いたんですが、そんなことはないんですか。

○谷口 増殖の検討は、三次元培養を行なったときに二次元の場合とどれぐらい違うのかというのは、極めて重要ですがまだ検討していません。ただ、低血糖で死ぬようなことは、例えば200個移植した場合などでも低血糖で素早く死ぬというようなことは経験しておりませんので、少なくとも同等か、ないしは若干増殖能が落ちているような印象を持っております。ただ、正確には今はわかりません。

このように、膵島スフェロイドを大量につくることは、少なくとも基本的な技術としてはできるだろうと思います。これももちろんプライマリーに持っていくということは非常に大事なことなんです、基本的技術ができてきたということで、もう一つ大事な要素技術としまして、スフェロイドの血管化ということをする必要があろうというふうに考えまして、このような血管構造をつくるという技術を、これは私の外科の時代の同僚の仕事なんです、彼がハーバードで非常に良い技術を確立したということで、その技術を導入いたしました。

ここでは、血管内皮細胞と、そして血管周皮細胞、ペリサイトと呼ばれる細胞なんです、これは発生の由来が違うということで、2種類の異なった細胞を使って血管

をつくっていくという技術があります。

これは、実際ヒトの臍帯血の血管内皮細胞、ヒューベックと呼ばれる細胞と、マウスの間葉系幹細胞のセルラインを使うというのがハーバード大で行われていた方法であります。

ここに足場材料があるということが非常に大事であります。ヒューベックと、これがマウスの間葉系幹細胞のセルラインと言われていますCH310T1/2（テンティアンドハーフ）と呼ばれる細胞株で、これらを混合してタイプIVコラーゲンとファイブロンネクチンをまぜ合わせたゲル、これと合わせまして三次元培養を24時間継続して、それをNOD/scidマウスに移植する、こういう実験系で三次元的な血管構造、が形成され、血流を有するか否かということを見るわけです。

この実験は、かなり特殊でありまして、ここにクラニアルウインドウ法とあるんですが、マウスの頭蓋部を一部除去しまして、この部分にゲルを移植してここをガラスで密封することによって、1匹のマウスを例えば半年以上にわたって、生体内で生じていることを継続的に観察していく、こういうような実験系で血管化を長時間追跡していくわけでありまして。

そうしますと、このような、こちらはヒトのヒューベックとマウスのテンティアンドハーフからつくられたヒトとマウスのキメラ血管なんですが、非常に密な毛細血管網ができてきて、長期間維持されるというわけでありまして。

これを実際、三次元的な観察を多光子顕微鏡を使って生体内3D画像を取得して計量的に評価していくということが出来ます。これは私どももようやく装置を導入しまして、可能になったところです。

このような再構成された血管を、ヒトの血管内皮細胞に対するPECAM-1と呼ばれるマーカーとペリサイトに対するSMAと呼ばれるマーカーで染色しますと、血管周囲からSMA陽性の細胞で取り囲まれておりますので、血管内皮細胞の周囲をステムセル由来の恐らくペリサイトが囲ったしっかりした細少動静脈レベルの血管はできているだろうというふうに考えています。

私どものプログラムが行いましたのは、これをヒト型血管にかえていくことでありまして、プライマリーのヒューマンステムセルを使ってヒト型血管ネットワークを同じ方法で作るということを行なっています。

一応、念のために血管内皮細胞と間葉系幹細胞との両方を入れた場合と血管内皮細胞だけということを行いまして、これはマウスの実験結果と同じで、間葉系幹細胞があればヒト型血管構造がきちっとインビボでもできますし、インビトロでもできてくるということになります。

これは実際にレトロウイルスでクサビラオレンジとBGF Pでマーキングしてインビボで血管再構築をしていくという実験系で調べております。

これは実際にインビトロで7日間、三次元培養したのですが、血管構造ができていくという実験結果であります、7日間かけまして、こういう構造体が実際にできます。

インビボにおきまして、同じようなことが起こって、そしてこれは長期間、少なくとも大体90日ぐらひは維持されることが今確認されておりますが、ヒト型の血管構造ができております。

そして、血管網の定量的な指標を測定しますと、ヒト方血管は減ることなく少なくとも維持されているということがわかっております。

実際、できている血管構造につきましては、蛍光デキストランを静注して、再構築された血管構造の中をきちんと血液が流れていることを確認しておりますので、ヒト型の血管をヒトの細胞から組織構造として再構成することが可能であるということがここで明らかにされたわけです。

工学領域における技術開発の方では、要素技術という概念が非常に大事であります

が、いろんな各要素技術をつくって、その要素技術同士を組み合わせることによって、さらに新しい技術をつくり出すという工学的な手法ですが、非常にいい方法だと思っております。膝関節スフェロイドを大量に創出する技術、それから、ヒト血管の再構成技術などの要素技術というのができておりますので、ここにもう一つ、新しい血管誘導をサポートする生体材料というのがもう一つあると思いますが、それらを融合させて血管化されたヒト膝関節をつくらうというようなことを今、最近やっているということでもあります。

今日の話で、カバーしておりますのはこの領域の研究で、三次元培養系と血管化技術、それぞれができてきた。これらを融合させるということも必要です。これらの上流というのはさまざまな研究がありますが、我々はこの部分を5年間研究しました。今はiPS細胞というのが新しくできてきたということで、プライマリーの膝臓から取り出す幹細胞からは大量のベータ細胞を作るといことはかなり難しいということはおわかってきましたので、新しいソースを積極的に求めるべきだという考えを持っています。iPSに関する大きなプロジェクトが取り組まれると思っておりますけれども、我々もiPS細胞の研究はやっていきたいというふうに考えておりました。最終的には分化誘導にも三次元培養が有益ではないか、あるいは、血管との緊密な関係が重要ではないかと考えております。

本研究は、我々横浜市大のグループと、物質・材料研究機構との共同研究で、あとハーバード大のラケシュ・ジェインとの共同プロジェクトになります。どうもありがとうございました。

○田中            ありがとうございました。それではどうぞ。

○安波            膝臓の先生がさっきおっしゃっていた細胞がどういうところが結果的に難しかったということがわかったんでしょうか。

○谷口            我々は、ステムセルバイオロジーの解明ということで、ステムセルを分離してそれらの性質を調べるという、そしてステムセルを同定するという研究を行いました。ところが、実際それを医療技術に使えるかということ、最終的に松本先生が野口先生のお仕事をお示しされましたけれども、恐らくそこにステムセルが存在するのかどうかを調べることはできるとしても、そこから医療に使える大量のベータ細胞をつくる技術にフラッシュアウトできるという点は、やっている本人として、結構難しいと感じています。少なくとも技術革新等の大きなものがないと簡単ではないと思っております。

その大きな技術革新がiPS細胞の開発であり、それはステムセル自身を大量につくることができる可能性があります。膝臓のステムセルからできるベータ細胞の数というのはかなり限定されているというのが私どもの研究結果ですので、ベータ細胞をつくるもとの膝臓のステムセルをiPSから大量につくっていくということが非常に重要なプログラムだろうと我々は考えて実験を計画しているところです。

○安波            そうすると、膝臓にあるステムセルというのは、ある程度研究されちゃって、非常にスローにしかふえない、ふやすことができない。

○谷口            ふえないです。そして、ベータ細胞に分化する能力をもったステムセルからでき上がってくるベータ細胞の量は相当少ないということ。

○安波            何らかの例えば炎症を起こすとかがすると、それが見えてふえたりとか減ったりとか、それはどうですか。

○谷口            その可能性は、全く否定はしませんけれども、これまでのさまざまなレポートからすると、ふえることはあるけれども、べらぼうにふえることはないと思っております。

○南              ごく最近のセルの論文で、やはり炎症というか、それで障害を起こしたときには、ある程度ステムセルの導引がかかってくるという話はあるんですけども、通常の状態、ベータ細胞を維持することの機能は余りないんじゃないかという感じ

です。

○田中 前に浅島先生ですか、ES細胞から新聞にでっかく僕は読んだことはあるんですが、その後どうなっているんですかね。

○谷口 僕らが知る範囲では、余り発表はその後はないと思います。

○田中 そうですか。

○谷口 ただ、浅島先生の最初の報告がショッキングだったのは、まさにアイレットというか、膵臓自体をつくってしまったという部分です。ステムセル研究の多くは、我々もそうだったんですが、ベータ細胞を分化誘導しようと、あくまで細胞の研究だったんですけども、臨床現場で求められているのは、細胞ではなくて、少なくとも組織であり、最終的には臓器だと思います。その細胞から組織へ移る部分のギャップが物すごく大きくなって、なかなかステムセル研究が臨床へ届くかというイメージを持ちにくいという部分が一番大きなギャップになっていると思うんですが。

そこで、我々はただ、だからと言ってステムセル研究が重要ではないということではなくて、その間にまだ少し技術開発の整合性がとれるのに、時間が必要だということで、我々はこれは研究は二本立てにしようということ、ステムセルの分解誘導という研究と、それからもう一つは出口の方から逆にたどって、組織をつくるという部分にフォーカスをした研究を、これは先行的にやって、恐らくそれはいい相互作用がこれから生じるんじゃないかと考えておりますけれども、二本立てでそれらを合わせるとい、これが工学でよく言われる要素技術開発で要素を融合するということになります。工学系では、各要素をそれで作って融合するという考え方を当たり前のようにやっていたんですけども、それが私にとって非常に新鮮で、それで自分達の研究を二本立てにしようと、要素開発としてステムセル研究だけをやるんじゃないで、ステムセル研究をやりながら、一方では出口に近い方の組織再構築技術も開発し、それを最終的に合わせるという方向で、今はまだですが、そういう長期的な方向性でやろうと考えています。

○松本 クラスタをつくったときに、どうしても中に血管がないことで、結局グルコースリストをするのは、サーテスの一部なだけなんです。実は、僕もクラスタをやっているんですけども、マチベーションすればするほど、インスリンはばりばりに染まってくるのに、GIが非常に悪くなるという現状があって、やはり中に毛細血管をつくらなきゃいけないだろうと、実は我々も考えました。

そこは、やはりペリサイトはどうしても必要ですかね。実際僕はアイレットの血管の構築を見たことがないんですが、やはり血管内皮だけでいいのかなというイメージだったんですが、そうではなく、MSCなりをやはり入れた方が血管構築は。

○谷口 少なくとも細胞が血管をつくり上げるというステップには、必ずないと思いません。ヒューベックだけで血管構造をどんなにつくろうとしてもできない。我々の中でできたということが経験がないです。それから、後は血管の因子等と考えると、やはり必要だと我々は考えています。

○南 MIN6でスフェロイドをつくったときに、グルカゴンはもっとふえていたというふうに思います。メッセージレベルで。

○谷口 そこは、ちょっとさまざまな意味で、ちょっと我々も興味を持っているんですが、メッセージレベルというのはタックマンPCRで見るということですが。

○南 実は、我々全然別の観点で、MIN6、スフェロイド化というのをやっていて、結果は逆なんです。むしろインスリンが非常に多くて、分泌機能が非常によくなるというデータを。

○谷口 インスリンのメッセージも三次元培養よりかなり高発現になります。その他のさまざまなインスリン分泌にかかわるようなものも上がっているんですが、どういうわけか、グルカゴン、我々の検討ではグルカゴン、ソマトスタチンのメッセージ量もインスリン以上に我々のデータでは上がっています。ただ、それは恐らく三次



元構造をつくるやり方がいろいろあって、これは肝臓の方でいろいろ調べたんですが、ハンギングドロップ法とこの方法を使ってできたのを比較するとかなり違うんです。そういったことも関係があるのかもしれませんが。

○田中       それでは、最後の松山先生の方から。

○松山       本日は、お招きいただきありがとうございました。

私と南先生で今回一緒にプロジェクトを提案させていただきまして、肝臓と膵臓の再生医療の実現を目指しているという形で、僕らはiPSとかESではなくて、ヒト体性幹細胞を用いた再生を行おうと思います。

ここは、釈迦に説法でございますが、肝臓の再生で、今非常に話題になっているフェブリノーゲン問題でございます。やはり再生をしてあげないといけないわけでありませぬ。それに加えて肝臓の再生になるかどうかわかりませんが、家族性高コレステロール血症の患者さんのように、アロで肝再生とか、あるいはフュージョンでもいいんですけれども、そういうことができれば、患者さんを救うことができるかもしれないと問題意識は持っています。

それから膵臓の再生の方は、インスリン欠乏と、これは当然のことでございますが、今日本では1型糖尿病患者は約10万人ぐらい。トータルで740万人と言われておりますが、日本人の場合、米国等に比べてベータ細胞が消失していくタイプのタイプ2である場合が非常に多いということでございまして、マーケットとしても、あるいは患者さんのご希望としても、非常に膵臓の再生というのは必要ではないかという状況でございます。

これは厚労省からもらってきたスライドですが、我が国の再生医療研究ということで、今大体パテントで9%ぐらいがわが国発というふうに伺っていますが、ただ9%と言っても、基本特許はほとんどアメリカに抑えられているので、何とか3分の1を日本発にして、基本特許の1割ぐらいは日本にと、こういう目標で今三省合同で動いていると伺っています。

皮膚とか骨とか軟骨とか、これはかなり進んでいるのでアウトプットのところなので、これは経産省の方にお任せして、再生肝臓とか、膵臓、これは何とか米国、韓国等をこのNOVOの論文が出ているので、ヨーロッパもありますけれども、日本はまだ世界に伍していける部分に何とか頑張らないといけないなと。10年後には何とか国際競争力、イノベーションの創出にもつなげたいなということでございます。

前半、私のグループのご説明をさせていただいて、きょうは南先生がいらっしゃるもので、後半は南先生にもしよければ話をさせていただこうと思います。

私がかつと何をしていたかということ、実は脂肪屋さんでございまして、もともと動脈硬化をやっている、動脈硬化からメタボリックシンドローム、松澤佑次の下で仕事をしていたので、どうしても内臓脂肪とか脂肪組織というのにアフィニティがあったと。たまたま非常に幸運なことなんですが、新しい脂肪組織由来の間葉系幹細胞を採ることに成功しました。

実は、これはプレプレーティング法でヘデリックとか、ブジョルトルプの方法でやっていたんですが、プレーティングしたまま忘れて帰ってしまったと。次の日にたまたまもったいないから採ろうとって、ある特殊なトリートをししたら、非常にislet-1、ポジティブにきれいなものが採れたという、これはまさに失敗から本当に出てきたものなんですが、islet-1が陽性、これは従来法で採ったADSC、幹細胞で私のADMPcと名前をつけているもので、不思議なことにnkx2.5が出ていると。これは実は、nestinが結構陽性でございまして、このごろ第4の胚葉と言われて、神経堤細胞に近いんじゃないかということで、非常にキャラクター的におもしろい細胞でございませぬ。

これは当然パテントとして抑えさせていただいています。

未分化性としても、ディファレンセーションがあり、骨分化としても非常にいい。

脂肪組織へのインダクションも非常にかかわるということです。

前駆細胞という名前をつけたのは、幹細胞という名前だとかぶっているだろうと言われるので、あえて前駆細胞という名前をリネームしたということと、それから islet-1 はポジティブのことで、この上限に PDX 1 があるのか、あるいは islet-1 の下流に PDX 1 があるのかという議論があるところですが、islet-1 から  $\beta$  細胞に行くし、肝細胞、心筋芽細胞等々と有利に行きます。そういう意味で前駆細胞と名前をつけさせていただいたと。

まず、心筋分化を話をさせていただくんですが、これは実は、ある GMP グレードでも購入できる薬剤を 1 剤入れただけなんですけど、これは心筋に分化する。これを移植すると、非常にきれいに下層が生き残った心筋細胞で上層が移植した心筋細胞なんですけれども、心筋として残るんです。なんでわざわざこれを出したかと言いますと、従来の細胞治療という、サイトカインセラピーで消えていくんだという形でこのごろ非常に再生医療がアゲインストになっている。

実際、本当にこの ADMPC をそのまま入れてあげるとほとんど消えていってしまうんですが、コミットメントさせてあげると、これは実は安波先生と、申しわけありません、考え方が若干違って、空間的な問題も非常にあると思っていて、あるべきところにあるべきような形でコミットメントした細胞を移植することによってまさに適切な形でコミットメントするだろうと考えています。

この細胞を、あるいは薬剤処理することによって移植してあげると、実は心筋に分化しているということでございます。これは大動物の実験がもうすぐ始まる予定になっていまして、澤らが恐らく阪大でされるということです。

次、肝細胞、これは実は菰田先生、よくご存じだと思いますが、菰田先生と一緒に仕事をやっていまして、菰田君がやった仕事です。

この ADMPC からうまいぐあいに分化しますと、非常にきれいに、これはクラスターをつくっているんですが、アルブミンが当然出てきますし、非常にすばらしいことに、刺激をかけると HFC のプロダクションが、要するに CYP に誘導がかかるということです。PAS でも染色されますし、LDL の取り込みもあるということで、これを見た瞬間に FH も使えるなと思ったということでございます。

実際にこれを CCL 4 の慢性肝炎モデルマウス、非常に高くて 1 匹つくるのに 30 万円ぐらいかかって、あと全部かかると 1 匹 100 万円の实验なんですけれども、たまたまお金があった時期にやっていただいた実験です。

CCL 4 でつくって、これは腎被膜下に移植します。そういう意味で、これは門脈に出ていないんですけども、腎被膜下でもしっかり動いているので、確かに安波先生がおっしゃるように、場所は関係ないのかもしれないなということで、ちょっと僕は今心が揺らいでいるんですが、こういう形できれいに PAS もありますし、アルブミンも。

ただし、一番すごいのは、ちゃんとビリルビンのリバー스가かかるということで、非常に機能していると。これは実は血管の中につくっていないんですけど、大体 100 マイクロぐらいのクラスターの大きさであれば、きっちりと機能するということがわかっています。

今何をしようとしているかという、どうしてもヒューマンに近づけていかなきゃいけないと、このクラスターを移植するときに、腎被膜下に入れるわけにはいかない。やはり系門脈的であろうと。ですから、このクラスターをラットで四塩化炭素で処理した慢性肝炎モデルのラットに門注をしようという、そのためのプロジェクトを今開始して、これは実はきのうようやくでき上がったというものなんですけど、これはインクです。黒いインクで門脈の本管に 18 ゲイジのカニューレをいれて、それできっちりと門脈に特異的に入れるということに成功しました。

比較的太いカニューレを入れる、そういう特殊な手技を使うことによって門脈に入

れることができるので、早々にこの実験を開始するという予定でございます。

これで最終的に分解、これはやはりスフェロイドをつくっているんですが、スフェロイドをつくって、大体100マイクロぐらいに上げて、これは大きくすると実は肝臓にならなくて、このスフェロイドの細胞数というか、非常に濃度がクリティカルだというのが経験的にございます。100マイクロより小さいと、実は、 $\beta$ 細胞としてファンクションしないと。これも非常に不思議なところで、非常に濃度がクリティカル、これを系門脈的に入れてあげようかなと。

自己も同種もございしますが、最終的に慢性肝炎とか肝硬変もございまして、FHほか遺伝子疾患と。なぜFHを入れているかという、これは全然サイエンティフィックではないんですが、将来的に基盤研のグラントをとろうとすると、オーファンドラッグの方が非常にグラントがとりやすいということがあって、しかも難病、健康局の持っているグラントとかも、非常に難病、治療につながるとかとりやすいというのがあって、まずここで採って、できれば確認申請から通すと。肝硬変、肝炎の方は、それを適応拡大の形でやると、非常に早くて優先的審査をしてもらえるとという形で、そういうふうな二段構えをすることによって、4年以内には、何とかまずFH、5、6年後にはこっちの方に何とか患者さんを提供したいと考えております。

次は、ベータ細胞の方で、これは主に私がさせていただいて、実はちょっと1年間ほど外にいたので、ほとんど松本先生、以前お見せしたデータから進んでいないと、非常に恐縮でございます。

大体六つの段階を踏むプロトコル、ただ、これ非常に6個のプロセスでやると非常に難しい。一番初め、これADSCでやっていたんですが、ADSCだと20株やって1株成功するかどうかぐらいなんですね。非常に成功率が低くて恐らくそれで再現性がないというふうに言われるんだろうと。

クラスターにすることによって未分化の細胞を採ります。クラスターにすることによって、どうも表面の部分、クラスターの表面の部分にネスチン陽性細胞がかなり集積してきて、それを特異的にステージ3でプレーティングして増殖させることによって、神経上皮に近い細胞をコレクションできると。

それをbFGFとビタミンAが結構クリティカルだったんですが、bFGFとretinoic acidを入れて、あとここが非常に問題なんですけれども、B27血清培養して入れて、それで最後にbFGFとRAを抜いてニコチン酸とexendin-4を入れてあげる。

そうすると、こういう形でスプラウティングするような形で出芽するような形で細胞が出てくるんです。実はこれをコレクトするとインスリンがPCRでかかってくるんですが、不幸なことにこれをはがすと細胞がどんどん死んでしまうと。どうもこの下側の細胞がフィーダー細胞になっていて、それがないと生き残らないんじゃないかという結論に達しました。それでクラスターにしたという状態でございます。

それで第6ステージのところに出てくると。これはADSCのときのデータなので、ADMPICにすると、実は第2ステージのところ結構いろんなものが出てくる。特にnestinなんかはかなり出てくるということです。

これもちょっと免疫染色をもう1回きれいに染めないと言われておるんですが、外側にグルカゴン、内側にベータ細胞、純化していないんですね、僕は。あえて純化しないことによってこういう形になると。これはもう7日目くらいでようやく出てくるんですが、大体21日目ぐらいになると、かなりしっかりとした形で外側にグルカゴン、内側にインスリンという形。ただ、ネックは何日か培養すると固くなり過ぎて、グルカゴンが殻みたいになってしまうんですね。GIが全然機能しなくなるんです。

先ほどの谷口先生の血管の話聞いて、参考にさせていただきたいということでございます。

これは7日目なので、比較的、恐らく穴が開いているんだと思いますが、ハイグル

コースで入れるとインスリンが反応。Cペプチドも出てきます。インスリンもきれいに反応して、ニフェジピンでブロックがかかるというデータです。

これが、腎被膜下に入れた移植で、血糖は下がるんですね。ここのときに勝ったと思ったんですが、翌週見ましたら、実は全然きかなくなっていて、大体2、3週間しかファンクションがないという状態で、今後これをどうするかというのが一つの課題だと思います。

それから、移植群でもIEQというのがべらぼうに多い量ということでございまして、やはりネイティブなアイレットに比べたら100分の1ぐらいにファンクションしている暇がないという状況で、これを何とか改善しないとイケない。

こんな状況では、サイエンスとしてはおもしろいのかもしれないんですが、患者さんに使えないというところがあるということです。

それから、先ほどN2-B27の話をしていただきましたが、あの中にインスリンが入っているの、取り込みを否定しろという形でリバイスに言われまして、それはCペプチド出ているしいんじゃないのと言ったら、それじゃだめと何回も落とされまくっているというのが現状です。

実は、ノボのあれもB27インスリンが入っているの、あれに何であっちが通ってうちが落ちたんだと非常に憤りを覚えているんです。

結局、ただ6個のステージやるというのは、これに僕はこだわっているわけではなくて、これはやはりプロセスが複雑になればなるほどコストも時間もかかりますし、失敗のリスクも高くなるので、いかに簡単なプロセスで、しかもできればオートメーションでできるようなものにしないといけないということです。やはりこれはドクターと検査技師とかが、一々プロセスしていたら、べらぼうにお金がかかるので、全自動化すると。ここら辺のイノベーションは、三菱重工とか日立とかサンヨーとか、日本のお家芸でございまして、できれば最低三つぐらいのプロセスにしたいなという形で、今まだちょっとベースの実験をしました。

これは、申しわけありません。3日前に出たデータで申しわけないんですが、この細胞をあるちょっと処理を加えるんですね。薬剤だけではないんですが、ある処理を加えると、インスリンが出てきて、グルカゴン、ソマトスタチンが全部出て、PDX1が出てislet-1が出てくる。そのような細胞に分化することは可能です。100%がこうなっているわけではないので、これからどうやってベータ細胞、グルカゴンを純化してくるか。あるいは採取してくるのは一つのターゲットにはなってくるかと。

おもしろいことに、非常に乱暴なんです、このBという細胞集団は、心腔内で打ったんです。心腔に打ったら、血糖値が下がってしまったという。この理由はわからないのですが、もしかしたら、一つは、STZで処理した後に残っているベータ細胞前駆細胞が賦活化したという可能性が一つ。もう一つはこれらの細胞が生着して、その部分でベータ細胞に分化したという可能性が一つ。幾つか考えられると思います。ちょっとこれは出たばかりですのと、まだお金がなかなか使えていない状態で、今後の課題、4月以降にきっちりします。

もしこれが、今心腔内投与なんです、門脈に打ったらどうなるのか。コミットメントしたらもしかしたら、肝臓の中に入れたら、それでインスリンに分化するかもしれない。ベータ細胞に分化するかもしれないから、本日は安波先生のご講演を聞いて、ちょっとやってみないといけないなと思ったんですが、門脈に打つのと、それからあと、小動物というのは非常に難しいんですが、セレクトィブに腹動脈からパングレアスの方に入れて、そこに細胞を何とかセレクトィブに入れてあげて、それで再生ができないかということをやろうと思っております。

ここから、南先生、もしよろしければ。

○南 簡単にいきたいと思いますけれども、私たちは膵臓の内分泌の組織を利用していい資料をつくらうということをやっています。これは左側に示します