ように、マウスでモデルとしてやっていますけれども、通常アイレットにするのと全く同じ方法で、Ficoll で分離して、ペレットに落ちてくる外分泌細胞を使っています。

これは膵島移植の際に、通常これは捨ててしまうんですけれども、これを再利用して、有効利用して膵島と一緒に移植したら成績がよくなるんじゃないかという単純な発想から始まったものですけれども、こういった形で内分泌細胞、この膵島以外の部分にインスリン陽性細胞になるものがあるんじゃないかということで始めております。

実際に、さまざまな条件で培養を試みたわけですけれども、非常にシンプルな方法でＥＧＦを存在させた状態、低血清０．５％のエッセンスを入れた状態でＥＧＦを加えて浮遊培養しますと、今まで共通で出てきたスフェロイドができます。ちょうど大きさとしては１００マイクロメートルから２００マイクロメートル弱ぐらいのものができてきます。

メッセージレベルで見ますと、明らかにインスリンの発現が誘導されてくるということがありまして、免疫染色しますと、インスリンＣデクタイトが検出されるということで、インスリン陽性細胞はこの条件でできるということがわかってきました。

さまざまな観察から、この外分泌細胞のうち、腺房細胞がこのインスリン陽性細胞の起源になっているんじゃないかというふうに考えましたので、私どもはこれを直接証明するために、こういうようなシステムを使って、このクローザーの下に蛍光タンパクが発現するようなレポーターマウスから採ってきた細胞にアミラーゼプロモーターでクレリコンビナーゼを発現するアデノウイルスを感染させまして、選択的に腺房細胞をマーキングするという方法でトレースしましたところ、インスリン陽性細胞とＥＣＦＰ陽性細胞が重なるということで、この条件で分化誘導されたインスリン産生細胞というのが腺房細胞由来であるということを証明しました。

実際に、この細胞がインスリンを分泌するんだということですけれども、ここに示しますように、左側にはグルコース濃度を３ｍＭに固定して、高濃度のＫＣｌ、グリベンクラミド、カルバコールで刺激すると、分泌すると。

右側には、グルコース濃度、グルコース応答性を示していますけれども、グルコース濃度が上がるとインスリン分泌がふえると。インクレチンホルモンであるＧＬＰ１によってもこれが増強されるということで、少なくとも質的には、正常なベータ細胞、膵島と似たような値を示すということがわかりました。

ただし、実際には、絶対値を示していませんけれども、インスリンの産生能としては、実際の膵島の４００分の１程度でありまして、まだこれは量としては全く足りないということで、改善の余地はかなりあるという現状であります。

これはマウスの結果だったんですけれども、じゃヒトで実際できるのかどうかということで、これはあくまでプレリミナリーなデータでありますけれども、膵臓がんなどで膵摘出があったときに、その一部の組織をいただいてきまして、これをマウスと同じような条件で培養するという形で実験をしております。

合計３２例で実験しておりまして、基本的には、非常に状態が悪くて、慢性膵炎があって、腺液があって、組織ががちがちで細胞が採れなかったというのも結構あったんですけれども、２１例で細胞分離ができまして、そのうち１２例は特によい状態のものが採れました。このうち、インスリンの発現誘導が見られたものが１１例ありまして、比較的大量に組織があったもので４例でインスリン分泌反応が検討できました。

やはり、このようにマウスと同じようなスフェロイド状の細胞塊ができまして、全例の平均値を見ますと、これはメッセージレベルですけれども、インスリンの発現の臓器、余り大したことはないんですけれどもあると。ＰＤＸ１が非常に強く出ています。グルコキナーゼの発現臓器も見られます。

これは、インスリン分泌反応ですけれども、ある一つの例を見ますと、このようにグルコース応答性、それから高濃度のＫＣＬ、グリベンクラミドに反応します。このとき約５グラムぐらいの組織を使っておりまして、実際膵臓の総重量約７５グラムと

考えますと、もし膵臓全体が使えた場合には、この条件では膵島２０万個分のものができるという計算になりますので、比較的この条件ではかなりたくさんのベータ細胞ができたというふうに判断しております。

ただし、これはあくまで最もいい例でありまして、実際には、数千個から数万個分ぐらいのものしかできていない、平均的にはその程度というのが現状でありまして、まだここも最初のマウスのときに申しましたとおり、再現性を含めて改善の余地がまだあると考えております。

これは、先ほどチラッと言いましたけれども、これをどういうふうに臨床に応用していくかということですけれども、これは膵島移植の松本先生にいただいた図なんですけれども、膵島移植の際には、膵臓をばらばらにして分離した膵島を移植すると。残ったこちら側の膵島以外の部分は捨ててしまうんですけれども、ここからインスリン分泌細胞を誘導しまして、これを追加して移植するということで、これまで２人、３人のドナーが必要だったのが、まず１対１からということで改善できるのではないかというようなことを考えております。どうもありがとうございました。

○安波　　最後のところで、この組織の外分泌からその膵島様細胞塊には具体的に培養してこうなったということですか。

○南　　そうです。

○安波　　これは、僕は昔随分ヒトの膵臓をやりました。１９８０年ぐらい、いかに当時から膵島、ヒトから採るかということで。例えば採出してマウスと同じようにやって培養すると、全部こうなるんです。最初膵島は採れたので喜んでいましたけれども、これは全部外分泌なんです。外分泌がどんどんアミナーゼはどんどん乗っかるんですけれども、膵臓の固まりは生きているんです。ずっと生きているんです。特にインスリンのある細胞だったときには、ずっと生きている。ベータ細胞を採ってもついてくる。クラスターが内分泌と外分泌でそのままずっと生きるんです。長期に行けば行くほど膵島がリッチになってくるわけですね。だからこれは外分泌からというよりも、そのままの細胞がずっと生きているということだけじゃないかなという気がするんです。これを新たにできたものというのはものすごく難しいと思います。

○南　　ヒューマンの場合は、証明のしようがないです。確かにおっしゃるように非常にマウスよりも固まりができやすくて、しかも先生がおっしゃるように維持が簡単、マウスよりずっと簡単ですので、確かにインスリンのコンタミネーションを否定することはヒトの場合にはできていなくて、本当にできているのか、今のところ自信はないので、ちょっとマウスの方のデータから類推はしていますけれども、ヒトでももうちょっとかなり改善しないと、現状ではこれでヒトでもインスリンができたというのは、ちょっと難しいという認識はしています。

○安波　　それと脂肪細胞について、それにほかのものに何で生理的にそういう細胞があるんですか。

○松山　　非常に不思議なんですが、場所によって実はかなり違って、一番多い可能性、やはりステムの問題があると思うんですが、皮下脂肪でも採れるんですが、。一番多いのは、実は褐色脂肪細胞が非常に多いということなんですね。次は、大網、実際僕ら使っているサンプルは、大網と皮下を比較して、ここら辺から採れたときが実は一番効率がいいんですね。褐色脂肪細胞があるところと比例しているんじゃなくて、これは印象なんですが、それを考えると、やはり神経堤由来幹細胞が残っていて、それがたまたまうまいぐあいに採れて、増殖がかかっている。

○安波　　何か先ほど谷口先生のお話を伺って、どうもそういう先生の中で膵臓本来にある細胞をある程度しかできないということだから、それと細胞が。

○松山　　非常にトランスディファレンシエーションって、難しいと思います。信じてもらえないというところは確かにあると思います。

○田中　　脂肪は年齢もあるんですか。

○松山　　　年齢は、６０歳を超えると若干収率は悪くなるんですが、７０歳ぐらいまで未分化性が維持できるということです。
○安波　　　ヒトの組織をですか。
○松山　　　これは全部ヒトです。なぜヒトにしたかというと、マウスにするとインスリンマウスと一緒のインスリン２の遺伝子が出てくるので区別がつかない。これを実験スタートしたとき、実は手元に１０万円しかお金がなかったんですよ。ヒューマンサンプルでしかスタートできなかったというのが、実は裏話があって、実はそれでヒューマンで。
○安波　　　その幹細胞はどこから採るんですか。
○松山　　　非常に難しいですが、神経堤由来細胞、もともとはそこに局在していたものなんだろうなという印象で考えています。ただ、別の人はもしかしたら、間葉系幹細胞が脂肪組織でそこでステムとして残っているんだとおっしゃると思うんですが、正直言ってどこ由来かというのはわからない。
○安波　　　どのくらい、マスとしてはあるんですか。
○松山　　　継代に関しては、継代１５までに分化性が維持できるということを確認しております。ですから、かなりふえる、継代１０代までやれば、恐らく１回分か２回分ぐらいの細胞としても１０×１０^{9}ぐらいの細胞数が採れますので。そこまでふやした段階で分化できるんです。これの場合、実はいろんなものに分化させちゃうと、成長が非常に遅くなって、ステージ５とか６にほとんどふえないんです。逆にそれは非常にいいことで、ふえると発がんがどうのこうのって必ず言われるんです。むしろとまってくれるからいいんだということです。

ですから、先ほどベータ細胞の株か、あるいはそのもうちょっと前のところでエックスパンジョンさせて、それからベータ細胞にするという話をされていたんですが、まさに私の選択肢でもそうです。
○田中　　　肝臓の再生実験では、要するにコンペティションというような問題があって、本来のネイティブリバーがあればあるほど、入れてもつかない、あるいは増殖しないというのがあるんですが、膵臓はどうなるんですか。
○松山　　　いや、それはどうなるか。
○谷口　　　恐らく同じメカニズムは各組織であると思います。必ず必要性がなければ、分化や増殖することはないと思いますので、膵臓でも正常のところに入れても増殖や分化はしない。
○田中　　　松本先生、移植と再生の融合という時代がやがて来るだろうと。それをどういうふうに融合させ、ベースの免疫抑制剤も大事だけど、この融合で先生から見られて、ヒトからの全膵臓から入れておきましょうと、だんだんディグラデーションしたら、その間、次々と再生で入れたらいいんじゃないかと、こういうプリミティブな着想があると思います。一体どれぐらいの後、追加するときに要るかというのは、やはり同じぐらいの量が要るんですか。
○松本　　　確かに難しい問題で、どれぐらい要るかで、それで一つ単純なのは、健康な人と比べて３割ぐらいのベータ細胞、マスがあればいいんじゃないかというのが一つ指標で、臨床的にいろんな手法で、今回膵島インデックスのようなものを示させていただいたんですけれども、あれである程度下がってきたときに、現在だとインスリンを打ち始めるというところで考えるんですけれども、その手前でまたリスティングしてあげたらいいんじゃないかと思います。

この辺のモニタリングは、むしろメタボリックな指標で、ある程度クリアできるんじゃないかと思います。
○田中　　　ほかに、すべてのプレゼンテーションについて何かありましたら。
○谷口　　　松山先生のマックＣ、キャシンバクファイティのマックＣとか、そういったものとは違った細胞、同じ細胞が別なところでやるんですか。

○松山　　　いや、難しいですね、違うというのと同じというのをどうやって証明するかですね。済みません、もしいい方法があったらぜひ。
どちらかというと、僕はサイエンティストいうより、エンジニアに近い発想なので、ぜひ先生方のご指導をいただければと思っております。
○田中　　　それでは、少し時間は残りましたけれども、きょうは本当にありがとうございました。
変な言い方ですけれども、大変勉強させてもらいました。お互いがインフォメーションを自由にやる中で、いい方向が出てくるんじゃないかなと強くそういう認識をしましたので、ぜひ皆さん頑張っていただきたいと思います。
ここは、再生医療実現化するという大きな命題を持ちながらのセンターですから、ぜひ松山先生、南先生の仕事が成功するように、いろんな意味でサポートをお願いしたいと思います。どうぞよろしくお願いいたします。
半年後か１年後にまた同じメンバーでここに一堂に集まっていただいて、３年後、４年後、あるいは５年後ぐらいには、迅速性というのも非常に大事ですので、その辺で臨床応用、社会に還元できればというふうに考えていますので、ぜひよろしくお願いいたします。
きょうは、これでよろしいでしょうか。どうもありがとうございました。
（１６時４２分　閉会）

Baylor Institute for Immunology Research
Support of Baylor Research Institute

膵島細胞移植と再生の世界の現状と将来

松本慎一

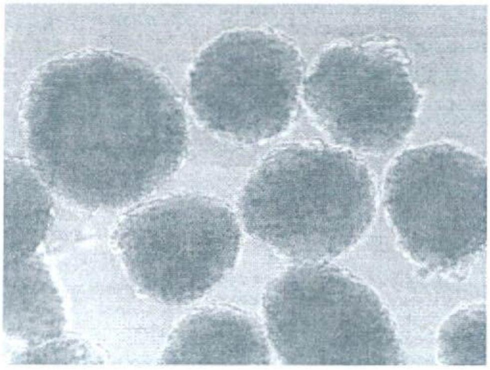
ディレクター
膵島移植研究所
ベイラー・リサーチインスティチュート

再生・移植医療の現状と将来に向けての国際比較
第3回班会議・セミナー
平成20年3月5日

Islets

Glucose sensor

Insulin Production

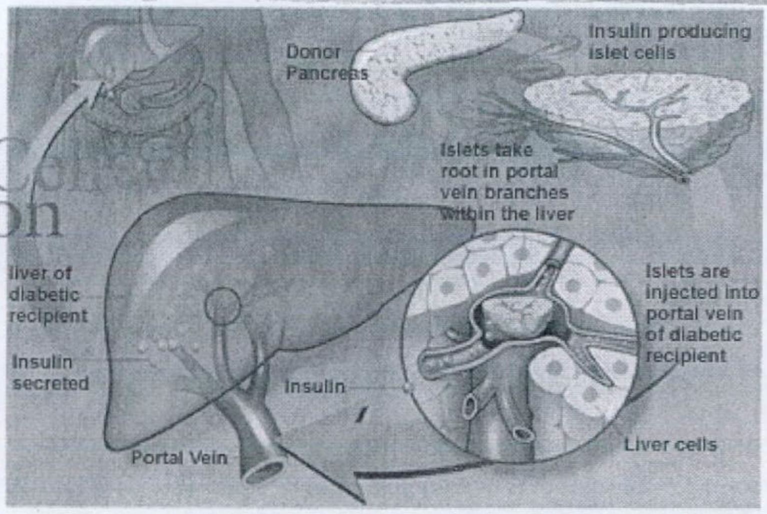


Life long work

Release insulin Perfect timing

Maintenance normal glucose

Islet Transplantation



From Baylor Health Care System Website

The Edmonton Protocol

The New England
Journal of Medicine

©Copyright, 2000, by the Massachusetts Medical Society

VOLUME 343 JULY 27, 2000 NUMBER 4

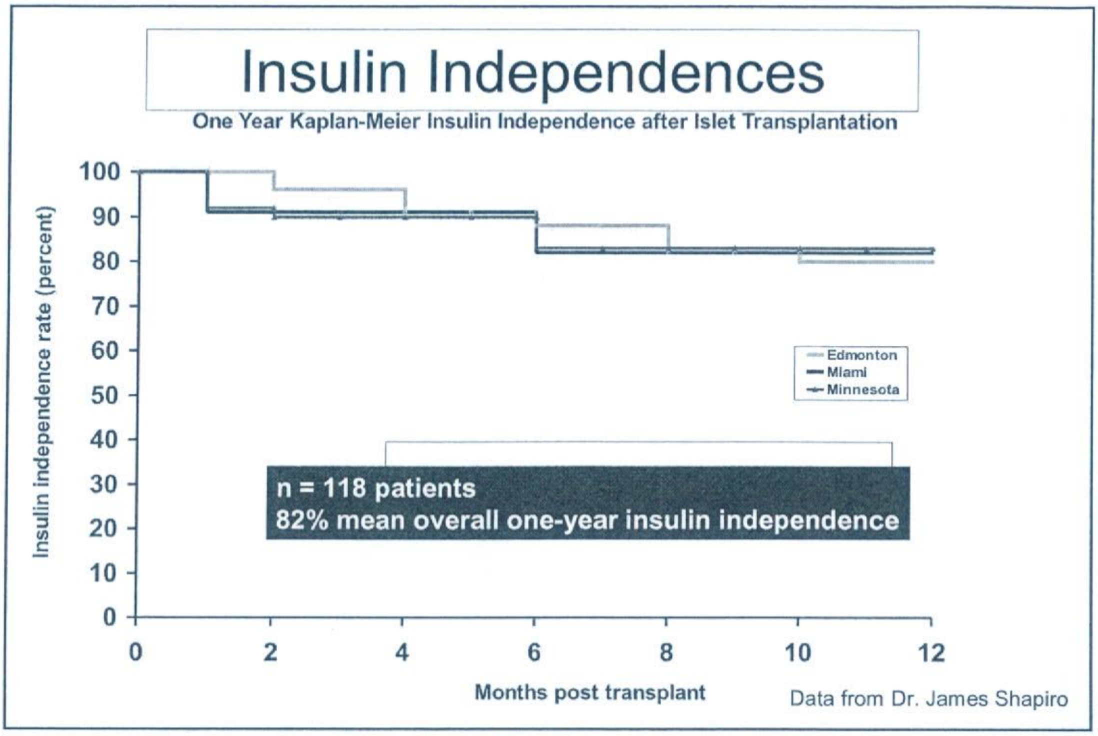
ISLET TRANSPLANTATION IN SEVEN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS USING A GLUCOCORTICOID-FREE IMMUNOSUPPRESSIVE REGIMEN

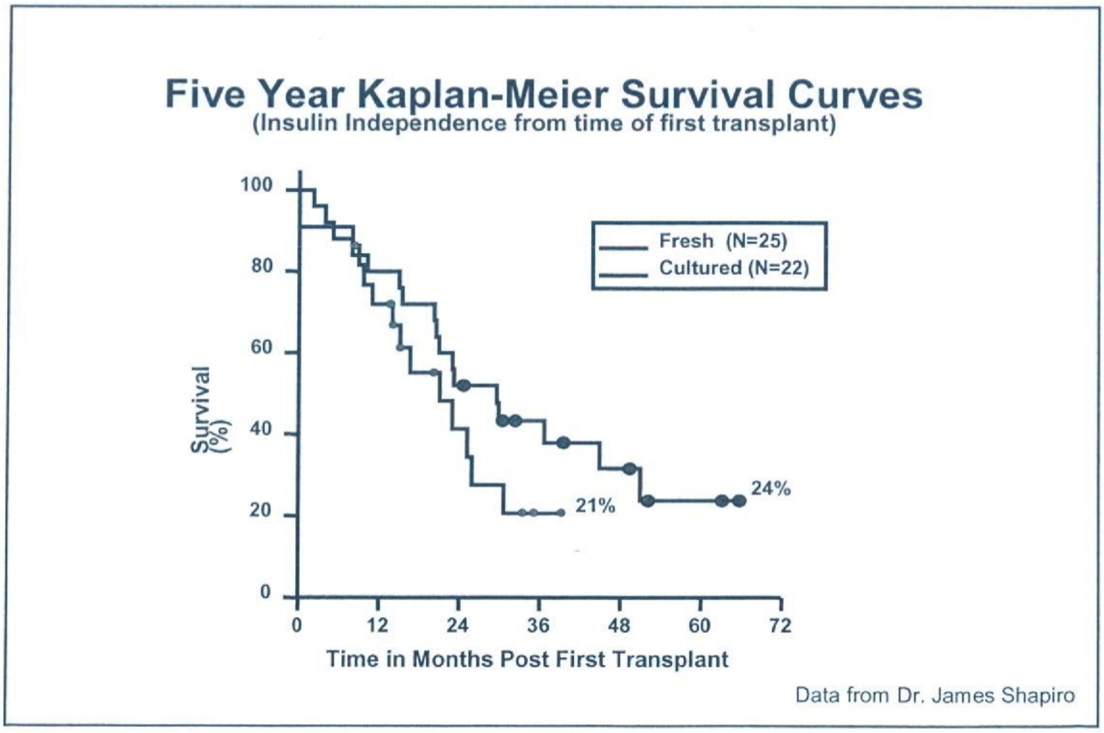
A.M. JAMES SHAPIRO, M.B., B.S., JONATHAN R.T. LAKEY, PH.D., EDMOND A. RYAN, M.D., GREGORY S. KORBUTT, PH.D., ELLEN TOTH, M.D., GARTH L. WARNOCK, M.D., NORMAN M. KNETEMAN, M.D., AND RAY V. RAJOTTE, PH.D.

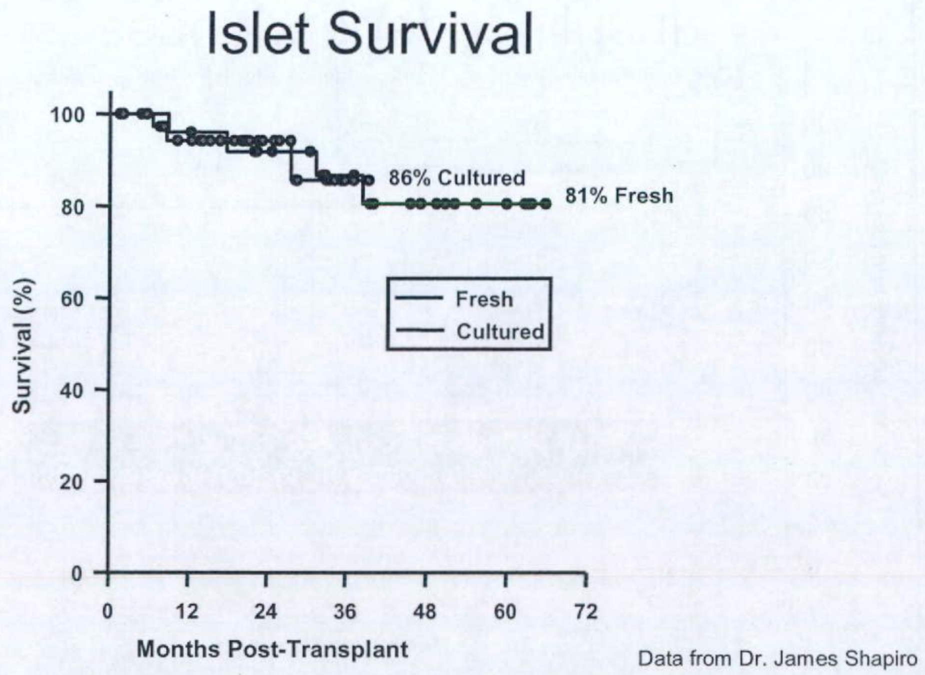
Insulin independent of 7 type 1 diabetic patients

Steroid-free immunosuppressive regimen

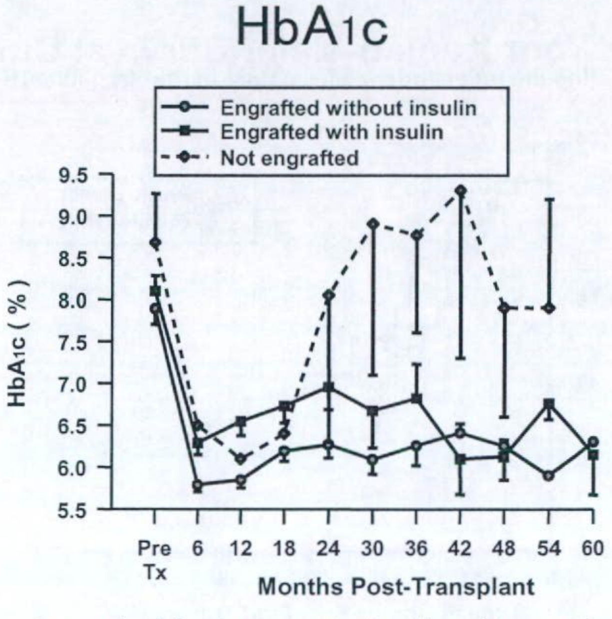
Multiple transplantation


Insulin Independences
One Year Kaplan-Meier Insulin Independence after Islet Transplantation
Insulin independence rate (percent)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
Months post transplant
Edmonton
Miami
Minnesota
n = 118 patients
82% mean overall one-year insulin independence
Data from Dr. James Shapiro


Five Year Kaplan-Meier Survival Curves
(Insulin Independence from time of first transplant)
Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0
12
24
36
48
60
72
Time in Months Post First Transplant
Fresh (N=25)
Cultured (N=22)
21%
24%
Data from Dr. James Shapiro



Data from Dr. James Shapiro



Good glycemic control for long period without hypoglycemic attack

Data from Dr. James Shapiro

Interpretation of Edmonton Protocol

Islet transplantation is a good method for maintaining good glycemic control without hypoglycemic attack

↓

Is this good enough??

↓

Who can answer?

↓

Only Patients can answer.

GOAL

Establishment of The Best Clinical Islet

Transplantation Program at BAYLOR

Which Patients Really Want

Islet Recipient Coordinator

↓

Communicate well to learn what patient wants
in each case

↓

Majority of Patients want to be
good glycemic control
Without fear of deterioration of islet function

Maintaining Good Glycemic Control

↓

Maintaining Enough Islet Mass

↓

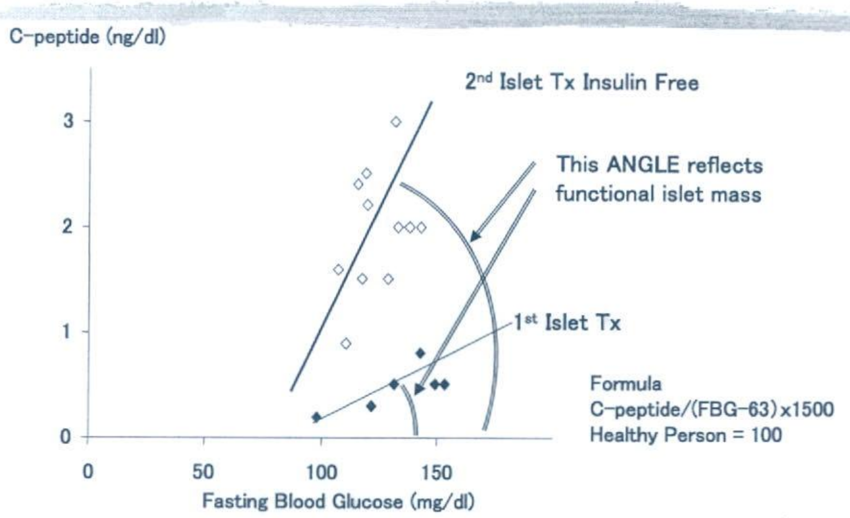
Monitoring Engrafted Islets Mass

↓

SUITO INDEX

SUITO index[1]

Percent Functional Islet Mass



1: Matsumoto S et al Transplantation Proc 37: 3435: 2005

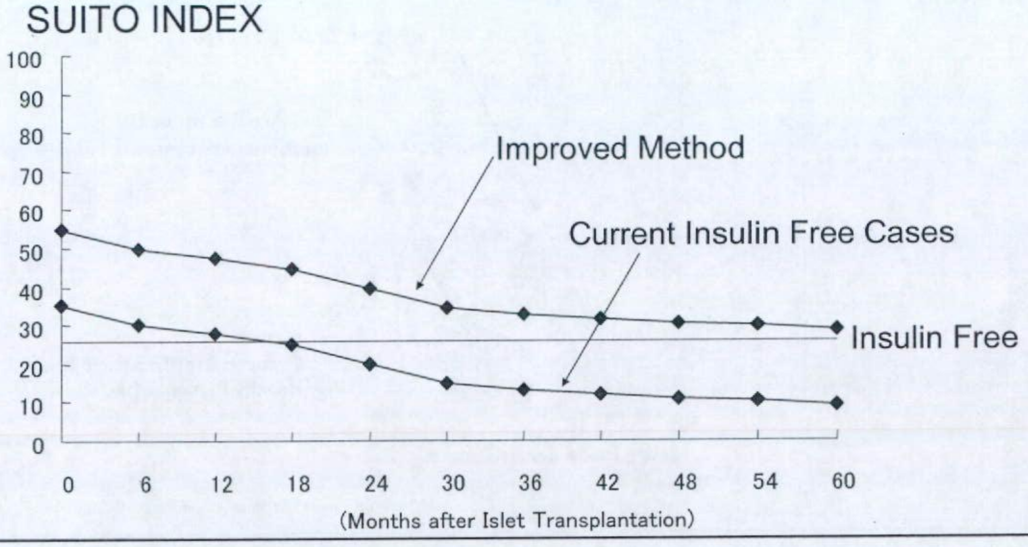
Secretory Unit of Transplant Object (SUITO index)

NHBD or Living Donor with Kyoto Method Matsumoto S et al. Transplant Proc 2006

	SUITO index	Insulin
Culture × 1 (*N* = 2)	2.1 ± 0.4*	>1/2, >1/2
Culture × 2 (*N* = 1)	12.1 ± 1.9	<1/2
Fresh × 1 (*N* = 3)	11.7 ± 1.0	>1/2, <1/2, <1/2
Fresh × 2 (*N* = 1)	28.5 ± 3.4	Free
Culture × 2 + Fresh × 1 (*N* = 1)	26.7 ± 1.7	Free
Living × 1 (*N* = 1)	40.7 ± 2.6†	Free

SUITO index more than 26 is associated with insulin free

Strategy to Improve Long-Term Results

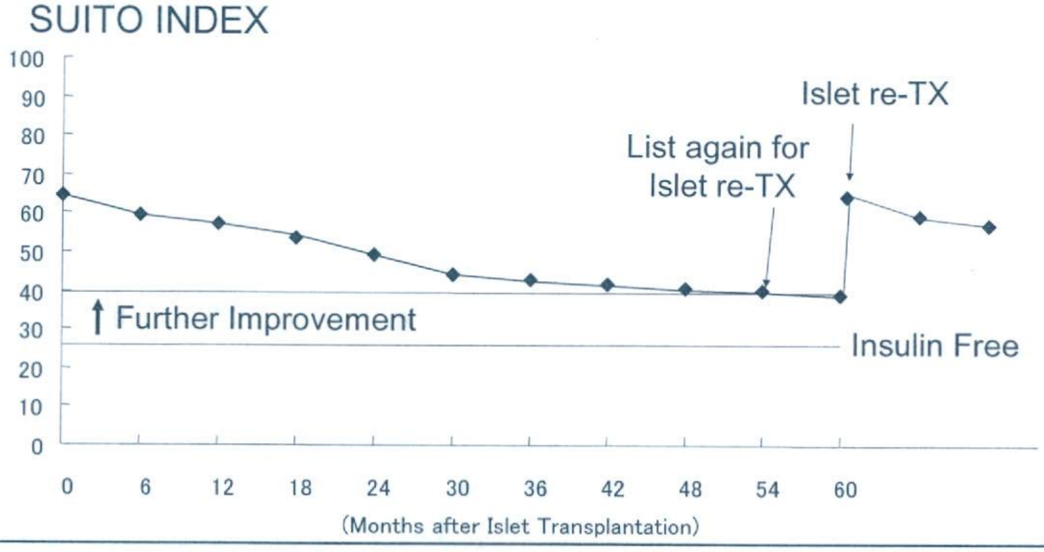


Does 5 year enough??

↓

Patients' Major Concern will be Deterioration of Islet Function

Further Improvement with Baylor Method

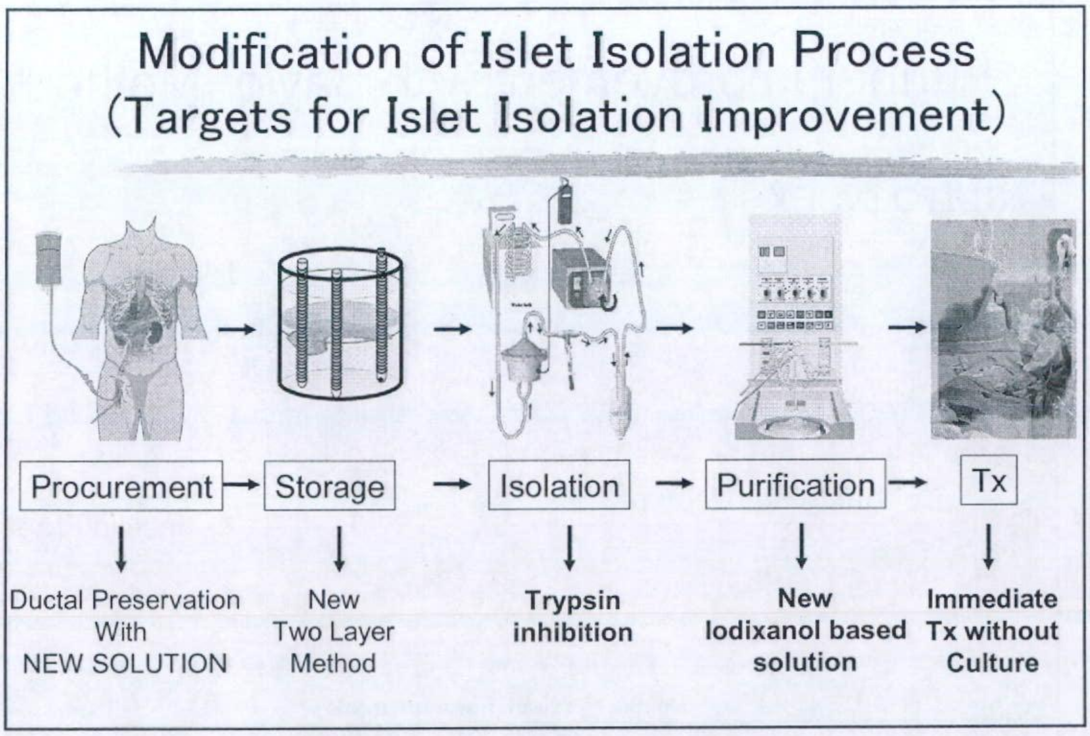


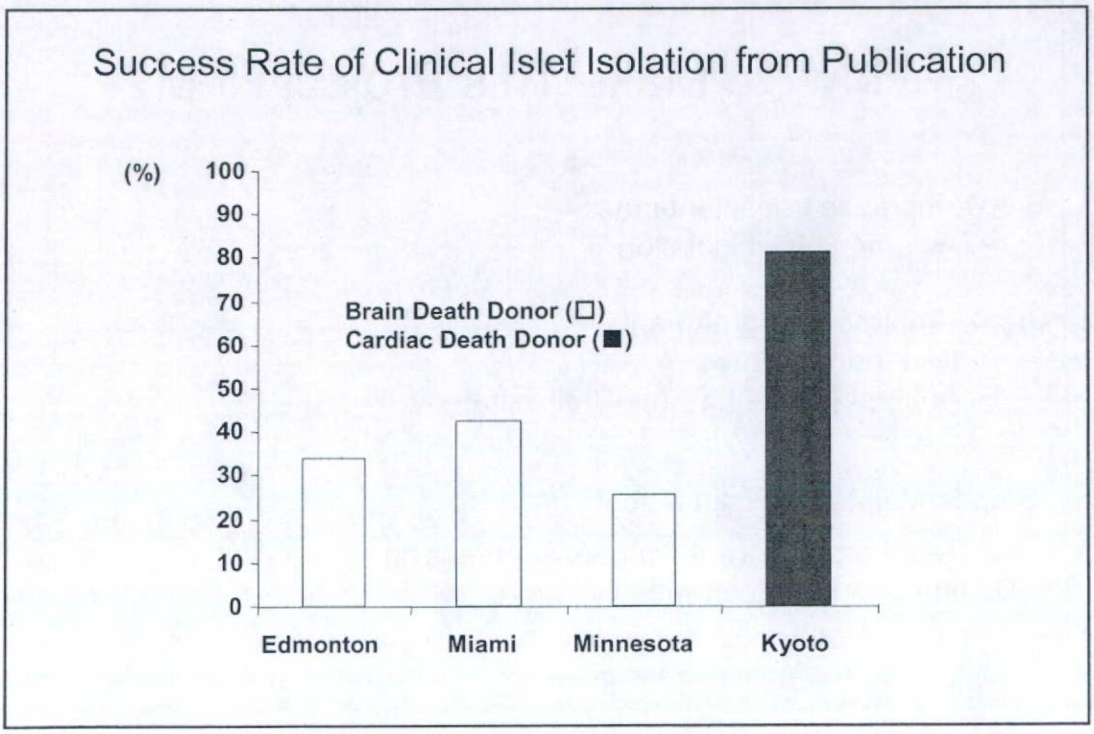
How To Make This Project Real?

Step1. Increase transplant mass
- A. Advanced Islet Isolation

Step2. Improving engraftment
- A. Islet friendly drugs
- B. Anti-apoptotic and Anti-IBMIR strategy

Step 3. Maintaining Islet Mass
- A. Regeneration prone immunosuppression
- B. Immunogenic tolerance


Modification of Islet Isolation Process
(Targets for Islet Isolation Improvement)
Procurement
Storage
Isolation
Purification
Tx
Ductal Preservation With NEW SOLUTION
New Two Layer Method
Trypsin inhibition
New Iodixanol based solution
Immediate Tx without Culture


Success Rate of Clinical Islet Isolation from Publication
(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Brain Death Donor (□)
Cardiac Death Donor (■)
Edmonton
Miami
Minnesota
Kyoto

Islet Transplantation at Baylor

Remote Center Islet Isolation

13 isolations 5 transplantations (38%)

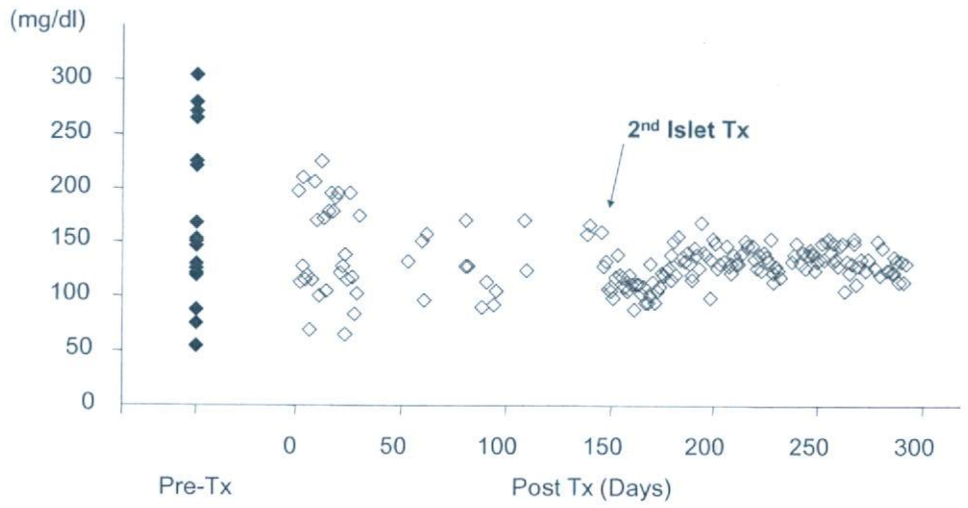
Own Center Islet Isolation

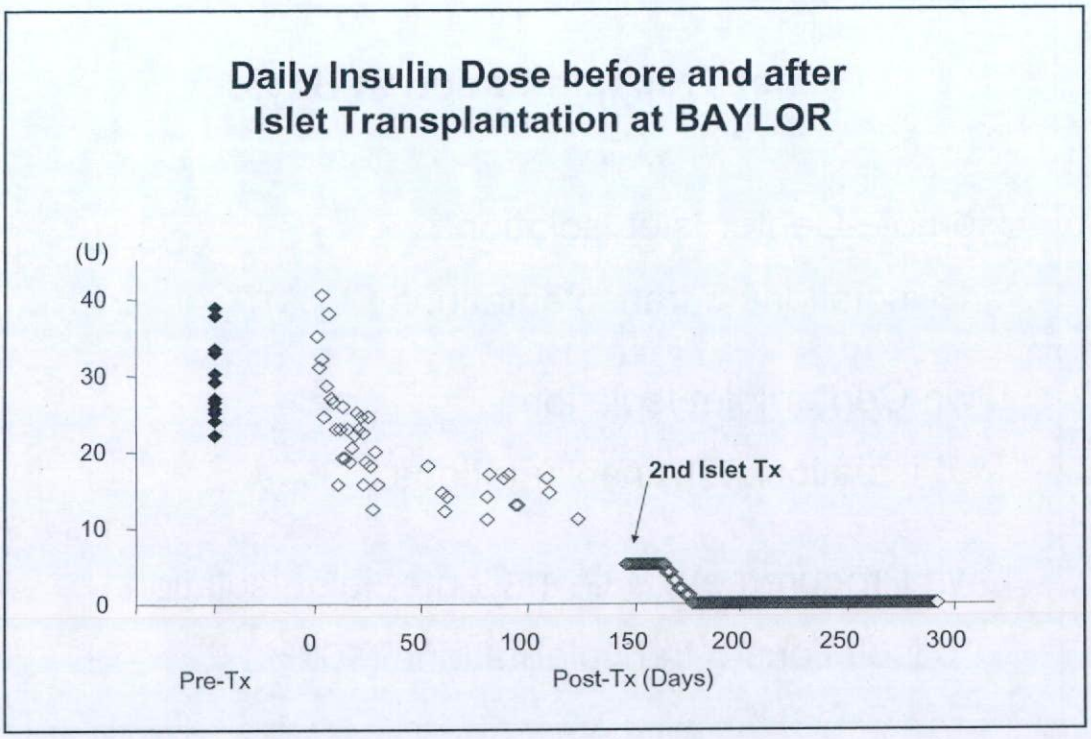
6 isolations 2 transplantations (33%)

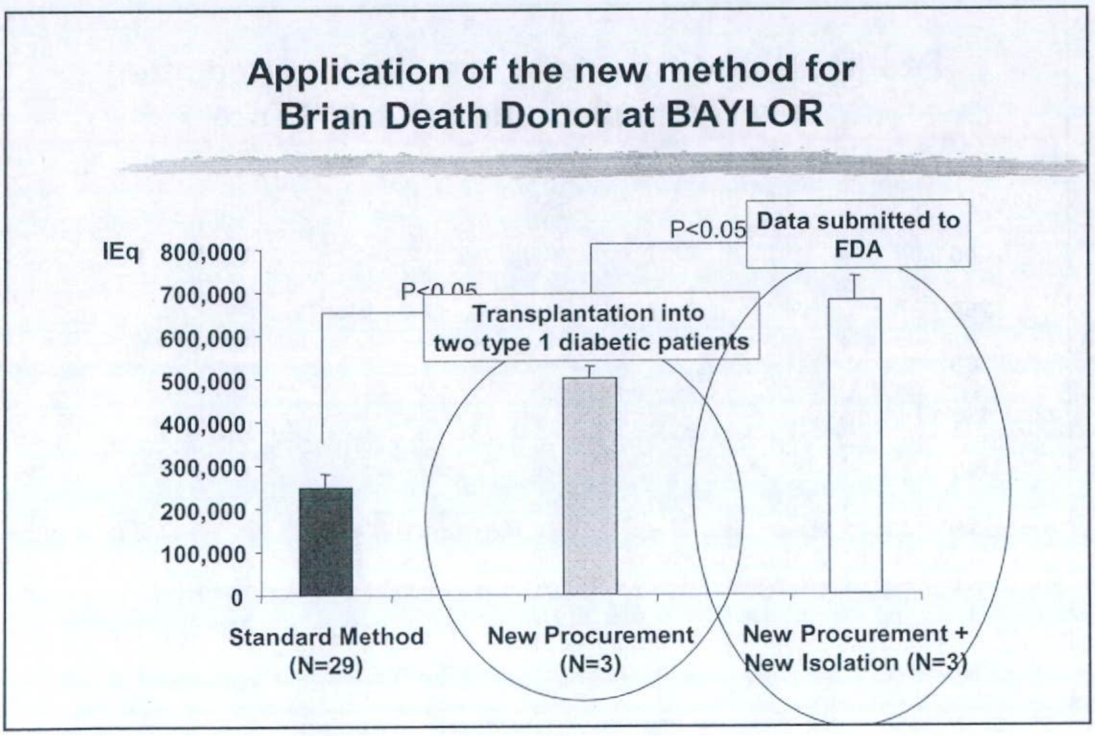
Own Procurement & Own Center Islet Isolation

5 isolations 5 transplantations (100%)

Fasting Blood Glucose Levels before and after Islet Transplantation at BAYLOR




Daily Insulin Dose before and after
Islet Transplantation at BAYLOR
(U)
40
30
20
10
0
2nd Islet Tx
0
50
100
150
200
250
300
Pre-Tx
Post-Tx (Days)


Application of the new method for
Brian Death Donor at BAYLOR
IEq
800,000
700,000
600,000
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
P<0.05
P<0.05
Data submitted to
FDA
Transplantation into
two type 1 diabetic patients
Standard Method
(N=29)
New Procurement
(N=3)
New Procurement +
New Isolation (N=3)

Life-long Excellent Glycemic Control

↓

Is this enough??

↓

Sure for patients with islet Tx

↓

BUT!

Many patients will not able to receive islet tx
Due to donor shortages

Expand Utilization of Marginal Donor
For Islet Isolation

Transplantation Rate

University of Minnesota
29/114 (25%)

Transplantation 2004 Matsumoto I et al

University of Miami
48/113 (43%)

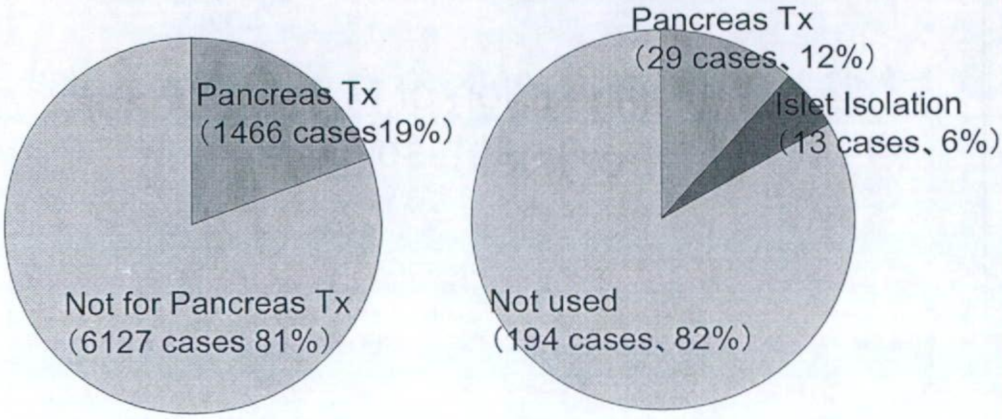
Am J Transplant 2005 Ichii H et al

Kyoto Method >80%
With NHBDs

Pancreas from Brain death donors in USA and TEXAS

UNOS 2005

TEXAS 2005 , 2006
(selected 236 cases)

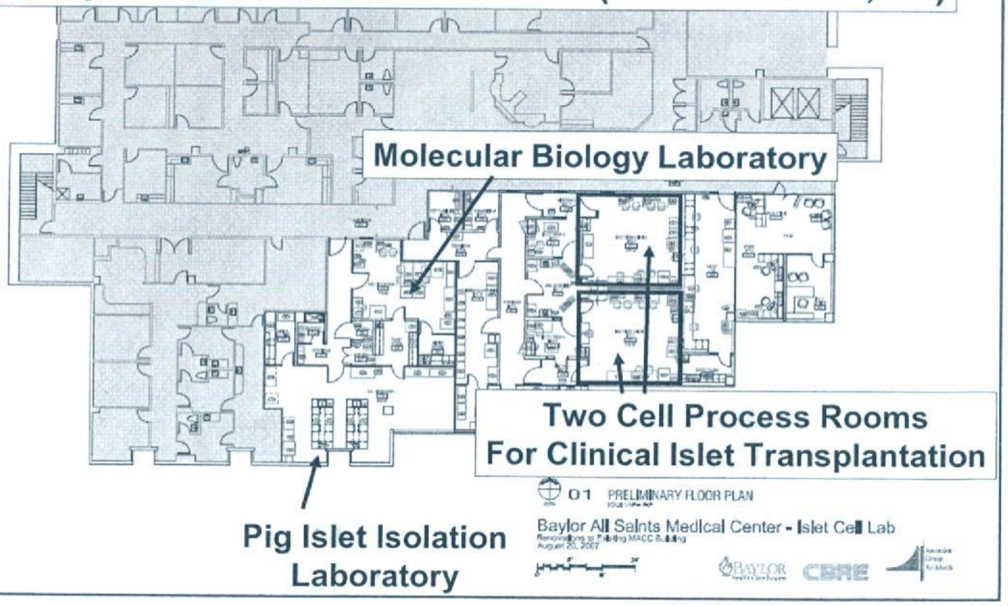


Re-evaluation of Islet Donors

1 Age up to 65
2 Accept donor
High BS
Cardiac arrest
Fatty pancreas
High Creatinine or Transaminase

Potential Islet Donors
95 cases (46%)
Approximately 80 islet transplantations per year
More than 40 patients satisfaction!!

New Facility to Maximize Islet Transplantation Activity at Baylor Research Institute West (FORT WORTH, TX)



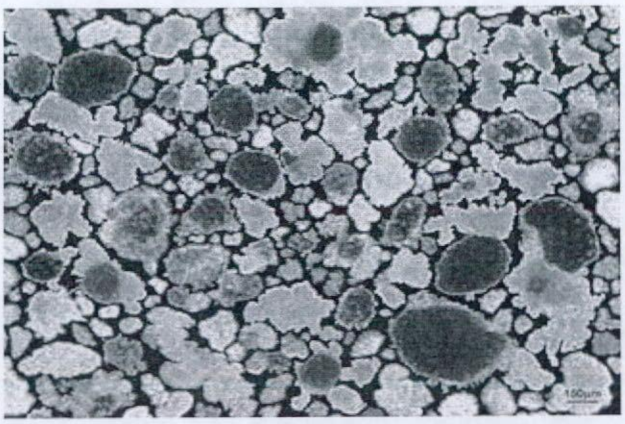
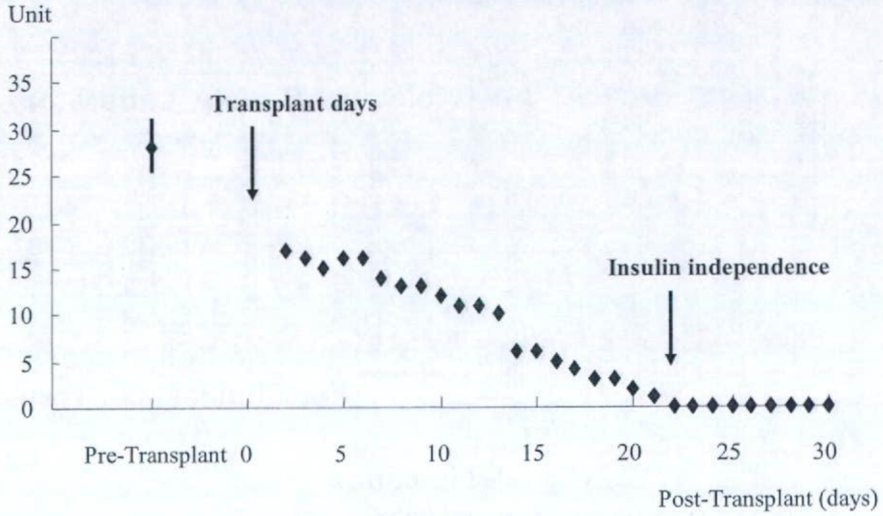
Islets from Living Donor

Yields
408,114 IE

10,740 IE/g pancreas
8,211 IE/kg recipient

Viability
99 %

Tissue Volume
9.5 ml



Daily Insulin Amount