

2014/5004A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (移植医療技術開発研究分野))

第三世代・第四世代臍島分離法を用いた 臨床臍島移植の実施

平成26年度
総括・分担研究報告書

研究代表者 野口 洋文

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (移植医療技術開発研究分野))

第三世代・第四世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野口 洋文

平成27 (2015) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
第三代・第四代腭島分離法を用いた臨床腭島移植の実施	-----	1
野口 洋文		
II. 分担研究報告		
1. 国立国際医療研究センター研究所	-----	7
霜田 雅之		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	12

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業)
(難治性疾患等実用化研究事業 (移植医療技術開発研究分野))
総括研究報告書

第三世代・第四世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施

研究代表者 野口 洋文 琉球大学大学院医学研究科 再生医学講座 教授

研究要旨

膵島移植は、インスリン依存状態糖尿病（主に1型糖尿病）に対する治療法であり、局所麻酔下にて膵島を経門脈的に注入するため、膵臓移植に比べ低侵襲で安全性が高いことが特徴である。研究代表者はハーバード大学、京都大学、ペイラー研究所で合計100例以上のヒト膵島分離を実施しており、第三世代膵島分離法を確立した。第三世代膵島分離法とは、1) 膵管保護、2) 二層法保存、3) 新規臓器保存液、4) 比重コントロールによる膵島純化、5) 膵島追加純化、6) 分離膵島低温保存、の6つの技術改変を行っており、分離成功率（膵島分離を実施して移植に至る確率）は80%以上、インスリン離脱率が単回移植で100%となった。本研究では平成25年度、26年度に第三世代膵島分離技術を用いた臨床膵島移植を日本で実施するとともに、現在開発中の第四世代分離法を最終年度の平成27年度に臨床実施することを目的としている。第四世代分離法とは、1) 膵管保護溶液にJNK抑制ペプチドを添加、2) 新規臓器保存液（HN-1溶液）の使用、3) 連続比重・密度勾配による純化、の3つの技術改変を加えたものである。本申請は3年の研究計画であるが、ヒト膵島分離を共同研究者の国立国際医療研究センターとともに、年間1-3例行う予定にしている。

平成26年度は研究代表者が膵島分離にかかわっている京都大学で2回の膵島分離を行い、1回の膵島移植を実施した。当初の計画通りではあるが、症例数が少ないのが問題点として挙げられる。国立国際医療研究センターでは臨床膵島移植の準備を順調に進めており、来年度の移植を目指している。

研究分担者

氏名	所属機関名
霜田 雅之	国立国際医療研究センター 一研究所

（主に1型糖尿病）に対する治療法であり、局所麻酔下にて膵島を経門脈的に注入するため、膵臓移植に比べ低侵襲で安全性が高いことが特徴である。研究代表者はハーバード大学で膵島分離技術を習得したのち、京都大学所属時に膵島移植グループの

A. 研究目的

膵島移植は、インスリン依存状態糖尿病

主要メンバーの一人として、日本初となる心停止ドナーからの膵島移植および生体ドナーからの膵島分離を実施した。その後、アメリカのベイラー研究所でAssociate Investigator、Directorとして100例以上のヒト膵島分離を実施しており、豊富な臨床経験を持つ。

膵島分離技術は非常に複雑で施設間格差が大きいことがわかっている。研究代表者は現在までに1) 膵管保護、2) 二層法保存、3) 新規臓器保存液、4) 比重コントロールによる膵島純化、5) 膵島追加純化、6) 分離膵島低温保存、の6つの膵島分離技術の改変を行っている。この6つの技術を臨床応用した第三世代分離法では、分離成功率（膵島分離を実施して移植に至る確率）は80%以上でありインスリン離脱率が単回移植で100%となった。欧米の標準施設では分離成功率は30-50%であり、インスリン離脱率は単回移植で10%（複数回移植で80%）であることを考慮すると、申請代表者の技術が世界最高水準であるといえる。本研究ではこの技術を用いた臨床膵島移植を日本で実施するとともに、現在開発中の第四世代分離法を最終年度に臨床実施することを目的としている。第四世代分離法とは、1) 膵管保護溶液にJNK抑制ペプチドを添加、2) 新規臓器保存液（HN-1溶液）の使用、3) 連続比重・密度勾配による純化、の3つの技術改変を加えたものである。昨年度、ブタ膵島分離にてその有効性を確認し、本年度に安全性の確認を行った。本申請は3年の研究計画であるが、ヒト膵島分離を共同研究者の国立国際医療研究センターとともに、年間1-3例行う予定にしている。

B. 研究方法

本研究では、第三世代膵島分離法を用いて臨床膵島移植を行うとともに、現在、研究開発を行っている「第四世代膵島分離法」を完成させ、平成27年度にこの技術を用いた臨床膵島移植を実施することを目的としている。

<平成26年度計画：第三世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施>

平成25年度同様、第三世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施を行う。第三世代膵島分離法は申請代表者が京都大学所属時およびベイラー研究所所属時に中心となって研究開発した技術である。具体的には、

- 1) 膵管保護
- 2) 二層法保存
- 3) 新規臓器保存液
- 4) 比重コントロールによる膵島純化
- 5) 膵島追加純化
- 6) 分離膵島低温保存

の6つの膵島分離技術の改変を行っている。この技術はすでにベイラー研究所で臨床実施されており、分離成功率は80%を超え、インスリン離脱率が単回移植で100%であった。欧米の標準施設では分離成功率は30-50%であり、インスリン離脱率は単回移植で10%（複数回移植で80%）であることを考慮すると、申請代表者の技術が世界最高水準であるといえる。また、臨床実施されていることからわかるように、この技術の安全性はすでに確認されている。

申請代表者は京都大学およびベイラー研究所で膵島移植のプロジェクトを立ち上げる際、クリーンルーム内での膵島分離を行う際の標準作業手順書（Standard Operating Procedure）

re: SOP) 作成を行った経験を持つ。研究代表者がかかわっている4施設(京都大学、大阪大学、千葉東病院、信州大学)ではすでに手順書作成は終了しており、いつでも膵島分離ができる体制となっている。また、琉球大学では、クリーンルームと同じ形態の部屋を研究室に設置し、イヌおよびブタ膵を用いて膵島分離のトレーニングを行っている。

国立国際医療研究センターでは独自の膵島分離法で膵島移植を実施する計画となっており、本年はその準備を行っている状況である。平成26年度にヒト膵島分離を1-3例行う予定にしている。

(倫理面への配慮)

臨床膵島移植に関しては、日本膵・膵島移植研究会より膵島分離・移植施設として認定を受けた施設でのみ実施できるしくみとなっている。人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除においては、日本膵・膵島移植研究会の指針に従って膵島移植を実施することにより確保できる。インフォームドコンセントの様式も、日本膵・膵島移植研究会で用意されているものを使用する。

米国では膵島移植はFDAの規制の下に行われているが、日本では日本膵・膵島移植研究会の定めた基準に従って膵島移植を行うことになっている。研究代表者は米国でFDAの規制の下、100例以上のヒト膵島分離を行ってきた経験者であり、また日本でも京都大学所属時に23例のヒト膵島分離を実施している。日本膵・膵島移植研究会の指針でも、米国FDAと同じくGMP基準に則って膵島分離を行うことと提唱している。膵島移植におけるGMPは、世界における膵島分離方法の標準であり、その基本理念

は患者の安全と移植の効果の確保である。

平成26年11月に施行された「再生医療等安全性確保法」の範疇に膵島移植が入ることとなり、日本膵・膵島移植研究会が中心となり必要書類の作成を行っている。研究代表者がかかわっている4施設ではすでに施設登録の申請を行っている。

C. 研究結果

平成26年度は臨床膵島移植を1-3例実施する計画となっていたが、研究代表者がかかわっている4施設のうち、京都大学で2回の膵島分離と1回の膵島移植を実施した。移植後の膵島生着率は良好であり、早期に追加移植が可能であればインスリン離脱が達成できるレベルであった。当初の計画通りであるものの、症例数が少ないのが問題点として挙げられる。平成26年度に申請代表者らが入手できたドナー情報自体が2回にとどまっており、ドナー不足およびドナー情報の入手経路の整備不足がその原因であるといえる。

共同研究施設の国立国際医療研究センターでは臨床膵島分離・移植の体制が整い、平成26年3月に日本膵・膵島移植研究会から膵島分離・移植施設として認定された。平成27年度から臨床膵島移植を実施する予定である。

D. 考察

日本で臨床膵島移植を行っていくうえでの最大の問題点はドナー情報の入手過程であり、ドナーコーディネートを一元化しなければ日本の膵島移植の成功は困難である。膵島移植は複数回の移植でインスリン離脱を目指す治療であり、初回移植から2回目、3回目の移植までの期間があくと、インスリン離脱を達成することが困難となることが報告されている。

現在の日本のドナー数を考慮すると、ドナー情報のとりこぼしにより 2 回目、3 回目の膵島移植の時期が遅くなると、インスリン離脱症例を出すことが困難となることが予想される。ドナーコーディネートの問題は、厚生労働省、日本臓器移植ネットワーク、日本組織移植ネットワーク、および日本膵・膵島移植研究会が関与する事案であり、関係団体が協力して早期に解決していただけることを期待している。また、日本の移植医療の根本的な問題として脳死ドナーの絶対的不足がある。欧米のドナーの割合を日本の人口に当てはまると、日本でも 2500 例前後の脳死ドナーが発生しているはずであるが、実際には年間 45 例前後の提供にとどまっているのが現状である。国民への普及啓発活動を根気よく続けていくとともに、脳死での臓器提供が行われやすい環境を作ることが大事であると思われる。

E. 結論

平成26年度は膵島分離を2回、移植を1回行った。当初の計画通りであるものの、症例数が少ないのが問題点として挙げられる。平成26年度に申請代表者らが入手できたドナー情報自体が2回にとどまっており、ドナー不足およびドナー情報の入手経路の整備不足がその原因であるといえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Miyamoto Y, Ikeuchi M, **Noguchi H**, Yagi T, Hayashi S. Three-Dimensional *in vitro* Hepatic Constructs Formed Using

Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device. *Cell Med.* 2015, 7(2):67-74.

2: Tsugata T, Nikoh N, Kin T, Saitoh I, Noguchi Y, Ueki H, Watanabe M, Shapiro AMJ, **Noguchi H**. Potential factors for the differentiation of ES/iPS cells into insulin-producing cells. *Cell Med.* 2015, 7(2):83-93.

3: **Noguchi H**, Saitoh I, Tsugata T, Kataoka H, Watanabe M, Noguchi Y. Induction of tissue-specific stem cells by reprogramming factors, and tissue-specific selection. *Cell Death Differ.* 2015 Jan;22(1):145-55.

4: Yukawa H, Nakagawa S, Yoshizumi Y, Watanabe M, Saito H, Miyamoto Y, **Noguchi H**, Oishi K, Ono K, Sawada M, Kato I, Onoshima D, Obayashi M, Hayashi Y, Kaji N, Ishikawa T, Hayashi S, Baba Y. Novel positively charged nanoparticle labeling for *in vivo* imaging of adipose tissue-derived stem cells. *PLoS One.* 2014 Nov 3;9(11):e110142.

5: Kuise T, **Noguchi H**, Tazawa H, Kawai T, Iwamuro M, Saitoh I, Kataoka HU, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T. Establishment of a pancreatic stem cell line from fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. *Biomed Eng Online.* 2014 May 27;13:64. doi: 10.1186/1475-925X-13-64.

6: Shimoda M, Chen S, **Noguchi H**, Takita M, Sugimoto K, Itoh T, Chujo D, Iwahashi S, Naziruddin B, Levy MF, Matsumoto S, Grayburn PA. A new

method for generating insulin-secreting cells from human pancreatic epithelial cells after islet isolation transformed by NeuroD1. Hum Gene Ther Methods. 2014 Jun;25(3):206-19.

7: Noguchi H. Islet Purification for Clinical Islet Transplantation. Current Tissue Engineering. 2014; 3: 34-38.

2. 学会発表

1: 丸山 通広, 野口 洋文, 大月 和宣, 坪尚武, 青山 博道, 松本 育子, 長谷川 正行, 西郷 健一, 浅野 武秀: 当院における膵島移植の現状. 第 76 回日本臨床外科学会総会. 2014/11/20-22 福島

2: 野口 洋文, 丸山 通広, 大月 和宣, 西郷 健一, 長谷川 正行, 青山 博道, 松本 育子, 浅野 武秀, 坪尚武: SUIT/EIR index を用いた膵島移植患者の膵島生着率の検討. 第 50 回日本移植学会総会.

2014/9/10-12 東京

3: 西郷 健一, 北村 博司, 坪尚武, 丸山 通広, 大月 和宣, 長谷川 正行, 青山 博道, 松本 育子, 野口 洋文, 浅野 武秀: 当院における腎移植後発癌症例の解析. 第 50 回日本移植学会総会. 2014/9/10-12 東京

4: 川口 武彦, 松本 育子, 野口 洋文, 青山 博道, 大月 和宣, 丸山 通広, 長谷川 正行, 西郷 健一, 浅野 武秀, 伊藤 泰平, 剣持 敬, 坪尚武: 高齢腎移植患者の移植腎予後についての検討. 第 50 回日本移植学会総会. 2014/9/10-12 東京

5: 松本 育子(国立病院機構千葉東病院 外科), 坪尚武, 西郷 健一, 長谷川 正行, 丸山 通広, 大月 和宣, 青山 博道, 野口

洋文, 剣持 敬, 浅野 武秀: 腎移植後妊娠 4 症例の検討. 第 50 回日本移植学会総会. 2014/9/10-12 東京

6: 坪尚武, 丸山 通広, 大月 和宣, 松本 育子, 西郷 健一, 長谷川 正行, 青山 博道, 野口 洋文, 浅野 武秀: 当院における安全な腎採取術のための取り組み. 第 50 回日本移植学会総会. 2014/9/10-12 東京

7: 長谷川 正行, 坪尚武, 伊藤 泰平, 丸山 通広, 西郷 健一, 大月 和宣, 青山 博道, 松本 育子, 野口 洋文, 北村 博司, 剣持 敬: 当科における腎移植レシピエントの BK ウイルス腎症に関する臨床的検討. 第 50 回日本移植学会総会.

2014/9/10-12 東京

8: 青山 博道, 西郷 健一, 長谷川 正行, 坪尚武, 丸山 通広, 大月 和宣, 松本 育子, 野口 洋文, 川口 武彦, 北村 博司, 浅野 武秀: 高齢者の腎移植の限界と挑戦 当院における高齢者腎移植の検討. 第 50 回日本移植学会総会. 2014/9/10-12 東京

9: 丸山 通広, 大月 和宣, 坪尚武, 青山 博道, 松本 育子, 野口 洋文, 長谷川 正行, 西郷 健一, 浅野 武秀, 穴澤 貴行, 後藤 満一: 脳死ドナー膵に対する膵臓移植・膵島移植の最適な選択 脳死下臓器提供における膵臓移植未施行例の検討. 第 50 回日本移植学会総会. 2014/9/10-12 東京

10: 宮本 義孝, 池内 真志, 野口 洋文, 鈴木 聡, 八木 透, 生田 幸士, 林 衆治: 培養デバイス' TASCL' による三次元肝細胞組織体の機能評価. 第 41 回日本臓器保存生物医学会学術集会. 2014/11/28-29 大阪

11: 坪 尚武(国立病院機構千葉東病院 外科), 丸山 通広, 松本 育子, 西郷 健一, 長谷川 正行, 大月 和宣, 青山 博道, 石田 健倫, 齋藤 友永, 野口 洋文, 浅野 武秀: 細胞移植 膵島移植に向けた採取膵持続冷却灌流保存の検討. 第 41 回日本臓器保存生物医学会学術集会. 2014/11/28-29 大阪

12: 丸山 通広, 坪 尚武, 野口 洋文, 大月 和宣, 長谷川 正行, 青山 博道, 松本 育子, 西郷 健一, 伊藤 泰平, 剣持 敬, 浅野 武秀: 当院における膵島移植の現状. 第 26 回日本肝胆膵外科学学術集会. 2014/6/11-13 和歌山

13: 野口 洋文, 齋藤 一誠, 片岡 仁美, 渡部 昌実, 野口 寧文, 西郷 健一, 長谷川 正行, 丸山 通広, 大月 和宣, 青山 博道, 松本 育子, 浅野 武秀, 坪 尚武: リプログラミングファクターの導入による人工膵幹細胞の作成. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014/5/22-24 大阪

14: 丸山 通広, 坪 尚武, 大月 和宣, 野口 洋文, 長谷川 正行, 青山 博道, 松本 育子, 浅野 武秀, 関 直人, 西村 元伸: 当院における膵島移植の現状. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014/5/22-24 大阪

15: 桂 央土, 坂本 扶美枝, 安田 哲行, 平井 孝一, 村田 雅彦, 小澤 純二, 北村 哲宏, 大月 道夫, 今川 彰久, 船橋 徹, 松岡 孝昭, 永野 浩昭, 野口 洋文, 伊藤 壽記, 金藤 秀明, 下村 伊一郎: 遺伝性膵炎に対し膵全摘術および膵島自家移植を施行した 1 例. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014/5/22-24 大阪

16: 丸山 通広, 坪 尚武, 大月 和宣, 青山 博道, 松本 育子, 長谷川 正行, 野口 洋文, 西郷 健一, 浅野 武秀, 伊藤 泰平, 剣持 敬: 脳死膵臓移植における高齢、肥満ドナーの検討. 第 114 回日本外科学会定期学術集会. 2014/4/3-5 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業)
(難治性疾患等実用化研究事業 (移植医療技術開発研究分野))
分担研究報告書

第三世代・第四世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施

研究分担者 霜田 雅之 国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト研究長

研究要旨

研究目的： 本研究は、第三世代・第四世代膵島分離法を用いた膵島移植を臨床で実施することを目的としている。分担研究施設である独立行政法人国立国際医療研究センター（以下 NCGM）は独自のプロトコールで臨床研究として実施する。

研究方法： H26年度は、NCGMでは臨床試験の実施を目指す。体制、準備が完了次第臨床試験を実施するが、まず少数例のパイロットスタディとして有効性と安全性の評価を行い、その結果により次相の臨床研究を行う予定である。

成果、結果： H26年度は臨床研究の準備を進めた。研究用ヒト膵臓の入手が困難な我が国では大型動物であるブタを用いてヒト膵島分離と同様の工程でのシミュレーションを行うことが重要であるが、H26年度は12例のブタ膵島分離を行った。膵島分離結果も良好である。臨床実施に向けて体制構築を進め、臨床試験の際に膵島分離を行うに当たって膵島の品質管理に必要なGMP基準を満たす細胞調製施設(CPC)をNCGM内に稼働させている。H26年3月に日本膵膵島移植研究会より膵島分離・移植実施施設に認定された。同種膵島移植はあらたにH26年11月に施行された再生医療等の安全性の確保等に関する法律において第1種再生医療等製品に該当することとなったため、その対応を行った。H26年度中にレシピエント登録手続きを開始した。

考察・結論：NCGMについては、H26年度は再生医療新法の対応、レシピエント登録手続き、その他の体制整備を行った。H27年度からの移植実施を予定している。

A. 研究目的

本研究では第三世代分離法技術を用いた臨床膵島移植を日本で実施するとともに、現在開発中の第四世代分離法をH27年度から臨床実施することを目的としている。国立国際医療研究センターでは独自の膵島分離法で膵島移植を実施する計画となっている。

B. 研究方法

NCGMで臨床試験として行われる膵島移植の概要は以下である。

対象：血糖値が不安定な1型糖尿病患者。
登録人数：3名。登録期間：24ヶ月。観察期間：24ヶ月。試験デザイン：単施設、前向き介入試験、非ランダム化、非盲検。主要

エンドポイント：初回移植から1年後にHbA1c値(NGSP値)が7.0%未満であり、かつ初回移植後28日から移植後365日にかけて重症低血糖発作が消失した患者の割合。

年次計画は以下である。

平成25年度：臨床試験の体制準備

- a. 細胞調製施設の準備
- b. 倫理委員会の承認
- c. 日本膵膵島移植研究会の施設認定

平成26年度

- a. 臨床試験開始・患者登録
- b. 膵島移植実施
- c. 評価項目のデータ収集

平成27年度

- a. 臨床試験継続
- b. 評価項目のデータ収集

倫理面への配慮

本研究は、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」(平成20年7月31日全部改正)および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)」を遵守し、機関の倫理委員会の承認を得て実施する。データは研究を担当するスタッフのみがアクセス可能とし、内容が第三者の目に触れないように、また、データが漏洩しないように、作業方法、作業場所、データ保管方法等を厳重に管理する。匿名化対応表は、データ固定後は個人情報管理者(企画戦略局長)が管理、保管する。データの解析は、個人情報保護のため、また、個人情報が結果の解釈に影響することを避けるため、連結可能匿名化された後に実施する。研究成果の公表に際しては、個人が特定されることのないように配慮する。また、被験者に理解を求め同意を得る方法としては上記の指針に則り、文書を用いて説明し、説明した内容を被験者が理解していることを確認した上で、自

由意思によるインフォームドコンセントを文書で取得する。その際、本研究に参加するか否かは被験者の自由意思に基づいて決定すること、研究に参加しなくても上記文書で研究参加者に与えられると説明されている利益を受けられなくなることを以外に不利益を受けないこと、一旦研究参加に同意した後でも特段の不利益を受けること無くいつでも同意を撤回できること、ただし、同意撤回以前に学会、論文等で発表した結果は取り消さないことを十分に説明する。

C. 研究結果

H26年度は臨床試験の準備を進めた。研究用ヒト膵臓の入手が困難な我が国では大型動物であるブタを用いてヒト膵島分離と同様の工程でのシミュレーションを行うことが重要であるが、H26年度は12例(H24年度より計34例)のブタ膵島分離を行った。膵島分離結果も良好である。臨床実施に向けて体制構築を進め、H25年6月に施設内の倫理委員会の承認を得た。臨床試験の際に膵島分離を行うに当たって膵島の品質管理に必要なGMP基準を満たす細胞調製施設(CPC)をNCGM内に稼働させており、再生医療新法に基づく細胞加工施設の届出手続きを行っている。H26年3月に日本膵膵島移植研究会より膵島分離・移植実施施設に認定された。また、再生医療新法に基づく細胞提供計画の申請準備を行った。H26年度後半より移植希望患者のレシピエント登録手続きを開始した。

D. 考察

H26年度の計画は進んでいるが、ヒト膵島分離および移植は未実施である。H27年度より

は NCGM もヒト膵島分離数に貢献すべく研究を推進する。

E. 結論

H27 年度より臨床膵島移植を実施する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugimoto K, Itoh T, Takita M, Shimoda M, Chujo D, SoRelle JA, Naziruddin B, Levy MF, Shimada M, Matsumoto S. Improving allogeneic islet transplantation by suppressing Th17 and enhancing Treg with histone deacetylase inhibitors. *Transpl Int.* 2014 Apr;27(4):408-15.

2. Shimoda M, Chen S, Noguchi H, Takita M, Sugimoto K, Itoh T, Chujo D, Iwahashi S, Naziruddin B, Levy MF, Matsumoto S, Grayburn PA. A New Method for Generating Insulin-Secreting Cells from Human Pancreatic Epithelial Cells After Islet Isolation Transformed by NeuroD1. *Hum Gene Ther Methods.* 2014 Jun;25(3):206-19.

3. Takita M, Itoh T, Shimoda M, Kanak MA, Shahbazov R, Kunnathodi F, Lawrence MC, Naziruddin B, Levy MF. Pancreatic Ductal Perfusion at Organ Procurement Enhances Islet Yield in Human Islet Isolation. *Pancreas.* 2014 Nov;43(8):1249-55.

4. Shimoda M, Matsumoto S. Questionnaire Survey of Patients with Type-1 Diabetes Mellitus and Their Family Members on the Acceptance of Newly Emerging Therapies. *Journal of Diabetes & Metabolism* in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	特になし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyamoto Y, Ikeuchi M, Noguchi H, Yagi T, Hayashi S.	Three-Dimensional <i>in vitro</i> Hepatic Constructs Formed Using Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device.	Cell Med.	7(2)	67-74	2015
Tsugata T, Nishioh N, Kin T, Saitoh I, Noguchi Y, Ueki H, Watanabe M, Shapiro AMJ, Noguchi H.	Potential factors for the differentiation of ES/iPS cells into insulin-producing cells.	Cell Med.	7(2)	83-93	2015
Noguchi H, Saitoh I, Tsugata T, Kataoka H, Watanabe M, Noguchi Y.	Induction of tissue-specific stem cells by reprogramming factors, and tissue-specific selection.	Cell Death Differ.	22(1)	145-155	2015
Yukawa H, Nakagawa S, Yoshizumi Y, Watanabe M, Saito H, Miyamoto Y, Noguchi H, Oishi K, Ono K, Sawada M, Katoh I, Onoshima D, Obayashi M, Hayashi Y, Kajiji N, Ishikawa T, Hayashi S, Baba Y.	Novel positively charged nanoparticle labeling for in vivo imaging of adipose tissue-derived stem cells.	PLoS One.	9(11)	e110142	2014
Kuise T, Noguchi H, Tazawa H, Kawai T, Iwamura M, Saitoh I, Kataoka H, U, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T.	Establishment of a pancreatic stem cell line from fibroblast-derived induced pluripotent stem cells.	Biomed Eng Online.	13	doi: 10.1186/1475-925X-13-64.	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimoda M, Chen S, Noguchi H, Takita M, Sugimoto K, Itoh T, Chujo D, Iwahashi S, Naziruddin B, Levy MF, Matsumoto S, Grayburn PA.	A new method for generating insulin-secreting cells from human pancreatic epithelial cells after islet isolation transformed by NeuroD1.	Hum Gene Ther Method	25(3)	206-219	2014
Noguchi H.	Islet Purification for Clinical Islet Transplantation.	Current Tissue Engineering	3	34-38	2014
Sugimoto K, Itoh T, Takita M, Shimoda M, Chujo D, SoRelle JA, Naziruddin B, Levy MF, Shimada M, Matsumoto S.	Improving allogeneic islet transplantation by suppressing Th17 and enhancing Th2 with histone deacetylase inhibitors.	Transpl Int.	Apr;27(4)	408-15	2014
Takita M, Itoh T, Shimoda M, Kanak MA, Shabazov R, Kunathodi F, Lawrence MC, Naziruddin B, Levy MF.	Pancreatic Ductal Perfusion at Organ Procurement Enhances Islet Yield in Human Islet Isolation.	Pancreas.	Nov;43(8)	1249-55	2014
Shimoda M, Matsumoto S.	Questionnaire Survey of Patients with Type-1 Diabetes Mellitus and Their Family Members on the Acceptance of Newly Emerging Therapies.	Journal of Diabetes & Metabolism	In press		

Three-Dimensional In Vitro Hepatic Constructs Formed Using Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device

Yoshitaka Miyamoto,^{*1} Masashi Ikeuchi,^{†‡} Hirofumi Noguchi,[§] Tohru Yagi,[¶] and Shuji Hayashi^{*}

^{*}Department of Advanced Medicine in Biotechnology and Robotics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Showa-ku, Nagoya, Japan

[†]Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

[‡]PRESTO, Japan Science and Technology (JST), Saitama, Japan

[§]Department of Regenerative Medicine, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

[¶]School of Information Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan

Attempts to create artificial liver tissue from various cells have been reported as an alternative method for liver transplantation and pharmaceutical testing. In the construction of artificial liver tissue, the selection of the cell source is the most important factor. However, if an appropriate environment (in vitro/in vivo) cannot be provided for various cells, it is not possible to obtain artificial liver tissue with the desired function. Therefore, we focused on the in vitro environment and produced liver tissues using MEMS technology. In the present study, we report a combinatorial TASCL device to prepare 3D cell constructs in vitro. The TASCL device was fabricated with an overall size of 10 mm × 10 mm with microwells and a top aperture (400 μm × 400 μm, 600 μm × 600 μm, 800 μm × 800 μm) and bottom aperture (40 μm × 40 μm, 80 μm × 80 μm, 160 μm × 160 μm) per microwell. The TASCL device can be easily installed on various culture dishes with tweezers. Using plastic dishes as the bottom surface of the combinatorial TASCL device, 3D hepatocyte constructs of uniform sizes (about φ 100 μm–φ 200 μm) were produced by increasing the seeding cell density of primary mouse hepatocytes. The 3D hepatocyte constructs obtained using the TASCL device were alive and secreted albumin. On the other hand, partially adhered primary mouse hepatocytes exhibited a cobblestone morphology on the collagen-coated bottom of the individual microwells using the combinatorial TASCL device. By changing the bottom substrate of the TASCL device, the culture environment of the cell constructs was easily changed to a 3D environment. The combinatorial TASCL device described in this report can be used quickly and simply. This device will be useful for preparing hepatocyte constructs for application in drug screening and cell medicine.

Key words: Primary hepatocytes; Hepatic constructs; Three-dimensional (3D) culture; Tapered stencil for cluster culture (TASCL) device; Biomedical microdevices

INTRODUCTION

Attempts to create artificial liver tissue from induced pluripotent stem cells (27–29), embryonic stem cells (1,3,30), other stem cells (12), and tissue cells (5,22) have been reported as alternative methods for use in liver transplantation (13) and pharmaceutical testing (4,14–17). In the construction of artificial liver tissue, the selection of the cell source (13,18–21,27,30) is the most important factor. However, an appropriate environment (in vitro/in vivo) for the cells cannot be provided; it is not possible to obtain artificial liver tissue with the desired functions, such as the capacity for albumin secretion, cytochrome P450 activity, ammonia metabolism, etc. Therefore,

we focused on the in vitro environment and attempted to create liver tissues using the MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) technique.

Various methods for manufacturing artificial liver tissue (14,17) (i.e., hepatic cell aggregates) have been devised using spinner flasks, gyratory culture apparatuses, culture devices modified with low cell adhesive cationic compounds (23), poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (32), hollow fibers (26), scaffolds (7), or the hanging drop method, etc. Conventional cell aggregate formation has also been induced using the hanging drop method. This method, however, is not suitable for the mass production of cell aggregates because it requires the manual

Received May 21, 2014; final acceptance November 10, 2014. Online prepub date: December 12, 2014.

¹These authors provided equal contribution to this work.

Address correspondence to Yoshitaka Miyamoto, Ph.D., Department of Advanced Medicine in Biotechnology and Robotics, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan. Tel: +81-52-719-1873; Fax: +81-52-719-1977; E-mail: myoshi1230@gmail.com or [ymiyamoto@med.nagoya-u.ac.jp](mailto:y Miyamoto@med.nagoya-u.ac.jp)

deposition of uniform small droplets containing cells onto the culture substrate. Recently, several culture methods have been developed for the mass production of cell aggregates using ultralow adhesive surfaces in which the cells are suspended in medium (9) or Matrigel, wherein the cells can migrate three dimensionally (2). However, there remain problems with these techniques, including that clusters of various sizes are formed during the experiments. Therefore, processes of separation are required following cell aggregate formation. The variation in cell aggregate size seemingly derives from the randomness of the initial condition of each cell aggregate formation number and population density of cells.

In order to address this problem, we proposed the use of the tapered stencil for cluster culture (TASCL) method (Fig. 1A, B), an array employing tapered microapertures of varying sizes made of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) (10,11,33). The self-sealing ability of PDMS enables the easy attachment and removal of a combinatorial TASCL on various substrates without adhesives. Briefly, by placing TASCL on a cell culture dish, microwells are formed

on the substrate (Fig. 1). The seeding condition in each microwell can be controlled based on the area of the top aperture x (mm^2) and bottom aperture y (mm^2). The cell population (P) in a microwell and cell density (D) at the bottom of the microwell are described as follows:

$$P \cong Ctx \text{ (cells)} \quad (1)$$

$$D \cong P/y = Ctx/y \text{ (cells/mm}^2\text{)} \quad (2)$$

where C (cells/ml) is the concentration of the cell suspension medium, and t (mm) is the depth of the medium. The walls between microwells are formed to have a knife edge so that all cells fall into one of the microwells, thus preventing the unexpected intrusion of cells following the initial sedimentation. Therefore, multiple 3D cell constructs can be initiated under defined conditions at the same time by simply placing a droplet of cell suspension onto the device. Unlike other previous reports using arrays of single-size microwells (24,31), a combinatorial TASCL device can be used to create 3D cell constructs under multiple controlled seeding conditions simultaneously.

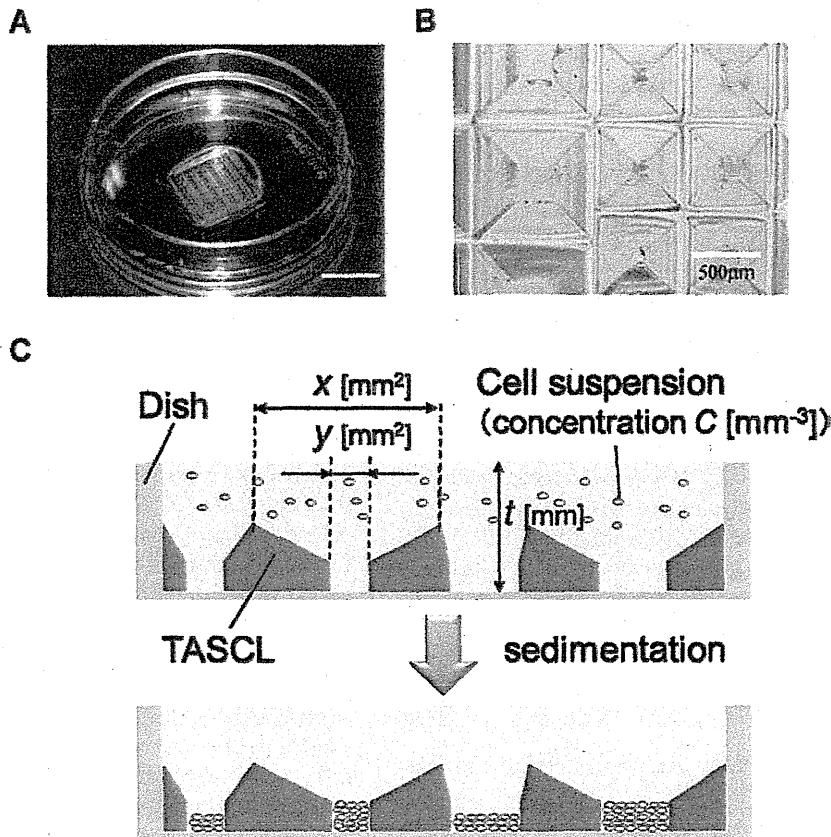


Figure 1. Fabrication of combinatorial TASCL device. (A) The combinatorial TASCL device consisted of various microwells measuring 10 mm by 10 mm with a thickness of 0.55 mm. Scale bar: 10 mm. (B) The combinatorial TASCL device was observed under phase-contrast microscopy. Scale bar: 500 μm . (C) A schematic diagram of cell seeding and cell construct process using TASCL. Cell constructs can be created under multiple initial conditions simultaneously by injecting cell suspension onto the TASCL device.

In the present study, we report the application of a combinatorial TASCL device to prepare 3D cell constructs in vitro. Using the TASCL device, we evaluated 3D constructs using primary mouse hepatocytes.

MATERIALS AND METHODS

Materials

William's E Medium and antibiotics (penicillin, streptomycin, and kanamycin) were purchased from Life Technologies, Inc. (Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Gemini Bio-Products (West Sacramento, CA, USA). Insulin and dexamethasone were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). All other materials and chemicals not specified above were of the highest grade available.

Fabrication of a Combinatorial TASCL Device

The dimensions of the top and bottom aperture of a combinatorial TASCL device are shown in Table 1. The TASCL device was created using PDMS (SYLGARD® 184; Dow Corning, Midland, MI, USA) according to the micromolding technique (10,11). First, a master mold was fabricated with photocurable resin (SCR770; D-MEC Ltd., Tokyo, Japan) using microstereolithography. In order to prevent adhesion of the PDMS and the master mold, the surface of the mold was dip coated with fluoropolymer (CYTOP; AGC, Tokyo, Japan) and baked at 200°C for 60 min. PDMS prepolymer (SYLGARD 184; Dow Corning Toray Co., Japan) was injected into the master mold, which was placed in a vacuum for 15 min to eliminate air bubbles trapped in the mold. After curing at 80°C for 12 h, the TASCL device was detached from the master mold and washed with Milli-Q water (Milli-Q Integral Water Purification System; Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) and ethanol and then placed on a 35-mm plastic culture dish (Falcon 3001; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and sterilized under UV for 12 h. The upper surface of the TASCL device was coated with an aqueous solution of polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide triblock copolymer (1 wt% Anti-Link; Allvivo Vascular, Inc., Lake Forest, CA, USA) for 12 h at room temperature. The copolymer self-assembles on hydrophobic surfaces and forms a hydrophilic layer that prevents cell adhesion. The bottom surface of the TASCL device is maintained intact due to the self-sealing

ability of PDMS, whereas the top surface is hydrophilic. The array of microwells was placed at the center of the TASCL device and surrounded by a trench to prevent the uncontrolled intrusion of cells from the boundary area.

Animals

Male Institute for Cancer Research (ICR) mice ($n=3$) (7–8 weeks old, specific pathogen free) weighing approximately 25–30 g were purchased from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan). The mice studies were approved by the review committee of Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

Isolation and Creation of 3D In Vitro Cell Constructs of Primary Mouse Hepatocytes Using a Combinatorial TASCL Device

Primary hepatocytes were isolated from ICR mouse livers ($n=3$) using collagenase (S-I; Nitta Gelatin, Tokyo, Japan), as previously described (6,25). The viability of the employed cells was greater than 85%, as determined according to the trypan blue dye exclusion test. The final concentration of trypan blue (Gibco®, Life Technologies Inc.) was 0.2%.

ICR mice primary hepatocytes at densities of 5×10^4 , 1×10^5 , and 2×10^5 cells/dish were inoculated on a combinatorial TASCL device to form hepatic cell constructs. The cells were then cultured in 0.35 ml of William's E Medium supplemented with 10% FBS, 1 $\mu\text{mol/L}$ of insulin, 1 $\mu\text{mol/L}$ of dexamethasone, 100 $\mu\text{g/ml}$ of kanamycin, 100 U/ml of penicillin, and 100 U/ml of streptomycin (culture medium). The cells were incubated at 37°C under a humidified 5% CO_2 atmosphere.

A 35-mm plastic culture dish (Falcon 3001) and 35-mm collagen-coated dish (BD Biocoat Collagen I Cellware, BD Biosciences, Bedford, MA, USA) were used as the bottom portion of the TASCL device. The medium on the dishes was partially changed every day. In the 2D monolayer culture (control) group, mouse primary hepatocytes were cultured at 37°C with 5% CO_2 in culture medium on 35-mm collagen-coated dishes. The cells were cultured for 6 days, and the differential hepatic activity was determined as described below.

Hepatic Function Tests In Vitro

The primary hepatocytes were stained with calcein acetoxymethyl ester (calcein AM, 1 mg/ml solution in anhydrous dimethyl sulfoxide, C3099; Molecular Probes®, Life Technologies, Inc.) to detect viable cells. We combined the reagents by transferring 10 μl of the supplied 1 mmol/L calcein AM stock solution to the 5 ml Dulbecco's phosphate-buffered saline without Ca^{2+} and Mg^{2+} supplementation (DPBS free; Life Technologies, Inc.). The cells were incubated in this 2 $\mu\text{mol/L}$ calcein AM/DPBS-free solution for 20 min at 37°C. Calcein AM-positive green

Table 1. Combinations of the Size of the Top and Bottom Apertures of the Combinatorial TASCL Device

Size of the Top Aperture (μm)	Size of the Bottom Aperture (μm)	Number of Microwells
400×400	40×40, 80×80, 160×160	12, 12, 12
600×600	40×40, 80×80, 160×160	8, 8, 8
800×800	40×40, 80×80, 160×160	6, 6, 6

cells were judged to be alive with a fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

We carried out 2D monolayer culture to confirm if primary hepatocytes isolated from ICR mice livers secrete albumin. After confirmation, we cultured primary hepatocytes from the same isolation in the TASCL device. The level of albumin production was assessed by the accumulation of albumin in the culture medium after 24 h using a mouse albumin enzyme linked immunosorbent assay quantification kit, as instructed by the manufacturer (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA).

RESULTS

Preparation of a Combinatorial TASCL Device

A combinatorial TASCL device was created with an overall size (Fig. 1A) of 10 mm \times 10 mm, containing microwells, which have a top aperture (400 μ m \times 400 μ m,

600 μ m \times 600 μ m, 800 μ m \times 800 μ m) and bottom aperture (40 μ m \times 40 μ m, 80 μ m \times 80 μ m, 160 μ m \times 160 μ m) per microwell (Fig. 1B, Table 1). The TASCL device can be easily installed on a commercially available culture dish and be used to freely replace the cell adhesion surface matrix. In this system, we used hydrophobic treatment of the surface inside the TASCL device and put 35-mm plastic (normal) and collagen-coated culture dishes under the TASCL device.

Creation of 3D In Vitro Constructs of Primary Mouse Hepatocytes Using a Combinatorial TASCL Device

We characterized the 3D constructs of primary mouse hepatocytes using the combinatorial TASCL device (Fig. 2). A total of 5×10^4 , 1×10^5 , and 2×10^5 cells were seeded onto the TASCL device and were cultured for 6 days. A 35-mm plastic culture dish was used as the

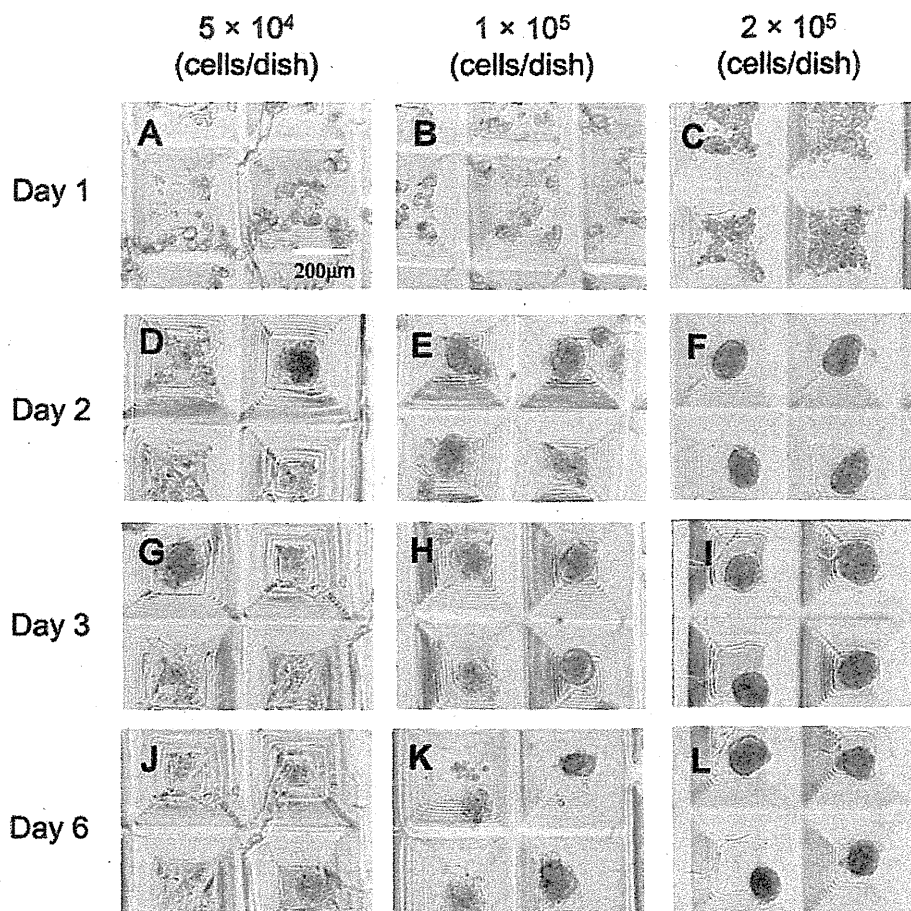


Figure 2. Phase-contrast photomicrographs of primary mouse hepatocyte constructs created using a combinatorial TASCL device and the bottom surface of the TASCL device employed as a 35-mm uncoated plastic culture dish. Primary mouse hepatocytes at a density of 5×10^4 (A, D, G, and J), 1×10^5 (B, E, H, and K), and 2×10^5 cells (C, F, I, and L) were inoculated on the combinatorial TASCL device for 6 days. The culture periods are as follows: 1 day (A, B, and C), 2 days (D, E, and F), 3 days (G, H, and I), and 6 days (J, K, and L). Scale bar: 200 μ m.

bottom part of the TASCL device. As cell seeding density increased, tendency toward the creation of hepatocyte constructs with a defined size was noted. After 2 days of culture, hepatocyte constructs were observed under phase-contrast microscopy (Fig. 2F). At cell densities of 1×10^5 and 2×10^5 cells/dish, hepatocytes in the constructs maintained their spherical morphology after 3 and 6 days of culture (Fig. 2H, I and K, L). However, at a low cell seeding density (5×10^4 cells/dish), seeded cells adhered to the bottom of the device and displayed morphology similar to that in the 2D monolayer culture (Fig. 2A, D, G, and J). The morphology of the hepatocyte constructs was significantly different between microwells.

Subsequently, hepatocyte constructs were created using a 35-mm collagen-coated dish (Fig. 3). More cells adhered to the 35-mm collagen-coated dish compared with the 35-mm plastic one used as the bottom part of the TASCL

device. At a low cell seeding density (5×10^4 cells/dish), seeded hepatocytes adhered to the bottom (Fig. 3D, G, and J), and some cells exhibited a cobblestone morphology similar to that in monolayer culture. At higher cell seeding densities (1×10^5 and 2×10^5 cells/plate), hepatocyte constructs of different sizes were obtained after 2 days of culture (Fig. 3E, F, H, I; and K, L). It was not possible to obtain hepatocyte constructs with similar morphology.

*Hepatic Function of the 3D In Vitro
Constructs of Primary Mouse Hepatocytes
Created Using the TASCL Device*

Based on the above results, we determined the preparation conditions for the formation of hepatocyte constructs using the TASCL device. A total of 2×10^5 cells were seeded in the TASCL device and cultured for 48 h. In the 2D monolayer culture, the cells exhibited a cobblestone

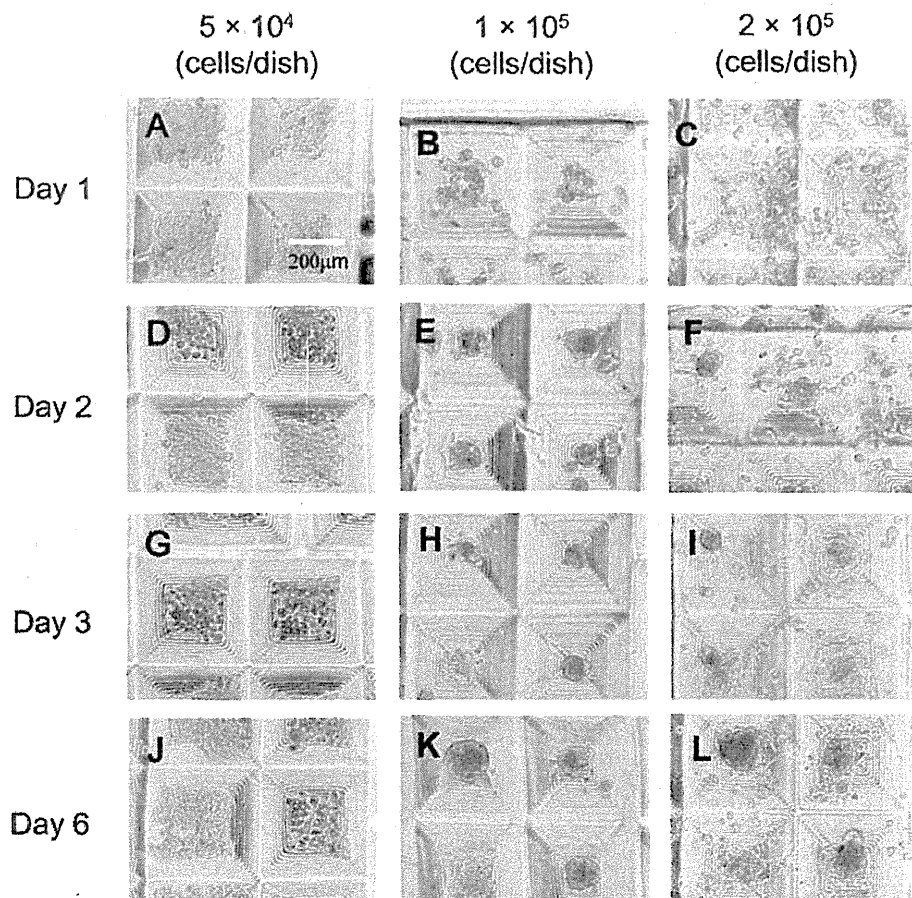


Figure 3. Phase-contrast photomicrographs of primary mouse hepatocyte constructs created using combinatorial TASCL device and the bottom surface of the TASCL device employed as a 35-mm collagen-coated culture dish. Primary mouse hepatocytes at a density of 5×10^4 (A, D, G, and J), 1×10^5 (B, E, H, and K), and 2×10^5 cells (C, F, I, and L) were inoculated on a combinatorial TASCL device for 6 days. The culture periods were as follows: 1 day (A, B, and C), 2 days (D, E, and F), 3 days (G, H, and I), and 6 days (J, K, and L). Scale bar: 200 μ m.

morphology (Fig. 4A–C). By comparison, after 48 h of culture, the morphology of the hepatocyte constructs (Fig. 4D–F) included uniform sizes (about ϕ 100 μm – ϕ 200 μm). The calcein staining results confirmed that the construct consisted of living cells (Fig. 4G–I).

We also evaluated the albumin secretion by mouse hepatocytes in the TASCL device (Fig. 5A). A total of 2×10^5 cells were seeded in the TASCL device and were further cultured for 48 h. The amount of albumin secretion in the TASCL device was measured, and as a result, the activity did not significantly change from 24 to 48 h (Fig. 5A). The level of albumin synthesis in the 2D monolayer culture increased at 24 h, then gradually decreased at 48 h, and maintained at 50% of the peak activity level (Fig. 5B). Conventional 2D culture showed the same tendency for albumin secretion.

DISCUSSION

In recent years, the application of several hepatocellular 3D culture techniques with various matrices as promising tools for innovative drug development has been reported (4,7,8,14–17,26,32). It has also been previously reported that long-term culture is useful for maintaining

the functions of hepatocytes that adhere to the matrix (4,22). Various methods for preparing artificial liver tissue consisting of hepatic cell aggregates have been attempted using biotechnology. In the present study, primary hepatocyte constructs were prepared using the TASCL device (10,11) fabricated according to MEMS technology. The TASCL device can be easily installed on various types of culture dishes with tweezers. We examined the cell constructs of the primary mouse hepatocytes by changing the bottom surface (plastic and collagen-coated dishes) of the TASCL device.

Using plastic dishes on the bottom surface of the combinatorial TASCL device, 3D hepatocyte constructs of uniform sizes (about ϕ 100 μm – ϕ 200 μm) were produced by increasing the seeding cell density of primary mouse hepatocytes (Fig. 2F, I, and L). The 3D hepatocyte constructs obtained using the TASCL device were alive and produced albumin (Figs. 4 and 5). On the other hand, partially adhered primary mouse hepatocytes exhibited a cobblestone morphology on the collagen-coated bottom of individual microwells using the combinatorial TASCL device (Fig. 3D, G, and J). By changing the bottom substrate of the TASCL device, the culture environment of the

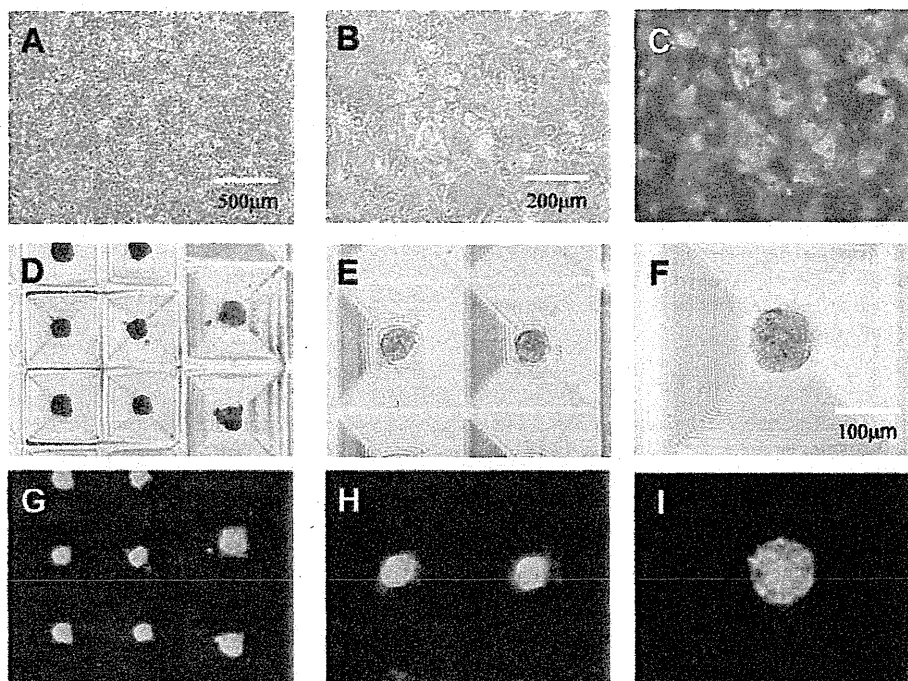


Figure 4. Morphological examination of primary mouse hepatocyte created using the TASCL device or a collagen-coated culture dish. Hepatocytes were cultured on the TASCL device (hepatocyte constructs) and a collagen-coated culture dish (2D monolayer culture). A total of 2×10^5 cells were seeded on the TASCL device and cultured for 2 days. A 35-mm plastic culture dish was used as the bottom part of the TASCL device. The morphology of the hepatocytes treated with 2D monolayer culture is shown after 48 h of culture (A, B, and C). The morphology of the hepatocyte constructs is shown (D, E, and F). (C, G, H, and I) Fluorescent photomicrographs of (B, D, E, and F) after staining with calcein AM. Scale bars: 500 μm (A, D, and G), 200 μm (B, C, E, and H), and 100 μm (F and I).