

図 10. 膵島移植後血糖値の推移

3. 新たな膵島保存法の開発

3-1. Cell Alive System による新たな膵島凍結保存法の基礎的研究

1) static incubation

Stimulation index は CP-1 群: 2.57 ± 0.86 (n=3), RPMI 群: 1.76 ± 0.25 , UW 群: 2.07 ± 0.23 , PFC 群: 1.03 ± 0.15 と CP-1 群で最も良好であり, 本凍結保存法においても CP-1 液が至適であると考えられた(図 11).

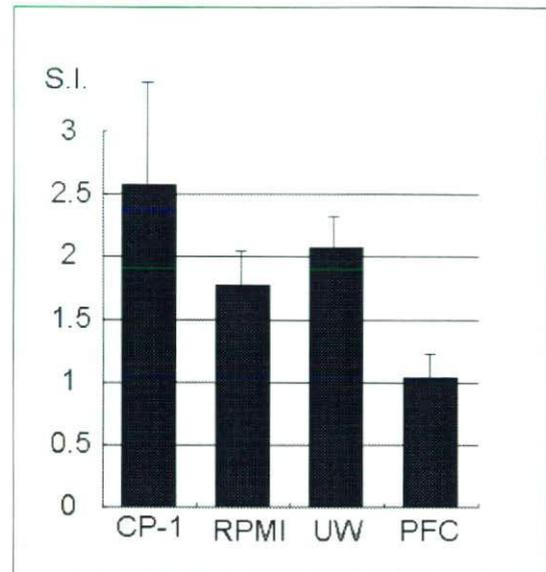


図11. Stimulation Index

3-2. 電磁波過冷却法を用いた短時間膵島保存法の基礎的研究.

1) 形態学的検討

UW 群, Prokept 群では形態は良好に保たれたが, 培養群では, 膵島の fragmentation, 中心壊死が著明であった.

2) 膵島回復率

膵島回復率は, 培養群: 63.5%, UW 群: 95.3%, Prokept 群: 92.8 と, 培養群に比し UW 群, Prokept 群で回復率が良好であった.

3) Static incubation

Stimulation index は培養群: 1.22, UW 群: 2.56, Prokept 群: 2.33 と回復率と同様, 培養群に比し UW 群, Prokept 群で良好であった.

D. 考察

わが国において当施設の 4 例を含む 18 例の心停止ドナー提供の臨床膵島移植が実施され, その安全性と有効性が得られているが, いくつかの課題も明らかとなってきた. わが国では条件の悪い心停止ドナー(いわゆるマージナルドナー)からの膵島分離であり, ドナーの条件により膵島収量, 純度のばらつきが大きい. 脳死ドナー膵からの膵島分離を原則とする欧米の膵島分離法がそのままわが国に適用するとは限らず現行の膵島分離法を更に改良し, 膵島分離成績を改善することは, わが国の膵島移植の発展に必須と考えられる.

本研究の膵管内 p38MAPK inhibitor 注入による

イス膵島分離成績の向上に関する研究成果から、膵臓の保存中また膵臓消化中の膵細胞のアポトーシスを抑制することで、膵島および膵外分泌組織の *viability* を保持し、分離膵島数(収量)の増加が可能となることが確認された。本研究は大動物を用いた結果であり、臨床応用が可能と考えている。

現在世界的には Edmonton protocol の成功から、新鮮膵島移植が主流であり、凍結膵島の移植は行われていないのが現状である。しかしながら、わが国では心停止ドナー膵からの膵島分離となるため、新鮮膵島移植の基準を満たさない分離例も多くみられる。ドナーの少ないわが国においては、このような膵島を凍結保存し、以後の移植に使用することは医学的のみならず、ドナーやドナー家族の提供意思の実現や社会的にも必要である。

当施設では、膵島の凍結保存に広く使用されている DMSO が膵島傷害性を有するため、細胞外凍結阻害剤として HES を使用することで、DMSO 濃度を通常の半分以下とする方法で、膵島を凍結保存した。イスを用いた基礎研究では、十分な凍結効果が得られ、臨床応用した。凍結解凍したヒト膵島を糖尿病ヌードマウスに移植した *in vivo* の検討にて、本方法にて凍結解凍された膵島はインスリン分泌能を有しており、糖尿病の回復効果を維持していることが確認された。しかし効果は新鮮膵島に比較し約半分となることが *in vitro*, *in vivo* の結果より示された。この結果より、今後わが国で凍結膵島移植の臨床応用する場合、新鮮膵島と同等の効果を得るためには約 2 倍の膵島数が必要であると考えられる。

しかしながらわれわれの凍結保存法にても膵島回復率は 70%程度にとどまっております、さらに優れた膵島回復率を実現する膵島凍結保存法の開発も重要である。今回、Cell Alive System による新たな膵島凍結保存法の基礎的研究を開始した。この方法で、植物や組織の凍結保存に優れた結果が得られており、新たな凍結保存法として期待される。また膵島分離から移植までは現在、無血清培地での培養法が一般的であるが、膵島数の減少、機能低下、Contamination のリスクなどが問題点である。われわれは、培養に代わる方法として、電磁波過冷却法を用いた短時間膵島保存法の基礎的研究を行い、Preliminary であるが培養法よりも優れた保存結果を得た。今後更に検討し、臨床応用につなげてゆきたい。

E. 結論

心停止ドナーという、条件の悪いドナーからでも十分移植に使用可能な膵島が得られることが、わが国の臨床膵島移植結果で実証された。しかしながら、さらなる膵島分離技術、凍結保存技術の改善は十分に

可能であり、今後の臨床膵島移植成績改善のうえ重要な課題であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(書籍)

1. 剣持 敬. 19 章 生体膵臓移植 膵臓移植 糖尿病根治を目指して 伊藤壽記・寺岡 慧 編, シュプリンガー・ジャパン, pp295-306, 2009 年 3 月 6 日, 東京
2. 剣持 敬. 膵・膵島移植 病気と薬パーフェクト BOOK2008. 池田宇一, 大越教夫, 横田千津子 編, 南山堂, pp1596-1598, 2008, 東京
3. 剣持 敬. V.移植療法の新しい展開 ①膵臓移植の現況と展望 糖尿病カレントライブラリー「糖尿病治療の新しい展開」岡 芳知 編, 文光堂, 東京(印刷中)
4. 剣持 敬. XIV. 腎移植と膵移植 2. ABO 血液型不適合膵臓移植 腎移植のすべて. 高橋公太 編, メディカルビュー社, 東京, (印刷中)
5. 剣持 敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪 尚武, 岩下力, 大月和宣, 伊藤泰平 ABO 血液型不適合ドナーからの生体膵・腎同時移植の成績 ABO 血液型不適合移植の新戦略 2009. 高橋公太・田中絃一 編, 日本医学館, 東京, (印刷中)

(雑誌)

1. Kenmochi T, Maruyama M, Mullen Y, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Ohtsuki K, Suzuki A, Miyazaki M.(2007) Successful Engraftment of Cryopreserved Human Pancreatic Islets into Diabetic Nude Mice. *Low Temp Med.* 33:4-7
2. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Ohtsuki K, Suzuki A, Miyazaki M.(2008) Cryopreservation of Human Pancreatic Islets from Non-heart Beating Donors using Hydroxyethyl Starch and Dimethyl Sulfoxide as Cryoprotectants. *Cell Transplant.* 17:61-67
3. Ishibashi M, Ito T, Furukawa H, Sekiguchi S, Gotoh M, Teraoka S, Sato Y, Matsuno N,

- Kenmochi T, Uchida H, Yoshimura N, Nakajima Y, Kuroda Y, Odan H, Idezuki Y, Kanazawa Y.(2008) Present status of pancreas transplantation in Japan: Donation predominantly from marginal donors and modified surgical technique: Report of Japan Pancreas Transplantation Registry. *Transplant Proc.* 40: 486-490
4. Kenmochi T, Saigo K, Maruyama M, Akutsu N, Otsuki K, Suzuki A, Miyazaki M.(2008) Results of kidney transplantation from ABO-incompatible living donors in a single institution. *Transplant Proc.* 40: 2289-2291
 5. Akutsu N, Iwashita C, Maruyama M, Otsuki K, Saigo K, Kenmochi T.(2008) Two cases of calcineurin inhibitor-associated reversible posterior leukoencephalopathy syndrome in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 40: 2416-2418
 6. Otsuki K, Kenmochi T, Saigo K, Maruyama M, Akutsu N, Iwashita C, Kono T, Okazumi S, Asano T, Yoshikawa K.(2008) Evaluation of segmental pancreatic function using 11C-methionine positron emission tomography for safe operation of living donor pancreas transplantation. *Transplant Proc.* 40: 2562-2564
 7. Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, Inoue I.(2008) Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma. *Hum Mutat.* 29(5):703-8
 8. Lee JI, Nishimura R, Sakai H, Sasaki N, Kenmochi T.(2008) A newly developed immunoisolated bioartificial pancreas with cell sheet engineering. *Cell Transplant.* 17:51-59
 9. Sato Y, Nakatsuka H, Yamamoto S, Oya H, Kobayashi T, Watanabe T, Kokai H, Kenmochi T, Hatakeyama K.(2008) Living related pancreas transplantation alone with enteric drainage in Japan: case report. *Transplant Proc.* 40:2559-61
 10. Suzuki A, Kenmochi T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Otsuki K, Miyazaki M.(2008) Evaluation of quality of life after simultaneous pancreas and kidney transplantation from living donors using short form 36. *Transplant Proc.* 2008 40:2565-7
 11. Kenmochi T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Otsuki K, Ito T, Suzuki A, Miyazaki M, Saito T.(2008) Successful islet transplantation from the pancreata of non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 40:2568-70
 12. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Ohtsuki K, Ito T. Clinical Islet Transplantation in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* (in press)
 13. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Ohtsuki K, Ito T, Suzuki A, Miyazaki M. Living Donor Pancreas Transplantation in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* (in press)
 14. *Am J Transplant* (Submitted)
 15. *Diabetes* (Submitted)
 16. 剣持 敬(2008) 本邦における生体臓器移植の導入と手術手技 *手術* 62: 91-105
 17. 大月和宣, 剣持 敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下 力, 河野世章, 岡住慎一, 浅野武秀, 吉川京燦(2008) 11C-methionine PETを用いた膵外科前後での部分膵機能評価; 生体部分膵移植ドナーへの臨床応用 *消化器画像* 9: 597-602
 18. 前島基志, 剣持 敬, 太田修司, 岡村康子, 大月和宣, 丸山通広, 石川 淳, 宮原行雄, 杉村有司, 酒巻建夫(2008) 腎移植後急性期患者の移植腎超音波検査 *超音波検査技術* 33: 425-433
 19. 剣持 敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 大月

- 和宣, 岩下 力, 伊藤泰平, 宮崎麻里子, 鈴木 亜希子, 首村守俊(2008) 長期透析患者の腎移植の適応とその問題点 腎と透析 65(3)363-367
20. 剣持 敬(2008) Q&A/1型糖尿病 世界の膵島移植の介入研究から何を学びましたか? 肥満と糖尿病 7: 61-63
 21. 剣持 敬(2008) 「生体ドナーに関する適応と諸問題」膵臓移植 移植 42: 514-522
 22. 坪 尚武, 剣持 敬, 丸山通広(2008) 膵島凍結保存 移植 43: 357-363
2. 学会発表(移植関連, First author のみ)
1. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Otsuki K, Ito T (2008) Successful simultaneous pancreas and kidney transplantation from ABO-incompatible living donors. (Symposium) XII International Congress of the Transplantation Society 2008.8.11 Sydney, Australia
 2. 剣持 敬(2008) 膵臓移植・膵島移植の臨床－糖尿病根治への挑戦－(教育講演) 自治医科大学大学院特別講義. 2008.2.14 栃木市
 3. 剣持 敬(2008) 肝胆膵・移植外科領域の手術.(特別講演) タイコヘルスジャパン社内講演. 2008.3.22 富士宮市
 4. 剣持 敬(2008) 移植－最近の話題－1. サイトメガロウイルス2. 移植後リンパ増殖性疾患(PTLD). (特別講演) 2008 年度千葉臓器移植セミナー. 2008.5.25 千葉市
 5. 剣持 敬(2008) 糖尿病性腎症に対する膵・膵島移植の臨床, －糖尿病根治への挑戦－. (特別講演) 東総膵腎移植セミナー 2008.6.10 旭市
 6. 剣持 敬(2008) わが国の移植医療の展開と当院の現状.(講演) 臓器移植についての公開講座「千葉県の移植医療の現状と成果」. 2008.7.6 千葉市
 7. 剣持 敬(2008) 腎移植と膵移植の現状と今後.(講演) 日本移植者協議会「第28回移植セミナー」. 2008.9.7 東京
 8. 剣持 敬(2008) 当院の移植医療の展開－腎・膵・膵島移植－. (特別講演) 東葛腎移植セミナー. 2008.9.10 柏市
 9. 剣持 敬(2008) 当院の移植医療の現状－腎・膵・膵島移植－. (特別講演) 千葉市医療連携セミナー. 2008.9.11 千葉市
 10. 剣持 敬(2008) 1 型糖尿病に対する膵・膵島移植の臨床.(特別講演) 第 14 回神奈川小児糖尿病研究会. 2008.11.19 横浜市
 11. 剣持 敬(2008) わが国の膵・膵島移植の現状.(特別講演) 成育医療センター糖尿病セミナー. 2008.12.13 東京
 12. 剣持 敬(2008) 重症糖尿病に対するb細胞移行治療法の選択－膵臓移植と膵島移植－(指定討論者) 第35回 膵・膵島移植研究会 2008.03.07 京都市
 13. 剣持 敬 膵(2008)膵手術2・2(座長) 第20回 日本肝胆膵外科学会 2008.5.29 山形市
 14. 剣持 敬(2008) 医療訴訟について(司会) 千葉東病院院内講演会 2008.6.3
 15. 剣持 敬(2008) 主題 II 胆・膵の再生医療(指定討論者) 第25回日本胆膵生理機能研究会 2008.6.21 京都市
 16. 剣持 敬(2008) 腎移植1(座長) 第15回 ABO 血液型不適合移植研究会 2008.8.3 名古屋市
 17. 剣持 敬(2008) サテライト・シンポジウム(司会) 第44回日本移植学会 2008.9.20 大阪市
 18. 剣持 敬(2008) 第5回臓器不全患者に対する外科・管理研究会(当番世話人) 2008.11.1 千葉市
 19. 剣持 敬(2008) 一般演題2「膵島移植」(座長) 第35回日本臓器保存生物医学学会 2008.11.22 東京
 20. 剣持 敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪 尚武, 大月 和宣, 岩下 力, 伊藤泰平, 宮崎麻里子, 鈴木 亜希子(2008) わが国の献腎移植の問題点－当院での経験からの考察－. (シンポジウム) 第41回日本臨床腎移植学会 2008.1.23 浜松市
 21. 剣持 敬, 浅野武秀, 丸山通広, 西郷健一, 坪 尚武, 岩下 力, 大月 和宣, 伊藤泰平, 鈴木 亜希子, 宮崎麻里子(2008) 重症 1 型糖尿病に対する生体膵臓移植の適応と治療成績.(パネルディスカッション) 第 108 回日本外科学会 2008.5.16 長崎市
 22. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪 尚武, 大月 和宣, 岩下 力, 伊藤泰平(2008) 膵体尾部切除後の膵液瘻予防としての gabexate mesilate の有効性－生体膵臓移植ドナー手術への応用－. (シンポジウム) 第 20 回 日本肝胆膵外科学会 2008.5.30 山形市
 23. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪 尚武, 岩下 力, 大月 和宣, 伊藤泰平, 松原久裕(2008) 生体腎移植, 生体膵・腎同時移植ドナーの術後 QOL の検討. (パネルディスカッション) 第 33 回日本外科系連合学会 2008.6.13 浦安市

24. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平, 松原久裕(2008) わが国における生体膵臓移植の導入と臨床成績. (パネルディスカッション) 第 39 回日本膵臓学会 2008.7.30 横浜市
25. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平, 松原久裕, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子(2008) 膵臓移植後の Primary graft failure の原因と対策. (シンポジウム) 第 44 回日本移植学会 2008.9.20 大阪市
26. 剣持 敬, 丸山通広, 大月和宣, 伊藤泰平, 西郷健一, 坪尚武, 岩下 力, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子, 齋藤友永(2008) 「Expand Criteria donor(ECD)あるいは心停止ドナーからの臓器・組織移植—現状と可能性」分野:膵島. (シンポジウム) 第 35 回日本臓器保存生物医学会 2008.11.22 東京
27. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平(2008) Workshop 5 Current status of islet isolation and preservation. Successful islet transplantation from the pancreas of non-heart beating donors. (ワークショップ) 第 35 回日本低温医学会 2008.11.23 東京
28. 剣持 敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 大月和宣, 岩下 力, 伊藤泰平, 宮崎麻里子, 鈴木亜希子(2008) 1 型糖尿病腎不全に対する ABO 不適合生体膵・腎同時移植. 第41回日本臨床腎移植学会 2008.1.23 浜松市
29. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子(2008) ABO 血液型不適合ドナーからの生体膵・腎同時移植 3 例の成績. 第35回 膵・膵島移植研究会 2008.03.07 京都市
30. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 大月和宣, 岩下 力, 伊藤泰平(2008) 1 型糖尿病腎不全に対する ABO 不適合生体膵・腎同時移植の導入と成績. 第 108 回日本外科学会 2008.5.16 長崎市
31. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子(2008) 1 型糖尿病腎不全に対する ABO 不適合生体膵・腎同時移植の導入と成績. 第25回日本胆膵生理機能研究会 2008.6.21 京都市
32. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子(2008) 1 型糖尿病腎不全に対する生体膵・腎同時移植の導入と成績. 第14回日本移植薬物研究会 2008.7.19 東京
33. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子(2008) ABO 血液型不適合ドナーからの生体膵・腎同時移植の成績. 第15回 ABO 血液型不適合移植研究会 2008.8.3 名古屋市
34. 剣持 敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下力, 大月和宣, 伊藤泰平(2008) 既存抗体陽性レシピエントに対する腎移植症例の成績. 第 44 回日本移植学会 2008.9.20 大阪市
35. 剣持 敬, 浅野武秀, 丸山通広, 西郷健一, 坪尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子(2008) 重症 1 型糖尿病に対する生体膵臓移植の適応と治療成績. 第 44 回日本移植学会 2008.9.20 大阪市
36. 剣持 敬(2008) 当院における移植医療の現況. 第 2 回千葉・茨城腎移植セミナー 2008.10.11 東京
37. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下 力, 大月和宣, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子(2008) 鏡視下ドナー手術を導入した生体膵・腎同時移植. 平成20年度千葉大学先端応用外科例会 2008.12.7 千葉市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

分担研究報告書

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立
膵搬送・膵島分離・膵島移植における酸素化 PFC の効果に関する研究

分担研究者:黒田嘉和 神戸大学 教授

研究要旨:膵島移植における適切な膵島輸送条件につき検討した。膵島輸送において、臓器保存液による冷保存と細胞培養液による室温保存は同等の膵島機能が維持されたが、酸素化 PFC の有効性は認めなかった。

A. 研究目的

不安定1型糖尿病に対する治療である膵島移植では、膵島を分離施設から移植施設へ輸送する行程での膵島機能の保持が課題の一つである。膵島は細胞集団であり、臓器でもなく細胞でもない。現在、膵島の輸送には室温の細胞培養液を用いているが、臓器保存に準じた冷保存と比較してどちらがよいかは不明である。今回、酸素化 PFC による輸送中の膵島の酸素化の有効性と併せて検討した。

B. 研究方法

ラット膵島を、密閉容器内で 22℃による RPMI(1 群)、RPMI と酸素化 PFC (2 群)、4℃による UW 液 (3 群)、UW 液と酸素化 PFC (4 群)の 4 群にて、24 時間保存後、SI、FDA/PI 染色、ATP assay により in vitro での膵島機能を評価した。また腎被膜下膵島移植モデルにおいて in vivo での膵島機能を併せて評価した。

C. 研究結果

SI、FDA/PI 染色では各群に有意差を認めなかったが、保存後の回収率は 4 群において有意に低かった。1 群と 3 群間において、ATP content、EC、ADP/ATP ratio に有意な差を認めなかったが、酸素化 PFC 用いた群 (2、4 群)では PFC を使用しない群 (1、3 群)に比較し、ATP content、EC は有意に低く、ADP/ATP ratio は有意に高かった。移植実験においては 4 群において治癒率が低い傾向があった。

D. 考察

膵島輸送条件において酸素化 PFC の有効性がなかった理由としては、①膵島が接触している PFC の表面張力にさらされ integrity が保てない、②酸素の供給過多により生じる酸化ストレスによる組織障害を受けることが考えられた。

E. 結論

膵島輸送において、臓器保存液による冷保存と細胞培養液による室温保存は同等の膵島機能が維持されたが、酸素化 PFC の有効性は認めなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 膵臓及び膵島移植における保存法。辻村敏明、黒田喜和、移植 43 巻 5 号 351-356, 2008
- ② Enrichment of putative pancreatic progenitor cells from mice by sorting for prominin1 (CD133) and platelet-derived growth factor receptor- α . Hori Y, Fukumoto M, Kuroda Y. *Stem Cells* 26, 2912-2920, 2008
- ③ Effect of oxygenated perfluorocarbon on isolated islets during transportation. Terai S, Tsujimura T, Li S, Hori Y, Toyama H, Shinzeki M, Matsumoto I, Kuroda Y, Ku Y. J Surg Res, in press

2. 学会発表

- ① 膵島移植における膵島輸送方法の検討 寺井祥雄, 辻村敏明, 李世日, 外山博近, 新関亮, 松本逸平, 黒田嘉和, 具英成 第 44 回日本移植学会総会
- ② 今後の展望膵臓移植 vs 膵島移植 神戸大学における膵島移植の現状と問題点 谷岡康喜, 酒井哲也, 大河原弘達, 辻村敏明, 黒田嘉和 第 44 回日本移植学会総会

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

分担研究報告書

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立

「膵島前駆細胞から膵島への分化培養法の開発」

および

「早期移植膵島傷害の機序としての血液凝固性炎症反応の制御」に関する研究

分担研究者 岩永 康裕 京都大学医学部附属病院臓器移植医療部 助教

研究要旨：膵島移植医療を確立するためには、良質な膵島を安定して得ることができ、さらに移植後の膵島生着率を改善して、中長期の移植成績を向上させることが重要である。本年度は、移植膵島の絶対数の不足を解決し良質な膵島を安定して得るために、①膵島分離法の改良、②膵島分離過程で廃棄される組織中にある膵島前駆細胞から膵島への分化培養方法の開発と、移植膵島の生着率を向上させるために③移植後即座に引き起こされる血液凝固性炎症反応(Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction：IBMIR) 軽減のための基礎的研究を行った。まず、①膵島分離法の改良では従来使用していた酵素に代わって、哺乳類動物由来成分を含まない新しいコラゲナーゼの臨床使用について、大動物（ブタ）を用いて検証し、従来のコラゲナーゼと遜色ないことを確認した。②膵島前駆細胞から膵島への分化培養方法の開発では、通常は膵島分離過程で廃棄される非内分泌組織（前駆細胞を含む）を培養し、膵島様組織への分化に成功し、そのインスリン産生能を確認した。③IBMIR軽減のための基礎的研究では、Agent Rという糖類により膵島を処理することでIBMIRが軽減でき、しかも生体に優しいため、臨床応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

良質の膵島を安定して得ること、及び移植後の膵島生着率を改善するために、本年度は、1) 膵島分離法の改良、2) 膵島前駆細胞から膵島への分化培養方法の開発、3) 移植後惹起される血液凝固性炎症反応（IBMIR）軽減のための基礎的研究を行なう。

B. 研究方法

1) 膵島分離法の改良

膵島分離法の際に膵臓を消化するための酵素はLiberase HIを使用してきた。しかし、Liberase HIの製造過程で哺乳類由来物質が混入する可能性があることが判明し、臨床膵島分離では使用不可となった。そこで、新たな酵素としてServa Collagenase及びNew Liberaseが

その代替品となりうるか大動物（ブタ）を用いて検証した。

心停止ブタの膵臓を用いて① Serva Collagenase及び②New Liberaseを使用した膵島分離を行なった。従来のLiberase HIを使用した膵島分離結果を対照群として、膵島収量、回収率、パイアピリティー（AO/PI）、ADP/ATP比（APOGLOW）を比較検討した。

2) 膵島前駆細胞から膵島への分化培養方法の開発

マウスの膵臓から膵島を取り除き、比重勾配でペレットとして分離。その非内分泌組織（腺房細胞、外分泌細胞、間質系細胞を含む）から、ある培養条件下で上皮系前駆細胞を選択的に増殖させる。これを分化用培地と共に、オービタル・シェーカーを用いた浮遊旋回培養法によって膵島様組織に分化させ、その形態と機能を評価する。

3) IBMIR軽減のための基礎的研究

膵島移植後即座に引き起こされる血液凝固性炎症反応（Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction:IBMIR）は、移植膵島の生着を著しく阻害するため解決策が求められている。そこで、IBMIRを抑制する機序を解明すると同時に、より効果的に抑制し、かつ生体に優しい物質を探索する。今回、Agent Rを用いて、in vitro実験を行なった。ループチューブ内で、Agent Rで処理したブタ膵島（Agent R群）をヒト血液とそれぞれ揺動させながら共

培養し、直後に採取した血液の組成を分析した。ブタ膵島を入れずに揺動させたものを対照群とした。

C. 研究結果

1) 膵島分離法の改良

Serva Collagenaseを使用した場合が最も回収率が低かった。パイアピリティー（AO/PI）とADP/ATP比は、3群間でそれほど差がなかった。

酵素	Serva Collagenase (n=4)	New Liberase (n=1)	Liberase HI (n=5)
純化前分離膵島数 (IE/g)	3515	2005	4920
純化後分離膵島数 (IE/g)	1493	1520	3141
回収率 (%)	42	76	63.9
パイアピリティー (AO/PI)	85	90	94
ADP/ATP比 (APOGLOW)	-0.223	0.104	-0.075

2) 膵島前駆細胞から膵島への分化培養方法の開発

様々な培養条件を検討し、最終的にマウスの膵臓から上皮系の前駆細胞を選択的に初期培養できる方法を確立した。その形態は、インスリン産生細胞への分化実験にしばしば使用されるラットの膵上皮系AR42Jセルラインと非常によく似た特徴をもっている。

抗インスリン抗体で免疫染色したところ、インスリン陽性細胞の割合は25%であった（図1）。インスリンRNA発現量は、定性的に検出できた（図2）。

図1.

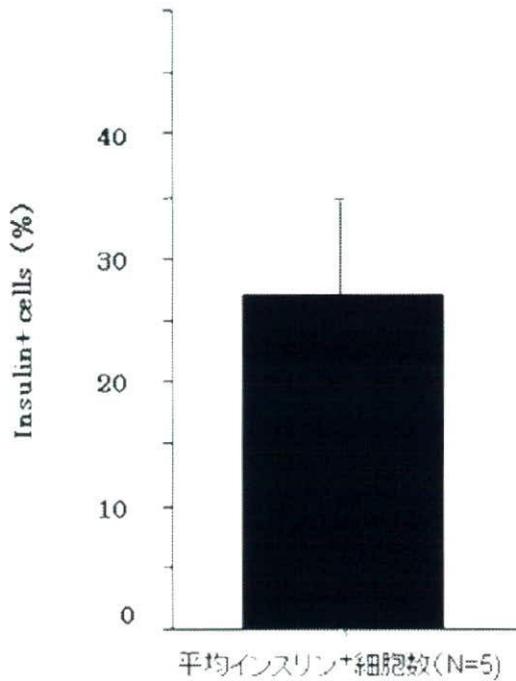
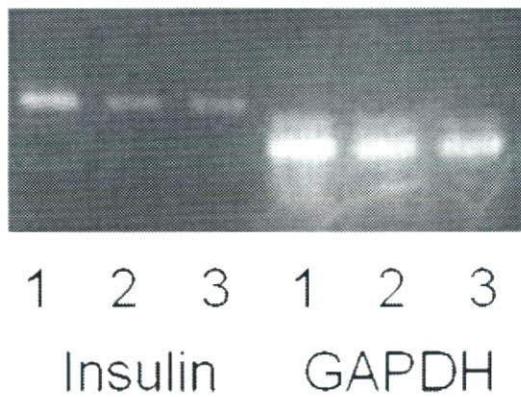


図2.



3) IBMIR軽減のための基礎的研究

共培養後のヒト血液組成の分析で、Agent R群で顆粒球の減少が他に比べて抑えられた（図3）。

血小板の減少速度は、Agent R群が最も遅く、膵島と混合していない血液（対照群）と比べて差がなかった（図4）。

凝固血量はAgent R群は他の処理群に比べて有意に少なく、血液凝固反応が抑えられたことが示唆された（図5）。

図3. 血球数の変化

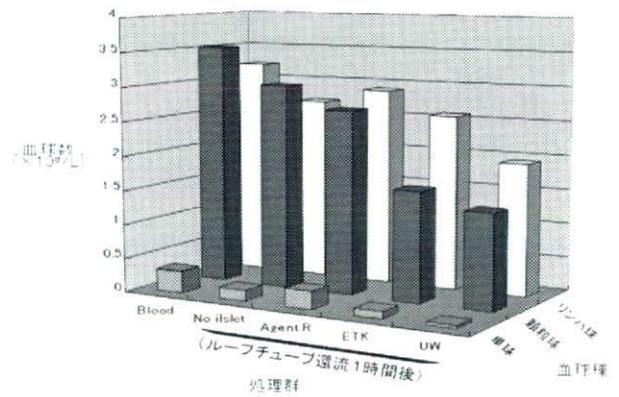


図4. 血小板数の変化

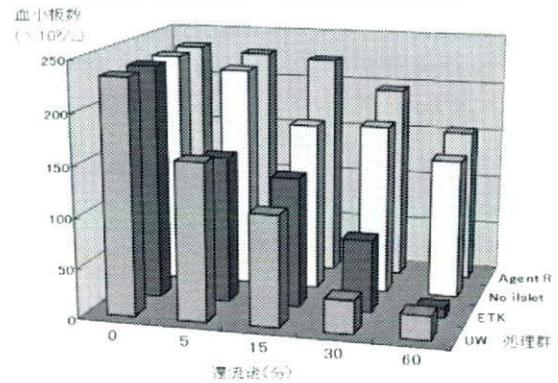
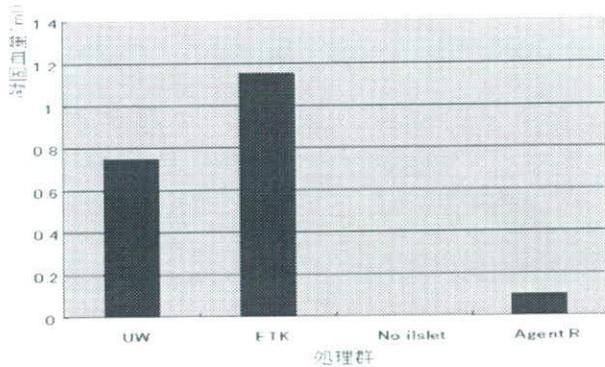


図5. 凝固血量



D. 考察

膵島移植医療を確立するためには、まず膵臓から安定して十分量の膵島を得ることが重要である。今回、膵島分離の消化行程で Serva collagenase 及び New Liberase を使用して従来の Liberase と比較検討した。Serva collagenase を使用した場合、純化後の膵島回収率が低かったが、New Liberase では、従来の Liberase と遜色なく臨床膵島移植でも使用できることが示唆された。さらに追試が必要である。

膵島前駆細胞から膵島への分化培養方法の開発では、通常膵島分離過程で廃棄される非内分泌組織からインスリン産生性細胞を分化させることは可能であることが示された。上皮系膵内分泌前駆細胞の増殖率を上昇させるための改善策が必要である。

IBMIR軽減のための基礎的研究では、共培養後のヒト血液組成の分析で、Agent R群では顆粒球の消費が抑制され、血液凝固反応を抑制することが示された。従って、Agent R処理によりIBMIRを軽減できる可能性が示唆された。今後、Tissue Factorなど詳細な凝固反応因子の分析が必要である。

E. 結論

臨床膵島移植において、従来の Liberase に代わる新しい酵素として New Liberase が使用可能であることが示唆された。

膵島前駆細胞から膵島への分化培養方法の開発では、マウス膵組織の選択培養と浮遊旋回培養分化法によりインスリン陽性膵島様組織へと分化する基本プロトコールを完成した。

移植膵島の生着率を改善するために、IBMIRの抑制をターゲットにして、Agent R という生体に優しい物質を発見した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(著書)

岩永康裕 膵島移植の現況 「進みつづける細胞移植治療の実際」(下巻) P147-151、遺伝子医学MOOK別冊 編集 田畑泰彦 株式会社メディカル ドウ、大阪 2008

(雑誌)

- 1) Iwanaga Y, Sutherland D.E.R., Papas K. K., Harmon J.V. Pancreas Preservation for Pancreas and Islet Transplantation *Current Opinion in Organ Transplantation* 2008 Aug;13(4):445-51.
- 2) 岩永康裕、上本伸二 糖尿病に対する外科的治療法 —膵臓移植と膵島移植— 糖尿病の療養指導 2008 第42集 152-156
- 3) 岩永康裕、興津輝、米川幸秀、川口義弥、上本伸二 心停止ドナー膵島移植 *Organ Biology* Vol.15 No.4 349-356, 2008 日本臓器保存生物医学会

2. 学会発表

シンポジウム

- 1) 岩永康裕、David E. R. Sutherland、Angelika C. Gruessner、米川幸秀、川口道也、川口義弥、上本伸二 International Pancreas Transplant Registry 第44回日本移植学会 2008. 9.20

一般演題

- 1) 米川幸秀、Hui-Jian Zhang、松本秀一郎、田中智浩、穴澤貴行、小林隆、岩永康裕、興津輝、上本伸二、David E. R. Sutherland 自家膵島移植のコンタミネーションについて 第36回膵・膵島移植研究会 2009. 2. 28
- 2) 藪中重美、井山なおみ、梅谷由美、澁谷直美、興津輝、岩永康裕、福田一仁、豊田健太郎、浜本芳之、上本伸二 初回膵島移植後に腎不全を来たし腎移植後再膵島移植を受けた症例における QOL の変化について 第36回膵・膵島移植研究会 2009. 2. 28
- 3) 金宗潤、岩永康裕、上本伸二 マウス膵上皮系非内分泌細胞を用いたインスリン分泌細胞への旋回分化法の検討 第8回日本再生医療学会 2009. 3. 5

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

基礎研究成果の臨床応用推進研究

分担研究報告書

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立

早期移植膵島傷害の機序としての炎症性メディエーター発現の制御に関する研究

分担研究者 里見 進 東北大学病院長

研究要旨

現状の膵島移植における最大の課題の一つが、一人の患者に複数のドナーを必要とすることである。その主原因の一つとして、移植後早期の膵島グラフト生着不全が挙げられる。これは、膵島自身が発現する炎症性メディエーターにより活性化されるホストの原始免疫系に起因することが判明している。種々の炎症性メディエーターの中でも、特に tissue factor (TF) と monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は臨床成績との相関が確認されており、重要である。炎症性メディエーターを惹起する因子として、ドナー発生から膵島分離に至る一連の過程でグラフトが受ける様々なストレスが考えられるが、これまでその影響を詳細に検討した研究は存在せず、対策を講じる上で大きな障壁となっている。そこで本研究においては、ドナーとして脳死ラットモデルを使用し、脳死および膵島分離操作に伴う阻血が分離膵島の発現する TF や MCP-1 へ及ぼす影響に関し検討を行った。脳死ドナーの分離膵島では TF および MCP-1 の発現が上昇したが、膵島分離施行前の膵臓組織では認めなかった。したがって、脳死は分離膵島の炎症性メディエーター発現を誘導するイニシエーターの役割を果たしており、さらに分離操作という阻血障害が加わることにより発現上昇が顕在化すると考えられた。また、脳死ドナーの分離膵島は収量と純度の低下を認めたが、バイアビリティーや機能は比較的良好に保持されていた。このことから、脳死は膵島のバイアビリティーや機能を低下させる以前に一早く炎症性メディエーターの発現を惹起することが判明した。さらに分離膵島の発現する TF や MCP-1 の経時的観察により、現行の膵島移植は脳死や分離操作に伴う阻血障害の影響を最も受けやすい時期に行われていることも明らかとなった。以上の検討結果より、分離膵島の炎症性メディエーター発現を抑制するためには、脳死による影響を制御し得る有用な抗炎症療法を臓器摘出の早期段階より導入することが有効であると考えられた。

A. 研究目的

本探索研究の最終目標は、膵島移植を医療として広く普及していくことである。そのためには、一つの臓器で一人の患者を治癒するいわゆる“One-to-One”を確立させ、貴重な臓器提供を有効利用することが重要である。

“One-to-One”の確立を阻む障壁の一つとして、移植後早期における膵島グラフトの生着不全が指摘されている。その主な原因として、「膵島自身が種々の炎症性メディエーターを発現しており、それらが移植時に門脈血流へ直接さらされることによって、ホストの原始免疫系を活性化し早期のグラフト障害を引き起こす」という一連の現象が判明している。実際マウスの同種同系膵島移植モデルにおいて、50~60%のグラフト膵島が移植後3日間でアポトーシスまたはネクローシスに陥っていることが報告されている。特に tissue factor (TF) と monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は臨床成績と有意に相関することが確認されており、重要な炎症性メディエーターとして注目されている。膵島移植の臨床成績を向上させるためには、分離膵島が発現するこれらの炎症性メディエーターの制御が特に重要である。

一般的にグラフトの炎症性メディエーターを惹起する要因として、ドナー発生から移植に至るまでの一連の過程、すなわち集中治療室管理、臓器摘出時の温阻血時間、臓器摘出後の冷阻血時間、血流再開後の再灌流障害などの影響が考えられている。臓器移植の分野においては、脳死がグラフト機能を低下させ、それにより移植成績が悪化することがこれま

で報告されている。しかしながら、脳死が分離膵島の TF 発現に及ぼす影響はいまだ明らかになっておらず、移植成績向上へ向けた有効な対策を講じる上で大きな障壁となっている。さらに膵島移植は他の臓器移植にみられない膵島分離操作という特殊な過程を有し、その中でも特に消化過程において、膵島は37°C 下で極度の低酸素状態にさらされることになる。この期間は一種の温阻血時間であり、膵島グラフトに大きな影響を与えていると考えられている。

そこで本研究においては、ドナーとして脳死ラットモデルを使用し、脳死および膵島分離操作に伴う阻血が分離膵島の発現する重要な炎症性メディエーターである TF や MCP-1 へ及ぼす影響に関し検討を行った。膵島分離施行前の膵臓組織と分離膵島の両者を評価することにより、分離操作前後での各過程で脳死が炎症性メディエーターの発現に与える影響を観察した。

B. 研究方法

本研究においては、ドナーとして脳死ラットモデルを使用し、脳死および膵島分離操作に伴う阻血が分離膵島のパイアビリティー、および発現する TF や MCP-1 へ及ぼす影響に関し検討を行った。

C. 研究結果

I 膵島収量および純度 (図1)

脳死群はコントロール群と比し、収量が低下する傾向にあり (脳死群 2110±231 IEQs; コントロール群 2390±528 IEQs; p=0.19)、純度

は有意に低下した (脳死群 $87.7 \pm 7.5\%$; コントロール群 $97.0 \pm 2.6\%$; $p=0.002$)。

II 膵島バイアピリティーおよび機能検査

ATP/DNA 比および呼吸活性指数は、計測時点に関わらず両群間に差を認めなかった

III 膵臓組織における TF および MCP-1 遺伝子発現 (図 2)

膵臓組織の TF および MCP-1 mRNA レベルは、両群間で差を認めなかった

IV 新鮮膵島における TF および MCP-1 遺伝子発現 (図 3)

TF の mRNA レベルは、コントロール群に比し脳死群で有意に発現が上昇した (TF/GAPDH 脳死群 0.148 ± 0.010 ; コントロール群 0.061 ± 0.0096 ; $p=0.0004$)。同様に、MCP-1 の mRNA レベルも、コントロール群に比し脳死群で有意に発現が上昇した (MCP-1/GAPDH 脳死群 0.240 ± 0.035 ; コントロール群 0.140 ± 0.007 ; $p=0.008$)。

D. 考察

本研究により脳死状態は分離膵島における TF および MCP-1 の発現上昇をもたらすが、膵島分離操作の影響を受けない膵臓組織には炎症性メディエーターの発現上昇を引き起こさないことが判明した。この差異は膵島分離操作中に生じる阻血障害、その中でも特に消化過程における温阻血障害に起因するものと推察された。しかし一方で脳死の影響を受けていないコントロール群では、分離膵島における炎症性メディエーターの発現上昇は確認

されなかった。したがって分離操作中に生じる阻血障害単独では、分離膵島の炎症性メディエーター発現を惹起するには不十分であると考えられる。以上の検討結果より、脳死は分離膵島の炎症性メディエーター発現を誘導するイニシエーターの役割を果たしており、さらに分離操作という阻血障害が加わることで発現上昇が顕在化すると考えられた。

脳死や分離操作に伴う阻血障害の影響を回避する一つの手段は、短期膵島培養の導入である。実際 Froud らや Hering らは、2 日間の短期膵島培養を導入し優れた臨床成績を報告している。本研究においても我々のこれまでの報告と同様に、分離膵島が発現する TF は脳死を伴わないケースにおいても分離後 12 時間に渡り一過性に上昇することが確認された。理由は明らかではないが、培養中の低酸素状態が血管新生作用を有する TF 誘導の一因となった可能性が想定される。これらの研究結果を考慮すると、48 時間の短期膵島培養後に膵島移植を施行することは、理にかなった方法であると思われる。しかし一方で、短期膵島培養により分離膵島の収量および機能が低下するという報告も散見されている。そのため多数の膵島を培養しなければ、移植時に十分な膵島収量を確保できない可能性がある。実際我々のグループのこれまでの研究結果においても、現行の臨床現場で主に使用されている無血清培地を用いた短期膵島培養後の移植成績は、新鮮膵島移植の成績と比し有意に悪化することが判明している。特に心停止ドナーに限局される我が国の膵島移植においては、脳死ドナー由来の分離膵島と比べ

阻血障害の影響が著しく強いため、短期膵島培養の適用が困難であると思われる。それゆえ、脳死や分離操作に伴う阻血障害の影響を短期膵島培養によって回避するためには、全ての症例に対処し得る様なさらなる培養技術の進歩が必須である。

分離膵島が発現する炎症性メディエーターを制御するための他の治療戦略として、脳死による影響を制御し得る有用な薬剤を、ドナー管理、臓器摘出、臓器搬送、膵島分離操作などの各過程で導入することが挙げられる。今後引き続き本研究で作成した実験系を利用して、分離膵島が発現する炎症性メディエーターを効果的に制御する薬剤のスクリーニングを進めると共に、膵島本来の機能も害しない臨床応用可能な治療方法を確立していく予定である。

E. 結論

脳死は分離膵島のバイアビリティーや機能を低下させる以前に、一早く炎症性メディエーター発現を誘導するイニシエーターとしての役割を果たしており、さらに分離操作という阻血障害が加わることにより発現上昇が顕在化することが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

後述の通り

2. 学会発表

(1) C5a を標的とした補体阻害ペプチド AcPepA 導入による移植後早期膵島障害の制御

第 43 回補体シンポジウム・2008 7 月 10-12 日 札幌

(2) A NOVEL PREDICTIVE METHOD FOR ASSESING THE QUALITY OF ISOLATED PANCREATIC ISLETS USING A SCANNING ELECTROCHEMICAL MICROSCOPY XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008 Aug 10-14 Sydney

(3) Predictive methods for assessing the quality of isolated pancreatic islets
XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008 Aug 10-14 Sydney

(4) THE INFLUENCE OF BRAIN DEATH ON TISSUE FACTOR EXPRESSION IN THE PANCREATIC TISSUES AND ISOLATED ISLETS IN RATS XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008 Aug 10-14 Sydney

(5) C5A INHIBITORY PEPTIDE COMBINED WITH GABEXATE MESILATE IS A CLINICALLY AVAILABLE CANDIDATE FOR PREVENTING THE INSTANT BLOOD-MEDIATED INFLAMMATORY REACTION XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008 Aug 10-14 Sydney

(6) C5a inhibitory peptide AcPepA is a clinically available candidate for preventing rapid loss of

intraportally transplanted islets XXII

International Complement Workshop, 2008 Sep

(7) 有用な膵島評価法である呼吸活性計測法
の実際 第 44 回日本移植学会・2008 9 月
19-21 日 大阪

(8) 東北大学における膵島移植の取り組み
第 44 回日本移植学会・2008 9 月 19-21 日 大
阪

(9) 補体阻害ペプチド導入による移植後早期
膵島障害の制御 第 44 回日本移植学会・2008
9 月 19-21 日 大阪

(10) 脳死状態が膵島の Tissue Factor 発現へ
及ぼす影響に関する検討 第 44 回日本移植
学会・2008 9 月 19-21 日 大阪

(11) Key issues in islet xenotransplantation 4th
Xenotransplantation Seoul Forum, 2008 Nov 8
Seoul

(12) Improvement of preservation and evaluation
for pancreatic islets by introducing bioengineering
approach 第 35 回日本低温医学会総会, 2008
Nov 22-23 Tokyo

(13) 脳死状態が膵島の炎症性メディエータ
ー発現へ及ぼす影響 第 35 回日本臓器保存
生物医学会定期学術集会・2008 11 月 22-23
日 東京

(14) 膵島移植の現在と未来 第 8 回東北小

28-Oct 2 Basel (Switzerland)

児糖尿病研究会・2008 11 月 29 日 仙台

(15) 今後の膵島移植発展への試み 第 36 回
膵膵島移植研究会・2009 2 月 27-28 日 福岡

(16) 長期保存を要する心停止ドナーからの
膵島分離への対策 第 36 回膵膵島移植研究
会・2009 2 月 27-28 日 福岡

(17) 凝固・補体系の制御による移植後早期膵
島障害の抑制 第 36 回膵膵島移植研究会・
2009 2 月 27-28 日 福岡

(18) 膵島移植の現状と今後の展望 第 8 回
日本再生医療学会・2009 3 月 5-6 日 東京

(19) 異種膵島移植実現へ向けたブタ膵島の
大量安定供給と品質評価システムの構築 第
12 回日本異種移植研究会・2009 3 月 7 日 鹿
児島

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1 件出願済み

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立
移植後早期膵島傷害の機序とその制御法の開発に関する研究

分担研究者 安波洋一 福岡大学医学部再生・移植医学 教授

研究要旨：臨床膵島移植で克服すべき最も重要な課題は一人の糖尿病レシピエントの治療に2・3回の膵島移植、すなわち2・3人分のドナーを必要とすることが上げられる。この問題の解決を目指して、本研究では移植後早期の生着に伴う（自然免疫）拒絶反応に着目、その制御により移植膵島障害を克服し、実験的には **one donor to one recipient** の移植が実現できることを明らかにした。本研究成果の臨床応用により臨床膵島移植の成績向上に寄与することが期待できる。

A. 研究目的

実験的膵島移植の系を用いて移植後早期膵島障害の機序を解明し、その制御法を開発する。新たな知見を基盤として、既に臨床使用されている薬剤をスクリーニングし、移植膵島障害に有用な薬剤を見出す。具体的には先の研究成果で肝内移植膵島が NKT 細胞を介して活性化される好中球により障害される機序が判明している。本研究では NKT 細胞抑制効果が報告されているアデノシンに着目し、その効果をマウス肝内同種同系膵島移植の実験系で検討した。

B. 研究方法

マウス膵島移植実験系を用いて、アデノシンならびにそのトランスポーター阻害薬、**dypiramole**（ペルサンチン）の移植膵島障害に対する有用性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は福岡大学アニマルセンター動物実験倫理委員会で承認された。

C. 研究結果

マウス肝内同種同系膵島移植の実験系で以下の知見を得た。

1. 移植時アデノシンの1回投与で移植早期膵島障害が制御でき、**one donor to one recipient**の膵島移植が実現できた。

2. 肝内単核球FACS解析で、アデノシン投与群では膵島移植後肝内 NKT 細胞、ならびに好中球からのIFN-g産生を抑制した。

3. NKT 細胞の合成リガンドである **aGalactosylceramide** 刺激で産生される NKT 細胞からのIFN-g産生がアデノシンにより抑制された。同様に好中球からのIFN-g産生も抑制された。

4. 同種異型膵島移植の系(BALB/c to B6)で

発現する拒絶反応を抗CD4抗体で制御し、アデノシンを投与すると **one donor to one recipient** の膵島移植が実現できた。

5. アデノシントランスポーター阻害薬である **dypiridamole**（ペルサンチン）もアデノシンと同様に移植膵島障害を軽減する作用を有することがわかった。

D. 考察

アデノシンもしくは細胞外アデノシン濃度を上昇させるアデノシントランスポーター阻害薬の投与で肝内移植早期膵島障害が制御できることが判明した。その機序として膵島移植後活性化するNKT細胞がアデノシンにより不活化され、引き続き発現する好中球活性化を抑制し、移植膵島障害を軽減することが明らかになった。

E. 結論

アデノシン、ならびにアデノシントランスポーター阻害剤、**dypiridamole**（ペルサンチン）により移植早期膵島障害が制御できることが明らかとなった。今後、膵島移植への臨床応用で膵島移植の治療成績の向上が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

安波洋一. NK T細胞の新展開；膵島移植拒絶反応とNK T細胞。医学のあゆみ 225(2): 151-155, 2008

2. 学会発表

#1. T Nitta, N Matsuoka, T Itoh, T Mera, A Kinjo, M Nakano, Y Yamashita, Y Yasunami. Adenosine has an inhibitory effect on NKT cells facilitating to prevent early loss of transplanted islets in association with engraftments. XXII International Congress of the Transplantation Society (Transplantation 86(2S):447,2008), August

10-14, 2008, Sydney, Australia

#2. T Itoh, R Nakagawa, Matsuoka, N Nagata, T Nitta, T Mera, Y Yamashita, K Okamoto, H Yamamoto, S Yamada, I Maruyama, M Taniguchi, Y Yasunami. A novel mechanism involved in early loss of transplanted islets in the liver mediated by HMGB1. Accepted for oral presentation in 2009 Annual Congress of American Diabetes Association.

#3. 伊東 威、新田智之、米良利之、小島大望、松岡信秀、中野昌彦、金城亜哉、山下裕一、安波洋一. 移植膵島から HMGB1 が放出され早期グラフト障害を惹起する. 第36回膵・膵島移植研究会、福岡 2/27-28, 2009

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得その他

なし

分担研究報告書

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立
移植膵島におけるオートファジー様細胞死の意義と分子機構の解析

伊藤 壽記 大阪大学大学院医学系研究科 生体機能補完医学講座 教授

研究要旨：本研究では、オートファジー様細胞死と移植膵島の機能傷害との関連を解析した。ラパマイシンは、膵島移植後に用いられる免疫抑制療法・エドモントンプロトコール(Edmonton protocol)の中心的免疫抑制剤であり、その薬理作用は mammalian target of rapamycin (mTOR)を阻害することにより、細胞周期を止め細胞増殖を抑制することである。mTOR 阻害剤は各種の細胞でオートファジーを誘導することが報告されており、本研究では 1 ng/ml または 10 ng/ml のラパマイシン濃度でマウス膵島を処理した。その結果、オートファジー誘導のマーカーである LC3-II タンパクの膵島細胞内蓄積を確認し、さらに膵島の viability も約 50%抑制されることを MTS assay で確認した。また、膵島からのインスリン分泌能をグルコース負荷テストで解析した結果、10 ng/ml ラパマイシン処理ではインスリン分泌はほぼ完全に抑制された。一方、オートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA)で追加処理することにより LC3-II タンパク膵島細胞内蓄積、膵島 viability さらに膵島インスリン分泌能を有意に改善させることができた。従って、膵島におけるオートファジー誘導は移植用膵島の品質管理に強く関与していることが示唆され、移植用膵島におけるオートファジー制御は移植膵島の品質保持、ひいては長期生着に有用であり、膵島生着率向上による「one donor-one recipient」膵島移植実現に向けた付加的効果も十分期待できると考えられた。

A. 研究目的

1 型糖尿病の根治療法として「膵島移植」が行われ良好な成績を得ている。膵島移植は心停止ドナーの提供臓器より膵島のみ分離・純化し新鮮膵島を門脈内に点滴する方法で、レシピエントにかかる侵襲もほとんどなく「理想的な根治療法」と言える。従来の膵島移植では『1 人のドナーより得られた膵島は、1 人のレシピエントに移植』されている。しかも移植膵島の生着率が低いため、インスリン離脱を目指すには 3 回の移植が必要で、これにより移植後 1 年でのインスリン離脱率は約 80%に達するが、5 年の遠隔期では約 10%にまで低下するのが現状である。従って、この遠隔成績不良の問題解決が膵島移植発展の急務である。移植膵島の長期生着不良の原因として primary non-function、免疫学的拒絶反応によるところも指摘されているが、世界中の 90%以上の膵島移植患者に使われているラパマイシンの薬物毒性による移植膵島の傷害も指摘されている。mTOR 阻害剤であるラパマイシンが哺乳類細胞にオートファジーを誘導することは報告されている。生体における飢餓適応としてオートファジーが誘導されることは、単細胞生物である出芽酵母を始めとし、線虫、ショウジョウバエ、哺乳類など多くの生物種において知られている。オートファジーは、細胞内成分をリソソームで分解するための主要な経路であり、普遍的なマシナリーで

ある。このシステムは、ユビキチン-プロテアソーム系とは異なり、基質となるタンパク質などを個別に認識することなく大量に分解するバルク分解系であり、ミトコンドリアなどのオルガネラをも消化しうる。オートファジーの生理機能は十分に明らかにされておらず、また疾患との関係も現在、解明途上である。膵島とオートファジーとの関連はこれまで報告はなく、オートファジー誘導が膵島の機能や viability、ひいては品質管理にどのように作用するかは全く不明である。本研究では、膵島移植で通常使用される免疫抑制剤、ラパマイシンを用いて膵島にオートファジーが誘導されるのか、さらに誘導後、膵島の生物学的機能・活性はどのように変化するかを解析した。

B. 研究方法

1, Isolation of pancreatic islets

BL6 mice の膵島を本研究の解析に用いた。マウスを全身麻酔下にて開腹し、総胆管からカニューレションの上、1mg/ml の collagenase を含んだ ET-Kyoto 液を 3ml 注入しマウス膵臓を十分に膨化し摘出し、摘出膵臓をさらに collagenase VIII で消化した。引き続いて膵消化液を Ficoll 非連続勾配法で膵島を分離・純化を行った。分離膵島は complete RPMI-1640 culture medium にて培養した。

2, Western blot analysis

オートファジー誘導のマーカーである LC3-II タンパク (LC3-phospholipidated conjugate) の細胞内蓄積を確認するために Western blot を行い解析した。Fresh mice islets (30 islets/well) を 1 または 10 ng/ml の rapamycin 存在下または非存在下で 24 時間、膵島を培養し、その培養膵島より lysis buffer を用いて膵島組織由来タンパクを抽出し 15% SDS/PAGE にて展開・分離した。泳動タンパクを PVDF membrane に転写後、anti-LC3 mAb (MBL) にて LC3-II タンパクの発現を detect した。タンパクの発現量は、それぞれの膵島 lysate 内の内因性 GAPDH 発現量も確認、LC3-II タンパクおよび内因性 GAPDH の発現量を Fluor-chem image analyzer (BioRad) にて定量化した後、LC3-II/GAPDH 比にて比較した。

3, Islet viability assay

Fresh mice islets (30 islets/well) を 1 または 10 ng/ml の rapamycin 存在下または非存在下で 24 時間膵島を培養し、その培養膵島の islet viability を the colorimetric methyl tetrazolium salt (MTS) Cell Titer 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (Promega) を用いて解析した。膵島 viability は MTS assay を用いて 490 nm 吸光度にて計測し、ラパマイシン処理していない膵島の viability を 100 (control) とし、ラパマイシン処理した膵島 viability を % absorbance として計算し比較検討した。

4, Blocking assay of autophagic signaling

Rapamycin 処理と同時にオートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) (10 mM の 3-MA 存在下または非存在下で培養) を用いてマウス膵島を 24 時間培養し、Western blot, MTS assay, static glucose challenge assay を行い LC3-II タンパクの蓄積、islet viability、インスリン分泌がどのように変化するか解析した。

5, Glucose-stimulated insulin release and stimulation index

膵島へのオートファジー誘導が、インスリン分泌にどのように影響するかを解析した。ラパマイシン処理またはラパマイシン+3-MA 処理した膵島を 2.8 mM (低血糖) または 20 mM glucose (高血糖) を含んだ培養液中にさらに 2 時間培養した。培養液中に分泌されたインスリンを ELISA を用いて定量化し、高血糖培養液中のインスリン量と低血糖培養液中のインスリン量の比 (stimulation Index: SI) を算出し比較検討した。

C. 研究結果

1, LC3-II タンパク発現量の変化

ラパマイシン処理していないコントロール膵島においても endogenous な LC3-II タンパクの発現を認め、LC3-II/GAPDH 比は 0.5 であった。しかし、ラパマイシン処理することにより LC3-II タンパクの発現は有意に増加した。1 ng/ml の rapamycin 存在下では、LC3-II タンパクの過剰発現は認められず LC3-II/GAPDH 比も 0.46 とコントロールと差は認めなかったが、10 ng/ml の rapamycin 存在下では、LC3-II タンパクの過剰発現を認め、LC3-II/GAPDH 比でも 1.08 とほぼ 2 倍の発現量を認め、ラパマイシンによりマウス膵島にオートファジーが誘導されているのを確認できた。また、3-MA によるオートファジーブロックングでは、約 32% LC3-II タンパクの発現を抑制することができた。

2, 膵島 viability の変化

Western blot により LC3-II タンパクの過剰発現を認め、マウス膵島にオートファジーが誘導されているのを確認できたが、その現症が膵島 viability にどのように影響するかを MTS assay にて解析した。コントロール膵島の viability を 100 とすると、1 または 10 ng/ml の rapamycin 存在下ではそれぞれ 56.8、49.0 と有意に膵島 viability は低下した。一方、3-MA によるオートファジーブロックングでは、1 ng/ml rapamycin+10mM 3-MA または 10 ng/ml rapamycin+10mM 3-MA 処理により膵島 viability は無処理膵島の viability と比し、それぞれ 68.5%、75.8% まで回復した。

3, インスリン分泌能の変化

膵島にオートファジーを誘導することによりインスリン分泌能がどのように変化するかを static glucose challenge test を行い stimulation index (SI) を算出し解析した。ラパマイシン処理していないコントロール膵島の SI は 1.38 でグルコース負荷によりインスリンが膵島より分泌されているのを確認した。しかし、1 ng/ml rapamycin 処理により SI は 1.17 まで低下し、10 ng/ml rapamycin 処理では、SI は 1.11 まで低下しインスリン分泌はほぼ完全に抑制された。しかし、3-MA によるオートファジーブロックングにより SI はそれぞれ 1.48、1.32 まで回復した。

D. 考察

インスリン分泌が完全に枯渇している 1 型糖尿病の根