

7. 剣持 敬(2009) わが国の腎移植の現状と当院の取り組み. (講演) 腎移植・公開講座. 2009.5.31 市原市
8. 剣持 敬(2009) 移植を経験された患者さんのお話. (座長) 脳死移植を推進する会 2009.6.7 東京
9. 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, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子(2009) 当施設でのABO血液型不適合腎移植 —治療戦略とリツキシマブの有用性—. (シンポジウム) 第 25 回腎移植・血管外科研究会. 2009.6.27 志摩市
10. 剣持 敬(2009) 千葉県の臓器移植の現状(司会) 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」. 2009.7.5 千葉市
11. 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(2009) ABO 血液型不適合生体腎・腎同時移植の導入と成績. (一般口演) 第 16 回 ABO 血液型不適合移植研究会. 2009.8.1 名古屋市
12. 剣持 敬(2009) シンポジウム 組織提供・移植における安全対策・事故防止対策. (司会) 第 8 回日本組織移植学会. 2009.8.29 東京
13. 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(2009) ABO 血液型不適合生体膵臓移植におけるアフレルシス療法の有効性. (シンポジウム) 第 30 回日本アフレルシス学会. 2009.9.11 札幌市
14. 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, 松原久裕(2009) ABO 血液型不適合ドナーからの生体腎・腎同時移植の成績. (一般口演) 第 45 回日本移植学会. 2009.9.17 東京
15. 剣持 敬, 浅野武秀, 西村元伸, 西郷健一, 丸山通広, 坪 尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平, 安西慶三, 松久宗英(2009) 生体膵臓移植ドナー適応基準の検討(一般口演) 第 4 回日本移植学会 2009.9.17 東京
16. 剣持 敬, 三重野牧子, 芦刈淳太郎(2009) レジストリー報告(腎臓移植)—わが国の腎臓移植の現況と問題点—(シンポジウム) 第 45 回日本移植学会 2009.9.17 東京
17. 剣持 敬(2009) レジストリーレポート(司会) 第 45 回日本移植学会 2009.9.17 東京
18. 剣持 敬(2009) 「臓器移植の推進と定着に向けて」わが国の現状と課題—移植医の視点より—(パネルディスカッション) 第 11 回臓器移植推進国民大会 2009.10.24 千葉市
19. 剣持 敬(2009) 慢性腎臓病(CKD)に対する腎臓移植(特別講演) 第 22 回腎臓病を考える会 2009.10.25 千葉市
20. 剣持 敬(2009) Session 5(座長) 第 6 回臓器不全患者に対する外科・管理研究会(COSMOF) 2009.11.14 東京
21. 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, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子, 曾根恵一(2009) わが国の移植医療の課題—改正臓器移植法施行に向けて—. (一般口演) 第 1198 回千葉医学会例会 2009.12.13 千葉市
22. 剣持 敬(2009) 膵癌と糖尿病に挑んで(浅野武秀講演). (記念講演) 第 1198 回千葉医学会例会 2009.12.13 千葉市
23. 剣持 敬(2009) 生体膵臓移植の適応・手技・成績について. (特別講演) 福岡膵移植セミナー 2009.12.15 福岡市
24. 剣持 敬(2010) 国立病院機構千葉東病院における先行的腎移植の現況. (講演) 第 43 回日本臨床腎移植学会 腎移植連絡協議会 2010.1.28 高知市
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, 鈴木亜希子, 宮崎麻里子(2010) 1型糖尿病腎不全に対する生体腎・腎同時移植の成績. (一般口演) 第 43 回日本臨床腎移植学会 2010.1.30 高知市

26. 剣持 敬, (2010) 千葉県と当院の現状. (講演) 第 43 回日本臨床腎移植学会 拡大臓器提供推進協議会 2010.1.30 高知市
27. 剣持 敬 (2010) 免疫抑制. (座長) 第 43 回日本臨床腎移植学会 2010.1.30 高知市
28. 剣持 敬 (2010) シンポジウム3「腎移植後の妊娠と出産」. (司会) 第 43 回日本臨床腎移植学会 2010.1.30 高知市
29. 剣持 敬 (2010) 当院における移植医療の現状. (特別講演) 第 14 回千葉県臨床工学技師会 2010.3.7 千葉市
30. 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 (2010) 生体臓器移植の臨床成績と将来展望. (シンポジウム) 第 37 回日本膵・膵島移植研究会 2010.3.13 宇都宮市
31. 剣持 敬 (2010) 一般演題①(O-1~3). (座長) 第 37 回日本膵・膵島移植研究会 2010.3.12 宇都宮市
32. 剣持 敬 (2010) 千葉県における移植医療の現状と課題. (特別講演) 旭中央病院院内講演会 2010.3.18 旭市

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

「探索医療の成果としての膵島移植医療の確立」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

膵島移植の治療効果を向上させるためには、より多くの膵島を得、移植後生着率を上げ、長期に渡ってその生着を維持させることが必要である。

中でもドナー不足が世界的に問題になっている昨今、多くの膵島を得ることは重要な課題である。そこで本年度は、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を用いた膵島様組織選択培養法の開発を行った。

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前駆細胞を用いた膵島様組織選択培養法の開発では、膵島の純化工程で廃棄される膵組織内から前駆細胞を取り出し、移植に利用可能な膵島様組織へと従来法よりも多く分化させることができた。その機能も良好であることが確認できた。

A. 研究目的

限られたドナーから多くの移植膵島を得ること、及び移植後の膵島生着率を改善するために、本研究では、1) 膵島分離法の改良、2) 前駆細胞を用いた膵島様組織選択培養法の開発を行う。

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、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、バイアビリティー（AO/PI）を比較検討した。

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従来使用してきた酵素Liberase HIに対して、哺乳類動物由来成分を含まないLiberase MTF-Sがそ

2) 前駆細胞を用いた膵島様組織選択培養法の開発

マウスの膵臓から膵島を分離後に通常廃棄される組織から（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、これを膵島様組織へ分化させる新規選択培養法を開発。さらに移植モデルを用いて、分化膵島様組織による血糖値安定化を検討した。

C. 研究結果

1) 膵島分離法の改良

Liberase MTF-Sを使用して膵島分離をした場合、Liberase HIを使用した場合と比較して純化前後の分離膵島数、回収率にほぼ同程度であった。

酵素	Liberase MTF-S (n=1)	Liberase HI (n=5)
純化前 分離膵島数 (IE/g)	4618	4920
純化後 分離膵島数 (IE/g)	3320	3141
回収率 (%)	71.9	63.9
パイアピリ ティー (AO/PI)	80	94

2) 前駆細胞を用いた膵島様組織選択培養法の開発

結果 1. 膵島分離後のマウス膵臓棄組織から、膵島様組織へと培養可能な前駆細胞を分離し、純化培養することができ(図 1. A)、インスリン分泌細胞への転写に重要な因子 Ngn3 を発現することが確認できた(図 1. B)。

結果 2. 純化培養した前駆細胞を今回開発した方法 (R 法) で培養した結果、従来法と比べてより多くの膵島様組織が培養できた(図 2. C)。また、より多くのインスリン産生細胞へと培養できた(図 2. D, E)。

結果 3. 培養した膵島様組織のインスリン分泌量は、他施設から発表されている方法と比べてより高く、しかもその分泌機能は明瞭なグルコース応答性を示した(図 3.)。

結果 4.

R 法で培養した膵島様組織を糖尿病化マウスに移植した結果、血糖値の低下を認めた(図 4.)。

図1.

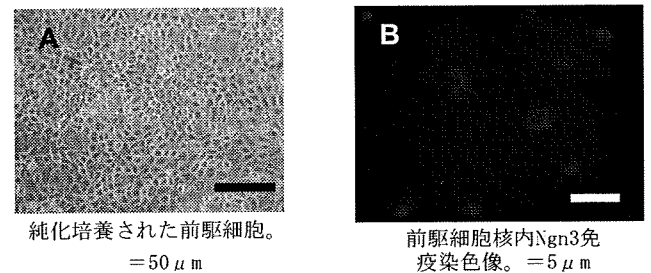


図2.

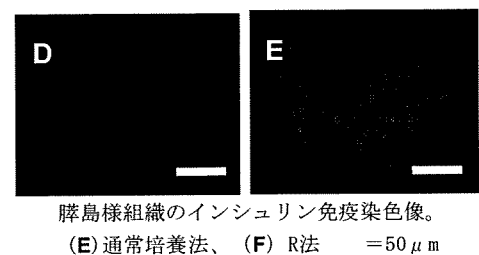
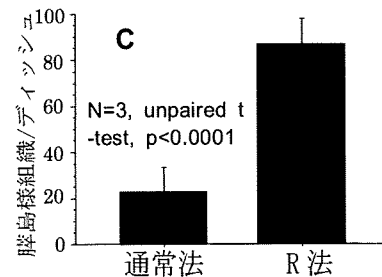


図3.

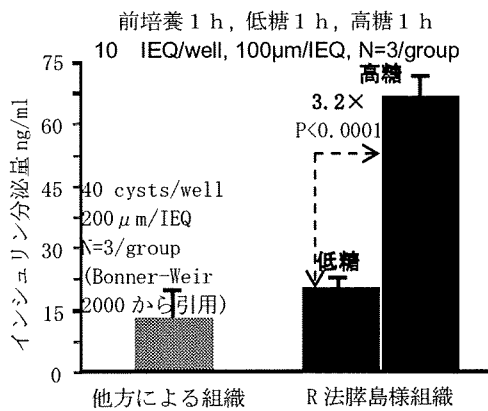
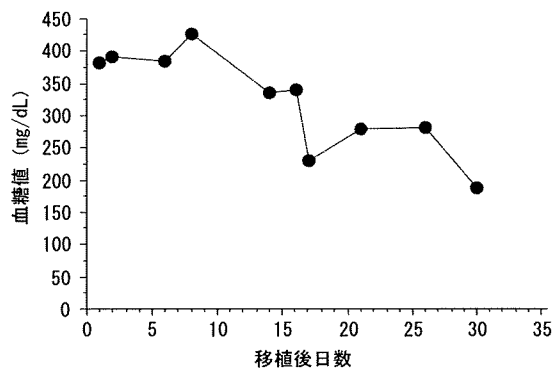


図 4.



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 Liberase MTF-S を使用して従来の Liberase と比較検討した。Liberase MTF-S 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。

前駆細胞を用いた膵島様組織選択培養法の開発では、膵島の純化工程で廃棄される膵組織内から前駆細胞を取り出し、移植に利用可能な膵島様組織へと従来法よりも多く分化させることができた。機能においても大変良好であった。

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哺乳類動物由来成分を含まない Liberase MTF-S が使用可能であることが示唆された。

膵島の純化工程で廃棄される膵組織内から前駆細胞を取り出し、移植に利用可能な膵島様組織へと従来法よりも多く分化させる培養方法を開発した。これはドナー不足問題を解決する方法となりうると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

(雑誌)

- 1) Sato E, Yano I, Shimomura M, Masuda S, Katsura T, Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Uemoto S, Inui K. Larger dosage required for everolimus than sirolimus to maintain same blood concentration in two pancreatic islet transplant patients with tacrolimus. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2009 24(2): 175-179
- 2) Noguchi H, Ueda M, Hayashi S, Kobayashi N, Okitsu T, Iwanaga Y, Nagata H, Liu X, Kamiya H, Levy MF, Matsumoto S.

Comparison of trypsin inhibitors in preservation solution for islet isolation. *Cell Transplant.* 2009;18(5):541-7.

- 3) 佐々真理子、岩永康裕、山田祐一郎 膵島移植と再生医療 日本内科学会雑誌 98 巻 4 号 2009:817-823

2. 学会発表

一般演題

- 1) Iwanaga Y, Matsumoto S, Noguchi H, et al. Kyoto Islet Isolation Method allows efficient islet retrieval from young donor pancreas for clinical use. International Pancreas and Islet Transplant Association 2009/10/12
- 2) 金宗潤、岩永康裕、上本伸二 分化膵島様組織の移植によるマウス in vivo 血糖安定化の検討 第9回日本再生医療学会 2010.3.6

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

金宗潤、岩永康裕、上本伸二、川口義弥

「膵島前駆細胞と血管内皮細胞の複合体による膵島様組織への分化促進法」

特願 2010-61404

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）

平成21年度 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

分担研究者 里見 進 東北大学病院長

研究要旨

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ための基盤技術を構築することである。膵島移植の成績の鍵を握る重要な要因の一つとして、“移植膵島の品質“があげられる。通常、“膵島の品質“とはその形態、機能、バイアビリティーによって評価される包括的・多角的な膵島の状態を示す総称を意味するが、様々な膵島移植操作工程により影響を受けることが知られている。移植前における膵島グラフトの保存方法も、膵島の質へ多大な影響を及ぼすと考えられるが、これまで膵島移植専用の培養・移植デバイスが存在せず、安全・衛生・医学的観点からその確立が強く求められてきた。そこで、本研究においては、酸素透過性に優れ膵島の凝集を起こしにくい新規至適材質をスクリーニングし、膵島細胞の質の向上をもたらす革新的培養・移植デバイスの構築を行った。これは分離膵島のバイアビリティー向上をもたらすばかりではなく、分離操作の安全性・迅速性を飛躍的に促進させ、膵島移植を医療として普及していく上で大きく貢献するものと思われる。

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ための基盤技術を構築することである。膵島

移植の成績の鍵を握る重要な要因の一つとして、“移植膵島の品質“があげられる。通常、“膵島の品質“とはその形態、機能、バイアビリティーによって評価される包括的・多角的な膵島の

状態を示す総称を意味するが、様々な膵島移植操作工程により影響を受けることが知られている。移植前における膵島グラフトの保存方法も、膵島の質へ多大な影響を及ぼすと考えられるが、これまで膵島移植専用の培養・移植デバイスが存在せず、安全・衛生・医学的観点からその確立が強く求められてきた。我々はこれまでに、世界に先がけ膵島培養において培養バッグが有用であることを報告してきた (*Transplantation* 78:1367:2004)。そこで、本研究においては、それをさらに推進し、企業と有機的連携を構築することにより、酸素透過性に優れ膵島の凝集を起こしにくい新規至適材質をスクリーニングし、膵島細胞の質の向上をもたらす革新的培養・移植デバイスの構築に取り組んだ。

B. 研究方法

臨床に準じ、温阻血を30分被ったブタより膵島分離実験 (n=20) を行い、(I)従来法である培養フラスコ (II) 市販血小板用培養バッグ (III) ニプロ (株) と共同開発した新規開発デバイスの三群に分け膵島を約24時間、37度5% CO₂下に培養した。培養後膵島の残存率、機能テスト *in vitro* 糖負荷試験、バイアビリ

ティーテスト (ADP/ATP assay) を評価し、各デバイスの比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、東北大学における動物実験に関する指針 (S 63.3.24) に従い、十分なる愛護精神をもってできるだけ動物に苦痛を与えぬように配慮した。

C. 研究結果

膵島残存率は (I) 21.9 ± 4.7 、(II) 19.8 ± 7.8 、(III) $37.4 \pm 6.4\%$ であり、新規開発デバイスにてより多くの膵島が保たれる事が判明した。*In vitro* 糖負荷試験においては、新規開発デバイスにて培養された膵島の stimulation index が有意に高値を示した ($p=0.04$)。バイアビリティーテストにおいても、新規開発デバイスにて培養された膵島の ADP/ATP ratio はフラスコに比べ有意に低値を示し、アポトーシスに陥る膵島の割合を減弱させる事が判明した (新規開発デバイス： 0.06 ± 0.02 vs フラスコ： 0.14 ± 0.03 、 $p=0.04$)。

D. 考察

本研究により、酸素透過性に富む新規素材を導入した初の膵島専用培養・移植用デバイスの構築に成功することができた。これは分離膵島のバイアビリティ向上をもたらすばかりではなく、分離操作の安全性・迅速性を飛躍的に促進させ、膵島移植を医療として普及していく上で大きく貢献するものと思われる。

今後、再開される臨床膵島移植の現場において、高度医療評価制度のもと、その安全性や有用性を実際のヒト膵島により検証し、我が国発の技術基盤として構築していく予定である。

E. 結論

新規膵島細胞用デバイスは、簡便性・清潔性・酸素透過性に優れており、培養から移植までの一連の操作時間を大幅に短縮し得るのみならず、細胞のクオリティを良好に保ち得ることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Brain death in combination with warm ischemic stress during isolation procedures induces the expression of crucial inflammatory mediators in the isolated islets
Saito Y, Goto M, Maya K, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, and **Satomi S**
Cell Transplantation :2010 in press

2. A novel predictive method for assessing the quality of isolated pancreatic islets using a scanning electrochemical microscopy
Goto M, Abe H, Ito-Sasaki T, Goto M, Inagaki A, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, Matsue T, **Satomi S**
Transplantation Proc. 41 (1):311-313:2009

3. The influence of brain death on tissue factor expression in the pancreatic tissues and isolated islets in rats
Saito Y, Goto M, Maya K, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, **Satomi S**
Transplantation Proc. 41 (1):307-310:2009

4. Superiority of fresh islets compared with cultured islets
Takahashi H, Goto M, Ogawa N, Saito Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Doi H, **Satomi S**
Transplantation Proc. 41 (1):350-351:2009

5. C5a inhibitory peptide combined with gabexate mesilate is a clinically available candidate for preventing the instant blood-mediated inflammatory reaction

Tokodai K, Goto M, Imura T, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, Okada H, **Satomi S**
Transplantation Proc. 41 (1):67-68:2009

6. ラット膵島移植モデルにおける移植前培養膵島に対する新鮮膵島の優位性の検証
高橋英幸、後藤昌史、小川則彦、藤盛啓成、黒川良望、土井秀之、**里見 進**
移植:44 (1):82-90:2009

2. 学会発表

(1) The impact of ischemic stress on the quality of isolated pancreatic islets
Masafumi Goto, Takehiro Imura, Akiko Inagaki, Norihiko Ogawa, Hideyuki Yamaya, Keisei Fujimori, Yoshimochi Kurokawa, **Susumu Satomi**
2009 International Pancreas and Islet Transplant Association, 2009, Oct 12-16, Venice

(2) A STRONG CANDIDATE APPROACH TO PREVENT THE INSTANT BLOOD-MEDIATED INFLAMMATORY REACTION IN CLINICAL ISLET TRANSPLANTATION

Kazuaki Tokodai, Masafumi Goto,
Akiko Inagaki, Wataru Nakanishi,
Noriko Okada, Hidechika Okada,
Susumu Satomi

2009 International Pancreas and
Islet Transplant Association,
2009, Oct 12-16, Venice

(3) 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
障害の抑制

戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中
西 渉、岡田則子、岡田秀親、**里見 進**
第 46 回補体シンポジウム、2009、Aug
21-22、福岡

(4) 臓器の阻血障害が膵島分離へ及ぼ
す影響に関する検討

後藤昌史、猪村武弘、稲垣明子、小川
則彦、山谷英之、Feng Qiang、藤盛啓
成、黒川良望、**里見 進**
第 45 回日本移植学会、2009、Sep
16-18、東京

(5) C5a を標的とした補体阻害ペプチ
ド 導入による移植後早期膵島障害の
抑制

戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、岡
田則子、岡田秀親、**里見 進**
第 45 回日本移植学会、2009、Sep
16-18、東京

(6) 臨床再開へ向けた膵島分離用酵
素剤の比較検討

後藤昌史、山形洋平、渡邊君子、村山
和隆、猪村武弘、稲垣明子、山谷英
之、小川則彦、藤盛啓成、黒川良望、
里見 進

第 37 回膵膵島移植研究会、2010、Mar
12-14、宇都宮

(7) 膵島分離用酵素剤の活性評価シ
ステムの構築

後藤昌史、山形洋平、國定孝夫、間塚
風介、矢内耕二、永里敏秋、渡邊君
子、村山和隆、猪村武弘、藤盛啓成、
黒川良望、**里見 進**

第 37 回膵膵島移植研究会、2010、Mar
12-14、宇都宮

(8) 長期冷保存を伴う膵島移植を対象
とした臓器保存溶液に関する検討

猪村武弘、後藤昌史、藤盛啓成、黒川
良望、**里見 進**

第 37 回膵膵島移植研究会、2010、Mar
12-14、宇都宮

(9) 移植後早期膵島障害の抑制を目
的とした新規プロトコールの有効性の
評価および作用機序の解明

戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中
西 渉、岡田則子、岡田秀親、**里見 進**
第 37 回膵膵島移植研究会、2010、Mar
12-14、宇都宮

(10)細胞シートによる膵島の新規移植
方法の検討

稲垣明子、後藤昌史、小林英司、大橋
一夫、里見 進

第9回日本再生医療学会、2010, March
18-19、広島

(11)膵島移植におけるトランスレーシ
ョナルリサーチ

後藤昌史、里見 進 (依頼講演)

第4回臓器保護と治療研究会、
2010, Apr 8、仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立： 移植後膵島障害の制御法開発

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。本研究ではこの問題の解決を目指して、移植後早期の生着に伴う自然免疫拒絶反応に着目した。前年度の研究では移植直後に膵島より放出される HMGB1 が肝内自然免疫系を賦活し、拒絶反応を惹起する移植膵島喪失の新たな機序ならびに制御法を明らかにした。本年度は移植膵島より HMGB1 が放出される機序について解析した。その結果、HMGB1 放出が膵島の肝内門脈移植に伴う虚血に起因し、移植膵島障害に関連して HMGB1 が放出されることが判明した。更にはドナー膵島の移植前処置により移植早期虚血膵島障害が制御できることが判明した。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

マウス膵島移植の実験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。特に先の研究で膵島の核に豊富に含まれる HMGB1 が移植直後より核から細胞質、更には細胞外、肝内に放出され、自然免疫を賦活し、拒絶反応を惹起することを明らかにした。本年度は移植早期膵島障害の成因として虚血を想定し、移植膵島からの HMGB1 放出機序を明らかにし、臨床応用可能な制御法を開発する。

B. 研究方法

マウス単離膵島を低酸素下で培養し、膵島細胞死と HMGB1 放出の関連性、ならびに機序について解析した。また、既に臨床で使用されている薬剤の中でドナー膵島の移植前処置で低酸素下培養膵島細胞死の軽減効果を有するものがないか検討した。In vitro で有効性が明らかになった薬剤についてはマウス膵島移植の in vivo 実験で明らかにした。

（倫理面への配慮）

本研究プロジェクト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

マウス単離膵島を用いた低酸素下培養の in vitro 実験、ならびにマウス膵島移植の in vivo 実験で以下の知見を得た。

1. 単離膵島を低酸素ガス（1%O₂ + 5%CO₂ + 94%N₂）で満たされたチャンバーで培養（37°C）すると6時間で軽度の中心壊死が発現し、12時間ではさらに進行し単離培養膵島の辺縁を残して中心部はすべて壊死に陥った。細胞死の評価はPI染色で行い、ホルマリン固定標本のパラフィン切片のHE、インスリン、タネル染色で確認した。

2. 単離膵島の低酸素下培養時の培養液中 HMGB1 ならびにインスリン濃度を測定した。培地中インスリン濃度は6時間では対照群と変わらず、12時間で有意に上昇した。培地中 HMGB1 濃度は培養6時間で有意に上昇、12時間では更に高値を示した。

3. 臨床で既に使用されている薬剤として PPAR γ アゴニスト(pioglitazon, アクトス)の効果を検討した。その結果、in vitroにおいて pioglitazon が低酸素下培養膵島細胞障害を軽減する効果を有することが明らかになった。また、in vivo マウス膵島移植実験でドナー膵島を移植前3時間のみ pioglitazon 存在下で培養後に移植すると移植早期膵島障害が制御できることが判明した。

D. 評価

1) 達成度について

移植膵島よりの HMGB1 放出の成因は移植後の虚血であることが判明した。また、その制御に PPAR γ が有用であることが明らかになり、研究目的は達成できた。

2) 研究の意義について

本研究成果は臨床導入によりインスリン依糖尿病の新規治療法である膵島細胞移植が現在直面する最重要課題：移植早期膵島障害のブレイクスルーとなる可能性がある。

3) 今後の展望

本研究成果の臨床導入により、膵島移植の臨床成績の向上に画期的成果をもたらすことが期待できる。

E. 結論

移植早期膵島障害に於ける HMGB1 放出は虚血に起因していることが明らかとなった。また、PPAR γ アゴニストが虚血による膵島障害を軽減する効果を有することが明らかとなり、今後の臨床応用での成果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. T Nitta, T Itoh, N Matsuoka, T Mera, D

Kojima, M Nakano, Y Yamashita, Y Yasunami. Prevention of early loss of transplanted islets in the liver of mice by adenosine. Transplantation 88(1):49-56, 2009

2. Nobuhide Matsuoka, Takeshi Itoh, Hiroshi Watarai, Etsuko Sekine-Kondo, Naoki Nagata, Kohji Okamoto, Toshiyuki Mera, Hiroshi Yamamoto, Shingo Yamada, Ikuro Maruyama, Masaru Taniguchi, and Yohichi Yasunami. High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets. JCI 120(3): 735-743, 2010

2. 学会発表

#1. T Itoh, R Nakagawa, N 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. 69th Scientific Sessions of American Diabetes Association, New Orleans, USA, June 5-9, 2009.

#2. 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. 知的財産権の出願・登録状況

①名称: Inhibition of transplanted islet dysfunction in islet transplantation
発明者: 安波洋一
権利者: 福岡大学
種類: 特許権
番号: 2005-300489

出願年月日:H17.10.14

国内外の別:国内

②名称:抗HMGB1抗体を含む臓器移植拒絶抑制
剤

発明者:安波洋一

権利者:福岡大学

種類:特許権

番号:2007-034280

出願年月日:H19.2.15

国内外の別:国内

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
in vivo モデルを用いた移植膵島におけるオートファジー誘導の有無

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、in vivo マウスモデルを用いて移植膵島におけるオートファジー誘導の有無を解析した。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) の中心的な免疫抑制剤であり、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にある。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いる。本研究ではラパマイシン、0.2 mg/kg、ip にて LC3-GFP transgenic mice を 1 週、2 週、3 週間処理し in vivo においても膵島にオートファジーが誘導されるかを解析した。その結果、ラパマイシン 1 週間処理では膵島にオートファジーの誘導は認められなかったが、2 週間を超えるラパマイシン処理では、実際に in vivo においても膵島に LC3-GFP dot の集積を認めオートファジー誘導が確認された。しかし、この in vivo 誘導はオートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) を 10 mM で同時投与することにより、LC3-GFP dot の膵島内蓄積は著明に抑制されオートファジー誘導は阻止された。平成 20 年度でのわれわれの in vitro での研究成果において、ラパマイシン処理による膵島へのオートファジー誘導は膵島の viability を低下させ、さらに膵島インスリン分泌能を有意に抑制することを考慮すると、膵島移植での遠隔成績不良の原因の一つとして、移植後投与されるラパマイシンの毒性によることが示唆され、その傷害のメカニズムは移植膵島におけるオートファジー誘導が主たる要因ではないかと考えられた。

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 % にまで低下していると報告された。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 や免疫学的機序（拒絶反応）によるところが指摘されているが、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の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。しかし、膵島とオートファジーとの関連はこれまで報告されてい

なかった。平成 20 年度のわれわれの研究成果では、ラパマイシン処理により膵島にオートファジーが誘導されることが確認され、この誘導に伴い膵島の viability および膵島からのインスリン分泌能も抑制されることを in vitro において見いだした。平成 21 年度は、実際に生体内 (in vivo) においてもラパマイシン投与により移植膵島にオートファジーが誘導されるか否かを解析した。

B. 研究方法

1, Mice and isolation of pancreatic islets

B6 mice 由来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ーションの上、1mg/ml の collagenase を含んだ ET-Kyoto 液を 3 ml 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。引き続き、膵消化液より Ficoll 非連続勾配法で膵島を分離・純化した。分離膵島は complete RPMI-1640 culture medium にて培養した。また、GFP-LC3 transgenic mice を理研バイオリソースセンター (RBRC00806) より購入し in vitro, in vivo でのオートファジー誘導を解析した。上記と同様の方法で Tg mice より膵島を分離・純化し、膵島を 1 または 10 mg/ml の rapamycin

存在下または非存在下で24時間培養し、蛍光顕微鏡にて膵島細胞内のLC3-GFP dotの増加とdotsの形状を観察した。さらに、このGFP-LC3 transgenic miceにラパマイシンを0.2 mg/kg, ipで1週、2週、3週間投与し、それぞれの投与期間でマウスを犠牲死させマウス膵臓を摘出、凍結切片を作成した。蛍光顕微鏡にて標本を観察し、膵島および膵外分泌組織でのin vivoオートファジー誘導を検討した。さらに、同一連続切片のインスリン染色も行い、膵島におけるインスリン顆粒の状態も観察した。

2, Islet viability assay

平成20年度では、培養膵島のviabilityをcolorimetric methyltetrazolium salt (MTS) Cell Titer 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (Promega)を用いて解析した。平成21年度では、ラパマイシン処理前後でTMREおよび7-AADを用いて膵島のviabilityを解析した。

3, 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、TMRE assay、7-AAD assayを行いviabilityがどのように変化するか解析した。また、GFP-LC3 transgenic miceより分離した膵島でも同様に、ラパマイシン処理と同時に3-MAに対しても処理しオートファジー誘導が阻止されるかをin vitroにて確認した。また、in vivoでの解析ではGFP-LC3 transgenic miceにラパマイシン0.2 mg/kg, ip投与と同時に10 mMの3-MAを腹腔内投与しオートファジー誘導の抑制を検討した。

C. 研究結果

1, GFP-LC3 transgenic miceを用いたin vitroでのオートファジー誘導

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はendogenousな蛍光のみ観察でき、膵島細胞全体にびまん性に蛍光が観察された。しかし、ラパマイシン処理することにより膵島組織内にGFP-LC3 dotsの蓄積が観察され、そのdotsはcup-shape様に集属しオートファジーの誘導を肉眼的に確認できた。また、3-MAによるオートファジーブロッキングでは、cup-shape様に集属していたGFP dotsは消失しコントロール膵島と同じくdiffuseな蛍光を観察するのみとなり、オートファジー誘導を抑制することができた。

2,膵島 viability の変化

GFP-LC3 transgenic miceを用いて、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、その現象が膵島のviabilityにどのように影響するかをTMREおよび7-AAD assayを用いて解析した。TMRE assayでは無処置膵島および3-MAのみ処理した膵島では約80%がviableな膵島であったが、1または10 ng/mlのrapamycin存在下では、それぞれ62.4%、52.1%までviableな膵島は減少していた。一方、3-MAによるオートファジーブロッキングでは、1 ng/ml rapamycin+10 mM 3-MAまたは10 ng/ml rapamycin+10 mM 3-MA処理により膵島のviabilityは無処置膵島のviabilityに比し、それぞれ80.1%、84.3%まで回復した。さらに、死細胞をdetectする7-AAD assayでは、無処置膵島および3-MAのみ処理した膵島では3.9~4.7%がnon viable isletsとしてdetectされたが、1または10 ng/mlのrapamycin存在下ではそれぞれ17.7%、18.7%までnon viable isletsは増加した。しかし、3-MAによるブロッキングでは1 ng/ml rapamycin+10 mM 3-MAまたは10 ng/ml rapamycin+10 mM 3-MAでは、各々5.0%、12.7%までnon viable isletsは減少した。

3, GFP-LC3 transgenic miceを用いたin vivoでのオートファジーの誘導

GFP-LC3 transgenic miceにラパマイシンを0.2 mg/kg, ipで1週投与した膵臓では、膵島、膵外分泌組織ともにGFP-LC3 dotsの蓄積は観察されなかった。しかし、2週間投与群では膵島、膵外分泌組織両者にGFP-LC3 dotsの蓄積が観察され、3週間投与群でも同様にGFP-LC3 dotsの蓄積が観察された。3-MAとラパマイシンの同時投与群では、2週間、3週間投与群ともに膵島内でのGFP-dotsの集積は認められず、組織内の蛍光は観察されなかった。また、膵島のインスリン染色では、オートファジーを誘導していない無処置膵島では、膵島内に均一にインスリンが明瞭に染色されたが、ラパマイシン処理したオートファジー誘導膵島では、インスリン染色の染色強度が現弱している所見で、3-MAによるブロッキングでは、コントロール膵島と同様に、明瞭にインスリンは染色された。しかし、ラパマイシン投与中のマウスの血糖値の推移を測定したが、投与前後で特に変動は認めなかった。

D. 考察

今回の研究により、ラパマイシン投与により *in vivo* においても膵島にオートファジーが誘導されることを確認し、それにより膵島の *viability* が低下することを見出した。すなわち、過剰なオートファジー誘導は膵島にとって悪影響を及ぼすことが示唆された。しかし、3-MA を併用することによりオートファジーの過剰誘導およびそれに伴う機能障害は回避されることも見出した。今後、3-MA などを用いた膵島保護プロトコルの確立を目指す。

E. 結論

ラパマイシン投与により、生体内でも膵島にオートファジーが誘導されることを確認した。しかし、オートファジー阻害剤・3-MA の同時投与によりオートファジー誘導は回避された。従って、膵島移植後の遠隔成績改善に3-MA の同時投与の有用性が期待できると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1、Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T.

Adenovirus-mediated gene expression of human c-FLIPL protects pig islets against human CD8+ CTL-mediated cytotoxicity.

Transplantation Proceedings. 41 (1) 319-322, 2009

2、Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T.

Rapamycin induces autophagy in islets : Relevance for islets transplantation.

Transplantation Proceedings. 41 (1) 334-338, 2009

3、Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Intra- and extracellular remodeling effectively prevent human CD8+ CTL-mediated xenocytotoxicity by coexpression of membrane-bound human FasL and pig c-FLIPL in pig endothelial cells.

Transplantation Proceedings. 41 (1) 391-394, 2009

2. 学会発表

1、Tanemura M., Ito T., Machida T., Deguchi T., Kobayashi S., Marubashi S., Takeda Y., Nagano H., Sawa Y., Mori M., Doki Y. Rapamycin Induces Autophagy in Islets and Impairs Islet Function.

American Transplantation Congress. (Boston; 2009, 5/30-6/2)

2、種村匡弘、伊藤壽記、永野浩昭、出口貴司、町田智彦、小林省吾、丸橋繁、武田裕、北川透、堂野恵三、門田守人、森正樹、土岐祐一郎

異種膵島移植療法の臨床応用に向けた先端研究

第21回 日本肝胆膵外科学会・学術集会（名古屋；2009, 6/10-12）

3、種村匡弘、出口貴司、町田智彦、永野浩昭、小林省吾、丸橋繁、江口英利、武田裕、塚本里加子、伊藤壽記、森正樹、土岐祐一郎

ラパマイシン毒性としての移植膵島におけるオートファジー誘導の意義

第45回 日本移植学会総会（東京；2009, 9/16-18）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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
— 臨床試験実施計画書の作成 —

分担研究者 山口 拓洋 東京大学医学部附属病院

研究要旨

昨年度に引き続き、臨床試験実施計画書「インスリン依存状態糖尿病の治療としての心停止ドナー膵島移植」の作成及び作成支援を行った。本年度は、研究の全体スケジュール特に患者の登録方法、観察・検査・報告スケジュールの整理、症例報告書（CRF）の整備、統計学的考察に重点を置いた。

A. 研究目的

本研究班において膵島移植療法の臨床試験計画書の作成及び作成支援を行っているが、本年度は特に以下の部分を重点的に整理する。

- 研究の全体スケジュール、特に患者の登録方法
- 観察・検査・報告スケジュールの整理
- 症例報告書（CRF）の整備
- 統計学的考察

B. 研究方法

研究者、データマネジャーらと協議のうえ、プロトコルの作成及び作成支援を行った。

（倫理面への配慮）

試験計画書作成にあたっては、「臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日全部改正）」、「疫学研究に関する倫理指針（平成19年11月1日施行）」などの関連指針や関連法規を遵守する内容となるように留意した。

C. 研究成果

- 研究の全体スケジュール
膵・膵島移植研究会の現状を踏まえ、変更した。
- 観察・検査・報告スケジュールの整理
本試験は観察・検索項目が多いことから、内容を整理した。
- 症例報告書（CRF）の整備
観察・検査・報告スケジュールに沿う形で症例報告書を作成した。症例報告書は次の分冊からなる。分冊タイトルと提出時期は次の通りである。

分冊タイトル	提出時期
登録前調査症例報告書	一次登録時
初回移植日（術前・術後・術後1日目）症例報告書	記入後速やかに
初回術後 7, 14, 28 日目症例報告書	記入後速やかに
初回術後 56・75 日目症例報告書	記入後速やかに
初回術後 90・120・150・180 日目症例報告書	記入後速やかに
初回術後 365 日目症例報告書	記入後速やかに
初回術後 730 日目症例報告書	記入後速やかに
プロトコル治療終了/中止時 転記症例報告書	終了・中止後速やかに 転記確定後速やかに
＜一次登録がなされた症例において、 登録期間中移植が施行されるまでの期間＞	
適格性調査報告書	一次登録完了3ヶ月経過毎にすみやかに
適格性調査報告書（詳細）	一次登録完了1年経過毎にすみやかに
＜2回目移植が施行された場合＞	
2回目移植日（術前・術後・術後1日目）症例報告書	記入後速やかに
2回目術後 7, 14, 28 日目症例報告書	記入後速やかに
2回目術後 75 日目症例報告書	記入後速やかに
＜3回目移植が施行された場合＞	
3回目移植日（術後・術後・術後1日目）症例報告書	記入後速やかに
3回目術後 7, 14, 28 日目症例報告書	記入後速やかに
3回目術後 75 日目症例報告書	記入後速やかに

- 統計学的考察
主要評価項目の解析以外の副次評価項目の解析などについても整理した。

D. 考察

本試験は測定項目が多く、かつ、データの収集スケジュールが複雑である。データマネジメントを含めた研究支援体制が重要であり、本年度はその体制作りに時間を要した。このような複雑な研究ほど統計家やデータマネジャーの関与が不可欠であることを再認識すべきである。

E. 結論

臨床試験実施計画書「インスリン依存状態糖尿病の治療としての心停止ドナー膵島移植」の作成及び

作成支援を行った。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし。
2. 学会発表
特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。