

200917003B

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)

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立

平成 19 年度～21 年度

総合研究報告書

研究代表者 寺岡 慧

平成 22 年(2010)年 5 月

## 目次

I. 統括研究報告	
1. 「探索医療の成果としての膵島移植医療の確立」総括研究	寺岡 慧 ……3
II. 研究分担報告	
1. 「移植膵島の viability 評価」および「わが国における臨床膵島移植成績」に関する研究	後藤満一 ……23
2. 「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	剣持 敬 ……28
3. 「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	岩永康裕 ……50
4. 探索医療の成果としての膵島移植医療の確立	里見 進 ……56
5. 移植後膵島障害の制御法開発	安波洋一 ……66
6. アポトーシスシグナルブロックによる移植膵島の生着延長効果と膵島組織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 ……70
7. 臨床試験実施計画書の作成	山口拓洋 ……85
8. 細胞治療に対するエンドポイント設定の研究	嶋澤るみ子 ……87
9. 膵島移植医療における QOL に関する研究	畑中暢代 ……91
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	……………95
IV. 研究成果の刊行物・別冊	……………105

# I. 総括研究報告

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

総合研究報告書

研究課題：探索医療の成果としての膵島移植医療の確立

研究代表者：寺岡 慧 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター外科教授

同 先端生命医科学研究所代用臓器学教授

**研究要旨** 糖尿病患者に対する根治療法としての膵島移植を確立する目的で以下の探索研究を行った。種々の条件下でマウス、ラットおよびブタ膵島分離実験を行い、膵消化および膵島分離のための至適条件を探索し、膵消化・膵島分離法の標準化を試みた。また分離膵島の viability 評価法、機能評価法について探索研究を行い、これらの評価法の開発および標準化を試みた。その結果、糖負荷膵島呼吸活性法、ADP/ATP 比、インスリン/DNA 比、 $\beta$  細胞独自の viability 評価法としての  $\beta$  cell viability index、WST-1 absorbance/DNA assay などの有用性が確認された。

臨床膵島移植における成績向上の最大の障壁は、移植後早期および慢性期膵島傷害であり、1 回の膵島移植によりインスリン離脱を目指す”1-donor to 1-recipient”の移植の実現、また長期成績の改善によってこれらの膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発は不可欠である。移植膵島傷害の機序として血液凝固性炎症反応（Intact Blood-mediated Inflammatory Reaction, IBMIR）、肝内の NKT 細胞を介する活性化好中球による傷害、種々のサイトカインによる傷害、拒絶反応、High-mobility group box 1（HMGB1）による傷害、オートファジー様細胞死などがあげられ、トレハロース添加、抗 IL-6R 抗体投与、アデノシン投与、さらにアデノシントランスポーター阻害薬である dypiridamole 投与、 $\alpha$ -galactosylceramide 処理、PPAR $\gamma$  アゴニストである pioglitazon 投与、ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 遺伝子導入、3-methyladenine 投与などがそれぞれの膵島傷害の制御に有用であることが明らかとなった。さらに臨床膵島移植の長期成績が不良であることの要因として膵島の再生不全があげられるが、移植膵島の再生を可能とする膵島の前駆細胞をインスリン産生細胞に分化させる新規選択培養法を開発した。また慢性拒絶反応を制御する目的で新しい免疫抑制レジメンを考案した。

膵島分離に頻用されてきた Liberase HI（Roche 社製）の製造工程で、ウシ脳の抽出物が添加されていたことが判明し、2007 年 3 月以降臨床膵島移植は中断された。これまでに実施された 18 例（34 回）の膵島移植患者の安全性を確認するために、Liberase HI に BSE プリオンが混入しているか否かについて検討した結果、Liberase HI 50mg 中に BSE ウシ脳 0.05mg に相当するプリオン感染価は含まれていないことが判明した。また CJD 専門神経内科医による follow-up 体制を構築し、膵島移植患者の診察、検査などの結果、これまでに CJD の発症を疑わせる事例は存在しないことが判明した。さらに Liberase HI に代わりうる膵消化酵素の探索研究の結果、mammalian-free の Liberase-MTF が臨床膵島移植にもっとも適した膵消化酵素と考えられた。

膵島移植患者の統計学的解析を行い、膵島移植により C-ペプチド値の上昇、インスリン投与量の減少、低血糖出現頻度の減少、HbA1c の改善など、血糖管理の安定化が得られたことが明らかとなった。また臨床膵島移植のエンドポイントとして、インスリン離脱、C-peptide 値に加えて、HbA1c < 6.5%、重症低血糖発作の消失、SUITO index が有用であると考えられた。種々の QOL 調査の結果から、患者と医療サイド間の認識のずれを最小化し、患者の満足度を改善することが重要と考えられ、治療選択の際に患者が必要とすると考えられる情報を網羅した患者用小冊子を作成した。以上の研究成果に基づいて新しい臨床膵島移植の実施計画書を作成し、現在、高度医療に申請中である。

研究分担者:

後藤満一 福島県立医科大学医学部臓器再生外科学講座教授  
剣持 敬 国立病院機構千葉東病院臨床研究センター長  
岩永康裕 京都大学医学部附属病院臓器移植医療部 助教  
里見 進 東北大学病院長  
安波洋一 福岡大学医学部再生・移植医学・教授  
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  
山口拓洋 東京大学医学部附属病院  
嶋澤るみ子 東北大学未来医工学治療開発センター  
畑中暢代 東京大学医科学研究所 先端医療社会コミュニケーションシステム 社会連携研究部門

## A. 研究目的

近年増加しつつあり、生命予後に重大な影響を及ぼす糖尿病患者に対する根治療法としての膵島移植医療を確立する。

臨床膵島移植を確立させるためには膵島分離・純化法、分離膵島の *viability* 評価法、分離膵島保存法、膵島移植法および免疫抑制法の開発が不可欠である。

膵島は移植後早期に、その 50~70%が傷害され、*apoptosis* に陥るため、インスリン離脱には2~3回の膵島移植を必要とする。その傷害機序として血液凝固性炎症反応 (*Intact Blood-mediated Inflammatory Reaction, IBMIR*)、肝内の *NKT* 細胞を介する活性化好中球による傷害、さらに膵島分離操作などの過程における虚血傷害に起因する炎症性メディエーターあるいは *High-mobility group box 1 (HMGB1)* の発現などがあげられる。1回の膵島移植でインスリン離脱を達成するには (1-donor, 1-recipient)、上記の移植後早期膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発が不可欠である。

また移植後慢性期に膵島が傷害されるため、膵島移植における長期生着率は5年で7.5%と不良である。その傷害機序として同種免疫応答 (慢性拒絶反応)、自己免疫機序、オートファジー様細胞死、膵島再生不全などがあげられる。膵島移植における長期成績の改善には、上記の移植後慢性

期膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発が必要である。さらに移植膵島の慢性拒絶反応を抑制し、免疫抑制薬の副作用を防止する目的で究極的にはドナー特異的免疫寛容の導入も有用な方策と考えられる。

かつて臨床膵島移植における膵島分離には、膵消化酵素として世界的に *Liberase HI (Roche 社製)* が用いられてきたが、その製造工程にウシ脳の抽出物が用いられていたことが判明し、全世界で臨床膵島移植が中断された。わが国においても2008年3月に臨床膵島移植を中断した。今後、臨床膵島移植の再開のためには哺乳類成分を含まない新しい膵消化酵素の探索が不可欠である。

臨床膵島移植を真の糖尿病に対する医療として確立させるためには、臨床データの収集とその評価法の確立、臨床指標としてのエンドポイントの設定、総合的評価法としての統計学的手法の選定、*Quality of Life (QOL)*、患者満足度の評価、これらの臨床現場へのフィードバックが必要である。

以上を背景として本研究の目的は、(1)膵島分離・純化法の標準化、膵島収量の増加、(2)分離膵島の *viability* 評価法の確立、(3)膵島保存法の開発、(4)1回の膵島移植でインスリン離脱を可能とするために、移植後早期膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発 (1-donor to 1-recipient の実現)、(5)長期生着率の改善のために、移植後慢性

期の膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発、(6)Liberase HI に代わりうる、哺乳類成分を含まない新しい膵消化酵素の探索とそれを用いた膵島分離法の標準化、分離膵島評価法の検討、(7)臨床例についての統計解析と評価法の確立、(8)臨床指標としてのエンドポイントの設定、(9)QOL 調査、(10)以上による総合的な評価法の探索、(11)以上の成果の研究、臨床への feed-back によりより良い臨床膵島移植を確立することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 膵島分離法の標準化

種々の膵消化酵素を用いて、マウス、ラット、ブタ膵からの膵島分離を行い、膵島分離のための至適条件を探索し、膵島分離法の標準化を試みた。

とくにその製造工程にウシ脳抽出物が用いられている Liberase HI に代わりうる膵消化酵素を探索し、各膵消化酵素を用いた膵島分離実験において、至適条件を探索し、標準化を試みた。

### 2. 移植膵島の viability 評価

細胞、臓器を問わず移植医療の最大の難関のひとつに、最終的には移植してみなければ移植された細胞、臓器の機能はわからない、という命題である。すなわち移植前の viability 評価、機能評価が非常に重要である。細胞移植においては比較的移植前 viability 評価、機能評価が行いやすいという利点がある。

この3年間の研究期間において、種々の分離膵島の viability 評価法、機能評価法について探索研究を行い、これらの評価法の開発および標準化を試みた。

### 3. 膵島保存法の開発

臓器移植においては臓器の保存時間が限られているため、臓器が提供されるまで移植を待たなければならない。そのために移植待機中に患者が死亡することは避けられない。細胞治療の利点は凍結保存などによって移植用の細胞を長期保存しておき、患者が必要とする時点で移植が可能であることである。

この観点から将来のバンキング・システムの構築を展望しつつ、分離膵島の長期保存法の開発を試みた。

## 4. 移植後膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発

### 1) 移植後早期膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発

膵島は移植後早期に、その 50~70%が傷害され、apoptosis に陥るため、インスリン離脱には2~3回の膵島移植を必要とする。1回の膵島移植によるインスリン離脱を可能とするためには(1-donor, 1-recipient)、この膵島移植後の早期傷害を克服することが不可欠である。

移植後早期膵島傷害の機序として、血液凝固性炎症反応(Intact Blood-mediated Inflammatory Reaction, IBMIR)、肝内のNKT細胞を介する活性化好中球による傷害、さらに膵島分離操作などの過程における虚血傷害に起因する炎症性メディエーターあるいはHigh-mobility group box 1(HMGB1)の発現、急性拒絶反応などがあげられ、これらの傷害因子について検討し、その制御法の探索研究を行った。

### 2) 移植後慢性期膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発

また移植後慢性期に膵島が傷害されるため、膵島移植における長期生着率は5年で7.5%と極めて不良である。膵島移植の長期成績を改善し、長期にわたる安定した治療効果を得るためには、慢性期膵島傷害の機序を解明し、その制御法の開発が不可欠である。

慢性期傷害の機序として慢性拒絶反応、自己免疫機序(再発)、オートファジー様細胞死、さらに膵島再生不全などがあげられる。

本研究では3年間にわたり、慢性拒絶反応を克服するための免疫抑制レジメンの探索研究、さらにはドナー特異的免疫寛容の臨床導入、オートファジー様細胞死の検討とその制御法の探索研究を行った。また移植膵島の再生を目指し、膵島細胞の前駆細胞を選択培養し、インスリン分泌細胞に分化させる方法を探索した。

## 5. 哺乳類由来成分を含まない新しい膵消化酵素の探索と膵島分離標準化

かつて臨床膵島移植における膵島分離には、膵消化酵素として世界的に Liberase HI (Roche 社製) が用いられてきたが、その製造工程にウシ脳の抽出物が用いられていたことが判明し、全世界で臨床膵島移植が中断された。わが国においても2008年3月に臨床膵島移植を中断した。今後、臨床膵島移植の再開のためには哺乳類成分を含まない新しい膵消化酵素の探索が不可欠である。

本研究の3年間において、哺乳類由来成分を一切含まず、GMP基準に準拠した、Liberase HIに代わりうる膵消化酵素を探索し、各膵消化酵素について種々の動物を用いて膵島分離実験を行い、その有効性を比較検討し、各膵消化酵素について膵島分離における至適条件を探索し、標準化を試みた。

## 6. 臨床膵島移植症例の統計学的解析

これまでに実施された18例(34回)の膵島移植の臨床データを解析し、膵島分離、膵島移植の成績に影響を与える因子を検討した。

膵島移植の効果と安全性に関するレトロスペクティブ調査における解析方法について Clinical Islet Transplantation Registry の Analysis Plan を参考に検討した

従来、膵島移植の有効性についてはインスリン離脱と C-peptide 値が用いられてきたが、より長期の総合的な評価の指標として、低血糖の頻度の減少、HbA1c 値の改善など血糖管理の安定化、糖尿病合併症の進展防止、QOL の向上、移植手技および免疫抑制による有害事象などについて検討を行った

## 7. 臨床膵島移植症例における安全性の確認

### 1) Liberase HI のプリオン感染の可能性に関する検討

Liberase HI に BSE プリオンが混入しているか否かについて、BSE プリオン蛋白質遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスの脳内に Liberase HI を注入し、BSE プリオンのバイオアッセイを行った。本検討については、毛利資郎動

物衛生研究所プリオンセンター所長に研究委託した。

Liberase HI は強力な消化酵素活性を有するため、加熱による酵素活性の失活が必要であり、また接種部位を脳内から腹腔内に切り替える必要があり、不活化 Liberase HI をマウス腹腔内に接種して、免疫染色法および Western blotting (WB) 法を用いてウシ由来プリオンの検出を行った。

### 2) 臨床膵島移植症例の follow-up

これまで Liberase HI を用いて膵島分離を行って膵島移植を行った18例の臨床膵島移植症例について、全国的な Creutz-Jakob 病 (CJD) 専門神経内科医のカウンセリング、受診体制を構築し、CJD 専門神経内科医に受診した上でカウンセリング、diffusion MRI および脳波などの検査を行った。

## 8. 臨床膵島移植におけるエンドポイントの設定

従来、膵島移植の有効性についてはインスリン離脱と C-peptide 値が用いられてきたが、より長期の総合的な評価の指標として、低血糖の頻度の減少、HbA1c 値の改善など血糖管理の安定化、糖尿病合併症の進展防止、QOL の向上、移植手技および免疫抑制による有害事象などについて検討を行った。

## 9. QOL 評価と臨床膵島移植の総合的検討

1型糖尿病患者(膵島移植未登録)、膵島移植待機患者、膵島移植患者に対して医療相談および QOL 調査を行い、医療サイドと患者間の認識のずれ、両者のコミュニケーション、さらにそれらが患者の満足度に及ぼす影響などについて検討を加えた。

778 件の医療相談の内容をカテゴリー分けし、糖尿病患者に特異的な QOL 尺度について検討した。

これらの作業後5段階の Lickert 型尺度を有する8分野合計50項目からなるアンケート用紙を作成し、新規尺度の妥当性について検討した。この過程で作成されたアンケート用紙を用いて108名の1型糖尿病患者に対して調査を行った。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 膵島分離法の標準化

種々の膵消化酵素を用いて、マウス、ラット、ブタ膵からの膵島分離を行い、膵消化および膵島分離のための至適条件を探索し、膵消化・膵島分離法の標準化を試みた。

膵消化の過程における至適消化時間、その確認法について検討し、各設定条件で得られた分離膵島の viability および機能評価を行った。すなわちより効率的な分離膵島の純化法の探索を行う目的で回路内容液中の ATP 量を経時的に測定した結果、回路内 ATP 量は 25 分で頂値に達し、30 分を過ぎると急速に減少した。膵島収量は消化開始後 30~35 分で頂値に達することから、回路内 ATP レベルは至適膵消化時間の 5~10 分先行して上昇し、回路内 ATP 量の測定は至適膵消化の有用な示標と考えられた。

また ATP 量の増加と並行して、total adenine nucleotide (TAN) 量、膵島数も増加し、ATP 量は先んじてピークに達し、膵島収量が最大になる時期と一致した。消化液中の TAN 量と膵島収量は正の相関を示し、ATP/TAN 比は消化開始後 15 分で plateau に達し、40 分以降で有意に減少した。膵島内 ATP 量、消化液中 TAN 量は膵島収量の指標となることが判明した。

膵消化中に経時的に採取された膵外分泌組織は徐々にその integrity を喪失し、adenosine 濃度も経時的に低下するが、この消化液上清と新鮮膵島を混合培養すると、次第に膵島細胞自体の integrity が失われ、ATP レベルが低下してゆることが明かとなった。膵島収量のみでなく膵島の viability の点からも至適消化時間の設定は重要と考えられた。

serine protease inhibitor を用いることにより、膵消化の過程における膵島傷害は軽減し、膵島の保護効果が認められた。

摘出膵の搬送、膵島分離、膵島移植の各行程における虚血傷害を軽減する目的で、上記の各行程において酸素化 PFC を用いて収量、viability 評価、早期膵島傷害の制御効果について検討した結

果、酸素化 PFC を各行程に用いることにより、収量、viability の改善が認められ、ラットおよびイヌ膵島移植モデルにおいて生着膵島数の増加が確認された。上記の各行程において虚血傷害が関与していること、また酸素化 PFC を用いることにより虚血傷害が軽減することが確認された。

分離膵島の純化過程における至適条件についても探索研究を行い、COBE2991 Cell Processor を用いて Euro-Ficoll 比重遠心法と HES-Collins 比重遠心法によりイヌ分離膵島を純化し、純化した膵島の Perfusion study におけるインスリン分泌能と、イヌ同種膵島移植後の血糖値の比較検討を行ったが、その結果、HES-Collins 比重遠心法により得られた純化膵島で perfusion study における良好なインスリン分泌能が認められ、イヌ膵島移植モデルにおいても血糖の正常化が認められた。今後さらに C3a などの補体、TNA- $\alpha$  などのサイトカインについて検討が必要と考えられた。

膵島収量の増量と膵島傷害の軽減を目指して、摘出膵の膵管内に p38MAPK inhibitor の注入を行い、膵島収量と膵島細胞の apoptosis 抑制効果について検討した結果、p38MAPK inhibitor の膵管内注入を行った群は対照群に比べて、有意な膵島収量の増加を確認した。TUNEL 法およびレーザースキャンサイトメトリー法を用いた検討で、 $\beta$  細胞における apoptosis の比率は p38MAPK inhibitor 膵管内注入群で有意に減少していた。p38MAPK inhibitor 膵管内注入により、膵島細胞の apoptosis が抑制されたことによって膵島収量が増加したものと考えられた。

温阻血負荷ブタ分離膵島を従来法、市販血小板用培養バッグ、新規開発デバイスの 3 群に分けて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下に 24 時間培養し、ADP/ATP assay 法を用いて 3 群間の viability を比較検討した結果、従来法、市販血小板用培養バッグ、新規開発デバイスの 3 群間で、膵島残存率は新規開発デバイス群で 37.4 $\pm$ 6.4% (vs 21.9 $\pm$ 4.7、19.8 $\pm$ 7.8) でもっとも良好であった。また in vitro 糖負荷試験においても新規デバイス群の stimulation



index がもっとも優れていた。viability 試験 (ADP/ATP assay) においても新規開発デバイス群が有意に低値を示し、apoptosis に陥る膵島の割合が減少することが判明した。

## 2. 移植膵島の viability 評価

分離膵島の viability 評価法、機能評価法について探索研究を行い、これらの評価法の開発および標準化を試みた。

Roche 社製 Liberase HI および Serva 社製 Collagenase を用いてブタ膵島分離を行い、収量を比較検討し、分離膵島の viability 評価法、膵島機能の評価法の探索を行った結果、糖負荷膵島呼吸活性法、ADP/ATP 比、インスリン/DNA 比などの有用性が確認された。

また従来の膵島の viability 評価は  $\alpha$  細胞など  $\beta$  細胞以外の膵島細胞も含めた評価であり、 $\beta$  細胞は  $\alpha$  細胞より傷害を受けやすいことから  $\beta$  細胞独自の viability 評価法の開発が待たれていた。本研究では分離膵島中の  $\beta$  細胞独自の viability 評価法の探索研究を行った結果、flow-cytometry によって測定された  $\beta$  cell viability に、LASER scanning cytometry (LSC) により算出された膵島中の  $\beta$  細胞構成率を乗じた  $\beta$  cell viability index は  $\beta$  細胞独自の viability 評価の有用な示標となりうることが示唆された。

Liberase HI を用いて Wistar ラットの膵島分離を行い、温阻血負荷群と対照群において WST-1 assay、ADP/ATP assay、Dithizone 染色、TUNEL 法によるアポトーシス評価により、分離膵島の viability 評価を行った結果、温阻血負荷膵島の viability 評価において、WST-1 absorbance/DNA assay 法および ADP/ATP 比による評価法は有用性が確認されたが、Dithizone 染色法、TUNEL 法では有用性は確認されなかった。

## 3. 膵島保存法の開発

臓器移植においては臓器の保存時間が限られているため、臓器が提供されるまで移植を待たなければならない。そのために移植待機中に患者が死亡することは避けられない。細胞治療の利点は凍結保存などによって移植用の細胞を長期保存

しておき、患者が必要とする時点で移植が可能であることである。

この観点から将来のバンキングシステムを目指して、分離膵島の凍結保存による長期保存法の開発を試みた。研究期間において細胞傷害性を抑制する膵島凍結保存法 (CHIBA CRYO TECHNIQUE) を開発したが、さらに保存後の膵島回復率を改善させる目的で、磁場環境下での食品凍結保存技術である Cell Alive System、および Prokept を用いた電磁波過冷却法などを開発し、その効果について検討を加え下記の結果を得た。

イヌ分離膵島を CHIBA CRYO TECHNIQUE で凍結保存後、解凍膵島の形態は保持され、膵島回復率は 71.2% と良好であり、static incubation で stimulation index は  $1.80 \pm 0.78$  とインスリン分泌は良好であり、perifusion assay において良好なインスリン分泌を示した。またヒト凍結膵島 (UCLA により提供) を凍結保存し、解凍後 streptozotocin 糖尿病ヌードマウスの腎被膜下に移植し、良好な血糖降下効果を確認した。

Cell Alive System 法により凍結保存後、解凍して static incubation を行った結果、CP-1 液による保存が最も良好なインスリン分泌能を示した。また電磁波過冷却法により保存したラット膵島では良好な回復率、インスリン分泌能が示された。

CHIBA CRYO TECHNIQUE に加えて、今後 Cell Alive System 法、Prokept を用いた電磁波過冷却法は、将来のバンキングシステムのための膵島保存に有望な方法と考えられた。

## 4. 移植後膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発

移植膵島障害機構の解明とその制御法の開発は、臨床膵島移植の成功に向けてもっとも重要な課題のひとつであるが、3年間の研究期間において、移植膵島傷害の機序として血液凝固性炎症反応 (Intact Blood-mediated Inflammatory Reaction, IBMIR)、肝内の NKT 細胞を介する活性化好中球による傷害、種々のサイトカインによる傷害、拒絶反応、High-mobility group box 1 (HMGB1) による傷害、オートファジー様細胞

死などが明らかにされた。

## 1) 移植後早期膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発

移植後早期膵島傷害の機序としての血液凝固性炎症反応 (IBMIR) に対して、各種オリゴ糖による制御効果の探索研究を行った結果、トレハロース添加の有用性が明らかとなった。

肝内の NKT 細胞を介する活性化好中球による傷害、さらに膵島分離操作などの過程における虚血傷害に起因する炎症性メディエーターあるいはなどがあげられ、これらの傷害因子について検討し、その制御法の探索研究を行った。

わが国ではキャスルマン病の治療薬として承認されている抗 IL-6R 抗体を投与して膵島移植後の早期傷害を制御しうるか否かについて検討した結果、抗 IL-6R 抗体と抗 CD4 抗体の投与により膵島の早期傷害が制御され、より効率的な生着が得られることが明らかとなった。

マウス肝内同種同系膵島移植モデルにおいて、アデノシン投与が膵島生着率に与える効果、ならびに肝内単核球 FACS 解析による NKT 細胞、好中球からの IFN- $\gamma$  産生に与える影響について検討した結果、肝内単核球 FACS 解析によってアデノシン投与群では NKT 細胞、好中球からの IFN- $\gamma$  産生が抑制され、マウス肝内同種同系膵島移植モデルにおいて、1 回のアデノシン投与により 1-donor to 1-recipient の膵島移植が達成された。また同種異型膵島移植 (BALB/c $\rightarrow$ B6) においても、抗 CD4 抗体およびアデノシンの投与により、1-donor to 1-recipient の膵島移植が達成された。

さらにアデノシントランスポーター阻害薬である dypiridamole についても上記の効果について検討した結果、dypiridamole についてもアデノシンと同様に早期移植膵島傷害を軽減する作用を有することが確認された。

さらに  $\alpha$ -galactosylceramide 刺激後の NKT 細胞、好中球からの IFN- $\gamma$  産生に及ぼすアデノシンの効果についても検討した結果、 $\alpha$ -galactosylceramide 刺激後の NKT 細胞、好中球からの IFN- $\gamma$  産生が、アデノシン投与により

抑制されることが判明した。

また急性拒絶反応においては CD4<sup>+</sup>細胞 (ヘルパー T 細胞) により分化・成熟し活性化した CD8<sup>+</sup>細胞 (細胞障害性 T 細胞) が、標的細胞を破壊するが、その機序は Fas-FasL および perforin-granzyme による標的細胞における apoptosis の誘導とされている。ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 遺伝子を高発現した膵島細胞はヒト CD8<sup>+</sup>細胞による直接細胞傷害性を強く抑制することが確認され、これらの遺伝子を発現した膵島の移植実験では生着延長効果が認められた。

マウス単離膵島を低酸素下で培養し、膵島細胞死と HMGB1 放出との関連性、ならびに機序について検討し、さらに PPAR $\gamma$  アゴニストである pioglitazon を用いた移植前処置によって制御しうるか否かについて検討を加えた結果、無処置群では 12 時間で単離培養膵島の中心部がすべて懐死に陥ったのに対し、pioglitazon 処置群においては低酸素下培養膵島傷害を軽減することが判明し、ドナー膵島を移植前 3 時間のみ pioglitazon 存在下で培養することにより、移植後早期膵島傷害が制御しうることを明らかとなった。

移植前に膵島を MMC の存在下に培養し、膵島の形態学的変化を電顕で観察するとともに、誘導される遺伝子をマイクロアレイにより検討した結果、MMC の添加培養により、膵島中心部の懐死領域は有意に縮小し、p53、p21waf1 タンパクの発現亢進が認められたが、p-Akt や caspase-3 の発現は変化しなかった。MMC 添加培養により膵島の中心懐死が軽減され、細胞周期停止を誘導するタンパクの発現が増加することが判明した。

膵島が発現する炎症性メディエーターが早期移植膵島傷害に関与している可能性に着目し、脳死ラットモデルを用いて、脳死という病態ならびに膵島分離操作が膵島における tissue factor (TF)、monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) 遺伝子発現に及ぼす影響について検討した結果、脳死ラット群では膵島収量が減少したが、膵島 viability、呼吸活性指数には差が認められず、膵組織の TF および MCP-1 mRNA レベル

においても差は認めなかった。しかし分離膵島における TF および MCP-1mRNA レベルは脳死群で有意に上昇しており、脳死という病態は分離膵島における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、これに分離操作という虚血傷害が加わることによりその発現が顕在化するものと考えられた。

## 2) 移植後慢性期膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発

また移植後慢性期に膵島が傷害されるため、膵島移植における長期生着率は5年で7.5%ときわめて不良である。膵島移植の長期成績を改善し、長期にわたる安定した治療効果を得るためには、慢性期膵島傷害の機序を解明し、その制御法の開発が不可欠である。慢性期傷害の機序として慢性拒絶反応、自己免疫機序（再発）、オートファジー様細胞死、さらに膵島再生不全などがあげられるが、3年間の研究期間においてオートファジー、慢性拒絶反応、膵島再生不全などの関与に関する検討、さらにそれらの制御法に関する探索研究を行った。

Edmonton protocol において臨床膵島移植において不可欠の免疫抑制薬とされてきた sirolimus (SRL) が、実は逆にオートファジー誘導を介して早期移植膵島傷害、インスリン分泌低下に関与していたことが明かされ、3-methyladenine (3-MA) により膵島のオートファジーが抑制されることが判明した。

すなわち SRL 存在下で培養したマウス分離膵島では、オートファジー誘導マーカーである LC3-II タンパクの発現が Western blot で確認され、さらに LC3-II 発現が有意に増加し、マウス膵島にオートファジーが誘導されていることが確認された。MTS assay による解析の結果、膵島の viability は SRL により有意に低下した。さらに static glucose challenge test によるインスリン分泌能の検討では、SRL により stimulation index が有意に低下した。

また 3-MA によるオートファジーブロッキングでは、LC3-II タンパクの発現が抑制され、膵島の

viability およびインスリン分泌能は回復した。

B6 マウスおよび GFP-LC3 transgenic mice を用いて膵島分離を行い、SRL 存在下で培養した後、TMRE assay、7-AAD assay 法により膵島の viability を検討し、GFP-LC3 transgenic mice に SRL 0.2mg/kg を腹腔内投与して in vivo における膵島および膵外分泌組織におけるオートファジー誘導について検討を加え、さらに SRL 処理とともにオートファジー阻害薬である 3-MA 処理を行い、オートファジー誘導が制御できるか否かについて検討し、以下の結果を得た。

すなわち無処置膵島においては膵島全体にび慢性に蛍光が観察されたのに対し、SRL 処理膵島においては cup-shape 様に集簇した GFP-LC3 dots の蓄積が観察され、オートファジーの誘導が肉眼的に確認できた。また 3-MA による Blocking assay では cup-shape 様に集簇した GFP dots は消失し、対照群と同様にび慢性の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確認された。次にオートファジーが膵島の viability にいかなる影響を与えたか否かについて TMRE assay、7-AAD assay 法により検討した結果、TMRE assay では対照群の膵島の viability は約 80%であったのに対し、SRL 処理群では 52.1~62.4%まで viability は低下した。

3-MA による Blocking assay では膵島の viability は 80.1~84.3%に回復した。死細胞を detect する 7-AAD assay では、無処置膵島においては 3.9~4.7%が non-viable islets として detect されたが、SRL 処理膵島においては 17.7~18.7%まで non-viable islets は増加した。3-MA による Blocking assay では、non-viable islets は 5.0~12.7%まで減少した。

GFP-LC3 transgenic mice に SRL 0.2mg/kg を2週間腹腔内投与した膵臓では、膵島、膵外分泌組織ともに GFP-LC3 dots の蓄積が観察された。3-MA、SRL 同時投与では GFP-LC3 dots の蓄積は観察されなかった。また膵島のインスリン染色では、無処置膵島においては膵島内に均一にインスリン顆粒が染色されたが、SRL 投与群ではイン

スリン染色の強度が減弱しており、これは 3-MA による Blocking では対照群と同様に明瞭にインスリン顆粒が染色された。

以上より膵島に対する SRL が *in vitro* および *in vivo* においてオートファジーを誘導して、viable islets の減少と non-viable islets の増加、インスリン染色性の低下を来し、3-MA による処理 (*in vitro*) あるいは 3-MA の同時投与 (*in vivo*) によりオートファジーは抑制され、viable islets の増加と non-viable islets の減少、さらにはインスリン染色性の回復が達成されたものと推察された。

慢性拒絶反応を完全に制御する方法は、現時点では残念ながら存在しない。しかし免疫抑制法の改良により、その頻度を減少させ、長期生着率を改善させることは可能と考えられる。免疫抑制薬の探索研究の結果、thymoglobulin、etanercept、mycophenolate mofetil (MMF) などの新たな免疫抑制薬を加えた新しい免疫抑制レジメン、すなわち thymoglobulin/basiliximab および etanercept、CNI 阻害薬 (ネオオーラル®あるいはグラセプター®)、MMF を用いたレジメンを考案し、このレジメンによる、心停止ドナーからの膵島移植を高度医療に申請中である。

ドナー特異的免疫寛容を誘導できれば移植後一定期間後、免疫抑制薬を中止してもドナー抗原に対する免疫応答は制御され、慢性拒絶反応は完全に制御される。臨床移植医療におけるドナー特異的免疫寛容の誘導を展望し、自己制御性 T 細胞の誘導によるドナー特異的免疫寛容の誘導を目指し、以下の検討を行った。

サル同種腎移植モデルにおいて、ドナーおよびレシピエント末梢血リンパ球を抗 CD80/86 単抗体存在下で培養し、この培養細胞をレシピエント静脈内に輸注することによりドナー特異的免疫寛容の誘導が確認された。本研究の研究期間においては、ヒトリンパ球を抗 CD80/86 単抗体存在下で 2 週間共培養することにより CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>細胞が誘導され、この細胞がヒト末梢血リンパ球のリンパ球混合培

養 (MLR) を用量依存性に抑制し、regulatory T cell (Treg) であると推察された。これによってサル同種腎移植モデルで確認された末梢性免疫寛容の導入が、ヒトにおいても可能であることが示唆された。

この結果に基づいて、臨床腎移植においてこの方法を用いてドナー特異的免疫寛容の導入を試みた。すなわち lymphocytapheresis によりドナーおよびレシピエント末梢血リンパ球を採取して、ドナーリンパ球を照射後、両者を抗 CD80/86 単抗体の存在下で混合培養を行った。1 週間後に再度採取して照射したリンパ球で刺激し、さらに 1 週間混合培養を行った。この培養細胞中には CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>細胞が豊富に含まれ、これを cyclophosphamide を投与してリンパ球を減少させた後に腎移植患者に輸注した。

ドナー特異的低応答性が誘導されたか否かの確認は、ドナー抗原に対する MLR が第三者に対する MLR に比して低応答性であることを確認した上で免疫抑制薬を減量し、この過程を繰り返しつつ免疫抑制薬を漸減してゆき、最終的には免疫抑制薬を中止する。現時点では全例において対ドナー MLR でドナー特異的低応答性が認められており、免疫抑制薬を減量中である。今後移植後約 1 年から 1 年半を目処に、MLR によるドナー特異的免疫学的低応答性を確認しつつ慎重に免疫抑制薬の中止をめざす。

膵島の幹細胞は膵管介在部に存在するとされており、膵島分離・純化の過程で廃棄される外分泌細胞、間質系細胞の中に含まれていると考えられる。分離した膵島を純化すればするほど、膵島再生のための前駆細胞は減少していることになる。臨床膵島移植の長期成績が不良であることの要因のひとつとして、膵島の再生不全があげられるが、純化膵島の移植では膵島前駆細胞は欠落しており、膵島の再生は期待できない。

以上より移植膵島の再生のための前駆細胞の誘導は、臨床膵島移植の長期成績向上のためには不可欠と考えられる。本研究では、マウス膵から膵島を分離後に廃棄される外分泌細胞、間質系細

胞から、ある培養条件下で上皮系前駆細胞を選択的に増殖させ、これが膵島様組織へ分化させることが可能か否かを検討し、以下の研究結果が得られた。

マウス膵島を分離後に廃棄される外分泌細胞、間質系細胞から膵島様組織へと培養可能な前駆細胞を分離し、新規選択培養法を開発した結果、純化培養により得られた細胞にインスリン分泌細胞への転写に必要な転写因子 Ngn3 の発現が確認され、得られたインスリン産生細胞のインスリン分泌量は多く、明瞭なグルコース応答性を示し、糖尿病マウスに移植後、血糖値の低下が認められた。移植膵島の再生を可能とする膵島の前駆細胞をインスリン産生細胞に分化させる新規選択培養法を開発した。この細胞を膵島とともに移植することにより、移植膵島の再生不全を克服することが可能となると推察された。

## 5. 哺乳類由来成分を含まない新しい膵消化酵素の探索と膵島分離標準化

臨床膵島移植における膵消化酵素として用いられてきた Liberase HI (Roche 社製) の製造工程にウシ脳抽出物が用いられていたことが判明し、臨床膵島移植は中断された。今後、臨床膵島移植の再開のためには哺乳類成分を含まず、GMP 基準に準拠した新しい膵消化酵素の探索が不可欠である。この条件を満たした膵消化酵素の探索研究を行い、以下の結果が得られた。

Liberase HI と Serva 社製 Collagenase を用いたブタ膵島分離の実験において、膵組織消化に要する時間、膵組織消化率、膵島収量において両群間に有意な差を認めず、分離膵島の機能、viability において両群間に差を認めず、Serva 社製 Collagenase は Liberase HI の代替膵消化酵素として有用と考えられた。しかし Serva 社製 Collagenase の製造工程にウシ由来成分が使用されている可能性があり、以後完全な mammalian-free の膵消化酵素の探索を行い、下記の結果が得られた。

哺乳類成分をいっさい含まない新しい膵消化酵素 (Liberase-MTF)、Serva 社製 collagenase、

Liberase HI を用いてブタ膵島分離実験を多施設合同で行い、その条件、収量について検討した結果、Liberase-MTF は Serva 社製 collagenase より回収率に優れ、viability (AO/PI)、ADP/ATP 比については3群間に有意差は認められなかった。以上より、完全な mammalian-free の膵消化酵素である Liberase-MTF が臨床膵島移植にもっとも適した膵消化酵素と考えられた。

## 6. 臨床膵島移植症例の統計学的解析

膵島移植の効果と安全性に関する統計解析の手法については、現状ではわが国の膵島移植例数が限られていることから、事前情報や先行研究結果を利用すること、また多くの変数を不備なく測定するためには、長期的かつ経時的にデータを収集する必要がある、長期的データ管理を含めた研究支援体制が必要と考えられた。

上記の観点から、これまでに実施された 18 例 (34 回) の膵島移植の臨床データを解析し、膵島分離、膵島移植に影響を与える因子を検討し、下記の結果が得られた。

臨床膵移植症例の統計解析の結果、C-ペプチド値の上昇、インスリン投与量の減少、低血糖出現頻度の減少、HbA1c の改善など、血糖管理の安定化が得られたことが明らかとなった。

移植膵島の長期機能については、C-peptide 分泌からみた膵島生着率は 1 年で 73.3%、2 年で 58.7%であった。また移植術および免疫抑制薬による合併症は非常に少なく、その安全性が確認された。

さらに初回膵島移植後の C-peptide、HbA1c などの各パラメーター間の関係を、相関係数や回帰モデルを用いて検討し、これらを臨床膵島移植の再開に向けた臨床試験実施計画書の作成に反映させた。

これまでに実施された 18 例 (34 回) の膵島移植における臨床データを用いて、膵島分離、膵島移植に影響を与える因子を多変量解析により検討した結果、心停止ドナーからの膵島分離成功率は 53% (34 回/64 回) であり、膵島分離成功に有意に寄与する因子として冷阻血時間が短いこと、

保存液として Kyoto 液を使用することがあげられた。

心停止ドナーから複数回の膵島移植を受けた場合における移植膵島の生着率は、1年 100%、2年 80%、3年で 57.1%であり、移植膵島生着に寄与する因子としてドナー死戦期における低血圧持続時間があげられた。

膵島移植の効果と安全性に関する統計解析の手法については、現状ではわが国の膵島移植例数が限られていることから、事前情報や先行研究結果を利用すること、また多くの変数を不備なく測定するためには、長期的かつ経時的にデータを収集する必要がある、長期的データ管理を含めた研究支援体制が必要と考えられた。

哺乳類成分を含まず GMP 基準をクリアした膵消化酵素が入手可能となり、thymoglobulin/basiliximab および etanercept、CNI 阻害薬（ネオーラル®あるいはグラセプター®）、MMF を用いた新しい免疫抑制プロトコールによる、心停止ドナーからの膵島移植が高度医療として再開される見通しであるが、その臨床試験実施計画書を作成した。さらに研究の全体スケジュール、観察・検査・報告スケジュールを整理し、それらに沿う形で症例報告所を作成した。

## 7. 臨床膵島移植症例における安全性の確認

### 1) Liberase HI のプリオン感染の可能性に関する検討

これまでに臨床膵島移植を実施した 18 例（34 回）の安全性を確認するために、Liberase HI に BSE プリオンが混入しているか否かについて検討した。すなわち動物衛生研究所プリオン研究センター毛利資郎所長に研究委託を行い、BSE プリオン蛋白質遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスの脳内に Liberase HI を注入し、BSE プリオンのバイオアッセイを行った。

Liberase HI は強力な消化酵素活性を有するため、加熱による酵素活性の失活が必要であった。また接種部位を脳内接種から腹腔内接種に切り替えて経過を観察した。不活化 Liberase HI をマウス腹腔内に接種して、免疫染色法および

Western blotting (WB) 法を用いてウシ由来プリオンの検出を行った結果、免疫染色法、WB 法によってもマウス腹腔内にウシ由来プリオンは検出限界以下であった。Liberase HI 50mg 中に BSE ウシ脳 0.05mg に相当するプリオン感染価は含まれていないことが明らかとなった。

### 2) 臨床膵島移植症例の follow-up

CJD 専門神経内科医の協力のもとに全国的な膵島移植患者の follow-up 体制を構築し、患者へのカウンセリング、検査などを行った結果、これまでに CJD の発症を疑わせる事例は存在しないことが判明した。今後とも慎重かつ、厳格な follow-up 体制のもとで、患者の安全を確認してゆく必要がある。

## 8. 臨床膵島移植におけるエンドポイントの設定

従来、膵島移植の有効性についてはインスリン離脱と C-peptide 値が用いられてきたが、より長期の総合的な評価の指標として、低血糖の頻度の減少、HbA1c 値の改善など血糖管理の安定化、糖尿病合併症の進展防止、QOL の向上、移植手技および免疫抑制による有害事象などについて検討を行った結果、膵島移植の有効性評価についてはインスリン離脱、C-peptide 値のみでなく、より有効なリスク・ベネフィット評価には、低血糖の発生頻度の減少、HbA1c 値改善など血糖管理の安定化、糖尿病合併症の進展防止、QOL の向上、免疫抑制薬による有害事象などがより長期の総合的な評価の指標として重要となることが確認された。

哺乳類成分を含まず GMP 基準に準拠した、Liberase HI に代わりうる膵消化酵素が入手できなかったため、わが国における臨床膵島移植が再開されなかったことから、米国 Clinical Islet Transplantation (CIT) Study のプロトコール (CIT-06 および CIT-07) のプライマリーエンドポイントを用いて、国内 18 症例（34 移植）の評価を行い、下記の結果が得られた。なお主要評価項目を初回膵島移植 1 年後の HbA1c 7.0 以下かつ重症低血糖発作の消失とし、期待割合を 70%、閾値割合を 40%、検定の有意水準を片側 5%、検出

力を 80%として、20 人を目標サンプルサイズとした。

CIT 臨床試験のエンドポイントとして CIT-06 では移植後 1 年後 HbA1c<6.5%かつ重症低血糖発作の消失とされ、CIT-07 では移植後 1 年後 HbA1c<7.0%かつ移植後 1 年間の重症低血糖発作の消失である。国内 18 症例中 14 例で初回移植 1 年後の HbA1c が測定されており、HbA1c<7.0%は 14 例中 10 例であり、HbA1c<6.5%は 14 例中 5 例であった。

エンドポイントとしての重症低血糖については、わが国の臨床膵島移植症例においては調査がなされていないため解析できなかった。重症低血糖の有無、その程度、頻度は患者の QOL にとって非常に重要な指標であり、膵島移植前および後に必ず調査し評価項目とするのが妥当と考えられた。

国内臨床膵島移植実施例の臨床データを用いて、Secretory Unit of Islet Transplant objects (SUITO) index の有用性について検討を加えた結果、SUITO index は、空腹時血中 c-peptide 濃度 (ng/dL) / [空腹時血糖値 (mg/dL) - 63] x 1500 で求められ、健常者を 100%として移植膵島の生着数が算出される計算式であり、30 以上でインスリンからの離脱が可能となり、10 以上で QOL の改善が得られるが、10 未満の場合は QOL の改善は認められなかった。SUITO index はインスリン減少率と高い相関が認められ、有用な指標と考えられた。

## 9. QOL 評価と臨床膵島移植の総合的検討

3 年間の研究期間において下記の研究結果が得られた。

1 型糖尿病患者 (膵島移植未登録)、膵島移植待機患者、膵島移植患者の QOL 調査の結果、医療サイドと患者間の認識のずれ、両者のコミュニケーションの問題が示唆され、QOL 向上のためには患者が膵島移植に何を期待しているかを把握し、これを IC に反映させ、患者と医療サイド間の認識のずれを最小化し、患者の満足度を改善することが重要と考えられた。

膵島移植医療においては QOL の改善、満足度の向上が重要であり、前年度までに行った 778 件の医療相談の内容をカテゴリ分けし、糖尿病患者の特異的 QOL 尺度について検討した。これらの作業後 5 段階の Likert 型尺度を持つ、8 分野合計 50 項目からなるアンケート用紙を作成し、その過程において糖尿病専門医および統計専門家により、新規尺度の内容妥当性について検討した。上記の過程で作成されたアンケート用紙を用いて 108 名の 1 型糖尿病患者に対して調査を行った。

108 名の 1 型糖尿病患者に対するアンケート調査の結果、8 割以上がインスリン治療からの開放を希望し、移植医療に対する興味や期待を有していたが、実際に膵島移植を希望する割合は 66%に止まった。移植希望者と非希望者の糖尿病罹病期間については、前者で 8.4±8.2 年、後者で 12.5±8.2 年と希望者で有意に短かった。低血糖症状の頻度は前者で 13.7±17.9 回/月、後者で 9.1±7.8 回/月で希望者に多い傾向にあった。しかし無自覚性低血糖の頻度は、前者で 12.0±27.4 回/月、後者で 2.2±2.8 回/月であり、移植希望者で有意に多かった。

また上記調査の結果、QOL に影響する因子として、低血糖症状≥5 回/月以上、女性、40 歳以上、成人発症糖尿病、罹病期間<3 年などがあげられた。

患者の健康状態全般を反映する short-form health survey (SF-36)、糖尿病患者の QOL を反映する Diabetes Form 2.1、インスリン治療の満足度を反映する Insulin treatment satisfaction questionnaire (ITSQ) を膵島移植前および膵島移植後の患者を対象として実施し、評価検討を加えた。

さらに前年度までの患者意向調査を踏まえ、また今回の SF-36、Diabetes Form 2.1 および ITSQ による患者意識調査を踏まえ、患者にとって必要であると判断された情報を網羅した患者用小冊子を作成した。これは患者の治療選択における自律性 (オートノミー) を支援することが目的である。

1型糖尿病患者の88%が低血糖症状からの解放を、86%がインスリン治療からの離脱を希望し、88%が膵島移植への興味を示した。他方、60%が膵島移植により1型糖尿病から解放されると考えており、94%が合併症に対して不安や恐怖を持っていることが判明した。患者の治療選択の際には医学的な情報のみでなく、患者が意思決定の際に必要な情報を提供することが重要と考えられた。

上記の患者が必要とすると考えられる情報を網羅した患者用小冊子の作成は、患者の治療選択におけるオートノミーを支援する観点から大変重要と考えられた。

#### D. 結論

1. 膵消化の条件、膵島分離法および純化法については、臨床膵島移植の再開に向けて標準化が達成された。

2. 膵島移植の有効性の確立、成績の向上のためには、分離膵島の viability 評価ならびに機能評価の標準化が必要であり、これらについてはほぼ達成できた。

3. 現状では新鮮膵島の移植が原則であるが、将来的には膵島を保存しておき、患者が必要とする時に直ちに移植を可能とするシステム、すなわち膵島のバンキングシステムが必要と考えられる。そのためには膵島の長期保存法の開発が不可欠であるが、分離膵島の保存法については基本的には臨床で使用可能な方法を開発しえた。今後さらに保存膵島の viability および機能の改善を目指し、安全かつ効率的な長期保存法確立のために、条件設定など細部における改善が必要と考えられる。

4. 移植後膵島傷害の機序については、移植膵島に対する肝内の NKT 細胞を介する活性化好中球による傷害、High-mobility group box 1 (HMGB1) による傷害、オートファジー様細胞死などの関与が解明され、これらは真にオリジナルな研究成果といえる。

また移植膵島傷害の制御法の探索的研究にお

いても、アデノシンおよびアデノシントランスポーター阻害薬である dypiridamole、さらには $\alpha$ -galactosylceramide などによる NKT 細胞を介する活性化好中球による傷害の制御法の開発、PPAR $\gamma$  アゴニストである pioglitazon を用いた HMGB1 放出による膵島傷害の制御、3-methyladenine を用いたオートファジー様細胞死の制御法の開発、さらにヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 遺伝子発現による CD8<sup>+</sup>細胞の細胞傷害活性の抑制などの成果は、わが国から世界へ発信できる研究成果と言えるであろう。

5. 自己制御性 T 細胞 (TReg) の誘導による末梢性ドナー特異的免疫寛容の導入は、non-human primate では他に例を見ない成果であり、現在臨床腎移植でその効果を確認中である。

6. 膵島分離後に廃棄される外分泌細胞、間質系細胞から膵島様組織へと培養可能な前駆細胞を分離し、インスリン分泌細胞への分化を可能とする新規選択培養法を開発した。この細胞を膵島とともに移植することにより、移植膵島の再生不全を克服することが可能となると推察された。

7. 臨床膵島移植の再開を目指して免疫抑制薬の探索研究を行い、thymoglobulin/basiliximab、etanercept、CNI 阻害薬 (ネオーラル<sup>R</sup>あるいはグラセプター<sup>R</sup>)、MMF を用いた新しい免疫抑制レジメンを考案し、このレジメンによる、心停止ドナーからの膵島移植を高度医療に申請中である。

8. 哺乳類由来成分を含まず、GMP 基準に準拠した新しい膵消化酵素の探索研究の結果、Liberase-MTF がもっとも適した酵素であることが確認され、Liberase-MTF による膵島分離の標準化についても、ほぼ達成できた。

9. 膵島移植の臨床データを統計学的に解析し、C-ペプチド値の上昇、インスリン投与量の減少、低血糖出現頻度の減少、HbA1c の改善など、血糖管理の安定化が得られたことが明らかとなった。また膵島分離、膵島移植に影響を与える因子を多変量解析により検討した結果、冷阻血時間および保存液が重要であることが明らかとなった。解析



の結果に基づいて、臨床膵島移植の再開のための臨床試験実施計画書を作成し、高度医療へ申請中である。

10. これまで臨床膵島移植に使用されてきた Liberase HI において、ウシ由来プリオンの検出を行った結果、免疫染色法、WB 法によってもマウス腹腔内にウシ由来プリオンは検出限界以下であった。Liberase HI 50mg 中に BSE ウシ脳 0.05mg に相当するプリオン感染価は含まれていないことが明らかとなった。

11. これまでわが国で実施された 18 例の膵島移植患者の CJD 専門神経内科医による調査では、種々の検査、診察の結果、現在までに CJD に関連した何らかの症状、検査所見はいっさい認められなかった。

12. 臨床膵島移植におけるエンドポイントについては、インスリン離脱、C-peptide 値に加えて、重症低血糖の消失、HbA1c 値改善、さらに SUITO index が採用され、最終的な臨床膵島移植再開に向けての実施計画書が完成し、現在高度医療に申請中である。

13. 膵島移植患者、移植待機患者、未登録糖尿病患者に対する QOL 調査、医療相談の内容をカテゴリ分けして糖尿病患者の特異的 QOL 尺度について検討し作成したアンケート表、SF-36、Diabetes Form 2.1 および ITSQ を用いて膵島移植前および膵島移植後の患者を対象として実施し、これらを踏まえ患者にとって必要であると判断された情報を網羅した患者用小冊子を作成した。

新しい細胞治療の臨床導入に向けては、基礎的研究、臨床例の統計解析、有用性評価、QOL 調査などの結果を、研究、臨床に feed-back し、よりよい研究モデル、医療モデルを構築することが重要である。

## E. 研究発表

### 1. 主な論文発表

- 1) Kido R., Shibagaki Y., Iwadoh K., Nakajima I., Fuchinoue S., Fujita T., Teraoka S.: How do

living kidney donors develop end-stage renal disease?. Am J Transplant 9(11):2514-2519,2009

- 2) Nyumura, I, Honda K, Babazono T, Taneda S, Horita S, Teraoka S, Yamaguchi Y, Iwamoto Y, Oda H: A long-term prevention of diabetic nephropathy in a patient with type 1 diabetes after simultaneous pancreas and kidney transplantation.. Clin Transplant 23 Suppl 20:54-57,2009
- 3) Sawada T, Ishii Y, Nakajima I, Fuchinoue S, Kubota K, Teraoka S: An experimental model of encapsulating peritoneal sclerosis.. Perit Dial Int 29 Suppl 2:S49-S50,2009
- 4) 寺岡 慧: 腎移植の免疫反応. [高橋公太 (監)、相川 厚、高原史郎、寺岡 慧、星長清隆、吉村了勇、他 (編)]腎移植のすべて:242-253, 2009
- 5) 矢嶋淳、唐仁原全、中島一朗、渕之上昌平、寺岡慧: 移植腎慢性拒絶反応に関する危険因子と治療効果の検討. 移植 44(6):592-599,2009
- 6) 寺岡慧: 臓器移植法の改正への取り組み 臓器移植法改正をめぐる移植学会ならびに関連学会の取り組み. 移植 44(5):375-390,2009
- 7) 石川亜矢子、宮尾眞輝、相馬泉、村上淳、金子岩和、久野正貴、峰島三千男、服部元史、渕之上昌平、寺岡慧、秋葉隆: 肝移植するも再発し救命できなかった小児劇症肝炎の1症例. 日本小児腎不全学会雑誌 29:290-291,2009
- 8) 杉田依里、久野正貴、藤木拓磨、黒田奈緒、藤井寛、近本裕子、秋岡祐子、石田英樹、田邊一成、寺岡慧、大澤真木子、服部元史: 小児血液型不適合腎移植における脾臓摘出とリツキシマブ投与の比較検討. 日本小児腎不全学会雑誌 29:192-194,2009
- 9) 松村英樹、梶保祐子、倉山亮太、藤木拓磨、藤井寛、久野正貴、近本裕子、秋岡祐子、渕之上昌平、寺岡慧、服部元史: 原発性高尿酸血症1型の2歳児に対する生体肝腎複合移植

の経験. 日本小児腎不全学会雑誌  
29:170-172,2009

- 10) 藤木拓磨、久野正貴、藤井寛、松村英樹、黒田奈緒、田中絵里子、三浦健一郎、近本裕子、秋岡祐子、瀧之上昌平、寺岡慧、金光泉、家後理枝、田邊一成、桑鶴良平、藤永周一郎、服部元史: 献腎移植後に移植尿管狭窄と移植腎動脈狭窄をきたした1例. 日本小児腎不全学会雑誌 29:162-164,2009
- 11) 梶保祐子、秋岡祐子、倉山亮太、藤木拓磨、松村英樹、藤井寛、田中絵里子、三浦健一郎、近本裕子、小山一郎、瀧之上昌平、寺岡慧、服部元史: 献腎移植後に腎実質に広範な石灰化をきたした1例. 日本小児腎不全学会雑誌 29:159-161,2009
- 12) 寺岡慧: 【わが国における臓器移植の現況と将来展望 脳死移植実施10周年を記念して】回顧録 わが国に脳死移植が発展しない理由. 移植 44(特別号):S6-S9,2009
- 13) 瀧之上昌平、寺岡慧: 【リツキシマブによる抗体抑制 腎移植を中心に】リツキシマブを用いたABO血液型不適合腎移植の経験. 今日の移植 22(2):187-192,2009
- 14) 寺岡慧: 【生体移植医療の実際】生体腎移植最近の進歩と今後の課題. 医学と薬学 61(3):321-329,2009
- 15) 寺岡 慧. 膵臓移植における免疫抑制療法. [出月康夫、野沢真澄 (監)、寺岡 慧、伊藤壽記 (編)]膵臓移植—糖尿病根治を目指して: 225-256, 2008
- 16) 寺岡 慧. 移植膵の非免疫学的傷害. [出月康夫、野沢真澄 (監)、寺岡 慧、伊藤壽記 (編)]膵臓移植—糖尿病根治を目指して: 201-214, 2008
- 17) 伊藤壽記、寺岡 慧. 移植膵の長期予後. [出月康夫、野沢真澄 (監)、寺岡 慧、伊藤壽記 (編)]: 371-377, 2008
- 18) 寺岡 慧. 膵臓移植の現況と課題. プラクティス別冊糖尿病の治療 新たなる展開: 113-119,2008

- 19) 寺岡 慧. 膵臓移植と膵島移植. 消化器外科学レビュー2009: 159-165,2009
- 20) 中島一朗、寺岡 慧. マージナルドナーからの膵臓移植. Organ Biology15(2): 129-137,2008
- 21) 瀧之上昌平、寺岡 慧. 【腎移植】腎移植の実際 糖尿病性腎症と腎移植. 臨床検査 52(7):778-782,2008
- 22) Satoshi T. Do patients who are aged 70 years or over benefit from deceased donor renal transplantation? Nature Clinical Practice Nephrology. 3:484-485, 2007
- 23) 寺岡 慧. 免疫抑制薬としての分子標的治療薬. Annual Review 腎臓 2008:153-170, 2008
- 24) 寺岡 慧. 腎臓移植. からだの科学(255): 155-170, 2007

## 2. 主な学会発表

### 1) 口頭・ポスター発表等

- 1) 松野直徒、竹内裕紀、平野俊彦、浦島良典、川瀬友則、寺岡慧: 腎移植におけるステロイド減量、離脱のためのCOR IC50の有用性. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
- 2) 萩野梓、岩藤和広、今泉理枝、三木克幸、工藤真司、石井保夫、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 糖尿病性腎症に対する腎移植におけるステロイドfreeプロトコールの有用性の検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
- 3) 久都内慶子、三宮彰仁、富田祐介、添野真嗣、関島光裕、白井博之、村上徹、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 高度石灰化に対し動脈内膜摘除術及び人工血管による動脈形成後に生体腎移植をし得た2症例. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
- 4) 折本小夜子、松野直徒、本間静、関真美、佐藤松子、浦島良典、川瀬友則、寺岡慧: 電子カルテを用いた腎移植患者の病棟薬剤管理. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
- 5) 村上徹、小川勇一、岩藤和広、関島光裕、工藤真司、白井博之、石井保夫、三宮彰仁、小

- 山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 腎移植後ニューモシスチス肺炎患者に関する検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
- 6) 白井博之、久都内慶子、富田祐介、関島光裕、岩藤和広、三宮彰仁、村上徹、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 腎移植後に発症したPTLD症例の検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 7) 岩藤和広、瀧之上昌平、甲斐耕太郎、石井保夫、三宮彰仁、村上徹、小山一郎、中島一朗、服部元史、田邊一成、寺岡慧: 腎移植後の発癌の現状と分析. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 8) 木戸亮、柴垣有吾、岩藤和広、中島一朗、瀧之上昌平、藤田敏郎、寺岡慧: 顕微鏡的血尿を呈する生体腎移植ドナーの提供後腎機能. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 9) 澤田登起彦、瀧之上昌平、寺岡慧、窪田敬一: ABO血液型不適合臓器移植とRituximab 臨床への導入・現状・展望. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 10) 石井保夫、岩藤和広、萩野梓、今泉理枝、三木克幸、工藤真司、三宮彰仁、村上徹、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 単独施設における高齢ドナー(65歳以上)からの生体腎移植の長期成績について. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 11) 矢嶋淳、岩藤和広、加藤容二郎、唐仁原全、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 移植腎慢性拒絶反応症例の解析. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 12) 今泉理枝、岩藤和広、石井保夫、甲斐耕太郎、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、田邊一成、寺岡慧: 当院における2次腎移植の検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 13) 石塚敏、石井保夫、安尾美年子、二ツ山和也、吉野敏栄、寺岡慧: 腎移植後における可溶性CD30と臨床的パラメーターとの相関性. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 14) 西村勝治、小林清香、岡部祥、石田英樹、田邊一成、寺岡慧、石郷岡純: 生体腎の提供意思はどのように決定されるか 質的アプローチによる検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 15) 水谷誠、梶保祐子、古山政幸、石塚喜世伸、藤井寛、近本裕子、秋岡祐子、瀧之上昌平、寺岡慧、服部元史: 脾摘後に先行的腎移植を行った肝線維症を合併した常染色体劣性多発性嚢胞腎の2小児例の検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 16) 入村泉、馬場園哲也、本田一穂、田邊一成、寺岡慧、小田秀明、岩本安彦: 腎移植後の糖尿病性腎症患者における尿中アルブミン排泄量と移植腎病理組織変化の関連性の検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 17) 岩藤和広、甲斐耕太郎、石井保夫、三宮彰仁、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 腎移植維持期におけるcyclosporineからtacrolimusへの変更例の検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 18) 川瀬友則、浦島良典、鈴木貫太郎、松野直徒、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 当施設での早期ステロイド離脱プロトコルによる腎移植の検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 19) 甲斐耕太郎、岩藤和宏、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、服部元史、田邊一成、寺岡慧: MMFは腎移植の長期成績を改善するか. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 20) 関島光裕、岩藤和広、甲斐耕太郎、石井保夫、三宮彰仁、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 当科における血縁間および配偶者間生体腎移植における移植腎生着率の検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 21) 富田祐介、岩藤和広、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、田邊一成、寺岡慧: 腎移植後の心血管系疾患合併症についての検討. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
  - 22) 工藤真司、中島一朗、村上徹、小山一郎、瀧

- 之上昌平、馬場園哲也、岩本安彦、寺岡慧: 移植膵血栓の機序とその対策 移植膵血栓症に関与する因子と抗血栓療法. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
- 23) 小山一郎、場集田寿、清野研一郎、村上徹、中島一朗、瀧之上昌平、奥村康、八木淳二、藤井壽一、寺岡慧: 臓器移植における免疫寛容の誘導 腎移植における末梢性免疫寛容の導入. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
- 24) 三宮彰仁、関島光裕、工藤真司、白井博之、石井保夫、村上徹、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: ABO血液型不適合移植の現状と今後の展望 rituximab投与脾臓温存 ABO血液型不適合腎移植の成績. 第45回日本移植学会総会. 2009年9月. 東京
- 25) 石塚敏、安尾美年子、吉野敏栄、二ツ山和也、寺岡慧: 腎移植におけるドナー特異的抗体検出法の検討. 第58回日本医学検査学会. 2009年7月. 横浜
- 26) 河原崎宏雄、柴垣有吾、木戸亮、福本誠二、寺岡慧、藤田敏郎: 腎移植後1年の高Ca血症、低P血症発症の移植前リスク因子. 第54回日本透析医学会総会. 2009年6月. 横浜
- 27) 三木克幸、白井博之、村上徹、関島光裕、添野正嗣、三宮彰仁、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 生体腎移植と同時に両側自己腎摘出を施行し術後副腎不全を呈した常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の1症例. 第54回日本透析医学会総会. 2009年6月. 横浜
- 28) 倉山亮太、藤井寛、近本裕子、秋岡祐子、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧、秋葉隆、服部元史: 血漿交換療法を繰り返すことで移植腎機能廃絶が回避できた生体腎移植後劇症型FSGS再発の1例. 第54回日本透析医学会総会. 2009年6月. 横浜
- 29) 岩藤和広、瀧之上昌平、白井博之、工藤真司、加藤容二郎、甲斐耕太郎、石井保夫、三宮彰仁、村上徹、小山一郎、中島一朗、寺岡慧: 腎移植における6年間の使用経験からみた Basiliximabの有用性の検討. 第54回日本透析医学会総会. 2009年6月. 横浜
- 30) 寺岡慧: 腎移植における免疫寛容の導入. 第54回日本透析医学会総会. 2009年6月. 横浜
- 31) 近本裕子、石塚喜世伸、倉山亮太、梶保祐子、藤木拓磨、藤井寛、久野正貴、秋岡祐子、田邊一成、寺岡慧、服部元史: 小児末期慢性腎不全患者における多次腎移植の検討. 第44回日本小児腎臓病学会. 2009年6月. 東京
- 32) 倉山亮太、梶保祐子、石塚喜世伸、藤木拓磨、藤井寛、近本裕子、秋岡祐子、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧、楊国昌、服部元史: 透析導入14年後に生体腎移植を施行したが、移植直後に再発し移植腎機能が急激に低下したFSGSの1例 病因と病態の検討. 第44回日本小児腎臓病学会. 2009年6月. 東京
- 33) 寺岡慧: 腎移植 up to date. 第44回日本小児腎臓病学会. 2009年6月. 東京
- 34) 寺岡慧: 探索医療の成果としての膵島移植医療の確立. 新しい医療機器研究 14:97-98,2009, 東京
- 35) 甲斐耕太郎、岩藤和広、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、服部元史、田邊一成、寺岡慧: ミコフェノール酸モフェチル(MMF)は腎移植の長期成績を改善するか. 第109回日本外科学会定期学術集会. 2009年4月. 福岡
- 36) 白井博之、小川勇一、工藤真司、石井保夫、三宮彰仁、岩藤和広、小山一郎、中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 腎移植におけるB型肝炎ウイルスの与える影響についての検討. 第109回日本外科学会定期学術集会. 2009年4月. 福岡
- 37) 中島一朗、瀧之上昌平、寺岡慧: 鏡視下ドナー腎摘術 500症例の検討. 第109回日本外科学会定期学術集会. 2009年4月. 福岡
- 38) ABO incompatible kidney transplantation. Teroaka S. Conjoint Annual Scientific Congress, Royal Australasian College of Surgeons and The College of Surgeons of Hong Kong,2008