

**Figure 4.** Flow cytometric analysis of cell surface molecules following EGCG treatment. C57Bl/6 splenocytes were either untreated or treated with EGCG ( $400 \mu\text{M}/10^7$  cells), stained with epitope-specific monoclonal antibodies and analyzed by FACScan. Representative results are shown.

a SPF condition and fed with sterilized water and food ad libitum. Then the animals were intraperitoneally injected with C57BL/6 splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells) either untreated or treated with  $200 \mu\text{M}$  EGCG/ $10^7$  cells. The mice were examined daily for mortality for a period of 17 days. Another set of animals that had been similarly treated was sacrificed on day 7 to examine the proliferation of grafted donor splenocytes. The splenocytes were stained with donor-specific fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse major histocompatibility complex 1 (MHC 1; H-2K<sup>b</sup>) monoclonal antibody (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) and analyzed on a FACScan flow cytometer.

#### Statistical Analysis

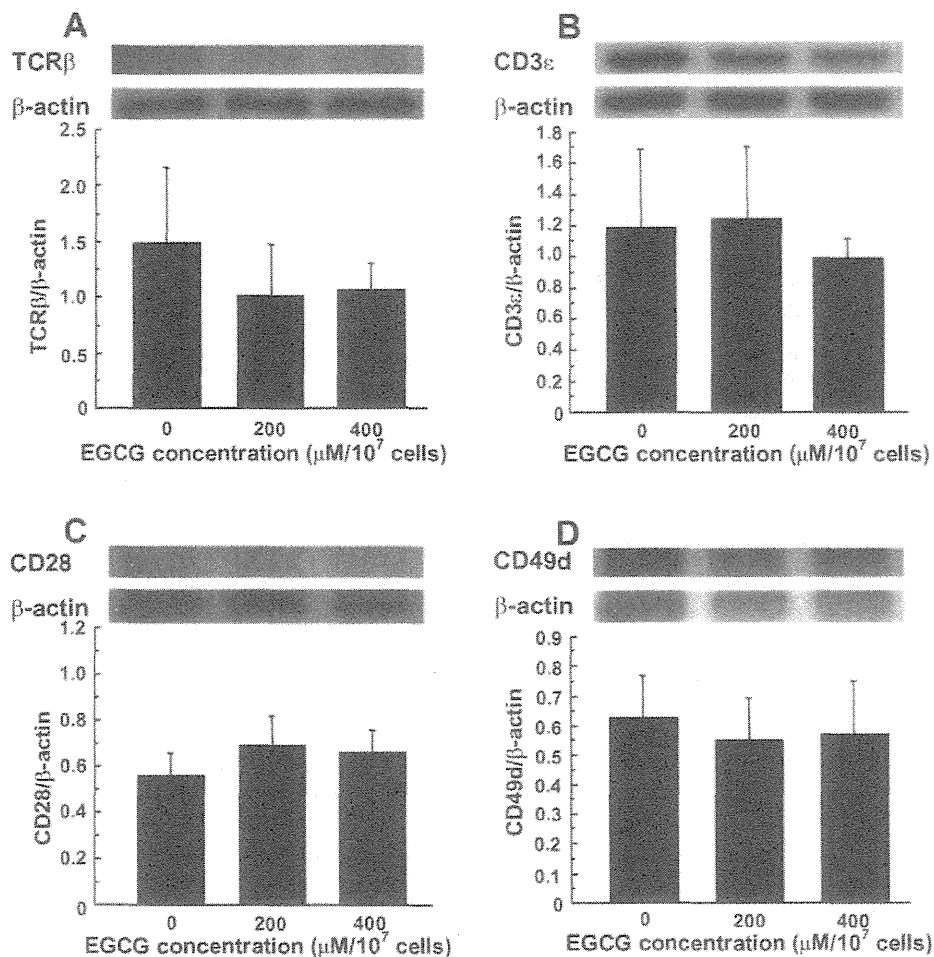
Statistical analyses were performed on a computer using StatView 5.0.1 (SAS Institute, Cary, NC) and STATISTICA 6.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK) software

for Windows. In most experiments, one-way ANOVA was performed and the significance of differences between groups was examined by Fisher's PLSD test. For analyzing the proportion of live cells from splenocyte cultures with respect to the effects of time and EGCG dosage, two-way ANOVA was performed to calculate the significance of each effect. For the data on mouse survival, Kaplan-Meier survival curves were constructed, and log-rank values were compared between treatment groups.

## RESULTS

### EGCG Inhibits Murine MLR Activity

We first examined the effects of EGCG treatment of responder T cells on their MLR activity. EGCG treatment of murine splenocytes significantly decreased T-cell proliferation in both one-way and two-way MLR



**Figure 5.** Effects of EGCG on the production of cell surface molecules in splenocytes. C57Bl/6 splenocytes were either untreated or treated with EGCG (200 and 400  $\mu\text{M}/10^7$  cells) and subjected to Western blot analyses for the expression of T-cell receptor (TCR) $\beta$  (A), cluster of differentiation (CD) $3\epsilon$  (B), CD28 (C), and CD49d (D). Densitometric analysis of individual values was presented as relative intensity against  $\beta$ -actin. Data are mean  $\pm$  SD density ratios for triplicate samples, and the differences between treated and untreated groups for any of these molecules were not significant ( $p > 0.05$ ).

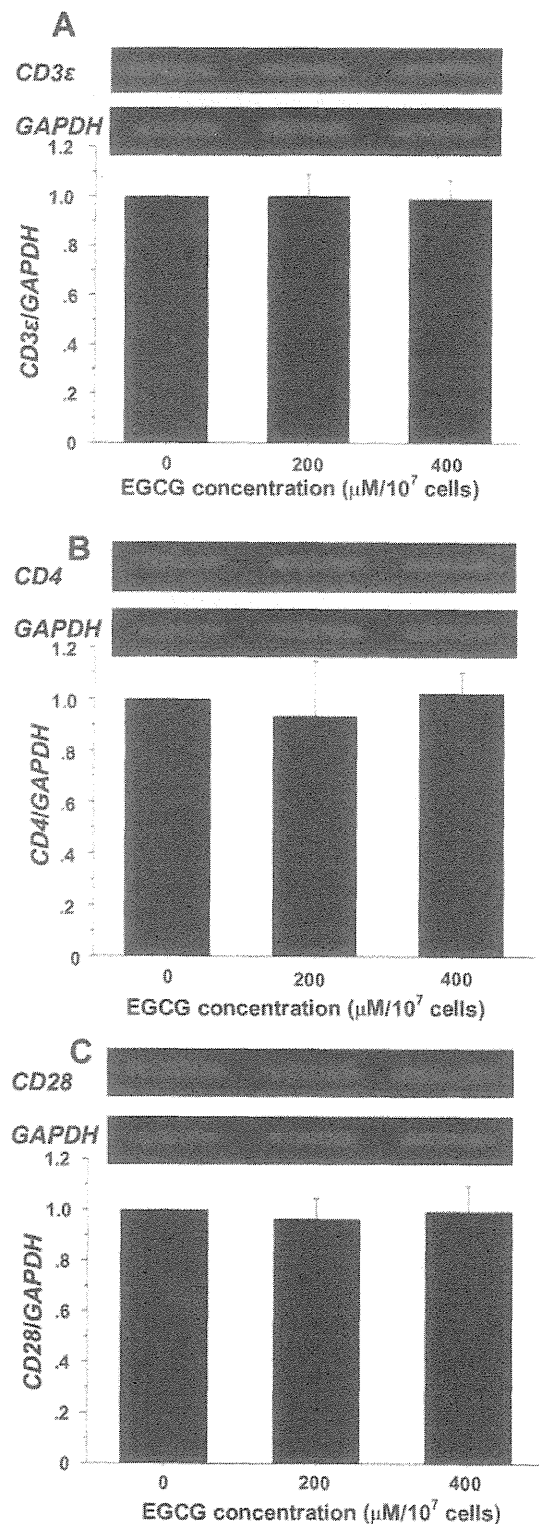
cultures (Fig. 1). The responder cells (C57BL/6, H-2<sup>b</sup>) without EGCG treatment recognized the stimulator cells (BALB/c, H-2<sup>d</sup>) as foreign and showed proliferation, but when the responder cells were treated with 200 or 400  $\mu\text{M}$  EGCG/ $10^7$  cells, the proliferation was attenuated down to about 50% of the untreated control. In two-way MLR, where both responder and stimulator cell populations were capable of proliferation, EGCG treatment attenuated the proliferation down to about 40% of the untreated control.

Parallel to this attenuation of T-cell proliferation, the production of cytokines was also attenuated. The amount of IL-2 and INF- $\gamma$  produced in both one-way and two-way MLR cultures significantly decreased when responder cells were treated with EGCG before coculturing

with stimulator cells (Fig. 2). To rule out the possibility that the direct toxicity of EGCG on the T cells might contribute to the reduction of T-cell proliferation, EGCG-treated C57BL/6 splenocytes were incubated alone. For all treatments, the cell viability dropped steadily with time, but EGCG treatment slightly increased the viability (Fig. 3).

#### *Reduced Detection of Cell Surface Molecules by EGCG Treatment*

To determine the mechanism that EGCG treatment attenuated the MLR activity of T cells, we further analyzed the blocking effects of EGCG on the cell surface molecules of T cells. Antibody-specific detection of epitopes for some cell surface molecules expressed on T



cells was reduced by EGCG treatment, but the levels of reduction varied among different cell surface molecules (Table 1). While a moderate to strong reduction was observed for CD3 $\epsilon$ , CD4, CD28, and CD49d, no substantial reduction was observed for TCR $\alpha\beta$  (Fig. 4, Table 1). Detection of other molecules such as CD2 and CD11a was also reduced but the degree of reduction was lower than that of CD3 $\epsilon$ , CD4, CD28, or CD49d (Table 1).

#### *The Production of Cell Surface Molecules Is Not Downregulated by EGCG*

To test if EGCG treatment downregulates the production of cell surface molecules of T cells, we further analyzed protein expression for some cell surface molecules by Western blot analysis. The amount of the proteins did not significantly differ between EGCG-treated and untreated splenocytes (Fig. 5). This was apparent not only for TCR (Fig. 5A), but also for other molecules such as CD3 $\epsilon$ , CD28, and CD49d (Fig. 5B–D).

#### *EGCG Does Not Reduce the mRNA Expression of Cell Surface Molecules*

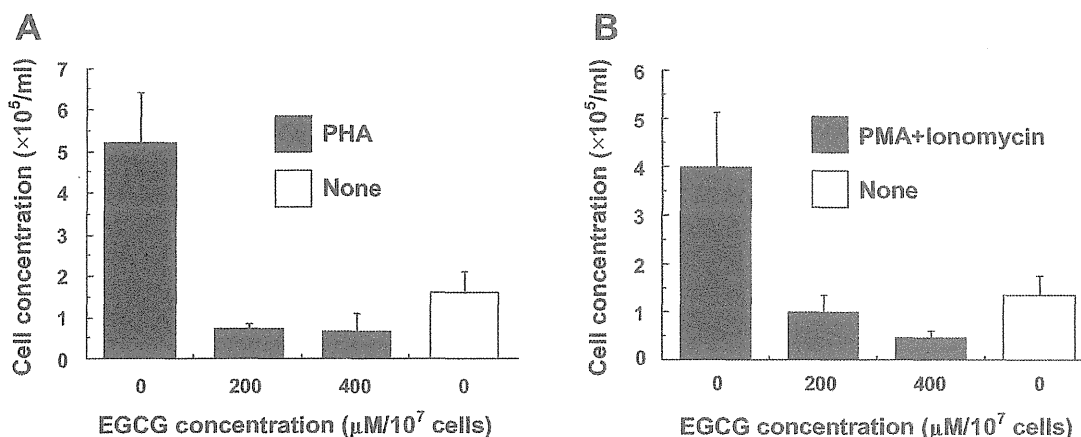
To examine if EGCG affects the cell surface molecules at a transcription level, mRNA expression was analyzed for CD3 $\epsilon$ , CD4, and CD28, whose epitope detection was reduced by more than 35% by 200  $\mu\text{M}$  EGCG. The results indicated that EGCG treatment did not significantly change the gene expressions, suggesting that it did not attenuate the transcription of these genes (Fig. 6).

#### *Proliferation Arrest in Mitogen-Stimulated Cells by EGCG*

To test if EGCG also inhibit the proliferating effects of exogenous mitogens, cell proliferation was assayed on mitogen-stimulated splenocytes. Results indicated that the proliferation of EGCG-treated cells after the stimulation with T-cell mitogens, PHA, or a combination of PMA and ionomycin significantly decreased (Fig. 7).

#### FACING COLUMN

**Figure 6.** Effects of EGCG on mRNA expressions of CD3 $\epsilon$ , CD4, and CD28 in splenocytes. C57Bl/6 splenocytes were either untreated or treated with EGCG (200 and 400  $\mu\text{M}/10^7$  cells) and subjected to the mRNA analysis for CD3 $\epsilon$  (A), CD4 (B), and CD28 (C). Densitometric analysis of individual values for EGCG-treated samples in three independent experiments is presented. Data are mean  $\pm$  SD density ratios for triplicate EGCG-treated samples relative to control, and the differences between treated and control groups for any of these signals were not significant ( $p > 0.05$ ).



**Figure 7.** Effects of EGCG on proliferative capacity of mitogen-stimulated splenocytes. C57Bl/6 splenocytes were either untreated or treated with EGCG (200 and 400  $\mu\text{M}/10^7$  cells), and then stimulated with phytohemagglutinin (PHA) (A) or a combination of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin (B), and cell numbers were counted 72 h after cultures. Open columns indicate the response without mitogen. Data are mean  $\pm$  SD cell concentrations for triplicate samples. (A) Differences were significant between untreated (0  $\mu\text{M}$ ) and treated (200 or 400  $\mu\text{M}$ ) groups ( $p < 0.0001$ ) or no mitogen group ( $p < 0.0002$ ). (B) Differences were significant between untreated and treated groups ( $p < 0.0004$ ) or no mitogen group ( $p < 0.0008$ ).

#### *EGCG Treatment Moderately Improved Survival of GVHD Mice*

We next investigated the effects of EGCG treatment of donor cells on the survival of GVHD-induced mice. The injection of untreated splenocytes resulted in a 50% survival time of 8 days, while that of EGCG-treated splenocytes extended the survival time to 10 days (Fig. 8A). In groups of immunocompromized mice that were injected with donor splenocytes without EGCG treatment, approximately 18% of the total splenocytes were H-2K<sup>b</sup>-positive donor-derived cells (Fig. 8B). In contrast, in mice injected with EGCG-treated splenocytes, only 5% were donor-derived cells.

#### DISCUSSION

In this study, we have shown that EGCG can attenuate allorecognition and severity of an early stage GVHD in both *in vitro* and *in vivo* murine allograft contexts. The EGCG treatment of murine splenocytes decreased their proliferation upon stimulation by either coculturing them with stimulator cells in MLR or injecting them into MHC-disparate mice.

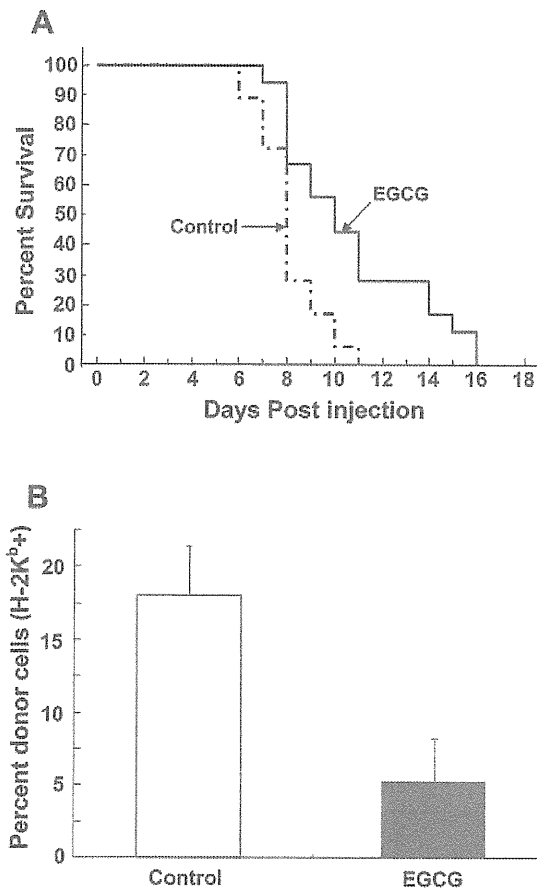
To reduce allogenic responses such as GVHD and transplant rejection, tissue matching and pharmacological interventions are employed, but these methods often fail due to the limited availability of tissue grafts in general and side effects caused by the therapeutic agents (2,4,25), respectively. As an alternative method, immunocamouflage, has been attempted, where a donor tissue with its intact cell surface antigenic determinants is

coated with nonimmunogenic compounds such as polyethylene glycol (PEG) to block recognition by the host immune system (21,22). Indeed, PEG coating of donor tissues is known to block allorecognition of T cells and prevent GVHD induction (6). In the present study, we hypothesized that a tea polyphenol, EGCG, when applied to donor cells, due to its high affinity for macromolecules, would block T-cell surface allorecognition molecules and decrease the occurrence of GVHD.

EGCG treatment of responder cells in MLR significantly decreased T-cell proliferation (Fig. 1) and the production of IL-2 and INF- $\gamma$ , two major indicators for T-cell activation and proliferation (Fig. 2). The overall decrease of proliferating T cells was not due to the direct toxicity of EGCG because EGCG-treated cells showed no significant mortality relative to untreated cells (Fig. 3).

Our *in vivo* experimental results indicated that EGCG treatment moderately extended survival time for the mice injected with EGCG-treated splenocytes compared with those injected with untreated splenocytes (Fig. 8). EGCG treatment did not completely prevent GVHD-enhanced lethality in mice, but it helped them tolerate the high-dose challenge with the splenocytes (i.e., a 2.5 $\times$  greater cell concentration than what has been reported to induce GVHD in healthy humans). Parallel to the survival experiments, the decreased donor splenocyte population in the recipient mice reflected the attenuating effect of EGCG on its proliferation.

What are the possible mechanisms behind these attenuating effects of EGCG on GVHD? One explanation is a blocking action of EGCG toward T-cell surface



**Figure 8.** Survival curve and donor T-cell proliferation in graft-versus-host disease (GVHD)-induced recipient mice. EGCG-treated or untreated C57Bl/6 splenocytes [major histocompatibility complex 1 (MHC 1); H-2K<sup>b</sup>] were injected into irradiated BALB/c recipient mice (H-2K<sup>d</sup>). (A) Survival curves of recipient mice. Differences were significant between EGCG-treated and control groups ( $\chi^2 = 10.2$ ,  $p = 0.0014$ ). (B) Percent donor T cells (H-2K<sup>b</sup>) (mean  $\pm$  SD) in irradiated recipient mice (H-2K<sup>d</sup>) ( $n = 8$ /group) assessed 7 days after injection with EGCG-treated or untreated splenocytes (control). Differences were significant between EGCG and control based on unpaired Student *t*-test at  $p < 0.0001$ .

molecules as postulated in our present hypothesis. The detection of cell surface molecules involved in allorecognition (CD3 $\epsilon$ ), costimulations (CD4, CD28), and cell-to-cell adhesion (CD49d) was indeed decreased by EGCG treatment (Table 1). The blocking action was further supported by the immunoblot data for some of these signal molecules, whose production was not significantly influenced by EGCG treatment (Fig. 5). In addition, mRNA expressions of some of these surface molecules were similarly not attenuated by EGCG treatment (Fig. 6), which supports the hypothesis that EGCG camouflages the surface molecules, although EGCG is

known to translocate into the nucleus and influence the expression of many genes particularly related to cell proliferation (3).

The weakening of the cell-to-cell signaling through these molecules could lead to incomplete activation of T cells, thereby decreasing GVHD induction (6). While different levels of blocking effects were exhibited among these cell surface molecules (Table 1), the expression of TCR remained essentially unaffected by EGCG treatment, suggesting that its receptor function is expected to be largely intact. In contrast, there was a strong attenuation effect on CD3 $\epsilon$ , which is involved in transmitting intracellular stimulatory signals (18). Attenuation occurred also for the costimulatory molecules, CD4 and CD28, which can abrogate costimulatory signals (7,9,14,23,24). These attenuation effects of EGCG are different in levels compared with those of other surface molecules, suggesting that EGCG treatment possibly leads to incomplete stimulation of T cells (16,20). Although cell surface molecule blockage is likely to be a primary effect of EGCG, allorecognition ability of the donor T cells can be restored over time. This is predicted because the EGCG treatment did not significantly influence the gene expression for these molecules. As EGCG will be diluted in vivo over time, newly synthesized molecules will eventually replace the EGCG-attenuated ones; therefore, EGCG is most likely to affect the early stage of GVHD. Thus, future studies need to analyze the detailed dynamics of the cell surface molecules as to how EGCG interacts with the receptors and whether they may be subsequently internalized into the cells under both in vitro and in vivo environments.

EGCG is also a well-known antiproliferating agent that downregulates some of the key intracellular pathways in cell cycle (3,10,15). EGCG treatment conditions and duration used in the present study can arrest cell cycle. Indeed, EGCG treatment significantly reduced mitogen-induced T-cell proliferation (Fig. 7), suggesting that it also interfered with proliferation pathways independent of signals through cell surface molecules. EGCG may influence the production of a number of cytokines that activate not only T cells but also regulatory T cells, the possibility of which needs to be examined in future studies (13).

Treating tissue and/or cell transplants with EGCG can be an inexpensive method to attenuate the responses of early stage GVHD. It can be integrated into clinical transplantation, where a transplant is immersed in a physiological solution containing EGCG before being transplanted to a human recipient. Although further study is necessary to understand the exact mechanisms of the immunosuppressive actions and acquire practical application strategies to prolong the actions, the EGCG treatment will have a potential value to control GVHD.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This work was funded by the grants from the Seeds Innovation Research Program by Japan Science and Technology Agency and Grant-in-Aid by the Ministry of Education Science and Sports in Japan. The authors are grateful to Mr. Noriaki Kitazumi for technical assistance. The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Ashida, H.; Fukuda, I.; Yamashita, T.; Kanazawa, K. Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett.* 476:213–217; 2000.
- Askenasy, N.; Yolcu, E. S.; Yaniv, I.; Shirwan, H. Induction of tolerance using Fas ligand: A double-edged immunomodulator. *Blood* 105:1396–1404; 2005.
- Bae, J. Y.; Kanamune, J.; Han, D.-W.; Matsumura, K.; Hyon, S.-H. Reversible regulation of cell cycle-related genes by epigallocatechin gallate for hibernation of neonatal human tarsal fibroblasts. *Cell Transplant.* 18:459–469; 2009.
- Blazar, B. R.; Korongold, R.; Vallera, D. A. Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol. Rev.* 157:79–109; 1997.
- Brubaker, D. B. Immunopathogenic mechanisms of post-transfusion graft-vs-host disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202:122–147; 1993.
- Chen, A. M.; Scott, M. D. Immunocamouflage: Prevention of transfusion-induced graft-versus-host disease via polymer grafting of donor cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 67A:626–636; 2003.
- Fallarino, F.; Fields, P. E.; Gajewski, T. F. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J. Exp. Med.* 188:205–210; 1998.
- Fidler, J. M.; Ku, G. Y.; Piazza, D.; Xu, R. S.; Jin, R. L.; Chen, Z. Q. Immunosuppressive activity of the Chinese medicinal plant *Tripterygium wilfordii*. III. Suppression of graft-versus-host disease in murine allogeneic bone marrow transplantation by the PG27 extract. *Transplantation* 74:445–457; 2002.
- Gudmundsdottir, H.; Turka, L. A. T-cell costimulatory blockade. New therapies for transplant rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10:1356–1365; 1999.
- Gupta, S.; Hussain, T.; Mukhtar, H. Molecular pathway for (–)-epigallocatechin-3-gallate-induced cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 410:177–185; 2003.
- Ikeguchi, R.; Kakinoki, R.; Matsumoto, T.; Hyon, S.-H.; Nakamura, T. Peripheral nerve allografts stored in green tea polyphenol solution. *Transplantation* 79:688–695; 2005.
- Kim, J.-Y.; Kina, T.; Iwanaga, Y.; Noguchi, H.; Matsumura, K.; Hyon, S.-H. Tea polyphenol inhibits allostimulation in mixed lymphocyte culture. *Cell Transplant.* 16:75–83; 2007.
- Kitazawa, Y.; Fujino, M.; Li, X.-K.; Xie, L.; Ichimaru, N.; Okumi, M.; Nonomura, N.; Tsujimura, A.; Isaka, Y.; Kimura, H.; H?nig, T.; Takahara, S. Superagonist CD28 antibody preferentially expanded Foxp3-expressing nTreg cells and prevented graft-versus-host disease. *Cell Transplant.* 18:627–637; 2009.
- Kurlberg, G.; Haglund, E.; Sch?n, K.; T?rnqvist, H.; Lycke, N. Blockade of the B7-CD28 pathway by CTLA4?Ig counteracts rejection and prolongs survival in small bowel transplantation. *Scand. J. Immunol.* 51:224–230; 2000.
- Mouria, M.; Gukovskaya, A. S.; Jung, Y.; Buechler, P.; Hines, O. J.; Reber, H. A.; Pandol, S. J. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int. J. Cancer* 98:761–769; 2002.
- Murphy, W. J.; Blazar, B. R. New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Curr. Opin. Immunol.* 11:509–515; 1999.
- Noguchi, H.; Matsushita, M.; Okitsu, T.; Moriwaki, A.; Tomizawa, K.; Kang, S.; Li, S.-T.; Kobayashi, N.; Matsumoto, S.; Tanaka, K.; Tanaka, N.; Matsui, H. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat. Med.* 10:305–309; 2004.
- Samelson, L. E.; O’Shea, J. J.; Luong, H.; Ross, P.; Urdahl, K. B.; Klausner, R. D.; Bluestone, J. T cell antigen receptor phosphorylation induced by an anti-receptor antibody. *J. Immunol.* 139:2708–2714; 1987.
- Sazuka, M.; Itoi, T.; Suzuki, Y. Evidence for the interaction between (–)-epigallocatechin gallate and human plasma proteins fibronectin, fibrinogen, and histidine-rich glycoprotein. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:1317–1319; 1996.
- Schwartz, R. H. T cell anergy. *Ann. Rev. Immunol.* 21:305–334; 2003.
- Scott, M. D.; Chen, A. M. Beyond the red cell: Pegylation of other blood cells and tissues. *Transf. Clin. Biol.* 11:40–46; 2004.
- Scott, M. D.; Murad, K. L.; Koumpouras, F.; Talbot, M.; Eaton, J. W. Chemical camouflage of antigenic determinants: “Stealth” erythrocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94:7566–7571; 1997.
- Turka, L. A.; Linsley, P. S.; Lin, H.; Brady, W.; Leiden, J. M.; Wei, R.; Gibson, M. L.; Zheng, X.; Myrdal, S.; Gordon, D.; Bailey, T.; Bolling, S. F.; Thompson, C. B. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102–11105; 1992.
- Vacchio, M. S.; Hodes, R. J. CD28 costimulation is required for in vivo induction of peripheral tolerance in CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 197:19–26; 2003.
- Walsh, P. T.; Taylor, D. K.; Turka, L. A. Tregs and transplantation tolerance. *J. Clin. Invest.* 114:1398–1403; 2004.
- Wang, X. M.; Sun, H. T.; Chen, G.; Liu, W. H.; Wise, Y.; Yung, C. L.; Sudo, Y.; Tamura, K.; Garcia, B.; Zhong, R. Immunosuppression with a combination of PG490-88 and a subtherapeutic dose of FK506 in a canine renal allograft model. *Transplantation* 79:1537–1544; 2005.
- Wilasrusmee, C.; Siddiqui, J.; Bruch, D.; Wilasrusmee, S.; Kittur, S.; Kittur, D. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. *Am. Surg.* 68:860–864; 2002.

## 外科領域における再生医療の応用

## 8. 再生医療を前提にした膵島医療—現状と将来—

1) 京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科, 2) 同 臓器移植医療部

岩永 康裕<sup>1)2)</sup>, 金宗 潤<sup>1)</sup>, 川口 道也<sup>1)</sup>, 高折 恭一<sup>1)</sup>, 上本 伸二<sup>1)2)</sup>**キーワード** 膵島移植, 再生医療, 膵上皮細胞, 分化転換, 糖尿病

## I. 内容要旨

膵島移植は、高い安全性と血糖値の不安定性に対する治療効果が確認されており、糖尿病に対する細胞移植医療の臨床型として確立されつつある。ただし、インスリン離脱に複数回の移植が必要で、ドナー膵不足が深刻な問題である。その解決方法として再生医療が挙げられ、特に膵島組織の成体内再生及び培養系で再生させた膵島様組織の移植が優れたアプローチである。胎生期以降の膵上皮細胞が膵島再生の基となる有力な候補である。動物モデルにおいて、β細胞は、数日の分裂休止期間後に細胞分裂サイクルを再開でき、増殖が可能であることが示唆されている。α細胞は、β細胞への分化転換のメカニズムが明らかにされている。膵管細胞は、その増殖と分化によってβ細胞の再生が起こる。腺房細胞の内分泌細胞への分化転換は低頻度ながら生体内で起こることが示された。これらの知見をヒト細胞での研究へと発展させ臨床応用するにはさらにステップが必要であるが、既に再生膵島移植への第一歩を踏み出すステージには上がっていると言える。

## II. はじめに

膵島移植は1型糖尿病等のインスリン依存状態糖尿病に対して行われる移植療法である。膵島組織を移植し適正なインスリン分泌によって糖代謝を正常化することで、糖尿病性合併症の発症・進展の予防と生活の

質(QOL)の向上を目的としている。1970年代から実験的に行われていたが、2000年にカナダのアルバータ大学からいわゆるエドモントンプロトコールが発表されて移植成績が向上し世界中に広まった<sup>1)</sup>。本邦では2004年4月に第1例目を実施された。

通常一人の患者に対して複数回の移植を行う必要がある。それが、ドナー不足を助長している。その解決方法として①ブタ膵島を用いた異種移植②再生医療が挙げられるが、ここでは後者について述べる。

β細胞はマウスやラットを用いた最近の実験データに見られるように、予想以上の増殖力と可塑性を備えている。かつては、β細胞の様に特定の機能を果たすように分化しきった細胞はそれほど増殖も変化もしないが、前駆細胞/組織幹細胞等は高い分化能力を備えており細胞療法に適していると信じられていた。ところが、最近「分化転換」なる用語と共に、β細胞と近縁の細胞の持つ高い可塑性、即ちβ細胞へと姿を変える現象が注目されており、これらの細胞による糖尿病治療への応用が議論されている。そこで、本稿では胎生期以降の細胞種、主に成体膵臓内のβ細胞、α細胞等成熟膵内分泌細胞、膵管細胞、及び腺房細胞について、動物モデルでの膵島細胞の成体内再生と体外分化誘導の基礎研究に関する新しい知見、そしてヒト細胞を用いた研究へと発展させるためのステップを考察する。

REGENERATIVE MEDICINE BY REGENERATING ISLETS: PRESENT AND FUTURE THERAPIES FOR DIABETES

Yasuhiro Iwanaga<sup>1,2</sup>, Jun Kanamune<sup>1</sup>, Michiya Kawaguchi<sup>1</sup>, Kyoichi Takaori<sup>1</sup> and Shinji Uemoto<sup>1,2</sup>Department of Hepatobiliary, Pancreas and Transplant Surgery, Kyoto University<sup>1</sup>, Transplant Unit, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan<sup>2</sup>

### III. $\beta$ 細胞の複製

$\beta$  細胞自身の細胞分裂は、健康なマウスでの主要な細胞増殖スタイルと考えられる。成体マウスの膵切除後、 $\beta$  細胞自身が増殖して複成することを、Dor 等はラットのインスリン遺伝子プロモーターを用いた遺伝子改変マウスの実験で示した<sup>2)</sup>。さらに、膵切除よりも確実に膵障害を起こすことで知られるジフテリア毒素 A の発現システムを用いて、 $\beta$  細胞の約 8 割を死滅させた場合も、やはり  $\beta$  細胞は主に  $\beta$  細胞自身の細胞分裂で複製され、前駆細胞等の他細胞から再生しないという結果が示された<sup>23)</sup>。

$\beta$  細胞の細胞分裂サイクルは正常なマウスの場合でも非常に緩慢で、その速度は週齢と共に低下することが知られている。このため、観察されている速やかな  $\beta$  細胞の複製が、全て  $\beta$  細胞の細胞分裂によるとは考えにくく、分化再生を担う前駆細胞が別に存在する可能性が高いという指摘がなされた。この反論を覆すべく、Brennan 等は、パルス—追跡法を用いて成体マウスの細胞分裂中の  $\beta$  細胞のクローンを解析した結果、全てのクローンが同じ  $\beta$  細胞集団サイズであり、各細胞が同じ速度で分裂していることを示した。このことは、培養系で  $\beta$  細胞を増殖できるという可能性をも示している。Dor 等はここから一歩進んで、成体マウスにおける  $\beta$  細胞の分裂動態を解析し、 $\beta$  細胞が数日の分裂休止期間後に細胞分裂サイクルを再開できることを示した。これらの結果は、 $\beta$  細胞の増殖が可能であることを示唆している。

ヒトでは、Meier 等が、乳児期から成人期（生後 2 週～21 歳）の膵臓 46 検体の  $\beta$  細胞の量を免疫化学染色と形態計測で解析し、これに該当する週/年齢 135 人の膵臓体積を CT スキャンで計測したところ、ヒト  $\beta$  細胞量の増加は主に幼児期に起こり、思春期における二次的な増加が殆ど認められなかった。Kassem 等は、 $\beta$  細胞の細胞分裂率は懐胎 17～32 週の 3.2% から分娩期の 1.1% にまで低下することを報告している<sup>4)</sup>。また、新生児期から青年期の間には、さらに 0.1% へと低下する<sup>5)</sup>。これらのデータは、 $\beta$  細胞の想定寿命のデータとほぼ一致し<sup>6)</sup>、ヒトの場合出生後 20～30 年で  $\beta$  細胞の量が決定されてしまうことを示している。また、成人の肥満に対する  $\beta$  細胞量の増加反応はげっ歯類の 1/5 程度で<sup>7)</sup>、妊娠期における反応は約 1/2 以下に留まる<sup>8)</sup>。これらの結果は、ヒト  $\beta$  細胞の細胞分裂は成人では限界があり、その臨床応用が困難

であることを示している。

培養系での  $\beta$  細胞の増殖に関して、Parnaud 等は培養 10 日後ですら Ki67 陽性や BrdU を取り込んだヒトの  $\beta$  細胞は全く確認できなかったが、ラットの  $\beta$  細胞は成長ホルモンの添加で増殖が促進したとしている<sup>9)</sup>。従って、ヒトでは  $\beta$  細胞の効率的な増殖を促す培養条件は未確立である。

### IV. $\alpha$ 細胞からの分化転換

$\beta$  細胞以外の膵内分泌細胞から  $\beta$  細胞への分化転換のメカニズムが最近明らかにされつつある。Collombat 等は、 $\alpha$  細胞に Pax4 を強制発現させ、内分泌系細胞全てが  $\beta$  細胞へと分化する複雑なプロセスを細胞追跡法で明らかにした<sup>10)</sup>。まず  $\alpha$  細胞が減少してグルカゴン濃度が下がり、これが引き金となって膵管前駆細胞が Ngn3 陽性細胞を経由して一旦  $\alpha$  細胞へと分化した。次に、ここで生じた  $\alpha$  細胞が Pax4 によって速やかに  $\beta$  細胞へと変化した。結果として、血中グルカゴンを制御できる程度の  $\alpha$  細胞を維持できなかった代わりに、週齢の低い糖尿病マウスでは充分な量の  $\beta$  細胞の複製を認めた。

さらに厳密な分化転換の解析では、Thorel 等がインスリンプロモーター下でジフテリア毒素受容体を発現する遺伝子改変マウスを用いた解析で、 $\beta$  細胞の消滅後に糖尿病マウスがインスリン離脱できるほどに充分量の  $\beta$  細胞が複製した<sup>11)</sup>。複製した  $\beta$  細胞の 32～81% が元々存在した 5～10% の  $\alpha$  細胞から分化転換したものであることが判明した。しかも、これらの  $\beta$  細胞はすべて膵島の内部に存在し、その 90% は 10 カ月間インスリンとグルカゴンを共発現し続けた。これらの結果は、 $\beta$  細胞の緩慢な増殖ではなく、明らかに  $\alpha$  細胞からの分化転換を裏付けるものである。

Chung 等は膵管を糸で軽く縛る膵管結紮法 (PDL = Pancreatic Ductal Ligation) で人為的にマウスの膵臓に膵炎を起こし、 $\beta$  細胞を消滅させる実験を行った。その結果、障害後約 2 週間で  $\beta$  細胞の速やかな複製を認め、これらの  $\beta$  細胞は主に  $\alpha$  細胞からの分化転換で生じたことを確認した。総じて上記三例の実験結果は、生体内で  $\alpha$  細胞から  $\beta$  細胞への分化転換が起こり得ることを示している。

ヒトの膵発生では、インスリン産生細胞が最も早く現れるので<sup>12)</sup>、マウスに見られたような  $\alpha$  細胞の可塑性が、はたしてヒトで存在するかどうかは未だ明らかにされていない。しかし、 $\alpha$  細胞に何らかの障害を加



えることでマウスと同様の細胞増殖や分化転換を誘導できるなら、成体内で $\beta$ 細胞の再生を促す糖尿病治療法に繋がる可能性があると考えられる。

## V. 膵管細胞

膵管細胞は膵臓の前駆細胞であるという仮説が長らく提唱されてきた<sup>13)14)</sup>。実際げっ歯類の膵管前駆細胞は、分化活性されると再び発生プロセスを経て再生膵島となることが免疫組織化学法で観察されている<sup>15)16)</sup>。しかし最近では、遺伝子改変マウスを用いた厳密な細胞追跡法で、成体膵における内分泌前駆細胞の探索が行われた。しかし一筋縄ではいかない結果が導き出されたため、この仮説に関する肯定派と否定派が白熱した議論を展開している。

Bonner-Weir等は、ヒト carbonic anhydrase II (CAII) という酵素プロモーターを用いた遺伝子改変マウスの実験で、CAII陽性細胞が膵内分泌と外分泌の両組織へと分化することを確認した<sup>17)</sup>。この膵再生実験では、生後マウスに対する上述のPDL膵障害モデルが用いられており、膵管細胞集団の一部がこの膵障害により前駆細胞へと脱分化を起し、内外分泌組織を再生させたと説明している。これと並行してHeimberg等は、膵管細胞集団がPDL障害で活性化され、内分泌細胞の発生にとって鍵となる転写因子Ngn3を発現することを明らかにした<sup>18)</sup>。これらのNgn3陽性細胞は、浮遊培養状態の胎生期膵臓に移植されると $\beta$ 細胞を含む全ての内分泌細胞へと分化した。

上記の膵障害モデルの結果と異なる膵再生現象が、Melton等のグループによって細胞系譜の追跡実験で示された。即ち、胎生前期では膵管の可塑性が内分泌細胞の再生を担うが<sup>19)</sup>、生後その能力を失うというものである。但し、同グループは、成熟した膵管細胞の中にNgn3陽性となりうる希少な細胞が含まれていることは確かであり、成体の膵管細胞が内分泌細胞へと分化転換する可能性を完全に否定することはできないとしている。

ヒト膵管組織内にしばしばインスリン産生細胞が観察される。Meier等によると生後2週~21歳までの若年層46名から得られた膵検体標本には、約0.5%の膵管細胞がインスリン陽性であることを確認している<sup>20)</sup>。一方、Butler等は肥満症や妊娠期にある成人で、それぞれ約2~3倍のインスリン陽性膵管細胞が観察されることから、膵管細胞はインスリン分泌を必要と

するような代謝条件の影響を受けている<sup>8)</sup>。また、慢性膵炎を発症した患者の膵管でもインスリン産生細胞の増加が観察されている<sup>21)</sup>。1型糖尿病膵移植患者の場合、 $\beta$ 細胞の減少が最も著しい移植患者で再生 $\beta$ 細胞が多く観察され、反対に正常血糖値を維持している移植患者では再生 $\beta$ 細胞は殆ど見られなかった。このように、高血糖、慢性膵炎、膵移植後の病態等が膵管の $\beta$ 細胞再生を惹起することが報告されている。Bouwens等は、9名の成人ドナーの膵島を分析し、 $\beta$ 細胞塊の約15%が直径20mm未満の膵管組織領域に分布することを観察した<sup>22)</sup>。これらの $\beta$ 細胞塊は、膵管組織内に存在、又は小膵管に隣接しており、ヒトでは $\beta$ 細胞の再生が膵管細胞の増殖と分化によるものと考えられている。

Bonner-Weir等はヒト膵管初期培養細胞を廃棄膵組織より単離・増殖培養し、グルコース応答性を持つ膵島様クラスターを形成させることに成功した<sup>23)</sup>。さらに、同グループは、表面マーカーCA19-9に対する抗体を用いた磁気細胞分離法で、ヒト膵廃棄組織から膵管細胞を純化し<sup>24)</sup>、純化細胞と未純化細胞塊其々NOD/SCIDマウスに移植したところ、未純化の細胞に含まれる間質細胞が、膵管細胞のインスリン産生細胞への分化を促進することを見出した。総じて、ヒト膵組織を用いた培養実験及びマウスへの移植実験から、膵管細胞が $\beta$ 細胞再生への鍵を握ると考えられる。

## VI. 腺房細胞

膵内分泌細胞の再生における膵管起源説以外に腺房細胞起源説というのがあり、Melton等は、膵発生段階の膵管細胞から生じた共通の前駆細胞から、腺房細胞と内分泌細胞が派生することを指摘している<sup>19)</sup>。この近縁関係を裏付ける見解として、Bouwens等は膵管起源説の発展型を提唱した。即ち、ある環境条件下では腺房細胞が中間的な細胞へと脱分化し、次いで内分泌細胞へと再分化するというものである<sup>15)</sup>。最近では、幾つかの研究グループが、腺房特異的な酵素プロモーターを用いた細胞追跡法で、腺房細胞の複製が主に自らの細胞分裂によることを明らかにし、腺房細胞の内分泌細胞への分化転換は低頻度ながら生体内で起こることもわかった<sup>25)</sup>。さらにMelton等は、ダイレクトリプログラミングという方法で、成体マウスの膵臓にPdx1, Ngn3, 及びMafAを同時発現させ、成熟した腺房細胞から、より自然膵島に近い $\beta$ 細胞へと

分化転換させることに成功した<sup>26)</sup>。

培養系では、Minami 等が EGF とニコチンアミドを含有する培地にマウスの膵房細胞を浮遊培養することで、このうちの 5% がグルコース応答性を持つインスリン産生細胞へと分化転換することを明らかにした<sup>27)</sup>。

ヒト膵房細胞の膵管細胞への分化転換に関するデータは知られていない。これは培養条件下でヒト膵房細胞が選択的にアポトーシスを起こすためではないかと考えられる。

## VII. おわりに

上記以外に中心膵房細胞が培養条件下で容易にスフェロイドを形成し、インスリン産生細胞へと分化することが明らかになり、今後の発展が期待されている。以上のように、膵島の再生に関する数多くのデータが提示されており、これらは新しい膵島再生医療への重要な糸口となり得る。今後の臨床応用への具体的なプロセスでは、げっ歯類で得られている膵島細胞再生のデータをヒトデータと比較する場合には、種の違いやインスリン分泌に関する生理的条件の違いを考慮すると共に、解析法の相違点にも注意する必要がある。対象とする細胞とその表現型、また細胞亜集団等の多様性を十分に把握することも重要である。最近明らかになってきた脱分化と再分化に影響を与える生体内及び培養系の条件設定に関する研究も重要である。

膵島再生に関する研究は最近殊にめまぐるしく進歩している。本稿で述べた膵上皮細胞が基となる細胞の有力候補として挙がっており、再生膵島移植は臨床応用へ向けて既に第一歩を踏み出すステージまで来ていると言える。そして膵島組織の成体内再生の実現が膵島再生医療の最終目標である。

## 文 献

- 1) Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al.: Five-year follow up after clinical islet transplantation. *Diabetes*, 54 (7): 2060-2069, 2005.
- 2) Dor Y, Brown J, Melton DA, et al.: Adult pancreatic  $\beta$ -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 429 (6987): 41-46, 2004.
- 3) Nir T, Melton DA, Dor Y: Recovery from diabetes in mice by  $\beta$  cell regeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 117 (9): 2553-2561, 2007.
- 4) Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, et al.:  $\beta$ -Cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes*, 49 (8): 1325-1333, 2000.
- 5) Bouwens L, Pipeleers DG: Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia*, 41 (6): 629-633, 1998.
- 6) Perl SY, Kushner JA, Buchholz BA, et al.: Significant human  $\beta$ -cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95 (10): E234-E239, 2010.
- 7) Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, et al.:  $\beta$ -cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52 (1): 102-110, 2003.
- 8) Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, et al.: Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia*, 53 (10): 2167-2176, 2010.
- 9) Parnaud G, Bosco D, Berney T, et al.: Proliferation of sorted human and rat beta cells. *Diabetologia*, 51 (1): 91-100, 2008.
- 10) Collombat P, Xu X, Ravassard P, et al.: The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into  $\alpha$  and subsequently  $\beta$  cells. *Cell*, 138 (3): 449-462, 2009.
- 11) Thorel F, Népote V, Avril I, et al.: Conversion of adult pancreatic  $\alpha$ -cells to  $\beta$ -cells after extreme  $\beta$ -cell loss. *Nature*, 464 (7292): 1149-1154, 2010.
- 12) Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, et al.: Beta cell differentiation during early human pancreas development. *Journal of Endocrinology*, 181 (1): 11-23, 2004.
- 13) Granger A, Kushner JA: Cellular origins of  $\beta$ -cell regeneration: a legacy view of historical controversies. *Journal of Internal Medicine*, 266 (4): 325-338, 2009.
- 14) Bonner-Weir S, Li WC, Sharma A, et al.:  $\beta$ -cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*, 59 (10): 2340-2348, 2010.
- 15) Wang RN, Klöppel G, Bouwens L: Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of ductligated adult rats. *Diabetologia*, 38 (12): 1405-1411, 1995.
- 16) Sharma A, Zangen DH, Reitz P, et al.: The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes*, 48 (3): 507-513, 1999.
- 17) Inada A, Nienaber C, Katsuta H, et al.: Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (50): 19915-19919, 2008.
- 18) Xu X, D'Hoker J, Stangé G, et al.:  $\beta$  cells can be generated from endogenous progenitors in injured

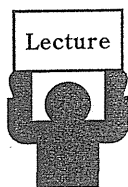
- adult mouse pancreas. *Cell*, 132 (2) : 197-207, 2008.
- 19) Gu G, Dubauskaite J, Melton DA : Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*, 129 (10) : 2447-2457, 2002.
- 20) Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, et al. :  $\beta$ -cell replication is the primary mechanism subserving the post-natal expansion of  $\beta$ -cell mass in humans. *Diabetes*, 57 (6) : 1584-1594, 2008.
- 21) Phillips JM, O'Reilly L, Bland C, et al. : Patients with chronic pancreatitis have islet progenitor cells in their ducts, but reversal of overt diabetes in NOD mice by anti-CD3 shows no evidence for islet regeneration. *Diabetes*, 56 (3) : 634-640, 2007.
- 22) Martin-Pagola A, Sisino G, Allende G, et al. : Insulin protein and proliferation in ductal cells in the transplanted pancreas of patients with type 1 diabetes and recurrence of autoimmunity. *Diabetologia*, 51 (10) : 1803-1813, 2008.
- 23) Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, et al. : In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (14) : 7999-8004, 2000.
- 24) Yatoh S, Dodge R, Akashi T, et al. : Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to  $\beta$ -cells. *Diabetes*, 56 (7) : 1802-1809, 2007.
- 25) Strobel O, Dor Y, Alsina J, et al. : In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia. *Gastroenterology*, 133 (6) : 1999-2009, 2007.
- 26) Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. : In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to  $\beta$ -cells. *Nature*, 455 (7213) : 627-632, 2008.
- 27) Minami K, Okuno M, Miyawaki K, et al. : Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (42) : 15116-15121, 2005.

利益相反：なし

#### REGENERATIVE MEDICINE BY REGENERATING ISLETS: PRESENT AND FUTURE THERAPIES FOR DIABETES

Yasuhiro Iwanaga<sup>1,2</sup>, Jun Kanamune<sup>1</sup>, Michiya Kawaguchi<sup>1</sup>, Kyoichi Takaori<sup>1</sup> and Shinji Uemoto<sup>1,2</sup>  
Department of Hepatobiliary, Pancreas and Transplant Surgery, Kyoto University<sup>1</sup>  
Transplant Unit, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan<sup>2</sup>

$\beta$  cell replacement by islet transplantation is a promising clinical therapy for patients with type 1 diabetes because it satisfies safety issues and offers reliability in controlling blood glucose levels. One remaining problem is that it requires islets from two to three donor pancreases to achieve insulin independence, thus aggravating the donor shortage. Islet regeneration in vivo and generation of  $\beta$  cells ex vivo followed by transplantation represent attractive therapeutic methods to restore the  $\beta$  cell mass. Recent studies have suggested a number of postnatal pancreatic epithelial cells as candidate sources for future  $\beta$  cell replacement therapy.  $\beta$  cells can reenter the cell cycle after a brief quiescent stage, suggesting the potential for engineering for expansion. The mechanisms of  $\alpha$  cell-to- $\beta$  cell transdifferentiation can also be utilized to increase the  $\beta$  cell population. Pancreatic ductal cells can proliferate and differentiate into regenerated  $\beta$  cells. Pancreatic acinar cells are also observed to transdifferentiate into endocrinal cells, although infrequently under in vivo conditions. After a few more series of careful studies performed on human cells, the ultimate goal of translation to the clinic appears to be just around the corner. Islet cell transplantation will become a welcome new form of cell-regeneration therapy.



## 解説

# 糖尿病患者における膵島移植\*

川口道也\*\* 岩永康裕\*\*\* 上本伸二\*\*

Key Words : islet transplantation, diabetes mellitus

### はじめに

糖尿病患者の総数は平成19年国民健康・栄養調査では237万人とされる。それ以外にも糖尿病が強く疑われる人、および糖尿病の可能性が否定できない人を入れると総計2,447万人となり10年前に比べ1.3倍になっている。糖尿病の合併症の一つである糖尿病性腎症により透析導入される患者は新規透析導入患者の中で43%を占め1.9兆円といわれる(2004年)医療費を押し上げている。糖尿病に対する予防医学の進展が必要と思われる。

糖尿病はその病態により1型と2型に分けられる。1型糖尿病は膵島細胞に対する自己抗体によってβ細胞が破壊され、インスリンが枯渇し重度の高血糖をひき起こし、急性症状として糖尿病性昏睡を起こし、慢性症状としては糖尿病性腎症から腎不全へと至る。かつては若年性糖尿病もしくはinsulin dependent diabetes mellitus (IDDM)と呼ばれた。経口血糖降下剤は無効で、インスリンの自己注射による血糖コントロールが行われる。しかしながら、糖尿病専門医が強化インスリン療法を行ってもコントロール困難な患者がおり、それらの患者が膵臓もしくは膵島移植の適応となる(表1)。2型糖尿病は成人型糖尿病もしくはnon-insulin dependent diabetes

mellitus (NIDDM)とも呼ばれ、発症してまもなくは食事療法や運動療法で対処されるが病状が進むにしたがって経口血糖降下剤を使い、やがてインスリン注射が必要になる。

膵臓移植はインスリン離脱率という観点では膵島移植より優れているが、開腹手術を要し侵襲が大きい。また、移植時点で高度の糖尿病がありその結果として患者の血管は脆弱であるため血管吻合が困難であることが多い。しかも術後も血栓などのトラブルにより移植膵除去のための再手術を要する例もある。その点、膵島移植は局所麻酔による径門脈的に点滴の要領で行う移植であり低侵襲で合併症も臓器移植に比べ少ないという利点を持つ。さらに移植組織が不幸にも機能不全となった場合にも摘出を行う必要なく追加の移植も行えるという利点を持つ。

### 膵島移植の歴史

臨床実施は米国のミネソタ大学において1970年代に始まった<sup>1)</sup>。しかしながらその成績は移植後1年以降にはインスリン離脱率が11%と低く、一般医療として定着するには不十分であった<sup>2)</sup>。その後、2000年にカナダのエドモントン大学から報告された“エドモントンプロトコル”による膵島移植が良好な成績を収めたと報告され注目された<sup>3)</sup>。

\* Islet transplantation in patients with diabetes mellitus.

\*\* Michiya KAWAGUCHI, M.D., Ph.D. & Shinji UEMOTO, M.D., Ph.D.: 京都大学大学院医学研究科外科学講座(肝胆膵・移植外科分野)(〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町54); Division of Hepato-Biliary-Pancreatic and Transplant Surgery, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8507, JAPAN

\*\*\* Yasuhiro IWANAGA, M.D., Ph.D.: 京都大学医学部附属病院臓器移植医療部

表 1 膵島移植の適応基準

適応
①内因性インスリンが著しく低下し、インスリン治療を必要とする
②糖尿病専門医の治療努力によっても、血糖コントロールが困難
③原則として75歳以下
④膵臓移植、膵島移植について説明し、膵島移植に関して本人、家族、主治医の同意が得られている
⑤発症後5年以上経過していること
禁忌
①重度の心疾患、肝疾患(心移植または肝移植と同時にを行う場合は考慮する)
②アルコール中毒
③感染症
④悪性腫瘍(5年以内に既往がないこと)
⑤重度の肥満(BMI25以上)
⑥未処置の網膜症(ただし失明例は除く)
⑦その他移植に適さないもの

その特徴として腎障害のない症例の膵島単独移植で①ステロイドを使用しない、②分離膵島はすぐに移植に使用する、③複数回の移植を実行することがあげられた。

この報告で膵島移植の安全性と治療効果の両方が示され、世界中で同プロトコルを使った膵島移植が実施された。60以上の施設で600症例以上に膵島移植が行われたが<sup>2)</sup>、その後のマルチセンタートライアルでは重症低血糖から解放されたが長期的なインスリン離脱は困難と報告された<sup>4)</sup>。

ミネソタ大学ではその後、レシピエントの基準を厳密に行い免疫抑制剤を工夫することによって良好な成績を得た。すなわち、体重70Kg以下、インスリン投与量1日40U以下、初回移植、creatinine clearance (CCr) 60ml/min以上、門脈圧亢進症なく肝機能が正常であることを満たす1型糖尿病患者に対して膵島移植後、初回導入時に抗TNF $\alpha$ 抗体(etanercept)、維持療法として低容量tacrolimus, sirolimusを用い、1回の移植でインスリン離脱、8例中5例は1年経過してもインスリン離脱状態であると報告した<sup>5)</sup>。現在、第III相臨床試験でその有用性が確かめられている。

### わが国の膵島移植

エドモントンプロトコルを用いて2004年から2007年3月まで65回の膵島分離が行われ34回の移植が18症例に対して行われた。その内訳は

移植回数1回8名、2回4名、3回6名である<sup>6)</sup>。移植後の成績は初回移植後1, 2, 3年時における生着率は76.5%, 47.1%, 33.6%で欧米に匹敵するものであり、膵島生着中の血糖制御は良好であった。しかしながらインスリン離脱は3症例(2回移植の1例と3回移植の2例)のみにとどまった。

2007年3月に膵島分離用酵素を産生する工程でウシ脳抽出物が使用されていたことより牛海綿状脳症(bovine spongiform encephalopathy; BSE)の危険性が否定できず、日本での膵島移植が停止することになった。その後、哺乳類由来の成分を用いない酵素が開発され、その有用性も実証されたため、2012年6月から膵島移植の臨床が再開可能となった。また、臨床膵島移植の再開にあたりより効果的な免疫抑制剤のプロトコルの採択が議論され、近年報告されたミネソタ大学のプロトコルを参考に決定された(図1)。

膵島移植は膵臓移植と異なり日本では組織移植として分類されており、扱っている法律も異なる。したがって、従来行われていた膵島移植はその大半が心停止ドナーを用いていた。今後は脳死ドナーからの提供で、臓器としての膵臓移植が行われなかった膵臓で比較的availabilityの高いものに関しては膵島移植にも使用可能になる見込みである。

また、膵島移植を一般医療として確立するために厚生労働省高度医療評価制度の下、多施設

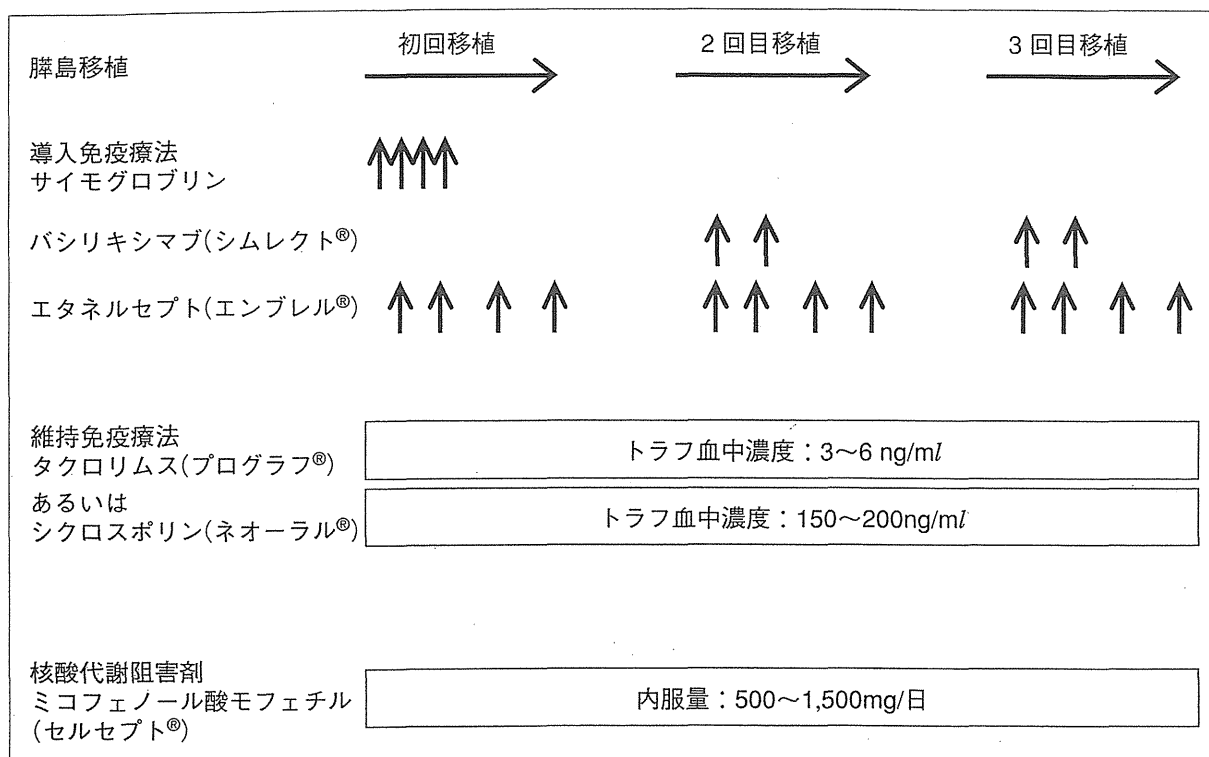


図1 多施設共同膵島移植臨床試験の新免疫抑制プロトコール

共同の臨床試験を実施予定である。この臨床試験は文部科学省による“橋渡し研究支援推進プログラム”による研究費が配給され、今まで多かった患者の自己負担を軽減することになった。

### 日本での膵島移植の体制

膵島移植施設として日本膵・膵島移植研究会が認定している福島県立医科大学附属病院，東北大学医学部附属病院，国立病院機構千葉東病院，大阪大学医学部附属病院，京都大学医学部附属病院，福岡大学医学部附属病院，以上6施設で行うことができる(近年，岡山大学，長崎大学，徳島大学が新たに追加認証となった)。それぞれの施設はブロック制をしいており施設の属する地域を担当し，ブロック内で提供された膵組織を摘出保存し各施設に運搬後，レシピエントに移植を行う(表2，図2)。

### 膵島移植の手技

膵島移植は他の臓器移植と異なりドナーから摘出した臓器をそのまま移植するのではなく膵島という形に加工して移植を行う。

その過程は大きく分けて，①臓器摘出，②臓

器保存および運搬，③膵島分離，④膵島の純化，⑤純化後の保存，⑥分離膵島の評価という過程を経て移植が行われる(図3)。

#### 1. 臓器摘出

日本においては従来，心停止ドナー腎移植のための腎臓摘出術と同時に摘出した膵臓を利用する。心停止前に大腿動静脈より挿入されたカニューレから，心停止後に冷却された灌流液が流され温阻血障害が最小限に食い止められる。さらに開腹後腹腔内に破碎した氷を入れる。腎臓チームが腎摘出を行ったあと，膵臓を摘出する<sup>7)</sup>。

#### 2. 臓器保存および運搬

摘出された臓器は氷上で冷却されたトレイの上で脾臓十二指腸が取り除かれ，主膵管開口部に金属製カニューレを挿入し，そこから冷却された保存液(ET-Kyoto溶液)を1~1.5ml/gを注入する。その後，ET-Kyoto溶液とパーフルオロデカリンの2つの比重の異なる溶液を入れた容器(1lのNalgene Jar)に膵臓を入れ両溶液に膵臓が接するように置く(二層法保存)。下層のパーフルオロデリカンには100%酸素で30分以上酸素化しておく<sup>8)</sup>。Nalgene Jarは氷を詰めたアイスボツ

表2 新鮮膵島移植レシピエントの選択基準

- ①地域性
  - ②ABO血液型
  - ③すでに膵島移植を受け、膵島移植によってインスリン離脱が期待できる例
  - ④待機日数
    - ・レシピエントは各ブロック事務局に登録されたレシピエント候補より、②→④の順に選択する
    - ・血液型一致候補がない場合は血液型適合候補の中から再度選択順位を決定する
    - ・当初数例は再移植、再々移植を優先する
    - ・移植時にはリンパ球クロスマッチを施行する
- 腎移植後の膵島移植レシピエントは以下の条件を満たす場合に選択される。
- ①腎移植後6か月以上経過している
  - ②クレアチニン1.8mg/dl以下で直近6か月の血清クレアチニンの上昇が0.2以下で持続的上昇を認めない
  - ③ステロイドは減量に努め、内服量10mg/日以下であることが望ましい

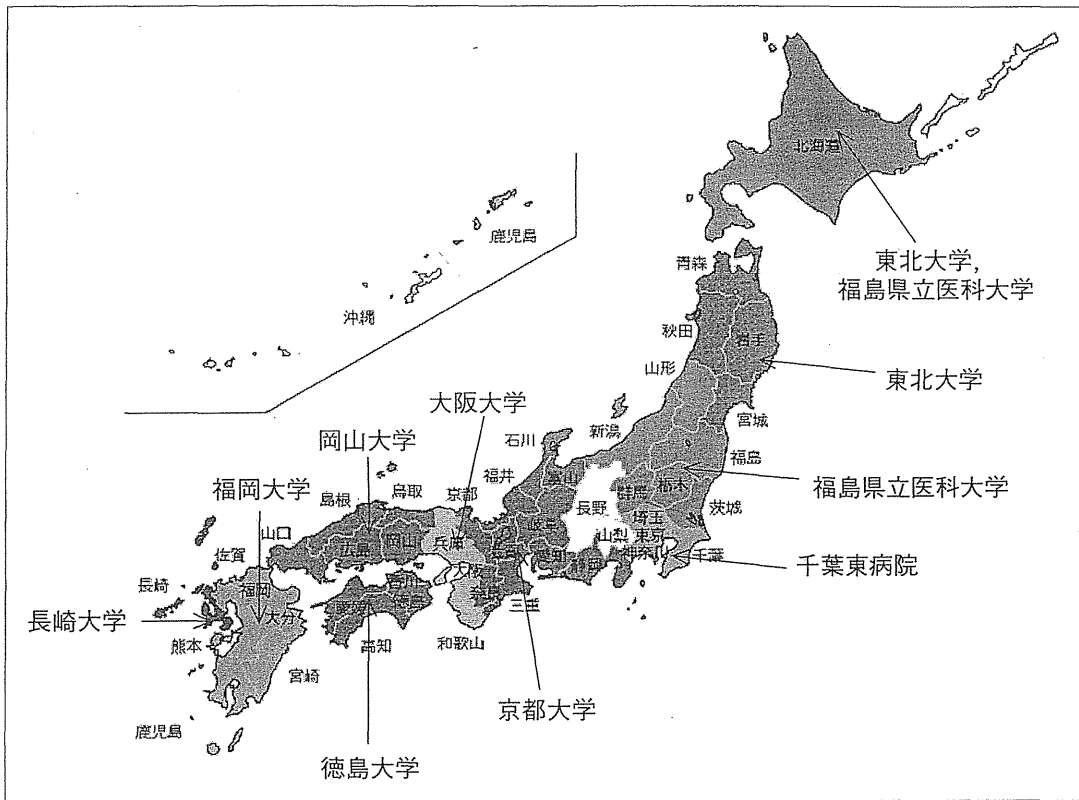


図2 膵島移植実施体制

北海道は福島医大と東北大が交互に担当、茨城県は北部は福島医大、南部は千葉東、淡路島は徳島大が担当、長野・山梨・沖縄は担当施設なし。(日本膵・膵島移植研究会事務局提供)

クスに入れ膵島分離施設まで搬送する。

### 3. 膵島分離

膵島分離は、細菌の混入の恐れのないクリーンルームで行われる。二層法容器から取り出された膵臓はまずイソジン溶液に投入され、続いて抗生物質そしてハンクス液で洗浄される。消毒操作の次は消化が行われる。冷却した灌流ト

レイに膵臓を乗せ、臓器摘出時に挿入した金属カニューレより消化酵素(リベレースMTF, ロッシュ社)を灌流させる。灌流時には圧力に留意し適切な膨化が得られるように膵被膜や支持組織を除去する。良好な膨化が得られたのち、膵実質以外の余分な組織を除去したあとに膵実質を7~9個に切断し7つのステンレスボールととも



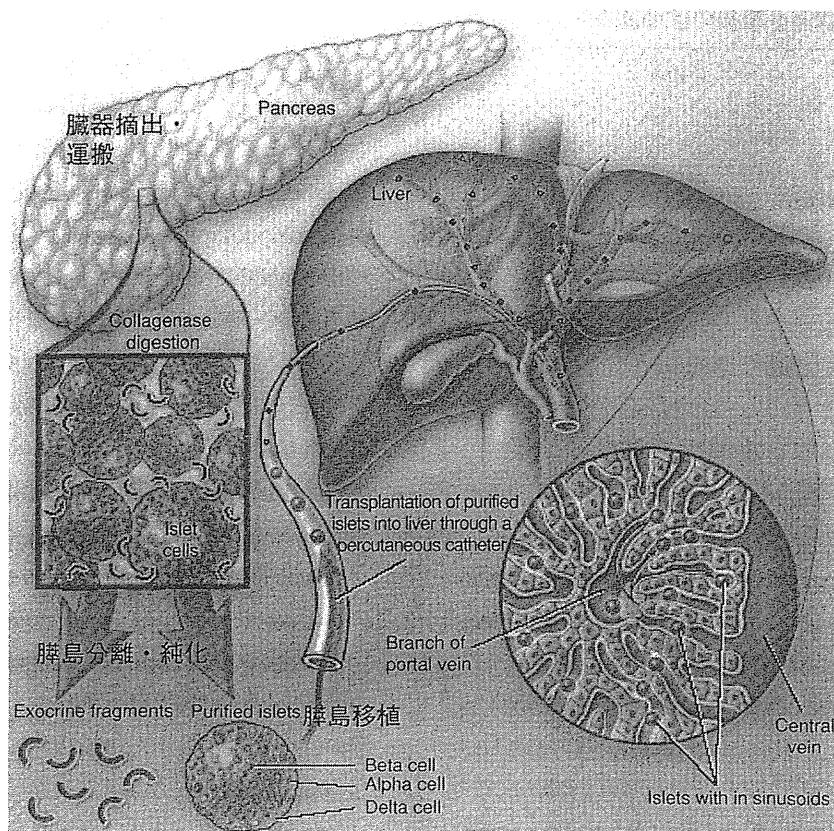


図3 胰岛移植

(Robertson PR. Islet transplantation as a treatment for diabetes—a work in progress. N Engl J Med 2004 ; 350 : 694. より引用改変)

にリコルディーチャンバーに入れられる。さらに膨化の際に使用したコラゲナーゼをリコルディーチャンバーに灌流させその温度を37度にするように調整する。2分おきに消化液をサンプリングし消化状態を把握する。分離胰岛が確認された段階から回収作業に移りコラゲナーゼはRPMI培養液で希釈されると同時に冷却され過消化を防ぐ。

#### 4. 胰岛純化

次に回収された消化臓を純化する作業に移る。純化は胰岛組織が他の組織に比べ密度が低いことを利用し、濃度勾配のある溶液に入れ遠心分離することにより他組織と分離できる。われわれは濃度勾配の溶液としてiodixanolを用いている。テストチューブでどの範囲の濃度勾配を作るか検討し、その範囲の連続濃度勾配のある溶液を作製しCOBE2991® Cell Processorで分離する。分離胰岛は数と純度を測定し高純度、低純度の2つのグループに分けられる。回収された胰岛は3回洗浄後に移植用バッグに注入される。

#### 5. 胰岛保存

移植バックに入れられた胰岛は12時間までは4度の冷蔵庫で移植まで保存される。レシピエント準備ができ次第搬送され移植される。そのため保存は移植溶液である10%ヒトアルブミン入りのCMRL培養液を用いている<sup>9)</sup>。

#### 6. 分離胰岛の評価

分離胰岛の評価は収量、純度、組織量、バイアビリティー、エンドトキシン量、細菌検査が行われ別表(表3)のような基準が満たされなければ移植には使用できない<sup>9)</sup>。

### 今後の展望

胰岛移植は、臓器移植としての臓移植に比べインスリン離脱という点では劣るが、複数回の移植が可能なこと、移植の際に低侵襲であり手術に伴う合併症が非常に少ないこと、機能廃絶時にも摘出処置を必要としないことなどさまざまな利点がある。また、移植症例を選別し新たな免疫抑制剤のプロトコールを用いることで今



表3 膵島分離後の移植基準

- 
- ①膵島量：5,000IE/Kg以上
  - ②純度：30%以上
  - ③組織量：10ml以下
  - ④Viability：70%以上
  - ⑤Endotoxin：5 EU/Kg以下
  - ⑥グラム染色：陰性
- 

後の成績向上が見込まれる。膵島移植は膵臓移植にとって代わる医療ではないが、移植手術が高リスクである患者にとっては有望な治療であり、一選択肢として定着するであろう。

### 文 献

- 1) Najarian J, Sutherland D, Matas A, et al. Human islet transplantation : a preliminary report. *Transplant Proc* 1977 ; 9 : 233.
- 2) Alejandro R, Barton F, Hering B, Wease S. 2008 Update from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Transplantation* 2008 ; 86 : 1783.
- 3) Shapiro AM, Lakely JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000 ; 343 : 230.
- 4) Shapiro A, Ricordi C, Hering B, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *Engl J Med* 2006 ; 355 : 1318.
- 5) Hering B, Kandaswamy R, Ansite J, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005 ; 293 : 830.
- 6) 日本膵・膵島移植研究会膵島移植班. 膵島移植症例報告(2010). *移植* 2011 ; 46 : 552.
- 7) Nagata H, Matsumoto S, Okitsu T, et al. Procurement of the human pancreas for pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 2004 ; 78 : 481.
- 8) Matsumoto S, Rigley T, Qualley S, et al. Efficacy of the oxygen-charged static two-layer method for short-term pancreas preservation and islet isolation from nonhuman primate and human pancreata. *Cell Transplant* 2002 ; 11 : 769.
- 9) Noguchi H, Naziruddin B, Jackson A, et al. Low-temperature preservation of isolated islets is superior to conventional islet culture before islet transplantation. *Transplantation* 2010 ; 89 : 47.

\* \* \*

## Significant Improvement in Islet Yield and Survival With Modified ET-Kyoto Solution: ET-Kyoto/Neutrophil Elastase Inhibitor

Tomohiko Machida,\*<sup>1</sup> Masahiro Tanemura,\*<sup>†1</sup> Yoshiaki Ohmura,\* Tsukasa Tanida,\* Hiroshi Wada,\* Shogo Kobayashi,\* Shigeru Marubashi,\* Hidetoshi Eguchi,\* Toshinori Ito,‡ Hiroaki Nagano,\* Masaki Mori,\* Yuichiro Doki,\* and Yoshiki Sawa§

\*Department of Gastroenterological Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

†Department of Surgery and Institute for Clinical Research, National Hospital Organization Kure Medical Center, Hiroshima, Japan

‡Department of Complementary and Alternative Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

§Department of Cardiovascular Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Although islet transplantation can achieve insulin independence in patients with type 1 diabetes, sufficient number of islets derived from two or more donors is usually required to achieve normoglycemia. Activated neutrophils and neutrophil elastase (NE), which is released from these neutrophils, can directly cause injury in islet grafts. We hypothesized that inhibition of NE improves islet isolation and islet allograft survival. We tested our hypothesis by examining the effects of modified ET-Kyoto solution supplemented with sivelestat, a NE inhibitor (S-Kyoto solution), on islet yield and viability in islet isolation and the effect of intraperitoneally injected sivelestat on islet graft survival in a mouse allotransplant model. NE and proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-6 increased markedly at the end of warm digestion during islet isolation and exhibited direct cytotoxic activity against the islets causing their apoptosis. The use of S-Kyoto solution significantly improved islet yield and viability. Furthermore, treatment with sivelestat resulted in significant prolongation of islet allograft survival in recipient mice. Furthermore, serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  at 1 and 2 weeks posttransplantation were significantly higher in islet recipients than before transplantation. Our results indicated that NE released from activated neutrophils negatively affects islet survival and that its suppression both in vitro and in vivo improved islet yield and prolonged islet graft survival. The results suggest that inhibition of NE activity could be potentially useful in islet transplantation for patients with type 1 diabetes mellitus.

Key words: Type 1 diabetes; Islet transplantation; Neutrophil; Neutrophil elastase (NE)

### INTRODUCTION

Since the reporting of the Edmonton protocol, islet transplantation has become one of the treatment options for patients with type 1 diabetes mellitus (8,41,43–48). Islet transplantation is a minimal invasive approach for  $\beta$ -cell replacement compared with pancreas transplantation (18,44,47). However, a sufficient number of islets derived from two or more donor pancreas are usually required to achieve insulin independence, since a substantial number of transplanted islets fail to engraft into the recipient liver for a variety of reasons such as apoptosis, inflammation, and ischemia (1,3,27,29,37,41, 42,47,52,57–59). Furthermore, research into islet transplantation has been hindered by the inability to isolate a sufficient number of islets from a single donor pancreas

(4,15,16,45,47). Thus, there is a need for novel strategies that increase islet yield, maintain high islet quality, and protect transplanted islet grafts.

Indeed, the islet isolation procedure itself can lead to tissue destruction and activation of cellular and non-cellular components of the pancreas, including resident neutrophils, macrophages, and T cells, which probably play an important role in impairment of islet survival (1,4,31,37,42). In the present study, we focused on the role of neutrophils, in particular neutrophil elastase (NE), against islets during islet isolation. The NE is a 29-kDa (kilodalton) glycoprotein chymotrypsin-like serine protease stored in azurophil granules in its inactive form until it is released after neutrophil exposure to inflammatory stimuli (17,49,55). Once released, NE is fully

Received June 17, 2011; final acceptance January 10, 2012. Online prepub date: April 2, 2012.

<sup>†</sup>These authors provided equal contribution to this work.

Address correspondence to Masahiro Tanemura, M.D., Ph.D., Department of Gastroenterological Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Tel: +81-6-6879-3251; Fax: +81-6-6879-3259; E-mail: [mstanemura@gesurg.med.osaka-u.ac.jp](mailto:mstanemura@gesurg.med.osaka-u.ac.jp)

active, and the excessive release of NE degrades elastin, collagens, laminins, and other extracellular matrix components, thereby leading to subsequent tissue damage through endothelial cell injury (12,17,49,54,55).

Sivelestat (ONO-5046) is a low molecular weight synthetic specific and competitive inhibitor of NE activity (12,17,21,30,49,50,54,55,60). This agent has been employed clinically in Japan and shown to attenuate acute lung injury associated with systemic inflammation response, which is sometimes seen after infection, surgical intervention, traumatic, or burn injury (11,49,50,60). In addition, sivelestat exhibits potent cytoprotective properties in animal models of liver and lung transplantation (30,54), hepatectomy (17,21), and ischemia/reperfusion injury (17,54,55).

The objectives of the present study were to determine whether the addition of sivelestat to the islet isolation solution improves islet yield and viability. We also investigated the cytoprotective effects of sivelestat in islet recipients. The results suggested that NE inhibition using sivelestat is an attractive new therapeutic option in islet isolation and transplantation and could have a significant impact on patients with type 1 diabetes by allowing successful one donor to one recipient.

## MATERIALS AND METHODS

### *Drugs and Reagents*

Sivelestat (ONO-5046) is a newly synthesized agent known to selectively inhibit NE. Sivelestat was a generous gift from Ono Pharmaceutical Co., Ltd. (Osaka, Japan). A stock solution was prepared by dissolving 200 mg of sivelestat at room temperature in 20 ml of phosphate-buffered saline (PBS) with 24.5 mg of sodium carbonate and stored at 4°C until use.

### *Preservation Solutions*

University of Wisconsin (UW, Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ) and extracellular-type trehalose-containing Kyoto (ET-Kyoto; Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) solution were prepared. Stock solutions of 20  $\mu$ M sivelestat in UW and ET-Kyoto were prepared as S-UW, S-Kyoto, each. Sivelestat did not change the density of islets or other tissue components of the pancreas.

### *Mice*

Male C57BL/6J mice and Balb c/A mice, 10–12 weeks old, weighting 20–30 g, were purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo). All experiments were approved by the international animal care and use committee (IACUC) of Osaka University Medical School.

### *Islet Isolation and Assessment*

Briefly, after clamping the distal common bile duct under anesthesia, the common bile duct was cannulated.

Then the pancreatic tissue was distended by using 3 ml of isolation solution containing 1 mg/ml of collagenase VIII (Sigma-Aldrich; USA). The distended pancreas was excised and incubated in 37°C warm shaker for 15 min. The digested pancreas was washed with appropriate isolation solution three times by centrifugation (270 $\times$ g, 2 min, 4°C), then purified with a discontinuous density gradient (1.111, 1.104, 1.097, 1.072 g/ml) in isolation solution containing iodixanol (Optiplep<sup>®</sup>, Axis-Shield, Oslo, Norway). The purified islets were collected and cultured with Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 0.1 mM non-essential amino acids (Invitrogen, Carlsbad, CA) under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C (26).

To evaluate the isolated islets, islet count, islet equivalents (IEQ), distribution of islet size, and islet purity were determined as described previously (35,40). Islet yield and distribution of islet size were determined by measuring islets after dithizone staining (Wako, Osaka) using VH analyzer (Keyence, Osaka). The purification recovery rate was defined as the percentage of IEQ recovered after purification compared to the IEQ before purification (34). Islet purity was assessed by four independent investigators.

### *In Vitro Cytotoxicity Assay*

The cytotoxic activity of NE against isolated islets was assessed by the lactate dehydrogenase (LDH) assay kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Briefly, the harvested islets were plated at 30 islets/well in 96-well round plate. NE (Calbiochem, San Diego, CA) was then added to the wells at various concentrations, and the plates were incubated for 24 h at 37°C. Next, 100  $\mu$ l of the culture supernatant was transferred into the wells of 96-well flat plate. The reaction mixture was added to each well, and then absorbance was measured at 490 nm. Moreover, to examine the cytoprotective effects of sivelestat on NE cytotoxicity, 2, 20, or 200  $\mu$ M of sivelestat was simultaneously added to the NE-containing wells and the plates were incubated for 24 h at 37°C followed by measurement of absorbance at 490 nm.

### *Staining for Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase*

To assess the accumulation of activated neutrophils in the pancreas during islet isolation, the tissue was stained by naphthol AS-D chloroacetate esterase (Sigma-Aldrich) as described previously (14,17). Briefly, the pancreas specimens obtained before and at the end of warm digestion were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Tissue sections (2- $\mu$ m thick) were stained with naphthol AS-D chloroacetate esterase. In addition, the specimens were counterstained with hematoxylin. Activated

neutrophils were positively stained red-brown and counted under the microscope at a magnification of 100 $\times$ .

#### *Neutrophil Elastase Activity Assay*

NE enzyme activity was measured in the supernatant at each step of islet isolation, including before warm digestion, at the end of warm digestion, and after purification, using the method described previously (11,12,17,55,59). For this purpose a 20- $\mu$ l sample was incubated with 1 mM of *N*-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-nitroanilide (*p*-NA) (Sigma-Aldrich), which is a highly specific synthetic substrate for NE, in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.5 M NaCl at 37°C for 24 h. The incubated samples were plated onto a 96-well plate, and then absorbance was measured at 405 nm to detect free *p*-NA.

#### *Assessment of Apoptosis of Isolated Islets*

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining was performed to detect apoptotic cells during islet isolation, using Apop Tag<sup>®</sup> Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International, Temecula, CA) as described previously (53–55). The negative control was prepared by omission of the terminal transferase. Positive control was generated by treatment with deoxyribonuclease (DNase) I. Peroxidase activity was visualized with diaminobenzidine (DAB) substrate, which yielded a brown oxidation product, and 0.5% methyl green was used for counterstaining. TUNEL-positive cells were counted under the microscope at 400 $\times$  magnification.

#### *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

Morphological analysis of the isolated islets was carried out by SEM as described previously (31). The isolated islets were fixed with 2.5% PBS (0.1 M, pH 7.4) glutaraldehyde (Tokyo Chemical Industry, Tokyo) solution at 4°C for 24 h. After washing, they were postfixed with 1% OsO<sub>4</sub>/PBS for 2 h at 4°C. Subsequently, the fixed islets were incubated in 1% tannin acid solution at 4°C overnight and then dehydrated. They were transferred to isoamyl acetate and dried in a critical point dryer using liquid CO<sub>2</sub>. They were mounted on the stage and observed under a scanning electron microscope (S-800, Hitachi, Tokyo). The morphology was assessed by four independent investigators.

#### *Islet Viability Assay*

The viability of isolated islets was assessed by tetramethyl rhodamine ethyl ester (TMRE; Molecular Probes, Eugene, OR) assay and 7-aminoactinomycin D (7-AAD; Molecular Probes) assay, as described previously (9). TMRE is an indicator of the mitochondria membrane potential (MMP) and used as a marker for live cells, while

7-AAD is used as a marker for dead cells or apoptotic cells. Briefly, the isolated islets were cultured for 24 h and then incubated in 1 ml of TrypLE Express (Invitrogen) for 15 min at 37°C to prepare single islet cells and then dispersed. The single islet cells were incubated with 100 ng/ml of TMRE for 30 min at 4°C. Subsequently, the fluorescence intensity of TMRE was analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (BD Immunocytometry, San Jose, CA). In a similar fashion, the isolated islets were dispersed into single cells and then incubated with 1  $\mu$ g/ml of 7-AAD. Subsequently, the fluorescence intensity of 7-AAD was analyzed with a FACS Calibur flow cytometer.

To further determine the islets viability, the colorimetric methyl tetrazolium salt (MTS) assay was performed as described previously (56). The viability of freshly isolated islets or cultured islets over either 24 or 48 h was evaluated by monitoring metabolic activity with MTS assay using the cell Titer 96 Aqueous One reagent (Promega, Madison, WI). The colorimetric reagent was added to each well and incubated for 2 h, and the absorbance values were read at 490 nm.

#### *Glucose-Stimulated Insulin Release In Vitro*

To evaluate the in vitro insulin function of islets, static glucose change was measured as described previously (33,35). Twenty islets were cultured overnight at 37°C and then preincubated in low-glucose culture medium (2.8 mM glucose) for 60 min at 37°C. After preincubation, the islets were incubated in low-glucose culture medium (2.8 mM glucose) at 37°C for 60 min. Subsequently, the supernatant of the culture medium was collected, and the islets were incubated in high-glucose culture medium (20 mM glucose) at 37°C for 60 min. Similarly, the supernatant was collected, and insulin concentration was measured by the mouse-insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Glucose-stimulated insulin concentration was expressed as the stimulation index (SI), calculated as the ratio of insulin released during exposure to high glucose over the insulin released during low-glucose incubation.

#### *Islet Transplant Experiments*

The recipient 10- to 12-week-old male Balb c/A mice were divided at random into two experimental groups (Fig. 6A) ( $n=5$ /group) to receive allogeneic islets isolated from C57BL/6J mice by the use of either isolation solution (i.e., ET-Kyoto and S-Kyoto solutions). The recipient mice were rendered diabetic by a single injection of streptozotocin (STZ) (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) at a dose of 180 mg/kg intraperitoneally. Hyperglycemia was defined as glucose level of >400 mg/dl measured twice consecutively after STZ injection. Then 500 of freshly isolated islets were transplanted under the kidney