

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15481

研究課題名(和文) 肝臓透明化技術を用いた臓器内部可視化による膵島移植の移植後病態解明

研究課題名(英文) Analysis of post-transplant islet by organ transparency and macro three-dimensional image

研究代表者

霜田 雅之(Shimoda, Masayuki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・膵島移植プロジェクト長

研究者番号：40640529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：不安定1型糖尿病の治療法として膵島移植が注目されている。門脈を介した移植のため侵襲性の低い細胞移植療法であり、欧米ではすでに標準的な治療法となっている国もある。一方で、膵島移植の課題の一つに低い生着率があり、その原因の解明が必要であるが、門脈注入後は、直接観察できなくなることが大きな障害になっている。そこで、臓器の透明化技術とセンチメートル単位で観察可能なシートレーザー蛍光顕微鏡と併せて用いることで、マウス肝臓内部を可視化し、3次元構造を保ったままで移植後膵島を観察した。その結果、膵島の全体分布、生着、膵島数の増減などを経時的に検証できた。結果を国際学会で発表した。

研究成果の概要(英文)：Islet transplantation has attracted attention as a treatment for unstable type 1 diabetes. It is a less invasive cell transplantation therapy and it is already a standard treatment in some countries. On the other hand, one of the drawbacks of islet transplantation is a low survival rate. It is necessary to elucidate the cause, but it is a big obstacle not to be able to observe the implanted islets directly after the portal vein injection. Therefore, by using the transparency technique of organs and a sheet laser fluorescence microscope, the whole mouse liver was visualized and the pancreatic islets were observed after transplantation while maintaining the three-dimensional structure. As a result, it was possible to verify the overall distribution of the islets, decrease of the number of islets over time. The results were announced at the international conference.

研究分野：膵島移植

キーワード：臓器透明化 膵島移植

1. 研究開始当初の背景

[研究の学術的背景]

膵島移植研究の課題

現在 1 型糖尿病の根治的治療としては膵臓移植や膵島移植が行われており、特に膵島移植は負担が少ない治療として有望である。通常膵島は門脈内に注入され、肝臓内に生着する。しかし移植後早期に、instant blood mediated inflammatory reaction(IBMIR)と呼ばれる凝固・炎症反応が引き起こされ、さらに分離時に血管網も寸断されているため半数以上の膵島が破壊されるとされている。さらに長期的には拒絶反応、免疫抑制剤毒性、脂質毒性、高血糖毒性、自己免疫再燃などにより徐々に機能が低下することも課題である。これらの克服のためには各現象の原因・メカニズムの解明および解決法の開発が必要である。しかし現実的には門脈注入後の肝臓内の膵島は外部から観察できず、その分布や経時的細胞数の変化を今までは直接検証するのは難しい。肝臓を薄切して 2 次元的に観察するか、超音波や MRI など外部から検査する方法はあるが、簡便性、解像度、染色不可等の問題で微細な検証はできなかった。

臓器の透明化技術

近年、小動物の臓器を形態・3 次元構造を保ったまま透明化する技術が発展してきている。特に以前の技術では困難であったが、近年タンパク(抗原性)を保持したまま透明化できるようになったため、抗体を用いた蛍光染色が可能となった。

顕微鏡技術の発展

また顕微鏡が発達し、多光子共焦点蛍光顕微鏡を用いれば数 mm 程度の幅ならば 3 次元の構造を観察することが可能となった。

透明化した臓器の 3 次元観察

上記の臓器透明化技術と顕微鏡技術を組み合わせ、マウスなどの脳を透明化して、神経細胞等の染色を行った検体を 3 次元的に観察し、神経線維の走行などを詳細に検証でき

るようになった。しかし、他の臓器、特に肝臓などの血流が多くサイズの大きな実質臓器は抗原性を保持したままの透明化が困難であった。

肝臓の透明化

そこで申請者らは、膵島移植の移植生着部位である肝臓全体の透明化を試み、これに成功した。本研究ではこの技術を膵島移植の研究に応用する。

2. 研究の目的

不安定 1 型糖尿病に対し、近年同種膵島移植が行われている。膵島は門脈内に注入されるため低侵襲の細胞移植治療として期待されているが、課題の一つに門脈注入後の低い生着率があり、移植後早期に半数以上が破壊されるとされている。さらに、長期的にもグラフト機能は低下していく。その原因・メカニズムの解明が必要であるが、門脈注入後は外部から膵島が見えなくなり、直接観察することができなくなることが大きな障害になっている。最近、我々はマウス肝臓を構造および抗原性を保持したまま全体を透明にする画期的な技術を開発した。この技術とミリメートル～センチメートルの単位で観察可能なレーザー蛍光顕微鏡を用いると肝臓内部を可視化してマクロ視野および微細構造の双方で 3 次元構造のまま詳細に観察可能である。本研究では移植後膵島を 3 次元的に観察し、膵島の全体分布、生着、炎症、血管新生、免疫反応、膵島数の増減、インスリン産生量の変化、細胞量の変化などを経時的に検証を行う。

3. 研究の方法

平成 27 年度

1. 肝臓透明化(霜田、松本、篠原)

パイロットスタディの結果を発展させ、マウス肝臓を用いて臓器全体を透明化する方法を開発する。その際、

i) 抗原性を保持すること

- ii) 短期間で透明化できること
- iii) 臓器の膨張を最小限にすること
- iv) 中心まで均一に透明化すること

の全てを満足するよう目指す。透明化に用いる薬剤は、スクロース、尿素、グリセロールを中心とし、他の有機化合物やその組み合わせを検証する。透明化した肝臓を、シートレーザを用いた低倍率で観察可能な蛍光顕微鏡を用いることにより、~2cm までのマクロ視野での観察を行う。血管等を染色し、内部まで染色できることを確認する。3 次元的に全体像を描出する。

2. 経門脈的膵島移植(霜田、松本、篠原)

まず免疫不全マウスに対して経門脈的に単離した膵島を移植する。移植膵島はマウスから単離するが、他にラット、ブタ膵島も検討する。さらに、通常のマウスに対して自家移植の系での移植、異なるマウス間での同種移植の系を、それぞれ免疫抑制剤の有無により群分けし、移植を行い、群間の相違を検証する。移植した膵島は、インスリン等で膵島特異的に染色するか、GFP マウス等から単離した膵島を用いて蛍光検出できるようにする。

平成 28 年度

3. 膵島移植後のマクロ視野観察(霜田、松本、篠原)

膵島移植後の各膵島の肝臓中での分布はこれまで簡便に一括で検出できる方法がほとんどなかったが、本技術で可能となった(図5: 透明化した肝臓の門脈内ビーズの観察)。本研究ではマクロ視野での全体的な膵島分布と、経時的な変化を検証する。多くの場合長期的に移植膵島機能は低下するが、膵島数の減少と各膵島のインスリン分泌能の低下の割合は定かでないので、本研究で検証する。

4. 膵島移植後のミクロ視野観察(霜田、松本、篠原)

膵島移植後、各膵島は周囲環境と相互作用

し、instant blood mediated inflammatory reaction(IBMIR)のような凝固炎症反応の亢進、免疫細胞浸潤、線維化などの生存に不利な反応、または血管新生などの有利な反応を起こす。予備実験で肝門脈に膵島と同サイズの直径 100 μ m の蛍光ビーズを注入し肝臓を透明化し、シートレーザ蛍光顕微鏡で観察し、3次元描出に成功した。それら微細な組織を多重染色した上で多光子共焦点顕微鏡(超微細構造)や前述のシートレーザ蛍光顕微鏡(微細~マクロ構造)で3次元的に観察する。さらに、IBMIR 抑制、炎症・免疫反応抑制、血管新生促進を目指した候補薬剤を投与して影響を検証し、膵島の生着率向上を目指す。以上の解析によって、透明化法を確立し膵島移植後の膵島および周囲環境の詳細な観察を3次元的・経時的に行う。さらに膵島移植成績向上のための新規治療法を開発していく。さらにiPS細胞等の幹細胞由来再生膵島の門脈内移植への応用を行っていく。細胞移植・再生治療分野は現在もっとも激しい開発合戦が繰り広げられている領域であり、本研究の成果は大きなインパクトを与える。

研究が当初計画どおりに進まない時の対応すでに予備実験で肝臓透明化の目的はたっているが、さらなる改良を行う。抗原性の保持は一部確認しているが、どんな抗原でも保持出来ているかは未知数である。透明化法を工夫し、抗原性の保持を検証する。蛍光顕微鏡での肝臓内部観察も可能なことを予備実験で確認しているが、内部の解像度が不良な場合は、さらなる透明化法、染色法、顕微鏡の改良を試みる。

4. 研究成果

マウス肝臓を用いて、透明化方法を改良し従前よりもさらに臓器中心部まで十分な透明化を得ることに成功した。さらにGFPマウスから蛍光を発する膵島を単離し、免疫不全マウスの門脈に注入して肝臓内に移植するモ

デル系を開発した。同モデルを作成して継時的に肝臓採取して全体を透明化し、ライトシートレーザー顕微鏡で観察した。その結果、肝臓全体の移植臓の分布、継時的な生着と分布の変化を肝臓全体としてマクロ視野で3次元的に検証することに成功した。結果を国際学会で発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Masayuki Shimoda, Koya Shinohara, Wenji Yuan, Shinichi Matsumoto. 3D imaging model for islet grafts in the transparent liver by whole-organ clearing method. IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress. Melbourne, Australia, November 15-19, 2015.

2. Koya Shinohara, Masayuki Shimoda. Analysis of post-transplant islet by organ transparency and macro three-dimensional image. 26th International Congress of The Transplantation Society, August 17-23, 2016, Hongkong, China.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 国立国際医療研究センター
研究所 膵島移植プロジェクト 霜田雅之
(SHIMODA, Masayuki)

研究者番号：40640529

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4)研究協力者 松本慎一、篠原孝也
(MATSUMOTO, Shinichi 、
SHINOHARA, Koya)