

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19591481  
研究課題名（和文）国際膵島移植ネットワーク構築に向けた移植用ヒト膵島の長期品質管理法の開発  
研究課題名（英文）Development of in vitro preservation of human islets to establish the global islets transplant network.  
研究代表者  
種村 匡弘（TANEMURA MASAHIRO）  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号 30379250

研究成果の概要：本研究ではオートファジー様細胞死と膵島保存・機能傷害との関連を解析した。1 ng/ml または 10 ng/ml のラパマイシン濃度でマウス膵島を処理した。その結果、オートファジー誘導のマーカーである LC3-II タンパクの膵島内蓄積を確認し、膵島 viability も約 50% 抑制されることを確認した。また、膵島のインスリン分泌能はグルコース負荷テストにおいて、10 ng/ml ラパマイシン処理では分泌はほぼ完全に抑制された。一方、オートファジー阻害剤・3-methyladenine で追加処理することにより LC3-II タンパク膵島内蓄積、膵島 viability、膵島インスリン分泌能を有意に改善させることができ、膵島におけるオートファジー誘導は移植用膵島の保存・品質管理に強く関与していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般

キーワード：移植外科学、膵島移植

## 1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病の根治療法として「膵島移植」が行われ良好な成績を得ている。膵島移植は心停止ドナーの提供膵臓より膵島のみ分離・純化し新鮮膵島を門脈内に点滴する方法で、レシピエントにかかる侵襲もほとんどなく「理想的な根治療法」と言える。しかし本

邦の「極端なドナー不足」さらに「膵島保存技術がない」ため新鮮膵島を移植する必要があり時間的制約も膵島移植の普及を妨げる大きな負の要因となっている。

さて移植先進国・アメリカでは脳死ドナー膵臓提供は年間約 6000 件あるが、膵臓また

は膵島移植に利用された提供膵臓はわずか1400~1600 件/年に過ぎず、大部分の提供膵臓は移植に利用されていないのが現状である。申請者は、この余剰な提供膵臓の有効利用に着目し、アメリカで分離した移植用ヒト膵臓を安定した状態で保存・品質管理し日本に shipping、レシピエントに移植することが可能となれば、血糖変動が激しいブリットル型を含めた多くの1型糖尿病患者を病魔から救うことができると考えている。遠隔地分離膵臓の有効利用は糖尿病根治を目指したロードマップの中で最も臨床応用に近い戦略であり、膵臓の保存期間が延長できればレシピエントに免疫抑制剤導入をあらかじめ先行させ、移植膵臓がより生着しやすい免疫環境を整えることが可能となり、one donor-one recipient 膵臓移植実現に向けた付加的効果も十分期待できる。

## 2. 研究の目的

膵臓を分離し、培養液中で長期間保存・品質管理することは、培養液が生体内環境と同じ状態で無い限り、膵臓に一種の栄養障害、すなわち飢餓ストレスと同じストレスがかかると考えられ、生体における飢餓適応としてオートファジーが誘導される。オートファジーは、細胞内成分をリソソームで分解するための主要な経路であり、普遍的なマシナリーである。オートファジーの生理機能は十分に明らかにされておらず、また疾患との関係も現在、解明途上である。

膵臓とオートファジーとの関連はこれまで報告はなく、オートファジー誘導が膵臓の機能や viability、ひいては品質管理にどのように作用するかは全く不明である。

本研究では、この生物学的疑問を解明する第1段階としてラパマイシンを用いて膵臓にオートファジーが誘導されるのか、さらに誘導後、膵臓の生物学的機能・活性はどのよう

に変化するのかを解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) Isolation of pancreatic islets

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

### (2) Western blot analysis

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

### (3) Islet viability assay

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

### (4) Blocking assay of autophagic signaling

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

### (5) *Glucose-stimulated insulin release and stimulation index*

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

#### 4. 研究成果

##### (1) LC3-II タンパク発現量の変化

ラパマイシン処理していないコントロール膵島においても endogenous な LC3-II タンパクの発現を認め、LC3-II/GAPDH 比は 0.5 であった。しかし、ラパマイシン処理することにより LC3-II タンパクの発現は有意に増加した。1 ng/ml の rapamycin 存在下では、LC3-II タンパクの過剰発現は認められず LC3-II/GAPDH 比も 0.46 とコントロールと差は認めなかったが、1 0ng/ml の rapamycin 存在下では、LC3-II タンパクの過剰発現を認め、LC3-II/GAPDH 比でも 1.08 とほぼ 2 倍の発現量を認め、ラパマイシンによりマウス膵島にオートファジーが誘導されているのを確認できた。また、3-MA によるオートファジーブロックでは、約 32% LC3-II タンパクの発現を抑制することができた。

##### (2) 膵島 viability の変化

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

##### (3) インスリン分泌能の変化

膵島にオートファジーを誘導することによりインスリン分泌能がどのように変化するかを static glucose challenge test を行い stimulation index (SI) を算出し解析した。ラパマイシン処理していないコントロール膵島の SI は 1.38 でグルコース負荷によりインスリンが膵島より分泌されているのを確認した。しかし、1 ng/ml rapamycin 処理により SI

は 1.17 まで低下し、10 ng/ml rapamycin 処理では、SI は 1.11 まで低下しインスリン分泌はほぼ完全に抑制された。しかし、3-MA によるオートファジーブロックにより SI はそれぞれ 1.48、1.32 まで回復した。

##### (4) 考察と今後の展望

インスリン分泌が完全に枯渇している 1 型糖尿病の根治療法として「膵臓移植」「膵島移植」が行われているが、レシピエントにかかる手術侵襲の程度、移植手技の簡便さなどを考慮すると、膵島移植はより患者に優しい根治療法と言える。しかしながら、インスリン離脱などの遠隔成績では膵臓移植を凌駕するまでには至らず、今後の改善が迫られる。膵島移植の遠隔成績不良の原因として勿論、免疫学的な移植膵島の拒絶が第 1 の原因と考えられるが、膵島移植で広く使われている免疫抑制剤・ラパマイシンによる膵島毒性の可能性も否定できない。

ラパマイシンは細胞内受容体である FKBP12 を介して mTOR に結合し、mTOR の機能を抑制する。その結果、ラパマイシンは細胞にオートファジーを誘導する。オートファジーは細胞内成分をリソソームで分解するための主要な経路である。一方、オートファジーが細胞死に関与している可能性を示唆する報告もある。近年、研究の進歩から、このシステムと神経変性疾患、感染症 (細菌からの生体防御)、心疾患 (心不全)、膵臓疾患 (膵炎) など疾患・病態とオートファジーの関係が明らかになりつつある。

今回の研究成果により、膵島にオートファジーが誘導されることを確認し、それにより膵島の viability および膵島からのインスリン分泌が低下することを見出した。すなわち、オートファジー誘導は膵島にとって悪影響を及ぼすことが示唆された。さらに、3-MA を併用することによりオートファジー誘導およびそれに伴う機能傷害は回避されることも見出した。今後研究を進め 3-MA などを用いた膵島保存プロトコルの確立を目指す。

## 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7件)

①Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Rapamycin induces autophagy in islets : Relevance for islets transplantation. Transplant Proc. 2009, 41 (1): 334-338 (査読有)

②Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Adenovirus-mediated gene expression of human c-FLIP<sub>L</sub> protects pig islets against human CD8<sup>+</sup> CTL-mediated cytotoxicity. Transplant Proc. 2009, 41 (1) : 319-322 (査読有)

③Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Intra- and extracellular remodeling effectively prevent human CD8<sup>+</sup> CTL-mediated xenocytotoxicity by coexpression of membrane-bound human FasL and pig c-FLIP<sub>L</sub> in pig endothelial cells. Transplant Proc. 2009, 41 (1): 391-395 (査読有)

④Kawamoto K, Tanemura M, Saga A, Komoda H, Fumimoto Y, Deguchi T, Machida T, Sawa Y, Nishida T, Ito T. Adenoviral-mediated overexpression of either membrane-bound human FasL or human decoy Fas can prolong pig islet xenograft survival in rat transplant model. Transplant Proc. 40(2):477-9, 2008. (査読有)

⑤Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Manabe N, Machida T, Deguchi T, Sawa Y, Nishida T, Ito T. Pig cellular FLICE-like Inhibitory Protein (c-FLIP) overexpression in pig xenograft cells induces resistance to human CD8<sup>+</sup> CTL-mediated xenocytotoxicity. Transplant Proc. 40(2):559-63, 2008 (査読有)

⑥Kawamoto K, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Sawa Y. et al. Prolonged survival of pig islets xenograft by adenovirus-mediated expression of either membrane-bound human FasL or human decoy Fas antigen gene. Xenotransplantation: 15(5) 333-343, 2008 (9人中2番目, Corresponding author) (査読有)

⑦Tanemura M, Saga A, Kawamoto K et al. In vitro and in vivo prevention of human CD8<sup>+</sup> CTL-mediated xenocytotoxicity by pig c-FLIP expression in porcine endothelial cells. Am J Transplant. 2008, 8(2):288-297. (8人中1番目) (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

①種村匡弘 :

移植膵島でのオートファジー誘導の臨床的意義- 膵島移植後免疫抑制療法としてラパマイシンは妥当か?

日本移植学会総会(44), 2008.9.19-21, 大阪

②Tanemura M. et al :

Intra- and extracellular remodeling effectively prevent human CD8<sup>+</sup> CTL-mediated xenocytotoxicity by coexpression of human membrane-bound FasL and pig c-FLIP<sub>L</sub> in pig endothelial cells. International congress of the transplantation society (22), 2008, 8.9-14, Sydney

③Tanemura M. et al :

Adenovirus-mediated gene expression of human c-FLIP<sub>L</sub> protects pig islets against human CD8<sup>+</sup> CTL-mediated cytotoxicity. 2008, 8.9-14, Sydney

④Tanemura M. et al :

Rapamycin induces autophagy in islets : Relevance for islets transplantation. 2008, 8.9-14, Sydney

⑤嵯峨礼美, 種村匡弘, 川本弘一, 菰田 弘, 文元雄一, 出口貴司, 町田智彦, 西田俊朗, 澤 芳樹, 伊藤壽記 :

ブタ cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) 過剰発現による細胞内シグナル伝達リモデリングを応用したヒト CD8<sup>+</sup> CTL 細胞傷害性の制御、第43回 日本移植学会総会、シンポジウム, 2007.11.23, 仙台

⑥Tanemura M. et al :

Pig cellular FLICE-like Inhibitory Protein (c-FLIP) overexpression in pig xenograft cells induces resistance to human CD8<sup>+</sup> CTL-mediated xenocytotoxicity. Joint Conference of IPITA, CTS and IXA, September 15-20, 2007, Minneapolis, Minnesota, USA

⑦種村匡弘、川本弘一、嵯峨礼美、菰田 弘、大森 健、文元雄一、島田和典、出口貴司、澤 芳樹、西田俊朗、伊藤壽記 :

I型糖尿病に対する異種膵島移植療法の確立—レシピエント細胞性拒絶回避の免疫学的戦略—

第107回 日本外科学会定期学術集会、ワークショップ, 2007.4.13, 大阪

〔図書〕(計1件)

伊藤壽記(編集)、種村匡弘

シュプリンガー・ジャパン刊「膵臓移植—糖尿病根治をめざして—」12章 術後管理 II 合併症 (i) 外科的合併症 : 2009年発行

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

種村 匡弘 (TANEMURA MASAHIRO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30379250

### (2) 研究分担者

伊藤 壽記 (ITO TOSHINORI)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：20231152

野村 昌哉 (NOMURA MASAYA)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30403190

### (3) 連携研究者