

平成21年5月22日現在

研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19790921  
研究課題名（和文） テロメラーゼ遺伝子導入による不死化膵島を用いた膵島移植胃粘膜下  
注入法  
研究課題名（英文） Islet transplantation by gastric submucosal-injection method using  
Immortalizing islet cells transferred telomerase gene  
研究代表者  
首藤 毅（SUDO TAKESHI）  
広島大学・病院・助教  
研究者番号：10423378

研究成果の概要：糖尿病に対する根本的治療である膵島移植の一般化のためには移植効率の向上が必要である。移植膵島の生着率向上のための胃粘膜下注入法の確立と生着膵島の長期機能向上のためのテロメラーゼ遺伝子導入による膵島不死化について研究した。研究の課程で膵島移植効率を向上する生着促進剤を発見した。ラット膵島移植において移植後急性期のエダラボン投与は移植膵島のアポトーシスを抑制して生着促進し、移植後膵島機能を向上した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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：膵島移植、胃粘膜下注入法、テロメラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

今後の膵島移植の推進、一般化に向けての課題は1ドナー／1レシピエントの実現にあり、そのためには、膵島回収量のさらなる改善と安定化、移植直後の膵島傷害の機序の解明とその防止策の開発、膵島の再生誘導や免疫寛容による長期予後の向上が必要不可欠である。我々は移植膵島傷害の機序とその防止策に関して、移植の場となる臓器の環境とその生着反応に注目してきた。今回、我々はin vivoでの移植環境としての消化管粘膜下層に注目し、膵島移植・胃粘膜下注入法の

移植効果を検証する。一方、移植膵島の再生誘導、長期生着に関して、分離した膵島グラフトにテロメラーゼ逆転写酵素(TERT)を遺伝子導入することにより、細胞分裂増殖を誘導し生着後の膵島再生を試みることにした。

## 2. 研究の目的

(1) 膵島移植における胃粘膜下注入法の移植効果を検証する。

(2) 分離した膵島グラフトにテロメラーゼ逆転写酵素(TERT)を遺伝子導入することにより、移植膵島生着後の膵島増殖・再生を試

みる。

### 3. 研究の方法

(1) 同系ラット膵島移植モデルにおいて、胃粘膜下注入膵島移植法と従来の経門脈的肝内膵島移植法の移植効果を比較検討し、膵島生着率、移植後膵島機能を検証する。

【糖尿病ラットの作製】F344 ラットを使用し、Streptozotocin で糖尿病を誘導し、レシピエントに使用する。

【膵島の単離】F344 ラットをドナーに使用し、Collagenase technique にて膵島を単離する。(1ドナー約 200 個)

【膵島移植】胃粘膜下膵島移植法は、2ドナー膵島約 400 個を開腹下に胃前壁を切開し後壁の胃粘膜下に注入する。経門脈的肝内膵島移植法は、従来通り 2ドナー膵島約 400 個を経門脈的に肝内に移植する。

【移植後機能評価】随時血糖、経静脈的糖負荷試験、インスリン濃度測定で、移植後インスリン分泌機能評価を行う

【移植膵島の生着率評価】レシピエントの胃、肝を摘出し、移植膵島の生着を免疫組織学的に評価する。抗インスリン抗体陽性部分を機能的生着膵島とし生着率を評価する。

(2) 膵島β細胞にテロメラーゼ逆転写酵素(TERT)を導入し、不死化膵島の作製を試みる。

【TERTの導入】F344 ラットから単離された膵島β細胞を培養し、テロメラーゼ逆転写酵素(TERT)を発現するレトロウイルスベクターを導入することにより、膵島細胞の不死化、再生誘導を試みる。

(3) 移植早期の虚血再灌流障害およびアポトーシスに注目し、動物実験で移植臓器保護効果が報告されているエダラボン投与による移植膵島の生着促進効果を検討する。

【実験モデル】エダラボンを膵島移植直後と 24 時間後に経静脈的に投与する群(n=10)と非投与群(n=10)を作成する。

【移植後機能評価】移植後 4 週間随時血糖を測定、2 週後に IVGTT を行い 30 分後の血中 insulin 濃度を ELISA 法で測定する。

【移植膵島の生着率評価】移植 2 日後の移植膵島の生着をレシピエント肝を用いて insulin 抗体と TUNEL 染色にて免疫組織学的に検討する。

### 4. 研究成果

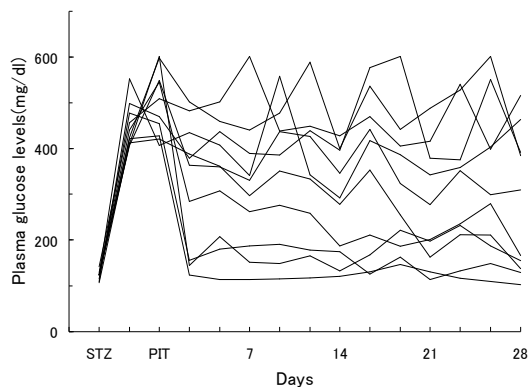
(1) 移植急性期の膵島傷害の軽減を目的として胃粘膜下注入法の移植効果を検証したが、従来法の経門脈的肝内移植法を上廻る効果は得られなかった。

(2) 移植早期の虚血再灌流障害およびアポトーシスに注目し、動物実験で移植臓器保護効果が報告されているエダラボン投与による移植膵島の生着促進効果を検討した。

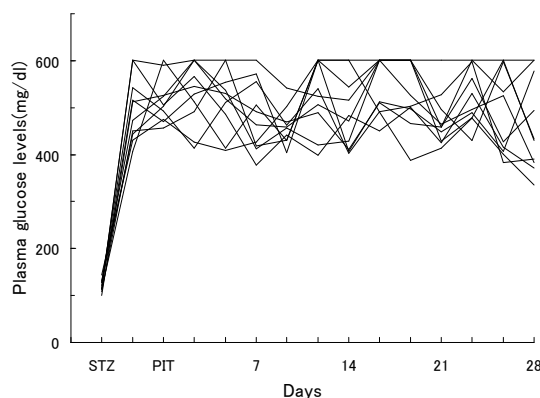
#### 【移植後膵島機能】

エダラボン投与群では血糖改善率(400mg/dl 未満)が 60%、正常化率(200mg/dl 未満)が 50%だったのに対し、非投与群は全例高血糖(400mg/dl 以上)が持続した(改善率 0%)。

エダラボン投与群の移植後血糖値の推移



エダラボン非投与群の移植後血糖値の推移



2 週後の insulin 濃度はエダラボン投与群が非投与群に比べて高値であり(0.99 ± 0.83ng/ml vs 0.20 ± 0.24ng/ml, p<0.01)、移植後膵島機能はエダラボン投与群で有意に良好だった。

#### 【移植膵島の生着率】

1 生着膵島あたりのインスリン陽性細胞数(24.4 ± 26.1 vs 14.7 ± 10.2, p<0.01)、インスリン陽性細胞面積(132 ± 54 μm<sup>2</sup> vs 110 ± 48 μm<sup>2</sup>, p<0.05)がエダラボン投与群において有意に高値で、機能的に生着したβ細胞の細胞数と個々の細胞の大きさがエダラボン投与群で有意に高値だった。

	Edaravone (n=62)	Control (n=45)
Size of islet	4455	5694
Beta cell area in each islet	1653	3058
Ratio of beta cell area in each islet	37	52
Number of beta cells in each islet	14.7	24.4
Size of beta cell	110	132

移植後膵島の生着率は形態的にも機能的にもエダラボン投与群で優れており、移植後急性期のエダラボン投与による膵島生着促進効果を認めた。

TUNEL 染色では1生着膵島あたりの TUNEL 陽性細胞数がエダラボン投与群において有意に低値であった。(0.23±0.68 vs 1.46±3.64, p<0.05)

	Edaravone (n=43)	Control (n=33)
Size of islet	7764	5240
Number of TUNEL-positive beta cells in each islet	0.23	1.46

移植後急性期(48時間)の生着率は形態的にも機能的にもエダラボン投与群で優れており、エダラボン投与群でアポトーシスに陥った細胞数が有意に少なかったことから、膵島移植後急性期のエダラボン投与は、移植膵島のアポトーシスを抑制して生着促進に働くことが示唆された。

#### 【結論】

ラット膵島移植後急性期のエダラボン投与は、移植膵島のアポトーシスを抑制して生着促進し、移植後膵島機能の向上に有効であった。

#### 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 17 件)

1. Nakamura H, Morifuji M, Murakami Y, Uemura K, Ohge H, Hayashidani Y, Sudo T, Sueda T: Usefulness of a <sup>13</sup>C-labeled mixed triglyceride breath test for assessing pancreatic exocrine function after pancreatic surgery. *Surgery*(査読有). 2009 Feb;145(2):168-175.

2. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hayashidani Y, Hashimoto Y, Ohge H, Sueda T: Impact of adjuvant gemcitabine plus S-1 chemotherapy after surgical resection for adenocarcinoma of the body or tail of the pancreas. *J Gastrointest Surg*(査読有). 2009 Jan;13(1):85-92.
3. 首藤毅, 村上義昭, 上村健一郎, 林谷康生, 橋本泰司, 浦部和秀, 大毛宏喜, 末田泰二郎: 特集/長期予後からみた慢性膵炎の治療—内科 vs. 外科, 慢性膵炎に対する膵管ドレナージ手術の適応と予後, 膵臓(査読有) 24(1): 89-96, 2009
4. Uemura K, Murakami Y, Hayashidani Y, Sudo T, Hashimoto Y, Ohge H, Sueda T: Randomized clinical trial to assess the efficacy of ulinastatin for postoperative pancreatitis following pancreaticoduodenectomy. *J Surg Oncol*(査読有). 2008 Oct 1;98(5):309-313.
5. Sudo T, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Hashimoto Y, Ohge H, Shimamoto F, Sueda T: Prognostic impact of perineural invasion following pancreatoduodenectomy with lymphadenectomy for ampullary carcinoma. *Dig Dis Sci*(査読有). 2008 Aug;53(8):2281-2286.
6. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hayashidani Y, Hashimoto Y, Nakagawa N, Ohge H, Sueda T: Adjuvant gemcitabine plus S-1 chemotherapy after surgical resection for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg*(査読有). 2008 Jun;195(6):757-762.
7. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hayashidani Y, Hashimoto Y, Nakagawa N, Ohge H, Sueda T: An antecolic Roux-en Y type reconstruction decreased delayed gastric emptying after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *J Gastrointest Surg*(査読有). 2008 Jun;12(6):1081-1086.
8. 首藤毅, 村上義昭, 上村健一郎, 林谷康生, 大毛宏喜, 末田泰二郎: 特集/膵癌の外科治療は進歩したか I. 総論 2. 膵癌に対する縮小手術はどこまで許されるか. *外科*(査読有) 70(6): 592-600, 2008.
9. Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Hashimoto Y, Ohge H, Sueda T: Long-term pancreatic endocrine function following pancreatoduodenectomy with pancreaticogastrostomy. *J Surg Oncol*(査読有). 2008 May 1;97(6):519-522.
10. Hashimoto Y, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Ohge H, Sueda T, Shimamoto F, Hiyama E: Mixed ductal-endocrine carcinoma derived from intraductal papillary mucinous neoplasm

(IPMN) of the pancreas identified by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression. J Surg Oncol(査読有). 2008 Apr 1;97(5):469-475.

11. Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Hashimoto Y, Nakagawa N, Ohge H, Sueda T: No mortality after 150 consecutive pancreatoduodenectomies with duct-to-mucosa pancreaticogastrostomy. J Surg Oncol(査読有). 2008 Mar 1;97(3):205-209.

12. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hayashidani Y, Hashimoto Y, Ohge H, Sueda T: Postoperative adjuvant chemotherapy improves survival after surgical resection for pancreatic carcinoma. J Gastrointest Surg(査読有). 2008 Mar;12(3):534-541.

13. Hashimoto Y, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Ohge H, Fukuda E, Sueda T, Hiyama E: Detection of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in tissue and pancreatic juice from pancreatic cancer. Surgery(査読有). 2008 Jan;143(1):113-125.

14. Hashimoto Y, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Ohge H, Fukuda E, Shimamoto F, Sueda T, Hiyama E: Telomere shortening and telomerase expression during multistage carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. J Gastrointest Surg(査読有). 2008 Jan;12(1):17-28.

15. Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Hashimoto Y, Nakagawa N, Ohge H, Sueda T: A soft pancreatic remnant is associated with increased drain fluid pancreatic amylase and serum CRP levels following pancreatoduodenectomy. J Gastrointest Surg(査読有). 2008 Jan;12(1):51-56.

16. Sudo T, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Hashimoto Y, Ohge H, Sueda T: Specific antibiotic prophylaxis based on bile cultures is required to prevent postoperative infectious complications in pancreatoduodenectomy patients who have undergone preoperative biliary drainage. World J Surg(査読有). 2007 Nov;31(11):2230-2235.

17. Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Ohge H, Sudo T, Sueda T: Re: "Intraductal papillary-mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas differentiated by ovarian-type stroma. Surgery(査読有). 2007 Jun;141(6):834-835

[学会発表] (計 18 件)

1. 首藤毅: シンポジウム「外科・救急・集中治療における感染治療戦略」肝胆膵外科における術後感染予防抗菌薬の選択－膵頭十二指腸切除術における胆汁培養に基づいた抗菌薬戦略－. 第 56 回日本化学療法学会西日本支部総会・広島 2008 年 12 月 6-7 日

2. 首藤毅: SMA 神経叢全周温存・膵頭十二指腸切除術のリンパ節・神経叢郭清の手技と成績. 第 61 回広島医学会総会・広島 2008 年 11 月 29-30 日

3. 首藤毅: ビデオシンポジウム「膵癌に対する標準的な膵頭十二指腸切除術」 SMA 神経叢全周温存・膵頭十二指腸切除術のリンパ節・神経叢郭清の手技と成績. 第 70 回日本臨床外科学会総会・東京 2008 年 11 月 27-29 日

4. 首藤毅: ビデオシンポジウム「胆道再建」肝胆膵外科手術における胆道再建の手技と工夫. 第 32 回広島肝胆膵外科手術研究会・広島 2008 年 11 月 11 日

5. 首藤毅: シンポジウム「長期予後からみた慢性膵炎の治療－内科 vs 外科」慢性膵炎に対する外科的治療の成績と術後膵機能第 39 回日本膵臓学会・横浜 2008 年 7 月 30-31 日

6. 首藤毅: ワークショップ「膵頭十二指腸切除術の再建法、吻合法の提案と課題」膵頭十二指腸切除術における膵胃吻合再建・膵管胃粘膜吻合法の成績と課題. 第 63 回日本消化器外科学会総会・札幌 2008 年 7 月 16-18 日

7. 首藤毅: ビデオシンポジウム「膵癌に対する膵頭十二指腸切除術の各種手術手技」膵頭十二指腸切除術における SMA 神経叢を全周温存したリンパ節・神経叢郭清. 第 63 回日本消化器外科学会総会・札幌 2008 年 7 月 16-18 日

8. 首藤毅: Anterior approach による膵体尾部切除術と膵断端処理の手技と成績. 第 31 回広島肝胆膵外科手術研究会・広島 2008 年 6 月 24 日

9. 首藤毅: Anterior approach による膵体尾部切除術の手技と成績. 第 20 回日本肝胆膵外科学会・山形 2008 年 5 月 28-30 日

10. 首藤毅: 教育ワークショップ「膵液瘻の予防と治療」膵胃吻合再建を伴う膵頭十二指腸切除術における膵液瘻の予防対策と治療成績. 第 20 回日本肝胆膵外科学会・山形 2008 年 5 月 28-30 日

11. 首藤毅: 膵胃吻合再建を伴った膵縮小手術－膵頭十二指腸第 II 部切除術と膵中央切除術の手技と成績－. 第 108 回日本外科学会定期学術集会・長崎 2008 年 5 月 15-17 日

12. 首藤毅: シンポジウム「Surgical Site Infection (SSI) をいかに防ぐか」膵頭十二指

腸切除術における SSI 対策－術中汚染菌から見た予防抗菌薬の選択－. 第 69 回日本臨床外科学会・横浜 2007 年 11 月 29 日-12 月 1 日

13. 首藤毅：ビデオシンポジウム「肝胆膵外科領域におけるリンパ節郭清」膵頭十二指腸切除術におけるリンパ節郭清の手技と工夫. 第 30 回広島肝胆膵外科手術研究会・広島 2007 年 11 月 13 日

14. 首藤毅：Gemcitabine/S-1 併用療法が著効し R0 切除可能となった腹膜播種進行肝門部胆管癌の 1 例. 第 43 回日本胆道学会学術集会・東京 2007 年 9 月 27-28 日

15. 首藤毅：十二指腸乳頭部癌に対する膵頭十二指腸切除術の遠隔成績と予後規定因子の解析. 第 82 回中国四国外科学会総会・倉敷 2007 年 9 月 13-14 日

16. 首藤毅：膵頭十二指腸切除術における上腸間膜動脈周囲神経叢を全温存したリンパ節郭清. 第 62 回日本消化器外科学会・東京 2007 年 7 月 18-20 日

17. 首藤毅：十二指腸乳頭部癌に対する膵頭十二指腸切除術の遠隔成績と予後規定因子の解析. 第 19 回日本肝胆膵外科学会・横浜 2007 年 6 月 6-8 日

18. 首藤毅：膵頭十二指腸切除術における感染制御－胆汁細菌培養に基づいた抗菌薬の選択－. 第 107 回日本外科学会定期学術集会・大阪 2007 年 4 月 11-13 日

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：組織移植における生着率増強剤

発明者：檜山英三、首藤毅、長谷諭

権利者：田辺三菱製薬株式会社

種類：特許権

番号：PCT/JP2008/56064

出願年月日：2008 年 3 月 28 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/geka1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

首藤 毅 (SUDO TAKESHI)

広島大学・病院・助教

研究者番号：10423378

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

長谷 諭 (NAGATANI SATORU)

広島大学・医歯薬学総合研究科・大学院生