

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18108

研究課題名（和文）生体内イメージングを応用した移植膵島可視化によるグラフト生着率改善の試み

研究課題名（英文）An improvement of graft survival by visualization of transplanted pancreatic islets using in vivo imaging system

研究代表者

三浦 宏平（Miura, Kohei）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70733658

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、移植する膵島をあらかじめ蛍光色素で染めることにより、移植後に生着部位を簡単に同定できるようになり、病理検査に必要な膵島の生検が可能となることが判明した。これにより今まで不可能であった膵島移植後の拒絶反応診断が可能となる。拒絶反応が診断されることで迅速な治療介入が可能となり、移植された膵島の生着率改善と長期インスリン離脱が実現する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、膵臓移植にかわる低侵襲な根治治療として発展してきた膵島移植の成績が向上し、より多くの糖尿病患者の病状改善に寄与することが期待される。また、蛍光色素で標識された細胞を移植しその機能を視覚化するという発想が、膵島移植以外の細胞治療にも応用される可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was found that by staining islets to be transplanted with fluorescent dyes in advance, it could be possible to easily identify the site of transplanted islets to perform the biopsy. This makes it possible to diagnose rejection after islet transplantation, which has been impossible until now. The diagnosis of rejection will enable prompt therapeutic intervention, which may improve the transplanted islet's survival rate and long-term independent from insulin therapy.

研究分野：肝胆膵・移植外科

キーワード：膵島移植 ICG蛍光法 IRIシステム 生検 拒絶反応 プタ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は、1型糖尿病に対して膵細胞を含む膵島のみを移植する治療法であり、開腹手術が必要な膵臓移植と比較してはるかに低侵襲である。しかし、現時点では移植後5年のインスリン離脱率が10%程度と極めて不良であることが課題であり、その原因の一つである急性拒絶反応による膵島生着率の低下をいかに克服するかが至上命題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「ICG (Indocyanine green) 蛍光法で肝内に移植された膵島を可視化し、確実な生検を実施すること」である。この技術が実現することで、移植後早期の拒絶反応が組織学的所見に基づいて診断可能となり、迅速な治療による膵島生着率の改善が期待できる。

3. 研究の方法

研究課題 A (2019年度): 膵島の最適な ICG 標識方法、および標識膵島の安全性を検証する

移植実験に先立ち、in vitro で最適な膵島標識方法を検証する。既存の ICG 標識法である単純共培養法、リポソーム修飾法、タンパク質結合法の3法でブタ膵島をそれぞれ標識する。組織学的な障害度、蛍光強度、蛍光持続期間を比較し、膵島にとって最適な標識方法を確認する。

次に、ICG 標識膵島の安全性を検証するため、拒絶反応の影響を受けないブタ自家膵島移植モデル作製する。ICG 標識群と、非標識群を比較し、耐糖能、肝機能、腎機能、炎症マーカーに差が無いことを確認する。安全性が確認できない場合は、標識過程で膵島が障害されている可能性があり、ICG 濃度や標識方法を変更して再度比較実験を行う。

研究課題 B (2020年度～): ICG 標識膵島が生体内で同定可能かどうかを検証する

研究課題 A で決定した ICG 標識法を使用し、ブタ自家膵島移植モデルを作製する。生着が予想される7日目以降に Infra-Red Imaging (IRI) システムを用いて肝臓を観察する。蛍光部位と非蛍光部位から組織を採取し、組織学的に生着膵島数を比較する。また、経時的な ICG 蛍光強度の変化を記録し減衰曲線を作製する。本研究課題では、蛍光部位に確実に膵島が存在すること、および生体内での蛍光の持続期間を確認する。

ブタ膵島はヒトと比較して分離後の絶対数が少なく、肝内で分散すると蛍光が確認できない可能性がある。その場合は、左肝に入る門脈を一時的に鉗子で遮断して右肝のみに選択的に移植する。これによってヒトに近い比率で移植され、蛍光確認が容易になることが予想される。

研究課題 C (2020年度～): ICG 蛍光法で拒絶反応を診断できるかどうかを検証する

脳死ドナーからの膵島移植を想定し、MHC (Major histocompatibility complex) 確立ミニブタを用いて同種膵島移植モデルを作製する。エドモントンプロトコルに準じた免疫抑制療法を行い、免疫抑制剤を調整して拒絶反応を誘発し蛍光部位を生検する。膵島の拒絶反応に特徴的な所見の有無を組織学的に確認する。本研究課題では、ICG 蛍光部位からの生検による正確な拒絶反応の診断可否を検証する。拒絶反応の所見が得られない場合は、免疫抑制剤の減量や中止など、確実に拒絶反応が誘発される投薬プロトコルに変更する。

4. 研究成果

2019年度は本研究の目的である「ICG 蛍光法で肝内に移植された膵島を可視化し、確実な生検を実施すること」を目指し、膵島の最適な ICG 標識方法、および標識膵島の安全性を検証した。

ICG 標識自家膵島移植モデルの作成: ICG 標識自家膵島移植モデルを体重 10kg から 20kg の実験用ブタ計 4 頭を用いて以下の方法で作成した。全身麻酔下にブタの尾側膵切除 (80% 切除) を実施した。切除膵の主膵管から 10mg/kg に調整したコラゲナーゼを注入し、ウミヒラチャンバーを用いて膵島を分離した。分離された膵島を 2.5mg/ml の ICG で単純共培養法により標識した。ICG 標識膵島を脾静脈から挿入されたカテーテルより経門脈的に肝内に自家移植した。この時点で IRI システムを用いて肝臓の蛍光確認部位と蛍光強度を記録し、タイムゼロポイントの ICG 標識膵島データとして記録した。

移植後の検体採取: 移植後は連日の血液検体の採取と血糖測定を実施した。また移植後 7 日目および 14 日目に全身麻酔下に開腹し、IRI システムを用いて標識膵島を観察した。いずれのポイントにおいても蛍光強度が保たれていることを確認した。また蛍光部位を生検し組織学的に標識膵島が生着していることを確認した。更に、既存の非標識膵島による自家移植群と血液検査データ、血糖値の推移を比較し有意差が無いことを確認した。上記実験結果より、適切な ICG 標識方法が確定し、また ICG 標識膵島による自家移植が安全に施行可能であることを確認した。

2020年度は ICG 蛍光法による拒絶反応の診断可否を検証する予定であった。具体的には、

脳死ドナーからの膵島移植を想定し MHC (Major histocompatibility complex) 確立ミニブタを用いて同種膵島移植モデルを作製、エドモントンプロトコールに準じてシロリムスとタクロリムスによる免疫抑制療法を実施、免疫抑制剤を調整し拒絶反応を誘発した後蛍光部位を生検、膵島の拒絶反応に特徴的な「膵島周囲の炎症細胞浸潤 (HE 染色)」、「インスリン分泌能低下 (免疫染色)」、「組織中の T リンパ球の上昇 (Flow cytometry : FCM)」などの所見の有無を確認する予定であった。残念ながら COVID-19 感染拡大に伴う実験動物の供給制限等の影響で上記の実施は困難であった。2019 年度に作製したブタの ICG 標識自家膵島移植モデルより採取した肝臓の組織を HE 染色で観察し、移植膵島の生着を再度確認した。In Vivo Imaging System (IVIS) によって標識された移植膵島の局在が同定可能であったため、同部の蛍光強度を測定し、蛍光強度の高い部位に多くの膵島が生着していることを確認した。

最終年度である 2021 年度には、移植された ICG 標識膵島の生検検体を検鏡し、同部に確実に膵島細胞が生着していることを確認した。また、ICG 標識膵島移植後の動物の生存率および血液検査データを解析し、移植が安全に実施され膵島が機能していることを確認した。初年度からの実験の結果、ブタにおける ICG 標識膵島の移植では、動物に過剰な侵襲を加えることなく安全に移植が実施され、さらに IRI システムにて肝外から膵島移植部を確実に生検できることが証明された。上記の結果を第 17 回アジア移植学会および Transplantation Proceedings 誌 (Miura K, et al. Transplant Proc. 54(2):507-512, 2022) にて報告した。研究目的である「ICG 蛍光法で肝内に移植された膵島を可視化し、確実な生検を実施すること」は達成されたと判断する。本研究では、研究課題 C として立案した拒絶反応診断可否の検証には至らなかったため、今後の研究の発展形として展開していく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kohei Miura, Takashi Kobayashi, Zhengkun Zhang, Pankaj Prason, Yuki Hirose, Hirotsuke Ishikawa, Kazuyasu Takizawa, Jun Sakata, Shiori Miura, Toshikuni Sasaoka, Toshifumi Wakai	4. 巻 54(2)
2. 論文標題 Establishment of a Long-Term Survival Swine Model for the Observation of Transplanted Islets: a Preliminary Step in an Allogeneic Transplant Experiment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 507-512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2021.10.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kohei Miura, Takashi Kobayashi, Pankaj Prason, Zhengkun Zhang, Yohei Miura, Kizuki Yuza, Takuya Ando, Yuki Hirose, Tomohiro Katada, Kazuyasu Takizawa, Jun Sakata, Shiori Miura, Nobuyoshi Fujisawa, Toshikuni Sasaoka, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Autologous Islet Transplantation in a Swine Model: A Preliminary Step in an Allogeneic Transplant Experiment
3. 学会等名 17th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------