

機関番号：14501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591526

研究課題名 (和文) 血管新生誘導による移植膵島の生着改善効果の検討

研究課題名 (英文) Effect of inducing neovascularization on islet transplantation

研究代表者 辻村 敏明 (TSUJIMURA TOSHIAKI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：30403249

研究成果の概要 (和文) : マウスの膵島移植モデルでは、移植後 1 週間頃より移植膵島の周囲の血管新生が誘導され、移植後 3 週間で血管新生は完成した。血管内皮前駆細胞 (EPC) を共同移植することにより、新生血管は増加した。GFP マウスを用いた病理学的解析では、移植 3 週間後も EPC は残存しており、膵島周囲では EPC 由来の血管新生が優位に起こっていた。糖尿病マウスの耐糖能改善効果の検討では、EPC 導入による上乘せ効果は得られなかった。

研究成果の概要 (英文) : In the mouse islet transplant model with, neovascularisation around the transplanted islets was confirmed one week after transplant and was completed three weeks after transplant, The neovascularity increased by transplanting endothelial progenitor cells (EPC) jointly. By the pathological analysis using a GFP mouse, EPC remained in three weeks after transplant. Neovascularisation derived from EPC occurred in predominance around transplanted islets. However, by induction of EPC, the glucose tolerance of the diabetes mouse was not improved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：膵島移植、血管新生

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵島移植

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は膵島の β 細胞の崩壊によってインスリンの絶対的不足をきたす疾患であり、生命の維持のためにはインスリンの補充が必須となる。近年、種々のインスリン製剤が開発され糖尿病患者のより厳密な血糖コントロールが可能となってきたが、それでもなお安定した血糖のコントロールの

得られない不安定 1 型糖尿病患者が毎年数千人発生している。こういった不安定 1 型糖尿病患者は予測不能の頻回な意識消失発作を生じ、著しい QOL の低下に苛まれる。さらにその多くは若年期発症で急激な経過をたどり、5～10 年の短期間で糖尿病性腎症による透析の導入、視力障害、神経障害などの合併症を引き起こす重篤な疾患である。

不安定 1 型糖尿病に対する根治的移植医療である膵島移植は、十分な量の膵島が移植されることにより膵臓移植に匹敵する成績が得られる。膵島移植はドナー膵臓より分離した膵島を局所麻酔下にてレシピエント肝の門脈に注入することにより、生理的な血糖のコントロールが可能となり、意識消失発作は消失し、各種合併症の予防につながる。膵島移植は、①全身麻酔による開腹手術の必要がなく、②拒絶反応の際にもグラフト摘出のための再手術を行う必要がないため、臓器移植と比べ低侵襲であるという利点がある。しかしながら、インスリン療法からの離脱を達成するにはレシピエント一人当たり複数のドナーからの膵臓を必要とするという問題が残されている。世界的なドナー不足の現状では、このことは膵島移植発展への大きな足かせとなっている。これに対するひとつの解決策としてES細胞あるいは幹細胞をインスリン分泌細胞に分化させるという研究が進められているが、ヒト細胞においては有意義な報告はされておらず、またブタ膵島の移植という異種移植に関しては道義的問題・未知のウイルス感染の危険性・拒絶反応の問題などがあるため、いずれも未だ臨床における実現への道は遠い。

膵島移植は 1960 年代より行われていたが、1 年後のインスリン離脱率が 10%程度と思わしい結果が得られなかった。2000 年にカナダ・アルバータ大学がステロイドを抜いた新規免疫抑制剤のプロトコールと複数のドナーによる十分な膵島量を移植するという Edmonton protocol を発表し、7 人の移植患者全員の 1 年後のインスリン離脱の継続を報告した。この Edmonton protocol による臨床治験により 1 年後のインスリン離脱率が約 80%と急激な成績向上が得られ、世界的に広く膵島移植が行われるようになってきている。申請者はこのアルバータ大学で 2 年間、実際に臨床膵島移植に従事し、研究面では膵島分離前の膵臓保存法（2層法による保存中の膵の酸素化）の改善による膵島移植成績の向上に着手しその有効性を報告してきた。この期間に膵島移植の効果を認識すると共に、そのさらなる発展のためには“移植後に失われる膵島を軽減させる”ことの必要性を痛感し、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

膵島移植では膵島は膵臓から膵島分離され、肝臓の門脈内に点滴注入することで移植される。この膵島分離の行程により全膵島量の約 60%が失われ、さらに移植後に肝に最終的に生着する膵島は移植膵島全体の 30～50%といわれている。つまりドナー膵臓に存在する約 10～20%の膵島のみが最終的に肝

に生着し機能しているにすぎない。よって現状では 1 人のレシピエントのインスリン離脱を達成するのに 2～3 回の移植が必要であることも理解できる。膵島分離方法に Ricordi 法以来の画期的な進歩がない以上、この移植時の膵島生着率を上げることが移植成績の向上に直結すると考えられる。そしてまた理論上、移植後の膵島の loss が半分以下になれば one donor-one recipient によるインスリンからの離脱が可能になると考えられる。ではいかにして膵島移植と膵臓移植で生着率の差が生じるかを考えると、その移植環境において最も異なるのは、血流である。臓器移植である膵臓移植は血管吻合により移植されるため移植直後から血流が戻り組織に酸素・栄養が十分に供給されるのに対し、膵島移植は膵臓より分離された“膵島”を血管内に注入するため移植後早期には膵島に“血管を介した酸素・栄養供給”がない。一般に門脈内に移植された膵島の血管新生が完成されるまでには 10～14 日間を要すると報告されており、毛細血管の形成が完了するまで膵島には周囲の血液からの direct diffusion による酸素・栄養供給しか得られない。さらに門脈血は静脈血であるため、膵島は著しい低酸素・低栄養状態にさらされている。こういった環境は、移植後の膵島が死滅し減少していく大きな要因のひとつであると考えられる。それゆえ移植後急性期の血管新生の改善は膵島移植における重要な課題である。

一方、血管新生の研究において胎児期の血管形成にのみ関わりとされていた血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cells: 以下 EPC) が、成体の末梢血中にも存在し、重症虚血部位の血管形成に関与することが示された。これにより新規血管の形成は「既存血管内皮細胞の再形成」だけではなく「EPC からの発生」のメカニズムで血管形成が営まれることが明らかになった。EPC は新規血管形成部に取り込まれる性質があり、局所投与により強固な血管形成を促進させる。EPC は生体では骨髄だけでなく末梢血液の単核球成分の一部として循環しており、骨髄及び末梢血から EPC を確保する方法はすでに確立されている。また近年 EPC は下肢虚血、虚血性心疾患に対する治療として臨床応用されてきている。

本研究では膵島移植に EPC を導入することにより、移植後急性期のグラフトの血管新生を促進し、失われる膵島を減少させ、one donor - one recipient の達成の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 膵島移植に EPC を導入した際の膵島の血管新生の変化の解析

C57BL/6Jマウスを用いた同系の門脈内注入膵島移植モデルにおいて、実験群：i) 膵島のみ移植、ii) 膵島+EPCを移植の2群につき検討する。移植後3、7、14、21日目に移植部位である肝臓を摘出する。

a) マウスEPCの作成

C57BL/6Jマウスの骨髄からMagnetic cell sortingなどによりLineage negative、Sca-1 positiveの細胞をselectionし、FACSにて確認。EPC-rich cell populationとして用いる。

b) マウス膵島分離及び膵島移植

マウス体内にてCollagenaseを膵管に注入、膵を膨化させ、膵を摘出。37度のincubationにてcollagenaseを活性化させ膵を消化する。消化組織をFicollを用いた比重遠心勾配法にて分離し、膵島のみを採取する。レシピエントマウスを小開腹し、腸間膜静脈に穿刺針を留置し門脈を介して肝臓に膵島及びEPCを移植する。

c) 病理学的解析

移植後の血管新生の形態学的評価を免疫学的染色による病理学的解析にて行う。移植後に肝臓を摘出し、凍結病理切片を作成。膵島に対するインスリン抗体、血管内皮細胞に対するレクチン抗体、細胞内の核に対するDAPI抗体にて免疫染色を行なう。NIH image softwareにより膵島周囲の占有面積を評価することにより血管新生の程度を評価する。

(2) 膵島移植モデルにEPCを導入した際の膵島の血管新生の由来の解析

実験1にて血管新生の経時的変化を確認することにより、実験2の検討のために移植後何日目に肝臓を摘出するのが適当かを決定する。1と同様の実験系にてドナーマウス、レシピエントマウス、EPC作成用マウスのいずれかにGFPマウスを使用し、摘出肝の病理切片にGFP染色を併用した1と同様の病理学的解析を行うことにより、膵島周囲の血管新生がEPC、膵島、レシピエント細胞のうち、いずれの細胞の由来となっているのかを検討する。

(3) 膵島移植におけるEPC導入による膵島生着効果の検討

前述のマウス同系門脈内膵島移植モデルにおいて、レシピエントにSTZの腹腔内投与により作成した糖尿病マウスを用いることにより、EPC導入の膵島生着率への影響を調べる。当教室の分離技術（マウス1匹当たり、約300 islets）で分離したマウス膵島を用いることで、無処置群では450 isletsがマウスにおける同系門脈内膵島移植のmarginal doseであることがpilot studyですでに判明している。よって投与する膵島数として1)450 islets、2)350 islets、3)250 isletsで検討する。実験群としてはi) 膵島のみ ii) 膵島+EPCの2群について以下の項目で検討する。

- ① 移植後の血糖及び体重の推移
- ② 移植後28日目のintraperitoneal glucose tolerance testによる耐糖能の評価
- ③ 肝臓全割による生着膵島の形態学的及び定量的評価（HE染色、インスリン抗体による免疫染色）
- ④ 末梢生化学血液検査によるレシピエントへの影響の評価

4. 研究成果

(1) 膵島移植にEPCを導入した際の膵島の血管新生の変化の解析

マウス膵島分離による膵島の回収、及び骨髄よりの血管内皮前駆細胞の回収を達成した。また、マウスを用いた膵島の門脈移植モデルを確立した後に、膵島と血管内皮前駆細胞を共同移植した。血管内皮細胞に対するレクチン抗体、細胞内の核に対するDAPI抗体を用いて血管新生の変化を経時的に観察したところ、移植後1週間頃より移植膵島の周囲の血管新生が確認され、移植後3週間には血管新生は完成されることがわかった。EPCを共同移植することにより、新生血管は増加した。

(2) 膵島移植モデルにEPCを導入した際の膵島の血管新生の由来の解析

膵島とEPCを共同移植するモデルに、ドナー、レシピエント、EPC作成用マウスのいずれかにGFPマウスを使用し、移植後のEPCの変化、及びEPC由来の血管新生の有無を、摘出肝の病理切片にGFP染色を併用した病理学的解析を行うことにより検討した。移植3週間後もEPCは残存していた。膵島周囲では、EPC由来の血管新生が優位に起こっていることを確認した。

(3) 膵島移植におけるEPC導入による膵島生着効果の検討

糖尿病マウスに同系門脈内膵島移植を用い、EPC導入の膵島生着率への影響を、1群：膵島のみ、2群：膵島+EPCの2群で、前述の各検討項目について解析を行ったが、2群の間に有意差を認める結果は得られなかった。これまでの確認できたEPCによる血管新生促進効果が膵島の生着の改善に繋がらない原因と対策につき検討中である。

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2件）

- ① 辻村 敏明、黒田 嘉和、膵臓及び膵島移植における保存法、移植、査読有、第43巻・5号、2008、351-356
- ② Terai S、Tsujimura T、Toyama H、Shinzeiki M、Matsumoto I、Kuroda Y、Ku

Y. Effect of oxygenated perfluorocarbon on isolated islets during transportation, J Surg Res、査読有、162 (2)、2010, 284-289

〔学会発表〕(計2件)

- ① 寺井祥雄, 辻村敏明, 李世日, 外山博近, 新関亮, 松本逸平, 黒田嘉和、具英成、膵島移植における膵島輸送方法の検討、日本移植学会総会 2008年9月、大阪
- ② 谷岡康喜、酒井哲也、大河原弘達、辻村敏明、黒田嘉和、今後の展望膵臓移植 vs膵島移植 神戸大学における膵島移植の現状と問題点、日本移植学会総会、2008年9月、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻村 敏明 (TSUJIMURA TOSHIAKI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：30403249

(2) 研究分担者

松本 逸平 (MATSUMOTO IPPEI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30379408

新関 亮 (SHINZEKI MAKOTO)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：60444598

外山 博近 (TOYAMA HIROCHIKA)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10444598

具 英成 (GU EISEI)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40195515

(3) 連携研究者

特になし

