

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591527

研究課題名（和文） 細胞死にともなうHMGB-1を標的とした移植片長期生着効果の誘導

研究課題名（英文） Long-term islet graft survival induced by regulating HMGB-1

研究代表者

斎藤 隆晴（SAITO TAKAHARU）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60508795

研究成果の概要（和文）：移植膵島の長期生着を目指すため、high-morbidity group box 1 protein (HMGB1)やCalreticulinといったdamage-associated molecular patterns (DAMPs)、並びにBipに代表されるresolution-associated molecular patterns (RAMPs)の表出の把握を目的とした。膵島分離による障害を受けた膵島は、培養後にcentral necrosis領域が認められ、その領域でDAMPsの表出が強く認められた。一方、障害領域にはDAMPsのcounterbalanceであるRAMPsの表出も認められた。DAMPsのみならず、RAMPsの表出にも注目することで、これらの制御を標的とした移植成績改善のストラテジーの確立が期待される。

研究成果の概要（英文）：Cellular stress or damage causes expression and release of endogenous molecules, such as damage-associated molecular patterns (DAMPs) molecules. High-mobility group box 1 (HMGB1) released from damaged islets has been shown to be associated with poor islet graft outcome, however, few studies evaluated implication of other endogenous molecules such as calreticulin as categorized DAMPs, and binding immunoglobulin protein (Bip) as categorized resolution-associated molecular patterns (RAMPs). Immediately after isolation, HMGB1, calreticulin as categorized DAMPs, and Bip, as categorized resolution-associated molecular patterns (RAMPs), signals were found in the cytoplasm of islet cells, more intensively as compared to those in islets in native pancreas. After culture for 1 day, only some of peripheral islet cells showed signals for these molecules, while central damaged areas, composed of necrotic cells but not apoptotic cells, strongly expressed these signals. Our findings suggest that necrotic process of the cells in central area after islet isolation and subsequent culture leads to express and release of not only DAMPs but also RAMPs, which might be responsible for counterbalance the DAMPs. A better understanding of the biological response to both DAMPs and RAMPs in isolated/cultured islets would improve its efficacy of islet transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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、 High-mobility group box 1、calreticulin、binding immunoglobulin protein

1. 研究開始当初の背景

膵島移植の成功の鍵は **viability** の良好な膵島に炎症反応を励起しない条件で移植することである。我々はこれまで、膵島を移植前に **Mitomycin C (MMC)** で約 30 分処理することによって培養中の細胞死の抑制とともに、著明な生着延長が得られることを明らかにしてきた。また、この細胞死はアポトーシスではなく、ネクローシスであることまた、細胞内に **damage-associated molecular patterns (DAMPs)** の代表である **high-mobility group box 1 protein (HMGB1)** 蛋白が表出していることを明らかにした。

2. 研究の目的

HMGB1 の表出は、不良な膵島移植結果に関与していることが明らかにされつつある。HMGB1 蛋白に代表される DAMPs の制御が、膵島移植成績改善に寄与するという仮説のもとに、膵島分離・培養過程での DAMPs の表出、また DAMPs の countetbalance である RAMPs の表出も合わせて把握することを目的とした。

3. 研究の方法

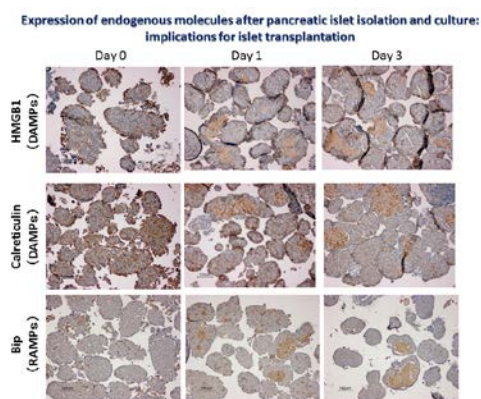
膵島分離による細胞障害、細胞ストレスを受けた膵島が DAMPs あるいは RAMPs をどのように表出するのかについて明らかにするため、分離・培養の経過における膵島の **viability** の測定に加え、DAMPs である HMGB1 や calreticulin、RAMPs である Bip の免疫染色を行い評価した。さらにこれらの表出に関与する細胞内シグナル伝達について Western blot にて検討した。

4. 研究成果

ラット膵島分離後に培養し、培養1日目、3日目には有意に膵島数の減少が観察された。(Fresh vs 1 day: 100% vs 86.2%, p=0.009 Fresh vs 3 day: 100% vs 72.3%, p=0.0007) FDA/PI法および glucose-stimulated insulin releaseにより評価した膵島の **viability** は経時的な変化は認めなかった。分離前の膵臓内の膵島に比してより強く、膵島分離直後の膵島には、その細胞質内に HMGB1、Calreticulin、および Bip の表出が認められた。培養1日目には、膵島内に central

necrosis領域が出現し、その領域に HMGB1、Calreticulin、および Bip の表出が認められた。培養3日目にはこれら DAMPs、RAMPs で染色される障害領域を減じた膵島が多く認められた (図)。

【図】



これら DAMPs および RAMPs の表出には小胞体ストレスが強く関与するとの仮説をたて、小胞体ストレスの動向の把握を Western blot にて検討したが、分離直後に小胞体ストレスのメディエーターである eIF2 α の強い発現が観察され、経時的に発現の減弱が観察されたものの、他の小胞体ストレスメディエーターには強い変化が認められず、小胞体ストレスの関与についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

DAMPs のみならず、RAMPs の表出にも注目し、これらの制御と移植結果の関連を明らかにすることで新たな膵島移植成績改善のストラテジーの確立が期待されうると思われた。

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 3 件)

- ① Saito T, Saito T, Sato Y, Ise K, Anazawa T, Oshibe I, Haga J, Yamamoto M, Waguri S, Gotoh M.

Mitomycin-C treatment significantly reduces central damage of islets in culture. *Pancreas*. 査読有 41(2), 2012, 245-252.
DOI: 10.1097/MPA.0b013e31822461c7

- ② Anazawa T, Sato Y, Saito T, Tsuchiya T, Kenjo A, Kimura T, Haga J, Miyake M, Waguri S, Hazama A, Gotoh M. Improved islet yield and function by use of a chloride channel blocker during collagenase digestion. *Transplantation*. 査読有 92(8), 2011, 871-877.
DOI: 10.1097/TP.0b013e31822e6eb4
- ③ Saito T, Ohashi K, Utoh R, Shimizu H, Ise K, Suzuki H, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation*. 査読有 92(11), 2011, 1231-1236.
DOI: 10.1097/TP.0b013e3182375835

[学会発表] (計 6 件)

- ① Anazawa T, Tsuchiya T, Kenjo A, Haga J, Sato T, Sato N, Saito T, Sato Y, Miyake M, Hazama A, Gotoh M. Inhibition of chloride ion influx into islet cells protects islets during pancreatic islet isolation. The 13th World congress of International pancreas and islet transplantation association. 2011.6.1-4, Prague, Czech Republic.
- ② Haga J, Saito T, Anazawa T, Tsuchiya T, Kenjo A, Sato S, Sato N, Saito T, Ise K, Yamamoto M, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin-C treatment protects islets from the progression of central damage during culture. The 13th World congress of International pancreas and islet transplantation association. 2011.6.1-4, Prague, Czech Republic.
- ③ Shimizu H, Ohashi K, Saito T, Utoh R, Ise K, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Functional Islet Tissue Engineering in Subcutaneous Site Using Fabricated Islet Cell Sheets. The 13th World congress of International pancreas and islet transplantation association. 2011.6.1-4, Prague, Czech Republic.

- ④ 穴澤貴行, 土屋貴男, 見城 明, 芳賀淳一郎, 佐藤 哲, 三宅将生, 狭間章博, 後藤満一. Clチャンネル阻害による細胞保護効果の膵島分離への応用—臨床膵島移植確立への細胞生理学的アプローチ—. 第 111 回日本外科学会定期学術集会. 2011.5.26-28, 東京 (誌上開催) .
- ⑤ 穴澤貴行, 土屋貴男, 伊勢一哉, 見城明, 齋藤拓朗, 後藤満一. 重症低血糖発作を伴うインスリン依存性糖尿病に対する心停止ドナーからの膵島移植: 日本膵・膵島移植研究会事務局報告. 第 47 回日本移植学会総会. 2011.10.4-6, 仙台.
- ⑥ Saito T, Saito T, Sato Y, Ise K, Oshibe I, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin-C treatment significantly reduces central necrotic damage of islets in culture. The 23th International Congress of The Transplantation Society. 2010.8.15-19, Vancouver, Canada.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 隆晴 (SAITO TAKAHARU)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号: 60508795

(2) 研究分担者

齋藤 拓朗 (SAITO TAKURO)

福島県立医科大学・医学部・医監兼教授
研究者番号: 20305361

佐藤 佳宏 (SATO YOSHIHIRO)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号: 60347218

穴澤 貴行 (ANAZAWA TAKAYUKI)

福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90566811

伊勢 一哉 (ISE KAZUYA)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90363746
後藤 満一 (GOTOH MITSUKAZU)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：50162160

(3)連携研究者

なし