

## 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：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791554

研究課題名（和文）細胞分離用酵素剤の最適化とイオンチャネル制御の膵島移植への応用

研究課題名（英文）Optimization of collagenase activity and regulation of ion channel associated with cell viability for improving pancreatic islet transplantation

研究代表者

穴澤 貴行（TAKAYUKI ANAZAWA）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90566811

研究成果の概要（和文）：膵島移植において、高い細胞収量と分離過程の細胞障害回避の両立は重要な課題である。Class I/II 比を最適化した collagenase に neutral protease を併用すると、従来法である Thermolysin の併用より高い収量が得られることが明らかにされた。また、膵島分離過程に Cl<sup>-</sup> イオン阻害剤の添加、Cl<sup>-</sup> イオンフリーとした細胞外溶液の使用を導入して、膵島分離収量や Viability は Cl<sup>-</sup> イオンの制御により改善されることが明らかとなった。さらに、本邦での臨床背景にそって、心停止ドナーモデルを構築し、心停止モデルでも同様の結果が得られることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Protection of pancreatic islets during isolation procedures and maximization of islet yield are mandatory for successful islet transplantation. An enzyme mixture composed of neutral protease with high intact class I collagenase recovered higher islet yield from both rat and human pancreas. Our results also indicated that Cl<sup>-</sup> influx into the cells causes the cell damage during the digestion procedure. Inhibition of Cl<sup>-</sup> influx into islets by Cl<sup>-</sup> channel inhibitor or Cl<sup>-</sup>-free condition protects islets in both heart-beating and non-heart-beating donor model, offering a new strategy for improving human islet isolation outcome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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、膵島分離、糖尿病、イオンチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分離から構築された移植片を用いる細胞・組織移植において、高い細胞収量と分離過程の細胞障害回避の両立は重要な課題である。特に膵島移植の分野では、膵島分離過程の特殊性から、収量の不安定性と分離過程で被る顕著な細胞障害が、臨床展開において大きな障害となっている。分離膵島を移植に供するには、分離後にレシピエント体重あたり5,000IEQ/kg以上の膵島収量が得られていることが主な基準に挙げられているが、その条件を満たす分離の成功率は、欧米でも本邦でもおよそ50%程度であるのが現状である。この事実は、同種膵島移植においては、1人のレシピエントに移植するためにおよそ2つのドナー膵が必要であることを意味しており、ドナー不足問題を抱える本邦においては極めて大きな問題である。また、膵島はその分離過程で強い細胞障害を被り、分離膵島あるいは移植された膵島細胞のアポトーシスあるいはネクローシス性細胞死が進行する。このため膵島移植によりインスリン離脱を達成するためには、複数回の移植が必要で、ドナー不足問題をさらに深刻化しており、この細胞障害からの細胞死の回避は膵島移植医療の一般化に向けて最大の課題といえる。

## 2. 研究の目的

今後の臨床膵島移植分野で使われるcollagenaseを用い、最も有効なproteaseの種類を明らかにし、その使用すべき最適なcollagenase/neutral protease unitの比を明らかにする。その際、この比の変化により変化する細胞障害を、細胞内Cl<sup>-</sup>イオンの動向を中心に、検出することも目指す。さらにCl<sup>-</sup>チャンネル阻害による細胞防御原理を応用することにより膵島・外分泌細胞を細胞障害

から予防し、機能の良好な膵島を高収率で確保できる分離法を確立し、膵島移植の成績向上を図ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

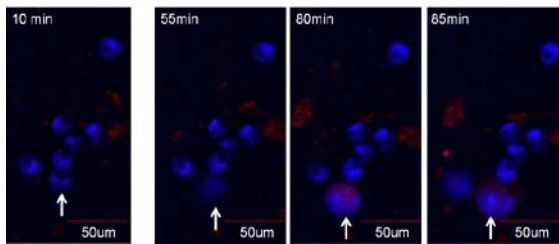
細胞分離用酵素の最適化を先行させ、Collagenaseとして、新たに利用可能となり本邦で臨床使用予定のLiberase MTFを、Proteaseとしては、ThermolysinまたはNeutral protease NBを用い、collagenase/proteaseの組み合わせが膵島分離成績に及ぼす影響を検証する。細胞内Cl<sup>-</sup>イオン濃度の変化に対する影響も把握し、続くイオンチャンネル制御による細胞保護効果の実現につなげる。Cl<sup>-</sup>イオンチャンネルの制御は各種Cl<sup>-</sup>チャンネル阻害剤の添加や、細胞分離溶液のCl<sup>-</sup>イオン濃度の調整をもって行う。まずはラットを用いた基礎実験を展開し、分離収量、膵島のviabilityなどの基礎データを蓄積する。併せて共同研究施設の協力のもとにヒト膵島分離への応用を計画する。

## 4. 研究成果

class I/II比を最適化した純度の高いcollagenaseにneutral proteaseを併用すると、従来法であるThermolysinの併用より高い収量が得られることが、ラットを用いた基礎実験で明らかにされた。さらに、共同研究関係にある米国ミネソタ大学において実施したヒト膵島分離にこの概念を導入して、この組み合わせがヒト臨床膵島分離においても極めて有効な結果をもたらすことが証明された(Transplantation. 93(7), 2012, 693-702.)。また、Cl<sup>-</sup>イオン制御による膵島分離成績への影響と細胞保護効果については、まず、膵島分離環境の違いにより細胞が受ける質的・形

態的变化を蛍光色素にて連続的、経時的に共晶点レーザー顕微鏡下で観察するシステムを構築した。ClイオンインディケーターであるMQAEを用い、細胞の形態変化に加え、細胞内Clイオン濃度の変化もとらえることを可能とした。そのシステムにて、膵島分離の消化過程の環境において、膵島細胞内にClイオンの流入と細胞膨化、その後起こるnecrosis型細胞死の観察に成功した(図)。

【図】



Clイオン制御による膵島分離成績への影響と細胞保護効果については、膵島分離過程にClイオン阻害剤(DIDS, NPPB)の添加、Clイオンフリーとした細胞外溶液の使用を導入して、分離成績や細胞のViabilityへの影響を調べ、膵島分離収量やViabilityはClイオンの制御により改善されることが明らかとなった。また、本邦での臨床背景にそって、ラット心停止ドナーモデルを構築し、心停止ドナーでも同様の結果が得られるかどうかの検証に取り組み、心停止モデルでも同様の結果が得られることが示唆された。今後、臨床膵島移植への導入が可能な、重要な結果であると考えられる。

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4件)

- ① Balamurugan AN, Loganathan G, Bellin MD, Wilhelm JJ, Harmon J, Anazawa T, Soltani SM, Radosevich DM, Yuasa T, Tiwari M, Papas KK, McCarthy R, Sutherland DE, Hering

BJ. A new enzyme mixture to increase the yield and transplant rate of autologous and allogeneic human islet products. *Transplantation*. 査読有 93(7), 2012, 693-702.

DOI: 10.1097/TP.0b013e318247281b

- ② 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

- ③ 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

- ④ Anazawa T, Matsumoto S, Yonekawa Y, Loganathan G, Wilhelm JJ, Soltani SM, Papas KK, Sutherland DE, Hering BJ, Balamurugan AN. Prediction of pancreatic tissue densities by an analytical test gradient system before purification maximizes human islet recovery for islet autotransplantation/allotransplantation. *Transplantation*. 査読有 91(5), 2011, 508-514.

DOI: 10.1097/TP.0b013e3182066ecb.

〔学会発表〕(計8件)

- ① Anazawa T, Tsuchiya T, Kenjo A, Haga J, Sato T, Sato N, Ise K, Saito T, Tasaki K, Gotoh M. Disappeared islet graft after intraportal transplantation in the recipient suffered from recurrent sepsis. 24th International Congress of the Transplantation Society 2012.7.15-19, Berlin, Germany.

- ② 穴澤貴行, 土屋貴男, 見城 明, 伊勢一哉, 芳賀淳一郎, 齋藤拓朗, 後藤満一. 膵島移植の現状と今後の展望. 第48回日本移植学会総会. 2012.9.20-22, 名古屋.

- ③ 穴澤貴行, 土屋貴男, 見城 明, 伊勢一哉, 齋藤拓朗, 後藤満一. 先進的組織細胞移植医療発展の先駆的モデルとしての膵島移植臨床開発: その展望と課題. 第 11 回日本組織移植学会学術集会. 2012.8.4, 東京.
- ④ 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.
- ⑤ Anazawa T, Graham M, Abouaish J, Loganathan G, Hering BJ, A.N. Balamurugan. Predicting porcine islet yield by acute C-peptide response to arginine stimulation of donor pigs and pancreas dithizone scoring system. The 13th World congress of International pancreas and islet transplantation association. 2011.6.1-4, Prague, Czech Republic.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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<sup>-</sup>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ー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) .
- ⑧ 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.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 細胞分離用酵素溶液及び細胞分離方法、並びに膵島分離方法

発明者: 穴澤貴行

権利者: 穴澤貴行、狭間章博、後藤満一

種類: 特許

番号: US13/812, 987

出願年月日: 2013/01/29

国内外の別: 国外

○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

穴澤 貴行 (TAKAYUKI ANAZAWA)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90566811