

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461914

研究課題名(和文) 希少糖D-alloseを駆使した膵島移植成績向上の研究

研究課題名(英文) A study for improvement of pancreatic islet transplantation outcome by using rare sugar D-allose.

研究代表者

鈴木 康之 (Suzuki, Yasuyuki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：40304092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病の治療法の1つに膵島移植があり、分離後膵島の機能を改善できれば移植成績向上につながる。

以前の実験から、膵島の培養時に希少糖D-アロースを添加すると、インスリン分泌能が改善し、糖尿病治癒率の上昇を認めていた。D-アロースの抗酸化作用が膵島機能改善の機序である可能性が示唆されていた。

また、今回の実験では糖尿病モデルマウスに膵島を移植し、移植直後、24時間後、48時間後にD-アロースを静脈投与したところ、コントロール群と比較して糖尿病治癒率が有意に上昇した。この結果に対し、現在免疫組織化学的に機序の解明を行っている。

研究成果の概要(英文)：Islet transplantation is a curative treatment option for Type-1 diabetes. The outcome would improve with amelioration of isolated islet function. From the previous experiments, addition of rare sugar D-allose to islet culture medium improved insulin secretion ability and the diabetes cure rate after transplantation. It has been suggested that an antioxidative effect of D-allose may be a mechanism for improving islet function. In addition, in the present experiment, pancreatic islets were transplanted into diabetic model mice, and D-allose was injected to the recipient mice immediately, 24 and 48 hours after transplantation. As a result, the diabetes cure rate was significantly increased compared with the control. We are now investigating the mechanism of this ameliorating effect of D-allose immunohistochemically.

研究分野：膵島移植

キーワード：希少糖 膵島移植

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病に対する膵島移植は、2000 年に報告された新しい免疫抑制法 (エドモンソン プロトコール) に加え、申請者らが考案、開発した二層法を膵島分離前の膵保存・搬送に応用することで臨床成績が大きく向上した。しかし膵島移植にはまだいくつかの問題点が残されている。

近年、臓器移植に適さない脳死ドナー膵は、膵島分離・移植に使用出来るようになった。とは言え、多くの心停止ドナーから質の高い膵島を十分な収量で分離・移植する手技の開発や、移植後の膵島機能を維持する新たな方法の開発は、膵島移植成績の向上にとって重要な課題である。

D-アロースは、D-グルコースの3位のエピマーであり自然界にはほとんど存在しない糖 (希少糖) である。現在世界で唯一本学において大量生成が可能になった希少糖で、我々は活性酸素産生抑制作用などユニークな生理活性を有することを報告している。これまでラット肝移植実験で FK506 との併用で免疫抑制効果の増強、ラット硬変肝切除における残存肝への好中球集積の抑制、血流改善効果、活性酸素産生抑制作用などを機序とした虚血再灌流傷害軽減効果が示された。また培養細胞の凍結保存に対する有効性を明らかにした。

過去3年の研究で膵島培養液に活性酸素産生抑制作用のある D-アロースを添加することで、インスリン分泌能 (stimulation index; SI) が有意に改善されることが判明している。また、膵島分離後に D-アロース添加培地を用いて、1 型糖尿病モデルのヌードマウスに対する膵島移植を行ったところ、コントロール群と比較して糖尿病治癒率が有意に改善することが判明し、実際の膵島移植においても D-アロース添加培養の有効性が示された。機序解明のため、D-アロース添加培地で一晚培養した膵島の、脂質過酸化分解生成物の一種であるマロンジアルデヒド (MDA) 量を測定したところ、コントロール群と比較して有意に低値であり、インスリン分泌能の改善効果の機序の一端は D-allose の持つ抗酸化作用によるものである可能性が示されていた。

2. 研究の目的

D-アロースの膵島移植における有効性を検討する。具体的には下記(1)(2)を行っていく。

(1) D-アロース添加培地を用いて培養を行った際の更なる機序の解明を目的とする。

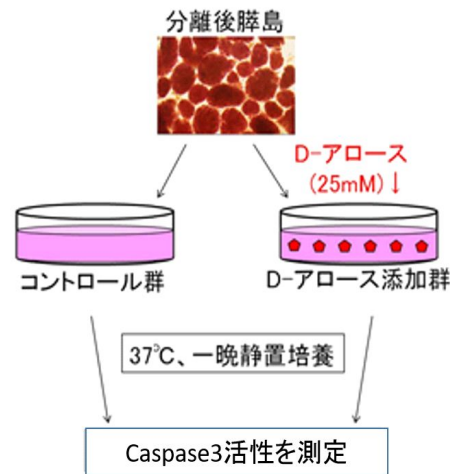
(2) 現在行われている膵島分離から移植にいたる幾つかのステップや、ドナー、レシピエントに D-アロースを使用し、分離膵島の状態改善や移植膵島の生着率を向上させ、膵島移植の成績向上を図ることを目的とする。

(3)(2)について有効性が明らかとなったものについては、機序についても検討を行っていく。

3. 研究の方法

(1) in vivo での D-アロースの有効性の検討：これまでの研究結果との対比とモデルの安定性を考慮し、確立しているラット (Wistar) を用いて行う。

これまでの研究結果で分離後膵島の overnight culture 時に D-アロースを培地に添加することで、SI の改善、膵島移植時の糖尿病治癒率の改善、脂質過酸化反応の指標である malondialdehyde (MDA) 値の改善を認めている。更なる機序の解明のため、アポトーシスの指標である、Caspase3 活性の測定を行い、比較検討した。



(2) レシピエントへの D-アロース投与の有効性の検討：

BALB/c マウスを使用した。

ストレプトゾトシン 200 mg/kg BW をマウスの尾静脈より投与し、1 型糖尿病モデルマウスを作成した。糖尿病マウスの定義として、随時血糖が 2 日以上連続して 400 mg/dl を超えたものを糖尿病モデルマウスとした。

膵島分離は、麻酔下に BALB/c マウスより膵臓摘出を行い、コラゲナーゼをマウスの総胆管より注入して膵臓を消化し、ヒストパークを用いた比重遠心分離法を用いて膵島を分離純化した。

膵島移植は分離純化した膵島を、保存せずすぐにモデルマウスの腎被膜下へ 15IEQ/g (レシピエントマウスの体重当たり) の膵島移植を行った。移植する膵島量については、事前に予備実験を行って決定した。

膵島移植を受けたモデルマウスを、D-アロース投与群 (D 群) と非投与群 (C 群) に分けた。D 群に対しては、移植直後、移植 24 時間後、移植 48 時間後に生理食塩水に溶解した D-ア

コース 400 $\mu\text{g/g BW}$ を尾静脈より静注した。この値は、これまで D-アロースを用いて行われた、他の移植実験を参考に決定した。C 群に対しては、生理食塩水を尾静脈より静注した。

膵島移植を受けたモデルマウスは週 3 回以上血糖測定を行い、糖尿病治癒の定義は移植後の随時血糖値が連続 3 回以上 150mg/dl 未満とした。

術後 4 週間経過した時点で、モデルマウスより膵島を移植した腎臓を摘出し、移植前の血糖値に戻ることを確認した。

糖尿病治癒率や耐糖能を C 群と比較し、移植膵島の組織学的な比較検討も行う。各群 10 匹程度を予定する。

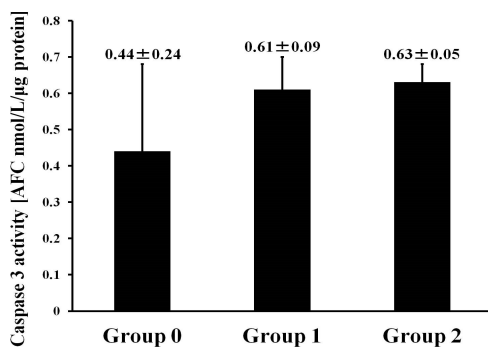
(3) レシピエントへの D-アロース投与による影響の組織学的検討。

BALB/c マウスより分離した膵島を、非糖尿病マウスの腎被膜下へ移植した後、3 日後に移植腎を摘出する。摘出した膵島に対して、HE 染色、インスリン染色、8-OHdG 免疫染色、TUNEL 染色を行い、膵島移植に対する D-アロースの作用を検討する。

4. 研究成果

(1) 分離後膵島の over night culture 時に D-アロースを培地に添加することで、膵島移植成績が改善したため、機序解明のために D-アロース添加が、膵島のアポトーシスを抑制するかどうかを検討した。

アポトーシスの指標としてのカスパーゼ 3 活性を測定して比較検討を行った。しかし、この活性には有意差は認めず、D-アロースの抗酸化作用による効果はアポトーシスの抑制という経路ではなく、何らかの別の経路での効果と考えられることが判明した(下図 Group0: 膵島摘出直後、Group1: C 群、Group2: D 群)。

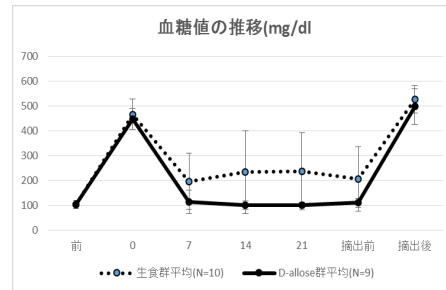


(2) BALB/c マウスより膵島を分離し、1 型糖尿病モデルマウスの腎被膜下へ 15IEQ/g BW 移植した。

レシピエントマウスに対して、移植直後、移植 24 時間後、移植 48 時間後に D-アロース

400 $\mu\text{g/g BW}$ 投与し、術後 21 日目の糖尿病治癒率を比較した。

D 群では糖尿病治癒率が 100%であったのに対し、C 群では 45%であり、D 群で優位に改善していることが確認できた($P < 0.05$)。



この結果から、膵島移植後にレシピエントに対して D-アロースの投与を行うことで、膵島の生着率を高める可能性が示唆された。

現在はこの結果に対して、機序を解明するために、DNA 酸化損傷マーカーの一つである、8-OHdG 免疫染色などを行い、病理学的な見地から検討を行っている。

(3) (2) で病理学的な検討を行っているが、移植した膵島がレシピエントマウスの糖尿病の状態によって影響を受けている可能性が考えられた。

糖尿病の影響を排除し、移植による膵島への影響に対する D-アロースの効果を確認するため、摘出した膵島を非糖尿病マウスに移植し、その影響を病理学的に検討することとした。

現在、術後 3 日目に摘出した膵島に対して、HE 染色、インスリン染色、TUNEL 染色、8-OHdG 免疫染色等を行い、病理学的な評価を行っているところである。

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 1 件)

Kashiwagi H, Asano E, Noguchi C, Sui L, Hossain A, Akamoto S, Okano K, Tokuda M, Suzuki Y.

Beneficial effect of D-allose for isolated islet culture prior to islet transplantation.

J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読あり

2016 Jan;23(1):37-42.

DOI:10.1002/jhbp.298.

Epub 2015 Nov 26.

[学会発表](計 2 件)

柏木、希少糖 D-アロースの膵島機能改善効果、第 43 回膵・膵島移植研究会、2016 年 03 月 04 日、(広島県・広島市)

柏木、希少糖 D-アロースの虚血再灌流障害
軽減効果、第 70 回日本消化器外科学会総会、
2015 年 07 月 15 日 (静岡県・浜松市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 康之(SUZUKI, Yasuyuki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：40304092

(2)研究分担者

徳田 雅明(TOKUDA, Masaaki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10163974

浅野 栄介(ASANO, Eisuke)

香川大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：90467837