

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861037

研究課題名(和文) 高感度イメージングシステムを用いた膵島移植における至適免疫抑制剤の検討

研究課題名(英文) Study on optimal immunosuppressive drugs in pancreatic islet transplantation using highly sensitive imaging system

研究代表者

西村 隆一 (Nishimura, Ryuichi)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90710864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵島移植において、免疫抑制剤のような外的因子だけでなく、ドナーとレシピエントの組み合わせ自体が膵島グラフト周囲への血管新生へ影響を及ぼしている可能性について検証を行った。結果は、移植後2週間の観察期間内において、同系移植群と同種膵移植群の膵島グラフト周囲の新生血管体積に有意な差を認めず、ドナーとレシピエントの組み合わせ自体が膵島グラフト周囲の血管網再構築へ及ぼす影響は極めて軽微であることが示唆された。以上より、自家移植と同種移植の成績の差には免疫抑制剤のような外的因子の影響が大きいと推察されたため検証しようとしたが、手技的問題により遂行困難であった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that pancreatic islet revascularization was influenced by not only the use of immunosuppressive drugs, but also by the immunological incompatibility between the donor and recipient, and we evaluated this hypothesis using a highly sensitive imaging system. At 14 days after pancreatic islet transplantation, no significant difference was detected in the newly-formed vascular volume between the pancreatic islet autotransplantation group and the allotransplantation group. These data suggest that the immunological incompatibility between the donor and recipient had only a marginal effect on the revascularization of transplanted islet grafts in pancreatic islet autotransplantation and allotransplantation models. Furthermore, we attempted to evaluate the impact of immunosuppressive drugs on the poor outcome after pancreatic islet allotransplantation. However, it was difficult to evaluate this by technical problems.

研究分野：膵島移植

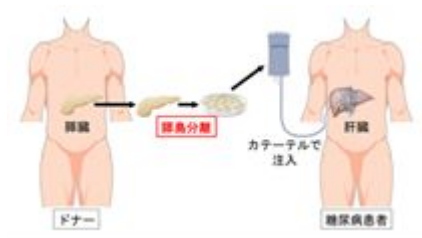
キーワード：膵島移植 血管新生 免疫抑制剤

1. 研究開始当初の背景

インスリンを分泌する膵ランゲルハンス島細胞の機能不全によって引き起こされる1型糖尿病に対して、膵島移植は有効な治療法として確立されようとしている。膵島移植はドナー膵臓からインスリンを分泌する膵島のみを分離し、レシピエントへ移植して生着させ、血糖をコントロールすることを目的としている。臓器そのものを移植する膵臓移植に対して、膵島移植は安全・簡便・低侵襲といった多くの魅力を備えている。膵島移植の中でも、膵動静脈奇形や慢性膵炎といった膵臓全摘を伴う良性疾患が対象となる自家膵島移植は、同種膵島移植に比べて少ないグラフト量で、長期に渡るグラフト生着や高いインスリン離脱率を得られるということがよく知られている。同種膵島移植の成績が劣る理由として、膵島分離に至るまでの冷保存時間が自家移植に比べて長いことや純化工程が必要であること、膵島グラフトに対する免疫反応を抑制するための免疫抑制剤の使用などの様々な要因が挙げられるが、免疫抑制剤の使用は特に重要な要因と考えられる。膵島移植では、膵島分離工程において膵島周囲の血管網が失われるため、移植後、グラフトは無血管環境下に晒される。したがって、移植膵島が生着して機能するためには、早急な血管網の構築が極めて重要である。しかし、2000年にカナダのアルバータ大学で開発され、膵島移植によるインスリン離脱を可能にしたエドモントンプロコールの主要免疫抑制剤であるラパマイシンが血管新生を抑制することが近年、明らかとなってきている。また、膵島移植で現在、標準的に使用されている免疫抑制剤であるタクロリムスが血管新生を抑制することを我々は報告した。我々は、Dorsal skinfold chamber法と多光子顕微鏡を組み合わせることで新たに開発した高感度イメージングシステムを用いて、タクロリムスの血管新生抑制効果を示すとともに、マイクロダイセクション法およびリアルタイムPCR法を導入して、タクロリムスは膵島グラフトからの血管誘導因子の放出制御を介さずに血管新生を抑制することを報告した。

2. 研究の目的

同種膵島移植の成績向上のためには、血管新生への影響を考慮した免疫抑制剤の最適化が極めて重要であり、より血管新生阻害効



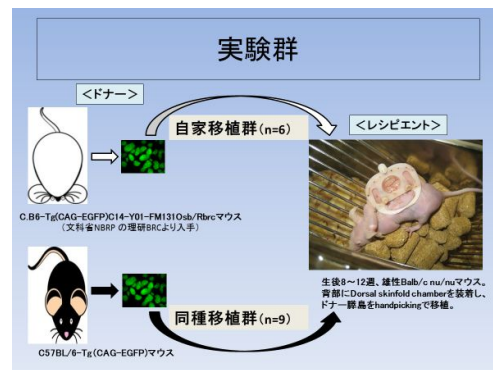
果が少ない免疫抑制剤を検証する。

3. 研究の方法

免疫抑制剤の血管新生阻害効果の検証に先立って、ドナーおよびレシピエントの組み合わせ自体が膵島グラフト周囲の血管新生へ及ぼす影響について検証した。

【実験動物、実験群】

レシピエントにはBalb/c nu/nu マウス (Slc, Japan) を用い、背部にDSC (Dorsal skinfold chamber) を装着して皮下膵島移植モデルを作製した。自家移植モデルは、同系移植モデルで代用した。ドナーとして、自家移植モデルでは C. B6-Tg (CAG-EGFP) C14-Y01-FM1310sb/Rbrc マウス (n=6)、同種移植モデルでは C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウス (n=9) を使用した。



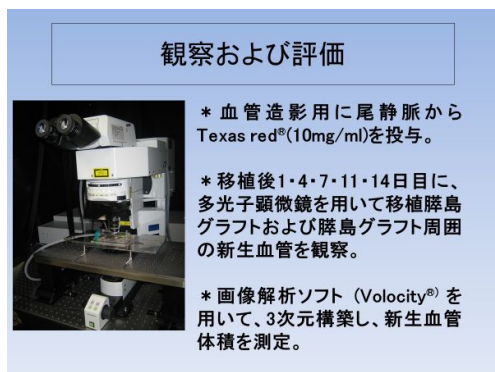
【膵島分離、培養方法、および移植】

1g/L の濃度で collagenase (Sigma type V; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) を溶解した cold Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS) を顕微鏡下に総胆管より注入し、膵臓を拡張させた後、膵臓摘出を行う。10 mL の HBSS を加えた後、37 °C で温浴させることにより膵臓を消化し、引き続き Histopaque-1119 (Sigma Diagnostics, U.S.A) と Lymphoprep™ (Nycomed Pharma AS, Norway) を用いた濃度勾配遠心を行い、膵島が存在する層の溶液を回収した。その後、マウス1匹から分離した約200~300IEQs (islet equivalents) の膵島を、5.5 mmol/L グルコース及び10% 胎児ウシ血清を添加した RPMI-1640 5ml とともに 50mm ペトリディッシュ (Sterilin, Cambridge, UK) に入れ、37 °C、5% CO₂ 下で培養した。3時間の培養後、分離した膵島をハンドピックアップでDSCに2~10個移植した。

【マウス膵島グラフトに対する新生血管の観察および測定】

血管造影のために、移植後1、4、7、11、14日目に Texas Red® (10 mg/mL; Invitrogen, Leek, Netherlands) 0.1mL を尾静脈から経静

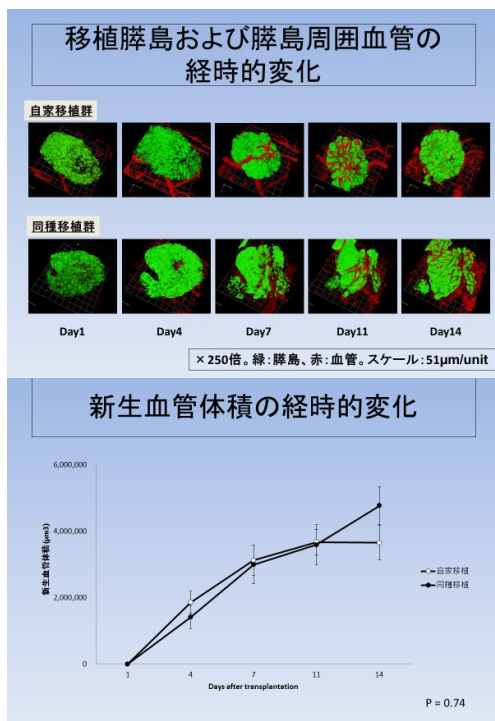
脈的に投与した。イソフルレンで麻酔をかけ、アクリル樹脂製の筒にマウスを入れてプレートに固定し、水浸レンズ (OLYMPUS XLPLN25XWMP NA1.05) を備えた多光子顕微鏡 (FluoView FV1000MPE; OLYMPUS) で観察した。多光子顕微鏡で取得した画像を画像解析ソフト Volocity (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて 3 次元構築し、各々の体積を測定した。



4. 研究成果

移植後 2 週間の観察期間内において、同系膵島移植群と同種膵島移植群間の膵島グラフト周囲の新生血管体積に有意な差は認めず、ドナーおよびレシピエントの組み合わせ自体が膵島グラフトの血管網再構築へ及ぼす影響は極めて軽微であることが示唆された。

この結果から自家移植と同種移植の成績の差には免疫抑制剤のような外的因子の影響が大きいと推察されたため検証しようとしたが、手技的問題により遂行困難であった。



< 引用文献 >

1. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med. 2000;343(4):230-8.
2. Lai Y, Schneider D, Kizszun A, Hauck-Schmalenberger I, Breier G, Brandhorst D, et al. Vascular endothelial growth factor increases functional beta-cell mass by improvement of angiogenesis of isolated human and murine pancreatic islets. Transplantation. 2005;79(11):1530-6.
3. Linn T, Schneider K, Hammes HP, Preissner KT, Brandhorst H, Morgenstern E, et al. Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans. FASEB J. 2003;17(8):881-3.
4. Sutherland DE, Gruessner AC, Carlson AM, Blondet JJ, Balamurugan AN, Reigstad KF, et al. Islet autotransplant outcomes after total pancreatectomy: a contrast to islet allograft outcomes. Transplantation. 2008;86(12):1799-802.
5. Goto M, Eich TM, Felldin M, Foss A, Kallen R, Salmela K, et al. Refinement of the automated method for human islet isolation and presentation of a closed system for in vitro islet culture. Transplantation. 2004;78(9):1367-75.
6. Goto M, Groth CG, Nilsson B, Korsgren O. Intraportal pig islet xenotransplantation into athymic mice as an in vivo model for the study of the instant blood-mediated inflammatory reaction. Xenotransplantation. 2004;11(2):195-202.
7. Nishimura R, Goto M, Sekiguchi

S, Fujimori K, Ushiyama A, Satomi S. Assessment for revascularization of transplanted pancreatic islets at subcutaneous site in mice with a highly sensitive imaging system. Transplant Proc. 2011;43(9):3239-40.

8. Nishimura R, Ushiyama A, Sekiguchi S, Fujimori K, Ohuchi N, Satomi S, et al. Effects of glucagon-like peptide 1 analogue on the early phase of revascularization of transplanted pancreatic islets in a subcutaneous site. Transplant Proc. 2013;45(5):1892-4.

9. Nishimura R, Nishioka S, Fujisawa I, Shiku H, Shimada M, Sekiguchi S, et al. Tacrolimus inhibits the revascularization of isolated pancreatic islets. PLoS One. 2013;8(4):e56799.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Does the immunological incompatibility between the donor and recipient affect pancreatic islet revascularization?

Ryuichi Nishimura, Akira Ushiyama,

Satoshi Sekiguchi, Keisei Fujimori,

Susumu Satomi, Noriaki Ohuchi,

Masafumi Goto

(World Transplant Congress 2014, San Francisco, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 隆一 (NISHIMURA, Ryuichi)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90710864

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()