

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390316

研究課題名(和文) 第四世代膵島分離技術の確立とその臨床応用化

研究課題名(英文) Establishment of 4th generation of islet isolation and the clinical application

研究代表者

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50378733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に、1. 膵管保護、2. 二層法保存、3. 新規臓器保存液、4. 比重コントロールによる膵島純化、5. 膵島追加純化、6. 分離膵島低温保存、という6つの膵島分離技術を改変して第三世代膵島分離法を確立した。本研究では、1. 膵管保護溶液にJNK抑制ペプチドを添加、2. 新規臓器保存液(HN-1溶液)の使用、3. 連続比重・密度勾配による純化、という3つの膵島分離技術を新たに導入することにより、第四世代膵島分離法を確立した。この膵島分離技術の確立により、2-3例の心停止ドナーからの膵島移植によるインスリン離脱のみならず、1例の脳死ドナーからの膵島移植によるインスリン離脱も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We previously established a new islet isolation protocol(3rd generation) based on the Ricordi method. It includes pancreatic ductal protection, a MK preservation solution, the two-layer method of pancreas preservation, a new islet purification solution (Iodixanol-based solution), supplemental purification, and cold preservation of isolated islets. In this study, we established 4th generation of islet isolation protocol, including HN-1 preservation solution, ductal injection with JNK inhibitor, and controll-density and osmolality solution for islet purification. Establishment of this method enables us to make diabetic patients insulin independent using islets not only from 2 or 3 pancreata of NHBDS, but also from a pancreas from a brain-dead donor.

研究分野：膵島移植

キーワード：膵島移植 膵島分離 JNK抑制剤 新規臓器保存液 膵島純化 連続比重勾配 連続密度勾配

1. 研究開始当初の背景

膵島分離技術は非常に複雑で移植成績の施設間格差が大きいことが、エドモントンプロトコール発表後に行われたマルチセンタートライアルで示されている。申請代表者はハーバード大学時代から臨床の膵島分離に携わり、常に膵島分離技術の向上を目指した技術開発に取り組んでいる。現在までにエドモントンプロトコールの分離技術から、以下の6つの改変を行っている。そのうち二層法保存以外の5つの技術は申請代表者が中心となって技術開発を行っている。

1. 膵管保護
2. 二層法保存
3. 新規臓器保存液
4. 比重コントロールによる膵島純化
5. 膵島追加純化
6. 分離膵島低温保存

膵島移植率（膵島分離を行って移植に至った割合）の全世界平均は30%前後であるが、上記の6つの技術を臨床応用化したところ（第三世代膵島分離法）移植率は80%以上となり、かつ移植後の成績は1回のみの移植でインスリン離脱率が100%となった。この成績は世界トップレベルであり、申請代表者の膵島分離技術の高さがうかがえる。

日本では臓器移植法が改正され脳死ドナーが増加傾向にあるが、いまだ欧米に比べて少ない。脳死ドナー膵の多くが膵臓の臓器移植に利用されることを考慮すると、膵島移植はごくわずかの脳死ドナーおよび心停止ドナーの膵臓を利用することになる。このため、移植率の向上とともに少ないドナー膵でのインスリン離脱を達成できるような分離技術が日本では必須である。

2. 研究の目的

今回の研究期間中に第四世代膵島分離法を確立することを目的とする。具体的には次の3つの改変を行う。

1. 膵管保護溶液に JNK 抑制ペプチドを添加
2. 新規臓器保存液（HN-1 溶液）の使用
3. 連続比重・密度勾配による純化

3. 研究の方法

ブタ膵島分離

体重 130kg 以上の雌ブタ（生後 2 年以上）の膵を用いて膵島分離を実施した。温阻血時間が 20 分-30 分程度になるようにコントロールし、膵臓を摘出した。膵管にカニューレを挿入後、ただちに保存液を 1ml/g 膵重量の割合で逆行性に注入し、PFC と保存液を用いた二層法保存で臓器保存を行った。平均 2 時間の臓器保存後、膵島分離を開始した。まず、圧コントロールのもと膵管からコラゲナーゼを注入し、その後臓器を Ricordi チャンバーに移し、膵消化を行った。膵島の純化は COBE 2991 Cell Processor を用いて連続比重勾配法にて行った。

JNK 抑制ペプチドの膵管保護溶液内添加による膵島移植への効果・安全性の確認

膵管保護溶液に JNK 抑制ペプチドを添加した場合の有効性に関しては、申請代表者がバイラー研究所所属時にヒト膵を用いてすでに確認している。本研究期間内にブタ膵を用いて有効性の再確認を行うとともに安全性の検討を行った。

新規臓器保存液（HN-1 溶液）の有効性・安全性の確認

世界的に使用されている臓器保存液として UW 溶液があるが、UW 溶液は膵島分離時に使用する主要な薬剤のひとつであるコラゲナーゼの活性を減弱させ、膵島分離効率の低下を引き起こす。申請代表者は京都大学で開発された Kyoto 溶液を改変した modified Kyoto 溶液（以下 MK 溶液）を膵保存液として用いることにより、膵島分離効率が上昇することを報告している。しかしながら、Kyoto

溶液はもともと肺の保存溶液として開発されたもので、抗酸化作用物質などは含まれておらず、UW 溶液と比べて臓器の長期保存には向いていないことが分かっている。このことを踏まえて申請代表者は、UW 溶液の臓器の長期保存効果と MK 溶液のコラゲナーゼ活性を減弱させないという、両方の利点を併せ持つ新規臓器保存液(HN-1 溶液)を開発した。HN-1 溶液の有効性および安全性を本研究期間中に評価した。

連続比重・密度勾配による純化の検討

膵島純化は、膵島と膵外分泌腺の比重の違いを利用して行うが、エドモントンプロトコルの膵島純化技術では純化前の膵島数の 55-65% しか回収できない状況であった。申請代表者は膵島純化前に膵組織の比重を測定し、その測定結果をもとに比重溶液を変化させ純化を行うことにより、純化効率を 80% 以上に上げることに成功している。また、組織の比重は浸透圧によって変化することが分かっている。本研究では、高比重と低比重の溶液の浸透圧を変化させ、連続比重勾配および連続密度勾配の純化溶液を作成し純化を行う。連続比重・密度勾配による純化の有効性は、申請代表者が膵島追加純化で証明しており、本研究ではその技術を膵島の標準純化に応用する。

4 . 研究成果

JNK 抑制ペプチドの膵管保護溶液内添加による膵島移植への効果・安全性の確認

膵管保護溶液に JNK 抑制ペプチドを添加した場合の有効性に関しては、ヒト膵を用いた場合と同様、ブタ膵においてもその有効性が確認された。安全性に関しては、分離膵島をマウスへ移植することにより検討されたが、副作用は認められておらず、安全性についても確認された。

新規臓器保存液(HN-1 溶液)の有効性・安全性の確認

申請代表者は、UW 溶液の臓器の長期保存効果と MK 溶液のコラゲナーゼ活性を減弱させないという、両方の利点を併せ持つ新規臓器保存液(HN-1 溶液)を開発した。UW 溶液および HN-1 溶液によるブタ膵保存を行った場合、HN-1 溶液を用いたほうが膵島分離による膵島収量は有意に高いことが確認された。また MK 溶液および HN-1 溶液によるブタ膵保存を行った場合でも、HN-1 溶液を用いたほうが膵島分離による膵島収量は有意に高いことが確認された。

HN-1 溶液の安全性に関しては、HN-1 溶液で保存された膵から分離された膵島をマウスへ移植することにより検討された。移植マウスにおいて副作用は認められなかった。

連続比重・密度勾配による純化の検討

連続比重・密度勾配による純化の有効性を検討したが、われわれが以前開発した純化法(比重コントロール法)と膵島収量はほぼ変わらず、純度がやや改善する程度であった。これは、比重コントロール法の純化効率ですでに 80% 強と高いため、連続比重・密度勾配による純化法でのさらなる成績向上が困難であったものと考えられる。しかしながら、新規純化法は比重コントロール法と比べて膵島収量では遜色ない結果であり、純度に関しては向上しているため、比重コントロール法に勝る純化法であるといえる。

また、連続比重・密度勾配による純化の安全性の検討を行った。連続比重・密度勾配によって純化された膵島をマウスへ移植し、その安全性を検討したが、マウスへの副作用は認められなかった。

以上のように、第 4 世代膵島分離法の有効性・安全性が確認された。今後、これらの技術を臨床応用化するための体制を整えていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 37 件)

- 1: Miyamoto Y, Noguchi H (5 人中 3 番目), et al. Three-Dimensional *in vitro* Hepatic Constructs Formed Using Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device. *Cell Med.* 2015, 7(2):67-74. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517914X685187>
- 2: Tsugata T, Noguchi H (9 人中 9 番目), et al. Potential factors for the differentiation of ES/iPS cells into insulin-producing cells. *Cell Med.* 2015, 7(2):83-93. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517914X685178>
- 3: Noguchi H, Saitoh I, Tsugata T, Kataoka H, Watanabe M, Noguchi Y. Induction of tissue-specific stem cells by reprogramming factors, and tissue-specific selection. *Cell Death Differ.* 2015 Jan;22(1):145-55. 査読有 doi: 10.1038/cdd.2014.132.
- 4: Yukawa H, Noguchi H (18 人中 7 番目), et al. Novel positively charged nanoparticle labeling for in vivo imaging of adipose tissue-derived stem cells. *PLoS One.* 2014 Nov 3;9(11):e110142. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0110142.
- 5: Kuise T, Noguchi H (10 人中 2 番目), et al. Establishment of a pancreatic stem cell line from fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. *Biomed Eng Online.* 2014 May 27;13:64. 査読有 doi: 10.1186/1475-925X-13-64.
- 6: Shimoda M, Noguchi H (12 人中 3 番目), et al. A new method for generating insulin-secreting cells from human pancreatic epithelial cells after islet isolation transformed by NeuroD1. *Hum Gene Ther Methods.* 2014 Jun;25(3):206-19. 査読有 doi: 10.1089/hgtb.2013.122.
- 7: Noguchi H. Islet Purification for Clinical Islet Transplantation. *Current Tissue Engineering.* 2014; 3: 34-38. 査読有 doi: 10.2174/2211542002666131230234825
- 8: Murakami T, Saitoh I (10 人中 2 番目), Noguchi H (10 人中 6 番目), et al. STO Feeder Cells Are Useful for Propagation of Primarily Cultured Human Deciduous Dental Pulp Cells by Eliminating Contaminating Bacteria and Promoting Cellular Outgrowth. *Cell Med.* 2013, 6(1-2):75-81. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X674234>
- 9: Seita M, Noguchi H (7 人中 2 番目), et al. Development of Canine Models of Type 1 Diabetes with Partial Pancreatectomy and the Administration of STZ. *Cell Med.* 2013, 6(1-2):25-31. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X674289>
- 10: Kubota Y, Noguchi H (9 人中 2 番目), et al. Maintenance of viability and function of rat islets with the use of ROCK inhibitor Y27632. *Cell Med.* 2013, 6(1-2):15-23. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X674199>
- 11: Kawai T, Noguchi H (11 人中 2 番目), Saitoh I (11 人中 8 番目), et al. Comparison of incubation solutions prior to islet purification in porcine islet isolation. *Cell Med.* 2013, 6(1-2):9-14. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X674180>
- 12: Katayama A, Noguchi H (14 人中 2 番目), Saitoh I (14 人中 10 番目), et al. Comparison of new preservation solution, HN-1, and University of Wisconsin solution in pancreas preservation for porcine islet isolation. *Cell Med.* 2013, 6(1-2):3-8. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X674171>
- 13: Kaitsuka T, Noguchi H (8 人中 2 番目), et al. Generation of Functional Insulin-Producing Cells From Mouse Embryonic Stem Cells Through 804G Cell-Derived Extracellular Matrix and Protein Transduction of Transcription Factors. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Jan;3(1):114-27. 査読有 doi: 10.5966/sctm.2013-0075.
- 14: Miyamoto Y, Noguchi H (13 人中 3 番目), et al. Observation of positively-charged magnetic

- nanoparticles inside HepG2 spheroids using electron microscopy. *Cell Med.* 2013, 5(2-3):89-96. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X666530>
- 15: Kataoka HU, Noguchi H. ER stress and β cell pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes and islet transplantation. *Cell Med.* 2013, 5(2-3):53-57. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X666512>
- 16: Kuise T, Noguchi H, Saitoh I, Kataoka HU, Watanabe M, Fujiwara T. Isolation efficiency of mouse pancreatic stem cells is age-dependent. *Cell Med.* 2013, 5(2-3):69-73. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X666503>
- 17: Noguchi H, Saitoh I, Kataoka HU, Watanabe M, Fujiwara T. Culture conditions for mouse pancreatic stem cells. *Cell Med.* 2013, 5(2-3):63-68. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517913X666495>
- 18: Huang P, Noguchi H (15 人中 5 番目), et al. Cancer stem cell-like characteristics of a CD133(+) subpopulation in the J82 human bladder cancer cell line. *Mol Clin Oncol.* 2013 Jan;1(1):180-184. 査読有 doi: 10.3892/mco.2012.29
- 19: Noguchi H, Kobayashi N. Controlled expansion of mammalian cell populations by reversible immortalization. *J Biotechnol Biomater* 3: 158. 査読有 doi:10.4172/2155-952X.1000158
- 20: Oishi K, Noguchi H (11 人中 11 番目), et al. In vivo imaging of transplanted islets labeled with a novel cationic nanoparticle. *PLoS One.* 2013;8(2):e57046. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0057046.
- 21: Saitoh I, Noguchi H (8 人中 8 番目), et al. Generation of mouse STO feeder cell lines that confer resistance to several types of selective drugs. *Cell Med.* 2012, 3(1-3):97-102. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639414>
- 22: Miyamoto Y, Noguchi H (7 人中 2 番目), et al. Cryopreservation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Med.* 2012, 3(1-3):89-95. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639405>
- 23: Yukawa H, Noguchi H (8 人中 2 番目), et al. Differentiation of Mouse Pancreatic Stem Cells Into Insulin-Producing Cells by Recombinant Sendai Virus-Mediated Gene Transfer Technology. *Cell Med.* 2012, 3(1-3):51-61. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639487>
- 24: Oishi K, Noguchi H (9 人中 2 番目), et al. Novel positive-charged nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging of islet transplantation. *Cell Med.* 2012, 3(1-3):43-49. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639397>
- 25: Noguchi H (10 人中 1 番目), et al. A combined continuous density/osmolality gradient for supplemental purification of human islets. *Cell Med.* 2012, 3(1-3):33-41. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639388>
- 26: Sugimoto M, Noguchi H (10 人中 5 番目), et al. Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3-encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy. *Oncol Rep.* 2012 Nov;28(5):1645-52. 査読有 doi: 10.3892/or.2012.2001.
- 27: Kanamune J, Noguchi H (7 人中 4 番目), et al. Attenuation of murine graft-versus-host disease by a tea polyphenol. *Cell Transplant.* 2012;21(5):909-18. 査読有 doi: 10.3727/096368911X623934
- 28: Miyamoto Y, Noguchi H (7 人中 4 番目), et al. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant.* 2012;21(2-3):617-22. 査読有 doi:

10.3727/096368911X605556
29: Hayashi T, Noguchi H (8人中4番目), et al. Transplantation of osteogenically differentiated mouse iPS cells for bone repair. Cell Transplant. 2012;21(2-3):591-600. 査読有 doi: 10.3727/096368911X605529
30: Naziruddin B, Noguchi H (12人中3番目), et al. Improved pancreatic islet isolation outcome in autologous transplantation for chronic pancreatitis. Cell Transplant. 2012;21(2-3):553-8. 査読有 doi: 10.3727/096368911X605475
31: Takita M, Noguchi H (12人中3番目), et al. Adverse events in clinical islet transplantation: one institutional experience. Cell Transplant. 2012;21(2-3):547-51. 査読有 doi: 10.3727/096368911X605466
32: Noguchi H (15人中1番目), et al. Fresh islets are more effective for islet transplantation than cultured islets. Cell Transplant. 2012;21(2-3):517-23. 査読有 doi: 10.3727/096368911X605439
33: Noguchi H (21人中1番目), et al. Comparison of ulinastatin, gabexate mesilate, and nafamostat mesilate in preservation solution for islet isolation. Cell Transplant. 2012;21(2-3):509-16. 査読有 doi: 10.3727/096368911X605420
34: Shimoda M, Noguchi H (11人中2番目), et al. Islet purification method using large bottles effectively achieves high islet yield from pig pancreas. Cell Transplant. 2012;21(2-3):501-8. 査読有 doi: 10.3727/096368911X605411
35: Noguchi H (13人中1番目), et al. Evaluation of osmolality of density gradient for human islet purification. Cell Transplant. 2012;21(2-3):493-500. 査読有 doi: 10.3727/096368911X605402
36: Shimoda M, Noguchi H (11人中2番目), et al. Improvement of porcine islet isolation by inhibition of trypsin activity during pancreas

preservation and digestion using α 1-antitrypsin. Cell Transplant. 2012;21(2-3):465-71. 査読有 doi: 10.3727/096368911X605376
37: Ueki H, Noguchi H (13人中8番目), et al. A novel gene expression system for detecting viable bladder cancer cells. Int J Oncol. 2012 Jul;41(1):135-40. 査読有 doi: 10.3892/ijo.2012.1417.

〔学会発表〕(計5件)

- 1: 野口洋文：岡山大学での臨床膵島移植へ向けた分離技術改変の取り組み：第40回日本膵・膵島移植研究会、2013/3/2、サンポートホール高松（香川県高松市）
- 2: 野口洋文：膵島移植・再生療法の現状と展望：第12回日本先進糖尿病治療研究会、2012/12/1、岡山市芸文館（岡山県倉敷市）
- 3: 野口洋文：膵島移植と再生医療：第39回日本臓器保存生物医学学会、2012/11/17、コラッセふくしま（福島県福島市）
- 4: 野口洋文：膵島移植の現況と展望：第11回日本再生医療学会総会、2012/6/13、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- 5: 野口洋文、齊藤一誠、片岡仁、渡部昌実、藤原俊義：マウス誘導膵幹細胞（Induced Pancreatic Stem (iPaS) Cells）の樹立：第112回日本外科学会総会、2012/4/12、幕張メッセ（千葉県千葉市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

野口 洋文（NOGUCHI, Hirofumi）
琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・教授
研究者番号：50378733

(2)研究分担者

齊藤 一誠（SAITOH, Issei）
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：90404540