

令和元年6月20日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10178

研究課題名(和文) HGF/c-Metシグナル活性化による移植膵島アポトーシス制御の試み

研究課題名(英文) Critical role of HGF/c-Met signaling pathway in islet transplantation

研究代表者

川原 敏靖 (KAWAHARA, TOSHIYASU)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：60407260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は移植膵島をいかに効率的に生着させて機能させるかでありました。われわれはドナー膵島をリコンビナントHGFで刺激しアポトーシスに耐えうる膵島作成を検討いたしました。17頭のブタの膵臓全摘術を施行しましたが一時的に血糖値は上昇しましたが安定した糖尿病状態を誘導することができませんでした。残存膵臓が機能している可能性があると考えました。膵臓全摘術の手技は安定していましたが、下大静脈近傍の膵臓を完全に切除するのはリスクが高く、高い手術死亡率が懸念されたため、膵臓全摘後にストレプトゾトシンを投与しました。しかしその効果はなく、リコンビナントHGF有用性を証明するまでに至りませんでした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵島移植は、1型糖尿病に対する低侵襲かつ根治的治療であります。その一方で肝臓内に移植した膵島細胞の多くは細胞死してしまい機能なくなる現実を克服すべく、リコンビナントHGF刺激により細胞死に耐えうる膵島を作成しようと試みました。残念ながら大動物の実験モデル作成に難渋し、結果を出すに至りませんでした。今後はiPS細胞などの出現によりさらなるこの分野の発展が期待されております。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to inhibit cell-death of transplanted islet cells in the livers by stimulation of HGF/cMet signaling pathway in vitro using recombinant HGF. We performed total pancreatectomy of 17 pigs to induce permanent diabetes as a model of type 1 diabetes. Despite of total pancreatectomy, blood glucose levels returned to normal 2 week after total pancreatectomy, probably due to residual pancreas around inferior vena cava (IVC). Since it was high risk to remove the residual pancreas surgically around IVC, we used streptozotocin to inhibit the function of residual pancreas after total pancreatectomy. However, unfortunately blood glucose levels came back to normal. We did not have enough time to clarify the role of HGF/cMet signaling pathway in islet transplantation.

研究分野：消化器外科 移植外科

キーワード：膵島移植

1. 研究開始当初の背景

毎年約 8,000 人が 1 型糖尿病と診断され、アメリカでは約 300 万人の 1 型糖尿病患者がいると推定されている。自己免疫疾患と考えられており、若年性発症が多いため長期間にわたる血糖値のコントロール不良は腎不全、心血管障害、糖尿病性網膜症のリスクを伴う。

1 型糖尿病の根本的な治療法としては、膵臓移植と膵島移植が挙げられる。膵臓移植を行うには、若くて肥満のないドナー提供が必要で、またレシピエントは上腹部から下腹部までの大きな切開が必要となり多大な侵襲となる。さらには数カ所の動脈吻合と門脈吻合を伴うために移植後の動脈血栓、門脈血栓のリスクも高く、拒絶反応が強い膵臓移植には強い免疫抑制が必要なためにそれに伴う感染のリスクも伴うことになる。一方、膵島移植は比較的高齢なドナーや肥満のあるドナーからでもインスリン産生細胞を含む膵島を分離することが可能である。一番の利点としてはカテーテルを門脈内に留置し肝臓内へ移植するため、開腹することなく局所麻酔下の 1 時間程度の手技で移植を受けることができることである。2000 年には、移植した膵島に障害を及ぼすステロイド剤を使わずに、m-TOR 阻害剤、抗 IL-2 受容体抗体を用いるエドモントンプrotocol がアルバータ大学で発表されたによりその生着率が著しく向上した。

その一方で、肝臓内に移植された膵島は移植された直後の炎症反応によりその 70%以上がアポトーシスを起こしてしまうことが報告されており (instant blood-mediated inflammatory reaction: IBMIR)、この反応は自己膵島移植 auto-islet transplantation でも起こることが知られている。欧米では一人のレシピエントは複数の脳死ドナーから複数回の膵島移植を受けているのが現状であるが、脳死ドナーの少ない本邦においては、移植膵島細胞を効率よく生着させることが特に重要課題となると考えている。

2. 研究の目的

本研究は 1 型糖尿病に対する低侵襲治療である膵島移植において、ドナーから分離した移植細胞をいかに効率的に生着させて機能させるかを目的としている。リコンビナント HGF の有効性は種々の臓器、細胞で報告されているが、高価であるためにヒトや大動物においての *in vivo* 投与には高額な研究費、医療費が必要となるのが難点である。そこでわれわれはドナー膵島を *in vitro* で培養することにより、低容量のリコンビナント HGF で、しかもアポトーシスに耐えうる膵島の作成を試みたいと考えている。

HGF トランスジェニックマウス、c-Met ノックアウトマウスの報告から、HGF は β 細胞の分化に大きく関与しており、われわれのモデルにおいてもリコンビナント HGF で刺激した膵島は HGF の抗アポトーシス作用により、IBMIR を克服して安定した生着と、さらにはインスリン分泌を認めることを期待している。

3. 研究の方法

- (1) 実験 A: ブタに対する腹腔鏡下膵全摘術とドナー膵の保存

ミニブタ (20-30kg) を全身麻酔下で気腹して、カメラポートを含めた 5 ポートで腹腔鏡下膵臓摘出術を施行する。切除した膵臓はエンドキャッチに入れて、新たに右下腹部の腹直筋右縁に縦の 小切開を加えて体外へ摘出する。この縦切開創は膵島細胞移植の際の門脈カテーテル留置の際にも使用する。摘出膵臓は臓器保存液 HTK 液内で、氷上で保存する。

(2) 実験 B: 膵全摘による糖尿病ブタの作成と術後管理

膵臓全摘により糖尿病を誘導したブタは術後 5 日目の膵島細胞移植まで血糖を管理し、適宜インスリン投与により血糖をコントロールする。高血糖による脱水、ケトアシドーシスの合併症を起こさないように術後管理する。

(3) 実験 C: ドナー膵臓からの膵島分離

HTK 液内で保存した膵臓は迅速に膵島細胞分離を行う。膵管内に HTK 液を注入した後、コラゲナーゼである Liberase PI (0.25g/pancreas) を用いて膵臓を消化し、ヒト膵島分離の標準である Ricordi 法で膵島を分離する。収量、純度、viability を評価する。

(4) 実験 D: 膵島のリコンビナント HGF による in vitro での培養

分離した膵島は in vitro で、リコンビナント HGF の有無の群に分けて 5 日間培養する。リコンビナント HGF 濃度は 10-500ng/ml の範囲で振り分け、インスリン産生能、細胞のリン酸化で最適濃度を検討する。

(5) 実験 E: 糖尿病ブタの小開腹による門脈内カテーテル挿入と、自己膵島肝内移植

実験 D で決定したリコンビナント HGF 濃度で培養した膵島は膵島移植に用いる。糖尿病ブタの左下腹部切開を開腹して、回結腸静脈から門脈へカテーテルを留置する。膵島 4000 IE/kg を門脈経由で肝臓内へ移植する。

(6) 実験 F: レシピエントブタの血糖値測定と術後管理、および術後 1 週間ごとの肝生検

移植後、経時的に血糖値をモニターし、また C ペプチド、インスリンレベルを測定する。さらには術後 1 週間ごとに体外式超音波ガイド下に肝生検を行う。肝生検はインスリン免疫染色で肝臓内に生着している膵島 (β 細胞) を、TUNEL 染色でアポトーシスを確認する。またグルカゴン染色で α 細胞も確認する。また、肝機能検査 (AST, ALT, T-BIL) も定期的に検査する。

4. 研究成果

2014 年から、継続して 21-41kg の豚を購入し、合計 17 匹の豚を使用し研究を行ってきた。豚に点滴ラインを確保し、気管挿管を行い、全身麻酔下で開腹膵臓全摘手術を行い、1 型糖尿病のモデル作成に着手してきたが、術後 1 週間までは血糖が上昇するものの、その後は下降傾向となり、術後 2 週間ではインスリン投与せずに正常レベルまで回復しまった。私の留学先であり膵島移植の世界的権威であるカナダ アルバータ大学の James Shapiro 教授に相談したところ、豚の膵全摘は難易度が高いため、安定したモデルを作成するには時間がかかるとのお話であった。豚の膵臓が下大静脈の背側に回り込んでいるために、切除が不完全であった可能性もあったが、残存膵を手術的に摘出することは手術死

亡率上昇に繋がると判断し、ストレプトゾトシンを投与したが、効果は認められなかった。そこで、本来の目的である hepatocyte growth factor (HGF) の膵島に対する細胞保護効果を確認することを第1の目標とし、マウスモデルで検討することにした。

しかしながら、当研究施設において、マウス研究の依頼を提出し、承認を得ることに時間を要し、さらには施設において配分される研究スペースに限りがあるため、新規申請の研究者への許可にも時間を要してしまった。研究スペースがなかなか確保できずに小動物での検討も不十分となってしまった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計0件)

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松野 直徒

ローマ字氏名：(MATSUNO, naoto)

所属研究機関名：旭川医科大学

部局名：医学部

職名：特任教授

研究者番号 (8桁)：00231598

研究分担者氏名：古川 博之

ローマ字氏名：(FURUKAWA, hiroyuki)

所属研究機関名：旭川医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8桁)：70292026

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。