

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10422

研究課題名（和文）ヒト膵島移植における分離後膵島の細胞評価

研究課題名（英文）Beta-cell evaluation for isolated islets in human islet transplantation

研究代表者

三田 篤義（Atsuyoshi, Mita）

信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・講師

研究者番号：60419398

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：膵島移植では、ドナー膵臓からコラゲナーゼを用いて膵島を分離・純化して移植片（グラフト）を作成する。この過程で膵島が障害を受け、細胞のインスリン分泌能が低下することがある。これまでの膵島評価法では、細胞のみならず、細胞等も含む膵島全体を評価していた。本研究では、細胞自体の評価を行うため、膵島を個別の細胞にさらに分離し、それぞれの細胞を染色して、フローサイトメトリーで解析することにより、細胞のみを抽出してそのviabilityを評価できるようにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵島内の細胞viability解析、および細胞含有率測定により細胞そのものを評価することで、膵島移植後のグラフト機能を予測し得る。十分な細胞機能を有するかわからないマージナルドナーから抽出した膵臓を膵島分離し、作成したグラフトの細胞を評価することにより、膵島移植に適するか、移植前に評価できるようになることが期待され、膵島移植の成績向上に寄与しうる。

研究成果の概要（英文）：Islets must be isolated and purified using collagenase from a donor pancreas before islet transplantation. Beta-cells might be injured during this process and decrease to produce insulin. Whole islets including not only beta-cells but also alpha-cells are evaluated in traditional method to evaluate islet's ability. In this research, we isolated beta-cells from islets and directly analyze beta-cell viability using flowcytometry.

研究分野：移植

キーワード：膵島移植 細胞 膵島 膵島分離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は、自己免疫的機序によりインスリン産生細胞である膵臓内の細胞が破壊され、重症になると体内で全くインスリンが産生されなくなる重篤な疾患であり、インスリン補充療法のみでは調節が難しく、高血糖、あるいはインスリン投与量の過剰による低血糖のために意識消失や動脈硬化の進行による心筋梗塞、腎不全など生命に危険が及ぶ重篤な合併症を引き起こす。また、膵疾患により膵全摘出術を受けた場合も同様に体内のインスリン分泌が全くなってしまい、治療困難な状態となる。

膵島移植は、そのようなインスリン依存状態糖尿病に対する治療であり、ことに 2000 年に Shapiro らにより報告されたエドモントン・プロトコールによる劇的な治療成績の改善¹⁾により、脚光を浴びるに至った糖尿病治療法である。

カナダやニュージーランド、イギリスでは重症 1 型糖尿病に対する治療として保険適応が認められており、アメリカでは膵全摘に対する自家膵島移植がメディケイドでの適応が認められている。日本では、日本膵・膵島移植研究会が中心となり、保険収載を目指して臨床研究が進められていた²⁾。

膵島移植では、膵島分離・純化の過程で、様々な原因により膵島細胞数の減少、viability の低下が起こる。分離後の膵島細胞、特に細胞が少ない、あるいはインスリン分泌能が低下していると、膵島移植を行っても十分な血糖低下が得られないことがある。膵島移植は、門脈塞栓による門脈圧亢進の危険があることから、行える回数が 3 回に限られており、3 回の移植でグラフト生着が得られない場合は、治療を断念せざるを得なくなる。したがって、1 回毎の膵島移植の成否が重要である。

従来、膵島分離・純化後の膵島細胞は、dye を用いた viability 評価(FDA/PI 等)と in vitro でのインスリン分泌能を評価するのみで移植が行われているが、これらは移植後インスリン離脱の成績を予測し得ないことがわかってきた。

Ichii らマイアミ大学グループが報告した、フローサイトメトリーとレーザー・スキャン・サイトメーターを用いる膵島細胞評価方法³⁾は、マウスに対する膵島細胞移植モデルと同様に膵島移植後のグラフト生着を予想しうる膵島細胞評価法である。当時日本でこの評価方法を行なっている施設はなかった。

2. 研究の目的

細胞 viability 解析および細胞含有率測定による膵島評価を本邦に導入することを目的とした。

3. 研究の方法

膵島移植を目的として、ドナー膵臓から膵島分離して得られた膵島を評価する。

膵島細胞塊を単細胞に分離して、フローサイトメトリーを用いて膵島内の他の細胞を除いた、細胞のみの Viability を評価し、免疫染色によって膵島細胞塊内の細胞の割合を特定する。まず、大動物ブタの膵臓から膵島を分離し、ブタ膵島を用いて細胞 viability 評価のためのフローサイトメーターの調整を行う。次にブタ膵島にさまざまな刺激を与えて傷害を加え、細胞 viability 評価法を行って viability の低下を正確に捉えられるかについて調べた。最後に実験用ヒト膵島を用いて、ブタ膵島を用いて調整した検査がヒト検体でも測定しうるか検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト膵島の細胞 viability 解析、および細胞含有率測定に用いるのと同じ、あるいは同等の試薬を用いて、ブタ膵島の評価を行うことができた。Dye として、生細胞 / 死細胞の鑑別に 7-AAD(aminoactinomycin D)を用い、細胞が細胞等その他の膵島構成細胞に比べて 2 倍の亜鉛を含有することから、亜鉛を検出する Newport Green を用いて細胞を抽出し、ミトコンドリア膜電位を反映する TMRE(tetramethylrhodamine ethyl ester)で viable な細胞の割合を測定した(図 1)。

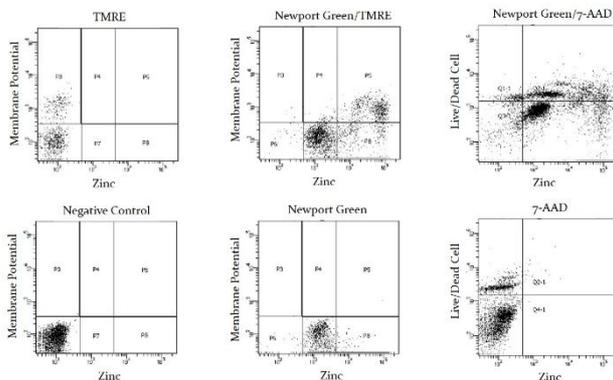


図 1 細胞 viability 解析

7-AAD、Newport Green、TMRE、それぞれの Dye を用いてフローサイトメーターの調整を行った。

(2) プタ豚島に、実験的に加えた虚血刺激や冷保存により 細胞 viability が低下することを確認した。対照に対し、コニカルチューブに沈殿させて Pellet 状にして6時間放置し、虚血障害を生じさせた豚島を比較し、細胞 viability が優位に低下し(図2)、細胞含有率は減少する傾向を認めた(図2)。豚島分離後に豚島を37 および4 で8時間保存した後に比較すると、後者では細胞 viability が低下した(図3)。

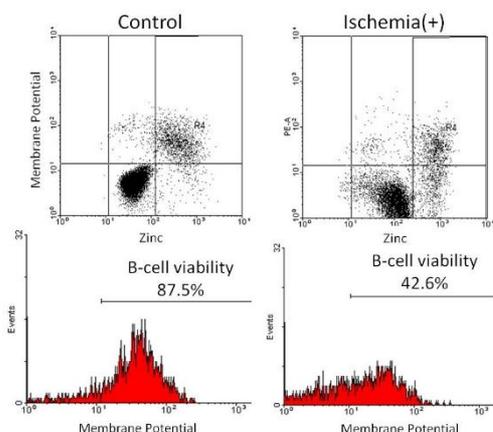


図2 虚血刺激による 細胞 viability の低下
虚血刺激が加わった群(Ischemia(+))では対照(Control)に比べて 細胞 viability が有意に低下している。

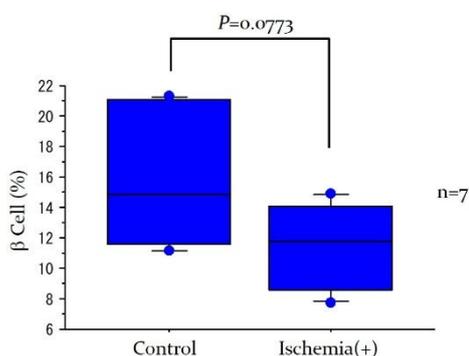


図3 虚血刺激による 細胞含有率
虚血刺激が加わった群(Ischemia(+))では対照(Control)に比べて 細胞含有率が減少傾向にある。

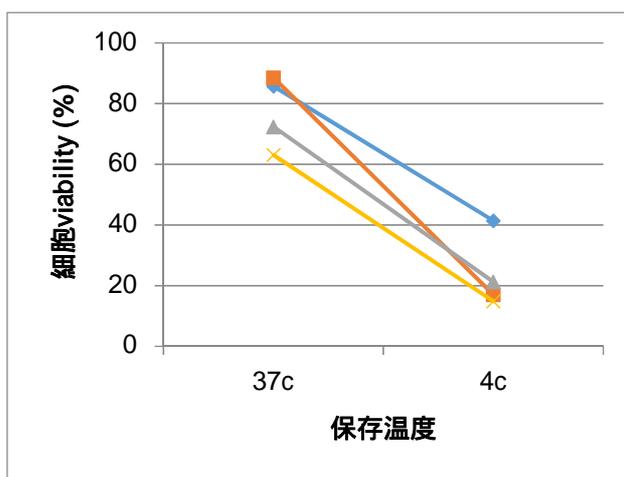


図4 冷保存による 細胞 viability の低下
4 で冷保存すると 37 保存に比べて 細胞 viability が低下している。

(3) 実験用ヒト豚島を用いて、プタ豚島と同様に測定できることを検証した(図5)。

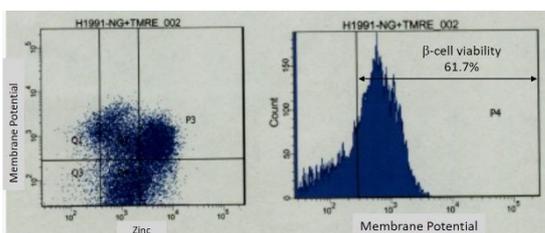


図5 ヒト豚島の 細胞 viability 解析

(4) 本邦の豚島移植は、本研究の研究期間に、保険収載を目指して臨床研究が行われたために、実施施設が制限されるに至り、当施設では豚島移植に用いられる豚島を評価する機会

に恵まれず、膵島移植成績との比較研究を行えなかった。令和2年4月より膵島移植が保険収載となり、今後当施設で膵島移植を行えるようになった際に改めて検証を行う予定である。

【参考文献】

1. Shapiro AM, et al. N Engl J Med 2000;343(4):230-238.
2. 1型糖尿病に対する膵島移植. 三田篤義; 信州医学雑誌 63(4):205-213; 2015
3. Ichii H, et al. Am J Transplant 2005;5(7):1635-1645.

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 吉彦 (Sato Yoshihiko) (50345732)	信州大学・医学部附属病院・准教授 (13601)	
研究分担者	増田 雄一 (Masuda Yuichi) (60467149)	信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教 (13601)	