

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10515

研究課題名(和文) D-アロース多段階使用による膵島移植成績向上の研究

研究課題名(英文) A study for improvement of islet transplantation results by using multi-steps of 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) 3,400,000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おり、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、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改善した。この結果に対し、免疫組織化学的に機序の解明を試みたが有意差を認めず、機序の解明には至らなかった。このため、リアルタイムPCRにて解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症低血糖発作を伴うインスリン依存型糖尿病の根治療法として期待される膵島移植であるが、ドナーから膵島を取り出してレシピエントへ生着するまでに、膵島に多大なストレスがかかり多くの膵島が生着出来ず効率が良くない事が分かっている。その原因の一つとして活性酸素によるストレスが考えられている。希少糖の一種であるD-アロースは、これまでの研究から活性酸素によるストレスを軽減することが報告されており、D-アロースを用いて膵島移植の成績を向上させる試みを行っている。

研究成果の概要(英文)：Islet transplantation is a curative treatment option for Type-1 diabetes. From the previous experiments, addition of rare sugar D-allose to islet culture medium improved insulin secretion ability and increased diabetes cure rate. It has been suggested that an antioxidative effect of D-allose may be a mechanism for improving islet function. In addition, when islets were transplanted into diabetic model mice and D-allose was intravenously administered immediately after, 24 hours, and 48 hours after the transplantation, the cure rate of diabetes was significantly improved as compared with the control group. We tried an elucidation of the mechanism immunohistochemically, but, for this result, did not lead to an elucidation of the mechanism without recognizing significant difference. Therefore, the experimental method was changed to real-time PCR for analysis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：希少糖 膵島移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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(エドモントンプロトコル)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が、膵島移植にはまだいくつかの問題点が残されている。

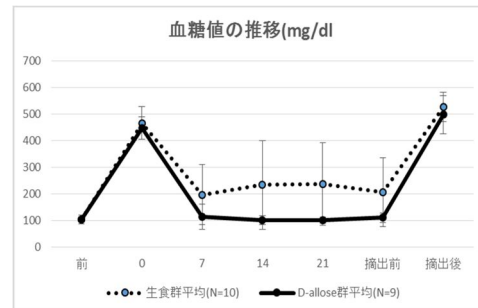
近年、臓器移植に適さない脳死ドナー膵は、膵島分離・移植に使用出来るようになった。とは言え、多くの心停止ドナーから質の高い膵島を十分な収量で分離・移植する手技の開発や、移植後の膵島機能を維持する新たな方法の開発は、膵島移植成績の向上にとって重要な課題である。

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。

(2) 過去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。

(3) また、前回の研究では、ストレプトゾトシン 200 mg/kg BWをBALB/cマウスへ投与して作成した糖尿病マウスに対し、別のBALB/cマウスより摘出した膵島を移植し、移植直後、移植24時間後、移植48時間後にD-アロース 400 µg/g BWを尾静脈より静注したところ、D-アロース投与群は非投与群と比較して移植後の血糖値に有意に改善を認めた。

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。



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、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。

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) 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。

8~12週齢、雄のBALB/cマウスを使用した。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。

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。

分離純化した膵島を、37℃及び5%CO₂を含む加湿環境にて2時間静置した。

アポトーシスの評価としてTUNEL染色を、DNA酸化損傷マーカーとして8-OHdG染色を行う方針とした。TUNEL染色を行う標本をホルマリン固定とし、8-OHdG染色に使用する標本をブアン固定とする方針とした。このため、移植対象となる非糖尿病BALB/cマウスの両側腎被膜下へ30IEQ/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。D-アロース投与群(D群)7例と非投与群(C群)7例に対してそれぞれ移植を行った。移植直後、移植24時間後、移植48時間後に、尾静脈より生理食塩水に溶解したD-アロース 400 µg/g BWを静注した。C群に対しては生理食塩水のみを静注した。

術後3日目に麻酔科に膵島移植腎を摘出した。摘出した左腎をホルマリン固定し、右腎をブアン固定した。

摘出した標本に対して、それぞれHE染色を行った後、TUNEL染色、8-OHdG染色(DNA酸化損傷マーカー)を行い、病理学的な評価を行った。

(2) レシピエントへのD-アロース投与による影響の、リアルタイム PCR を用いた検討。

8~12 週齢、雄の 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、37 °C 及び 5%CO₂ を含む加湿環境にて 2 時間静置した後、糖尿病モデルマウスの腎被膜下へ 15 IEQ/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、以前の予備実験に従った。

膵島移植を受けた糖尿病モデルマウスを、D-アロース投与群(D 群)6 例と非投与群(C 群)6 例に分けた。

D 群に対しては、移植直後、移植 24 時間後に生理食塩水に溶解した D-アロース 400 µg/g BW を尾静脈より静注した。C 群に対しては生理食塩水のみを静注した。移植 24 時間後の投与よりさらに 1 時間経過した後、麻酔下に手術創を解放して膵島移植腎を露出させ、移植膵島を周囲の腎実質を含めて摘出した。摘出した組織はすぐに液体窒素温度で保管し、その後 -80 °C で保存した。

摘出した組織に対してビーズ式細胞破碎を行い、その後スピカラム法にて RNA 抽出を行った。抽出した RNA に対して逆転写反応で cDNA を合成した。

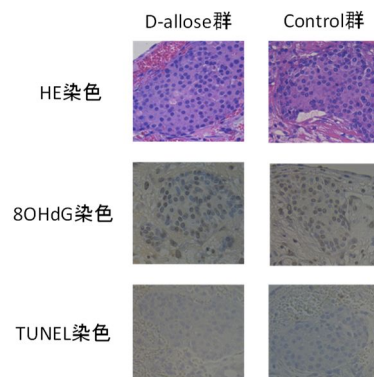
Vii7 リアルタイム PCR システムを用いて、炎症性サイトカインである、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、アポトーシス関連因子である Caspase3 について比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) 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。

術後 3 日目に、非糖尿病マウスより摘出した膵島移植腎に対して、HE 染色、TUNEL 染色、8-OHdG 染色を行った。

膵島に対する染色性を比較検討したが、明らかな有意差は認めなかった。

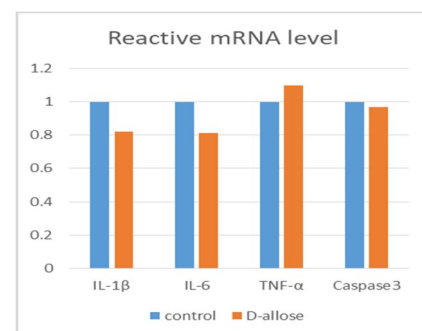


(2) リアルタイム PCR を用いた検討。

リファレンス遺伝子として Actb を用い、CT 法にて検討した。

コントロール群と D-allose 群で、遺伝子の発現量比を比較した。IL-1 β と IL-6 についてはコントロール群と比較して D-allose 群で発現量の低下傾向を認めた。しかし、明らかな有意差は認めなかった。

今後、Hmx1 や Nos2 等の発現量の比較を行う予定である。



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	徳田 雅明 (Tokuda Masaaki) (10163974)	香川大学・インターナショナルオフィス・特命教授 (16201)	