

平成21年 5月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591499

研究課題名（和文）：肝内移植膵島障害における凝固系と炎症反応の相互作用：
サルモデルでの解析と制御研究課題名（英文）：Interrelation between coagulation and inflammatory reaction after
intrahepatic islet transplantation in non-human primate model

研究代表者 中野 昌彦（NAKANO MASAHIKO）

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：90389354

研究成果の概要：

2007年度は二頭のサルで膵島分離を行った。一頭目は分離した膵島が移植基準に達せず、移植できなかった。二頭目は移植基準に達したため、自家膵島移植を行ったが、糖尿病は軽快しなかった。2008年度は二組のペアで同種膵島移植を試みたが、一組目は二頭共に分離した膵島数が移植基準に達しなかった。二組目は分離した膵島は移植基準に達したが、一頭は膵切後の腹膜炎で死亡し、もう一頭は糖尿病を誘発するために投与した薬剤の毒性で死亡した。

交付額：

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：膵島移植、糖尿病、膵島グラフト障害、非特異的炎症、凝固系、
活性化プロテインC

1. 研究開始当初の背景

インスリン依存糖尿病（IDDM）の新しい治療として2000年から欧米では経門脈的肝内膵島移植の本格的な臨床応用が開始され

た。我が国でも2000年4月から既に24例に実施された（2006年9月現在）。このうち、2～3回の膵島移植を受けた3例ではインスリン治療からの離脱に成功した。その他の症例

ではインスリン治療からの離脱は得られていないが、全例で必要インスリン量が減量でき、また血糖の安定化により無自覚低血糖から解放されるなど、膵島移植の有効性が確認されている。しかし、インスリン注射からの離脱には十分な数の膵島が必要で、欧米の報告でも2~3名のドナーの膵臓から分離された膵島を用いている。また、臨床例において、肝内に移植された膵島の残存率が20~30%と低いことが報告され、移植後に膵島が拒絶反応のみでなく、非特異的機序によっても破壊されると推定されている。その要因として、移植局所での血管内皮細胞障害、血液凝固因子の活性化、それらにより誘導される非特異的炎症反応の関与が想定される。単離された膵島が門脈内に移植された場合、膵島周囲に速やかに血栓が形成され (IBMIR; instant blood-mediated inflammatory reaction)、これが膵島の破壊に関与していると報告された。

2. 研究の目的

凝固反応においては、エンドトキシンや炎症性サイトカインに刺激されて内皮細胞や単核球に組織因子(TF)が発現することが最初のステップであるが、我々は、これまで平成17年度科学研究費補助金を受けて、マウスのモデルにおいて門脈内に移植された膵島内に浸潤してきた単核球にTFが発現し、それが活性化プロテインC (APC) 投与によって抑制されることを初めて示した (校正中)。また、最近、我々は移植後早期のグラフトの障害には、NKT細胞によって刺激されたGr-1陽性CD11b陽性単核球からのIFN- γ が重要であることを報告したが (J Exp Med 202, 913-918, 2005)、APCはGr-1

陽性CD11b陽性単核球のIFN- γ とTNF- α の産生を著明に抑制した。この様に、APCがTFの発現を契機とするIBMIRを抑制し、かつ、移植後早期の浸潤単核球による炎症性サイトカインの産生を抑制したため、APC群では移植後に残存する膵島数が多く、血糖の改善につながったと思われる。本研究では、これまでのマウスのモデルで得られた知見が、臨床に直結するサルモデルでも認められるかを検討する。

3. 研究の方法

2007年度

1. サル自家膵島移植

(1) 膵臓全摘出術

全身麻酔下に、腹部正中切開で開腹して、膵臓と共に膵体尾部を剥離し、門脈の直上で膵をリニアークッターで切断し膵体尾部を摘出する。膵摘出後は止血を確認し、閉腹する。術後は3日間、抗生物質を投与する。

(2) 膵島分離

摘出後、直ちに主膵管よりリベレース溶液を注入し、膵体尾部を消化する (Transplantation 42, 689, 1986)。消化した膵組織よりCOBE2991 cell processorを用いて比重濃度勾配により、膵島を外分泌組織から分離し、1週間~10日間培養する。

(3) 糖尿病誘発

サルは膵臓全摘だけでは糖尿病を発症しない。また、術後2~3日で膵臓全摘のダメージから回復し、食事摂取も可能になるので、手術後4日目に全身麻酔下に薬剤 (ストレプトゾトシン STZ 125mg/kg) を投与し糖尿病にする。STZ投与後は糖液の点滴と覚醒後は果汁ジュース等を与えて、低血糖を予防する。その後、空腹時血糖 200mg/dl 以上が2回連続した時点で糖尿病と診断し、診断後2

日以内に分離した膵島を自家移植する。これまでの予備実験でサルは STZ 投与後 2~3 日で糖尿病を発症することがわかっている。

(4) 膵島移植

全身麻酔下に腹部に小切開を加えて小腸を体外に誘導し、その腸間膜の静脈に 20G のアンギオキヤスを留置し、膵島 3000 個/kg を注入する。注入された膵島は腸間膜静脈から門脈を経て臨床と同様に肝内に生着する。マウスのモデルで膵島の生着延長効果がみられた薬剤を移植直後より投与する。移植後 3 日間、抗生物質を投与する。移植後は一日一回空腹時血糖を測定し、週 2 回は体重も測定する。移植後 60 日目に IVGTT (intravenous glucose tolerance test) を施行し、耐糖能を評価する。これまでの予備実験で、サルの自家膵島移植では血糖の正常化に少なくとも 5000 個/kg の膵島が必要であることが判明している。投与した薬剤に効果があれば、膵島 3000 個/kg の移植でも血糖の正常化や耐糖能改善が期待できる。

2008 年度以降

2. サル同種移植

(1) 同種性とクロスマッチ陰性の確認
2 頭のサルから膵臓を亜全摘して膵島を分離し、それぞれ糖尿病にした後に相手のサルの肝内に移植するが、同じ群れからのサルであると血縁関係にあることがあるので、MLR (リンパ球混合試験) を行い、ペアーリング前に同種性を確認する。また、臨床と同様にクロスマッチ陰性であることを確認しておく。

(2) 膵臓亜全摘から解析まで
自家膵島移植モデルと同様に膵臓亜全摘から膵島分離を連日して、2 頭のサルで行う。その後、同日 (術後 4 日目、5 日目) に自家移植モデルと同様に糖尿病誘発、膵島移植を行うが免疫抑制剤は臨床と同じくダクリツマブによる導入とタクロリムス、シロリムスによる維持で行う (N Engl J Med 343, 230-238, 2000)。

4. 研究成果

2007 年度は二頭のサルで膵島分離を行った。一頭目は体重 8kg に対して膵島が約 8000 個しか分離できず、移植基準 (3000 個/kg) に満たなかった。二頭目では体重 10kg に対して膵島 38250 個を分離した。その後、計画通り、薬剤にて糖尿病を誘発した後に、分離した膵島を自家移植した。二頭目はコントロール群であったため、APC 等の薬剤は使用しなかった。移植後、サルの血糖はやや低下したが、移植後 4 週目と 8 週目の耐糖能試験では耐糖能異常を認めた。

2008 年度は二組のペアーで同種膵島移植を試みたが、一組目は二頭共に分離した膵島数が約 5000 個で移植基準に達しなかった。二組目は膵島分離数は 20000-30000 個と移植基準に達したが、一頭は膵切除後の膵液漏による腹膜炎で、もう一頭は糖尿病誘発のための薬剤投与後に死亡した。膵切除後でまだ手術侵襲から充分回復していない時期に薬剤を投与したために死亡したと思われる。

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 1 件)

1. Beneficial Effects of Activated Protein C on Amelioration of Hyperglycemia in Streptozotocin-induced Diabetic Mice Receiving Intrahepatic Syngenic Islets From a Single Donor (in press) Nakano M, Itoh T, Matsuoka N, Nitta T, Mera T, Kojima D, Ono J, Yamashita Y and Yasunami Y. Med Bull Fukuoka Univ 2009
査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 移植膵島からHMGB1が放出され早期グラフト障害を惹起する 伊東 威、新田智之、米良利之、小島大望、松岡信秀、中野昌彦、金城亜哉、山下裕一、安波洋一 第36回膵・膵島移植研究会 (2009. 2. 27 福岡)

2. 移植早期膵島障害に対するアデノシンの効果 —one donor - one recipientの実現に向けて—新田智之、伊東威、米良利之、小島大望、中野昌彦、松岡信秀、金城亜哉、山下裕一、安波洋一第7回日本組織移植学会総会・学術集会 (2008. 8. 23 札幌)

3. Adenosine has an inhibitory effect on NKT cells facilitating to prevent early loss of transplanted islets in association with engraftments. T. Nitta, N. Matsuoka, T. Itoh, T. Mera, A. Kinjo, M. Nakano, Y. Yamashita, Y. Yasunami. X X I I International Congress of the Transplantation Society(2008. 8. 10 Sydney)

4. アデノシンによるNKT細胞、Gr-1+CD11b+細胞を介した移植早期膵島障害の制御新田智之、松岡信秀、伊東威、米良利之、中野昌彦、山下裕一、安波洋一、第108回日本外科学会定期学術集会 (2008. 5. 16長崎)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 昌彦(NAKANO MASAHIKO)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：90389354

(2)研究分担者

安波 洋一(YASUNAMI YOHICHI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：00166521

安西 慶三(ANZAI KEIZO)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：60258556

波部 重久(HABE SHIGEHISA)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：70037430

(3)連携研究者

なし