

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20249057

研究課題名（和文）非侵襲性微小組織診断システムの導入による糖尿病治療のメディカルイノベーション

研究課題名（英文）Medical innovation for diabetes care by introducing non-invasive diagnostic system against small tissues

研究代表者

里見 進（SATOMI SUSUMU）

東北大学・病院・教授

研究者番号：00154120

研究成果の概要（和文）：本研究により、複数の微小組織サンプルの呼吸活性指数を 15 分以内に高精度で計測できる臨床応用可能なシステムを構築することに成功した。開発したシステムを活用することにより、糖負荷前後における分離膵島の呼吸活性の変動指数が移植後の膵島グラフト機能と有意に相関し、有用な移植前評価法となり得ることが判明した。さらに本システムは、新規膵島分離酵素剤や新規膵島培養デバイスの構築に極めて有用であることも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In the present study, clinically applicable new system in which the respiratory activity of multiple small tissues can be measured accurately in 15 minutes was successfully established. By applying this novel system, it was demonstrated that the glucose stimulated respiratory activity of isolated pancreatic islets was significantly correlated with the graft function after islet transplantation, suggesting that this could be used as a reliable potency test for isolated islets. Furthermore, it was also proved that established system in the present study could be useful for developing a new enzyme of islet isolation and a new culture device of isolated islets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2009 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2011 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
総計	37,200,000	11,160,000	48,360,000

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：糖尿病、細胞・組織、膵島、移植

## 1. 研究開始当初の背景

膵島移植はこれまで主流であった膵臓移植に比し、安全・簡便・低侵襲といった多く

の利点を備えた患者に優しい画期的治療法であるため、欧米の一部では既に保険適応となっている。しかし、移植効果の予見が極めて困難である事や、効果を発揮した場合にお

いても現状では一人の患者の治療に複数ドナーを要するという課題を有しているため、ドナー不足が深刻な本邦においては一般医療に至っていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

上記課題を解決するため、本研究においては膵島の活性・機能を迅速かつ的確に診断できる新規デバイスシステムの開発、及びそのデバイス活用による革新的膵島分離システムの構築を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 微小組織診断システムの医療応用へ向けた改良

- ① 試料導入・導出工程：動物種による膵島の大きさの違いに対応し得るデバイスを設計する。
- ② 可動式バルブの検討：PDMS 積層バルブの作製に加え、専用アクチュエータを介する電動制御も検討していく。試料の導入・導出工程を呼吸活性測定と切り離して独立にデバイス化した上で、膵島に負荷を与えない条件を最適化する。
- ③ 従来法との整合性の確認：ラット膵島を用いて、実際に流路デバイス上で呼吸計測を実施する。従来法との比較検討を行い、補正項を決定した上で、さらにその理論的補強を行う。
- ④ 呼吸測定の所要時間を、1試料あたり1分以内に短縮できる機器を構築する
- ⑤ 1試料あたり2分以内で呼吸測定及び解析を可能とする「呼吸解析ソフト」を開発する。
- ⑥ 試料の導入、導出や解析を含めた全工程の所要時間を1試料あたり5分以内に短縮できる機器を構築する。
- ⑦ システム改良：微小電極を埋め込んだ新型微小組織診断デバイス、その制御系、ソフトウェアの改良を更に進める。膵島をはじめとする様々な微小組織の活性計測に適用し、特性評価を進めるとともに操作性・安全性等を考慮し、医療現場でより使いやすいシステムの実現を図る。

(2) 移植前膵島評価法の確立

膵島におけるミトコンドリアの細胞内移動、微細構造変化など呼吸機能に関連する形態的变化を解析する。

- ① 呼吸代謝活性の有力な指標であるATP産生能を解析するために、細胞内ATP量を定量

化する。

- ② 核ゲノム由来の呼吸関連遺伝子(チトクロームc等)の発現を解析し、呼吸計測値との関連を調べる。
- ③ 膵島のバイアビリティーと機能(グルコース応答性インスリン放出能)を同時に計測する事を目的とした、呼吸活性 Stimulation Indexの有効性について検討を行う。
- ④ 膵島の移植効果と、呼吸活性値および呼吸活性 Stimulation Indexとの関係を明らかにするために、呼吸活性値および呼吸活性 Stimulation Indexを測定した膵島を糖尿病動物モデルへ移植し、その相関性を調べる。
- ⑤ 呼吸活性値あるいは呼吸活性 Stimulation Indexに移植効果との間に相関性を認めた場合は、その閾値を検討する。

(3) 移植前膵島評価法の確立及び新規膵島評価法を活用した革新的膵島分離システムの構築

本研究においてこれまでに確立した新規膵島評価法を活用し、以下の項目に該当する革新的膵島分離システムの構築を行いその評価を実施する。

- ① 新規膵島分離用酵素剤の至適化およびその評価
- ② 新規膵島培養デバイスの至適化およびその評価

## 4. 研究成果

(1) 微小組織診断システムの医療応用へ向けた改良

H21年度は、まず膵島の呼吸活性の評価をマイクロチップ上で行うことを目的として、PDMSを材料としてマイクロウェル流路デバイスを作製し、膵島の代用モデルとしてマウス培養胚を用いた検討を行った。また、デバイス形状を考慮した呼吸活性応答の補正を行うことにより、高い再現性をもつ呼吸活性計測が可能であることを確認した。実際、デバイス内で培養を行ったところ、従来法と比較して遜色ない発生率を確認することができた。さらに、重力沈降法を利用することにより、シリンジポンプ等を用いた複雑な流体制御を行わずに、デバイス流路内での単一胚の呼吸評価にも成功することができた。一方、膵島自身の呼吸活性を正確に計測するシステムを確立するため、膵島に至適な組成を有し、かつマイクロ電極を阻害しない溶液のスクリーニングを行い、膵島専用の呼吸活性溶液を樹立することができた。

H22年度は、H21年度に作製した呼吸活性測定用デバイスを改良し、ガラス基板に3本の測定用微小電極を固定し、その上に逆円錐型のPDMSウェルを接着させた改良デバイスの作製を試みた。このデバイスを用いて、膵島のモデルであるマウス培養胚の呼吸活性測定を行ったところ、従来法と相関性の高い結果を得ることができた。また、3本の電極で胚サンプル表面の局所酸素濃度を計測し、その値を平均化することにより、サンプルの配向や極性を排除し、信頼性の高い測定値を得られることが判明した。

H23年度は、H22年度までに確立した呼吸活性測定装置の操作性、スループット向上を目指し、微細加工技術を利用して石英ガラス基板上に微小電極を配置し、微小組織導入用ウェル、保持用チャンバー、測定溶液リザーバーを集積化する新規システムを構築した。このシステムは、微小電流の測定部および制御部、解析ソフトウェア、多検体セルから構成され、膵島6サンプルの呼吸量測定を15分以内に実現できることが可能であり、臨床応用に十分可能であることが確認された。

## (2) 移植前膵島評価法の確立

至適化したデバイスを使用し、実際に小動物の分離膵島の呼吸活性、エネルギーチャージの解析を行った。解析検討の結果、糖負荷前後における分離膵島の呼吸活性の変動指数が移植後の膵島グラフト機能と有意に相関していることが判明し、有用な移植前評価法となり得ることが示唆された。

また、膵島自身の呼吸活性を正確に計測するシステムを確立するため、膵島に至適な組成を有し、かつマイクロ電極を阻害しない溶液のスクリーニングを行い、膵島専用の呼吸活性溶液を樹立することができた。

さらにH21-22年度にかけて、実際に前臨床モデルである大動物の分離膵島の呼吸活性、エネルギーチャージの解析を行った。解析検討の結果、小動物におけるケースと同様に、糖負荷前後における分離膵島の呼吸活性の変動指数が移植後の膵島グラフト機能と有意に相関していることが判明し、有用な移植前評価法となり得ることが示唆された。

## (3) 移植前膵島評価法の確立及び新規膵島評価法を活用した革新的膵島分離システムの構築

本研究において確立した新規膵島評価システムを活用し、世界初となるリコンビナン

トタイプの膵島分離酵素剤のスクリーニングを行い、H24年度よりヒトにおける探索的臨床試験実施まで到達した。

また、同様に酸素透過性に富む材質より構成される膵島培養・移植専用のデバイス構築にも成功し、今後開発デバイスは国内における高度医療制度臨床試験、および国外において探索的臨床試験に活用されることとなった。

このように本研究において確立した新規膵島評価システムは膵島移植の技術改良に有用に活用されており、本研究の当初の目的が十分に達成された。

## 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17件)

1. A novel predictive method for assessing the quality of isolated pancreatic islets using a scanning electrochemical microscopy

Goto M, Abe H, Ito-Sasaki T, Goto M, Inagaki A, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, Matsue T, Satomi S  
*Transplantation Proc*  
41(1):2009:311-313 (査読:有)

2. The influence of brain death on tissue factor expression in the pancreatic tissues and isolated islets in rats

Saito Y, Goto M, Maya K, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, Satomi S  
*Transplantation Proc*  
41(1):2009:307-310(査読:有)

3. Optimization of a Prominent Oxygen-Permeable Device for Pancreatic Islets

Goto M, Yoshikawa Y, Matsuo K, Shirasu A, Ogawa N, Takahashi H, Saitoh Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Tamai M, Satomi S  
*Transplantation Proc*  
40(2):2009:411-412(査読:有)

## 4. 膵島移植の現状と展望

### 後藤昌史

最新医学 64(2):2009:45-52 (査読:無)

5. ラット膵島移植モデルにおける移植前培養膵島に対する新鮮膵島の優位性の検証  
高橋英幸、後藤昌史、小川則彦、藤盛啓成、黒川良望、土井秀之、里見 進

移植 44(1):2009:82-90(査読：有)

6. Superiority of fresh islets compared with cultured islets  
Takahashi H, Goto M, Ogawa N, Saito Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Doi H, Satomi S  
*Transplantation Proc*  
41(1):2009:350-351(査読：有)

7. Entrapment and Measurement of a Biologically Functionalized Microbead with a Microwell Electrode.  
C. Y. Chang, Y. Takahashi, T. Murata, H. Shiku, H. C. Chang, T. Matsue  
*Lab Chip*:9:2009:1185-1192(査読：有)

8. ここまで進んだ膵島移植  
後藤昌史  
糖尿病診療マスター 8:2010:203-207 (査読：無)

9. Chronoamperometric characterization of secreted alkaline phosphatase from single cell entrapped in a poly(dimethylsiloxisane) microwell  
H. Shiku, J. Suzuki, T. Murata, K. Ino, T. Matsue  
*Electrochim. Acta* 55:2010:8263-8267(査読：有)

10. Simultaneous non-contact topography and electrochemical imaging by SECM/SICM featuring ion current feedback regulation  
Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, Y. Murakami, H. Shiku, Y. E. Korchev, T. Matsue,  
*J. Am. Chem. Soc.* 132:2010:10118-10126(査読：有)

11. C5a-Inhibitory peptide combined with gabexate mesilate prevents the Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction in a rat model of islet transplan  
Tokodai K, Goto M, Inagaki A, Nakanishi W, Okada N, Okada H, Satomi S  
*Transplantation Proc*  
42:2010:2102-2103(査読：有)

12. Attenuation of cross-talk between the complement and coagulation cascades by C5a blockade improves early outcomes after intraportal islet transplantation  
Tokodai K, Goto M, Inagaki A, Nakanishi W, Ogawa N, Satoh K, Kawagishi N, Sekiguchi S, Nilsson B, Okada N, Okada H, Satomi S  
*Transplantation* 90:2010:1358-1365(査読：有)

13. The impact of ischemic stress on the quality of isolated pancreatic islets  
Goto M, Imura T, Inagaki A, Ogawa N, Yamaya H, Fujimori K, Kurokawa Y, Satomi S  
*Transplantation Proc*  
42:2010:2040-2042(査読：有)

14. Quantification of the islet product: Presentation of a standardized current Good Manufacturing Practices compliant system with minimal variability  
Friberg A, Brandhorst H, Buchwald P, Goto M, Ricordi C, Brandhorst D, Korsgren O  
*Transplantation* 91:2010:677-683(査読：有)

15. Assessment for revascularization of transplanted pancreatic islets at subcutaneous site in mice with a highly sensitive imaging system  
Nishimura R, Goto M, Sekiguchi S, Fujimori K, Ushiyama A, Satomi S  
*Transplantation Proc*  
43:2011:3239-3240(査読：有)

16. Effect of synthetic protease inhibitor gabexate mesilate on attenuation of coagulant activity and cytokine release in a rat model of islet transplantation  
Tokodai K, Goto M, Inagaki A, Imura T, Satomi S  
*Transplantation Proc*  
43:2011:3176-3178(査読：有)

17. 吸入麻酔イソフルランが膵島移植に及ぼす影響  
山谷英之、後藤昌史、Feng Zhaoqiang、猪村武弘、小林英司、里見 進  
移植 46:2011:154-162(査読：有)

[学会発表] (計 19 件)

1. 高度炎症を伴う膵動静脈奇形に対する自家膵島移植3例の検証  
後藤昌史  
第39回日本膵膵島移植研究会  
2012-0310  
旭川

2. 糖尿病治療のメディカルイノベーション  
後藤昌史  
第47回日本移植学会  
2011-1005  
仙台

3. 臨床応用を目的とした大動物モデルにおける新規膵島評価法の有用性に関する検証

**後藤昌史**

第47回日本移植学会

2011-1005

仙台

4. A novel potency test for assessing the quality of isolated pancreatic islets using a scanning electrochemical microscopy

**Masafumi Goto** (招待講演)

International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA)

2011-0602

プラハ (チェコスロバキア)

5. Development of a highly efficient collagenase for isolating pancreatic islets

**Masafumi Goto**

International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA)

2011-0602

プラハ (チェコスロバキア)

6. Successful islet autotransplantation under severe inflammatory status due to a rupture of the pancreatic arteriovenous malformation by introducing a novel graft protecting protocol

**Masafumi Goto**

International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA)

2011-0602

プラハ (チェコスロバキア)

7. 膵島移植の現状と今後の展望 (依頼講演)

**後藤昌史**

第13回近畿膵移植検討会

2010. 12. 04

大阪

8. 現状における臨床グレードの膵島分離用酵素剤の検証

**後藤昌史**

第46回日本移植学会

2010. 10. 21

京都

9. No Need of Tryptic-like Activity for Successful Porcine Islet Isolation

**Masafumi Goto**

XXIII International Congress Of The Transplantation Society

2010. 8. 16

Vancouver (Canada)

10. 膵島分離用酵素剤の活性評価システムの構築

**後藤昌史**

第37回膵膵島移植研究会

2010, Mar 12

宇都宮

11. The impact of ischemic stress on the quality of isolated pancreatic islets

**Masafumi Goto**

2009 International Pancreas and Islet Transplant Association

2009, Oct 13

Venice (Italy)

12. Potency tests for assessing the quality of isolated pancreatic islets

**Masafumi Goto**

The 10th Cell Transplant Society Congress (招待講演)

2009, April 20

Okayama

13. 膵島移植の現状と今後の展望

**後藤昌史**

第8回日本再生医療学会

2009, March 5-6

東京

14. 今後の膵島移植発展への試み

**後藤昌史**

第36回膵膵島移植研究会

2009, Feb 27-28

15. Improvement of preservation and evaluation for pancreatic islets by introducing bioengineering approach

**Masafumi Goto**

第35回日本低温医学会総会

2008, Nov 22-23

Tokyo

16. 東北大学における膵島移植の取り組み

**後藤昌史**

第44回日本移植学会

2008, Sep 19-21

大阪

17. 有用な膵島評価法である呼吸活性計測法の実際

**後藤昌史**

第44回日本移植学会

2008, Sep 19-21

大阪

18. Predictive methods for assessing the quality of isolated pancreatic islets

**Masafumi Goto**

XXII International Congress Of The  
Transplantation Society  
2008, Aug 10-14  
Sydney

19. A NOVEL PREDICTIVE METHOD FOR ASSESING  
THE QUALITY OF ISOLATED PANCREATIC ISLETS  
USING A SCANNING ELECTROCHEMICAL  
MICROSCOPY

**Masafumi Goto**

XXII International Congress Of The  
Transplantation Society  
2008, Aug 10-14  
Sydney

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

里見 進 ( SATOMI SUSUMU )

東北大学・病院・教授

研究者番号：00154120

(2) 研究分担者

末永 智一 (MATSUE TOMOKAZU)

東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・  
教授

研究者番号：70173797

藤盛 啓成 (FUJIMORI KEISE)

東北大学・病院・准教授

研究者番号：50238622

後藤 昌史 (GOTO MASAFUMI)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・  
教授

研究者番号：50400453