

## 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 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790617

研究課題名（和文）移植膵島の新規三次元画像解析技術の確立

研究課題名（英文）

Development of new method for the three-dimensional analysis of transplanted islets

研究代表者 藤本 裕之 (FUJIMOTO HIROYUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50437274

研究成果の概要（和文）：

移植膵島を三次元的に観察・解析するために Optical Projectin Tomography(OPT)を用いて方法の確立を行った。OPT で、肝臓に移植した膵島を観察でき、三次元的に画像を構築でき、移植膵島数と OPT で画像解析した移植膵島の数は良好な相関を示した。マウス同種同系、同種異系で糖尿病モデルマウスへの膵島移植を行い、膵島の数、量、分布の解析を移植後血糖値に顕著な差が出た際に解析した結果、数、量ともに同種同系移植で膵島が多く残存していることが分かり、その大きさの分布および位置的分布も評価することができた。以上のことより OPT を用いた移植膵島の三次元的解析を非常に有用なツールであることが示された。

研究成果の概要（英文）：

I established a novel imaging technique suitable for analysis of transplanted islets in liver using an optical projection tomography (OPT) method. A three-dimensional tomographic image of the transplanted islets in liver was reconstructed. The number of islets transplanted and the number of transplanted islets observed using OPT showed good correlation. The OPT method was used to compare the numbers of transplanted islets in mouse syngeneic and allogeneic transplantation models. In mice transplanted with allogeneic islets, the number and the volume of transplanted islets was significantly reduced in hyperglycemic condition of allogeneic transplantation. These results indicate that OPT imaging and analysis may be a useful tool to quantitatively and sterically evaluation of transplanted islets in liver at the cellular level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：代替医療

## 1. 研究開始当初の背景

膵島細胞が枯渇することによるインスリン依存状態の糖尿病への一つとして膵島移植が行われているが、移植後の膵島障害により膵島細胞が減少し、インスリン離脱率は経時的に低下している。膵島障害を防ぐために、移植後の膵島細胞の状態を知る必要がある。これまでのPETやMRIなどではその分解能より膵島レベルでの解析は困難である。そのため、光投射型断層技術であるOptical projection tomography(OPT)を用いて膵島細胞を膵島レベルで三次元的に観察・評価するための手法の開発を行った。

## 2. 研究の目的

移植膵島の状態を知るための方法としてOptical Projection Tomographyを用いた移植膵島の観察・解析方法の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス肝臓に移植した膵島をOptical Projection Tomographyを用いて観察可能な条件を染色条件などの検討を行った。染色は膵島内のインスリンを免疫染色することにより行った。

つぎに移植膵島の定量性を評価するため、75, 150, 300個の膵島を経門脈的に肝右葉に移植し、直後肝臓を試料とし、OPTで観察・評価した。

また、糖尿病モデルマウスへの同種同系(C57BL6(ドナー)-C57-BL6(レシピエント))および同種異系(C57BL6(ドナー)-Balbc(レシピエント))移植を行い、膵島細胞の減少について評価した。糖尿病モデルマウスはストレプトゾトシンを投与することで作製し、高血糖状態になったマウスのみを移植ドナーとして用いた。移植膵島数は300個とした。移植後血糖値を測定し、同種同系、同種異系で血糖値に顕著な差が出た際に膵島移植肝臓を摘出しOPTを用いて膵島の形態とくに数、総量、大きさについて三次元的に観察・評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マウス肝臓内における移植膵島の観察

マウス膵臓内膵島の観察条件を用いて、移植膵島の観察を行った。図1に示すように肝臓に移植した膵島を観察することができた。また、移植した膵島が血管の末梢に位置すること(c, d, e)や、側壁に着いたもの(f)が観察できた。

### (2) 移植膵島のOPT解析による定量性評価

移植膵島数が75, 150, 300と増えるにつれて図2a-c中の白色点(膵島)の増加を観察できた。また、移植した膵島数とOPTにより観察・解析した膵島数を比較した結果、図2dに示すように良好な相関を示すことが分かった。そのため、本手法により定量性が評価

可能であり、移植膵島の解析に利用可能であることが示された。

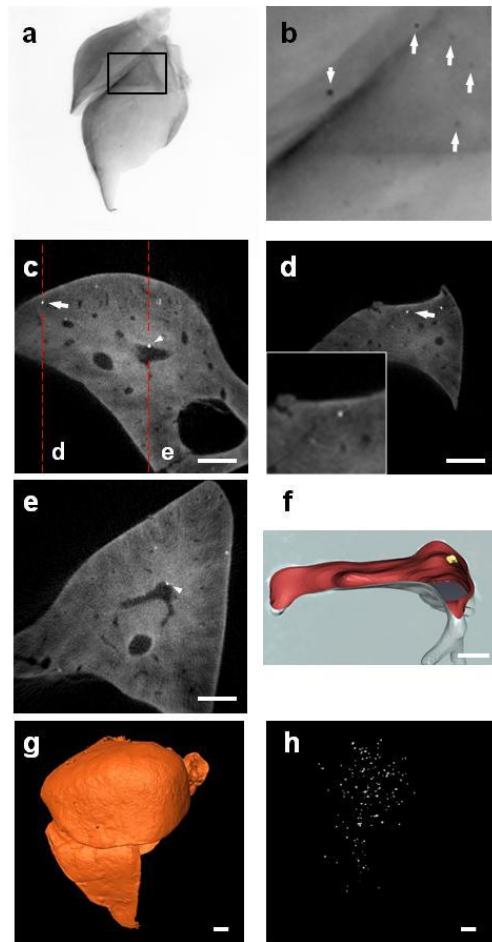


図1. マウス肝臓へ移植した膵島のOPT画像  
a) 明視野像、b)拡大像(aの□、矢印:膵島)、  
c)断面図、d)e)断面図(c内の点線、垂直面)、  
f)血管壁面に生着した移植膵島、g)OPT構築  
肝臓(右葉)、h)移植膵島

### (3) 同種同系、同種異系での移植膵島の数・量の変化についての検討

移植後の血糖値の変化を図3aに示す。移植を行うことで高血糖状態が改善された。移植8日後から同種異系移植で血糖の上昇が観察された。移植11日における生着(残存)移植膵島数を解析した結果を図3bに示す。移植膵島数は同種異系において大きく減少していることがOPTにより解析することができた。

移植膵島の大きさのヒストグラムを図4aに示す。通常膵島の大きさである直径0-150μmに多くの膵島が観察できた。また、同種同系、同種異系移植ともに同じようなパターンを示した。また、図4bには、移植11日後の移植膵島の量について示している。数と同様、同種異系移植において大きな減少が観察

された。

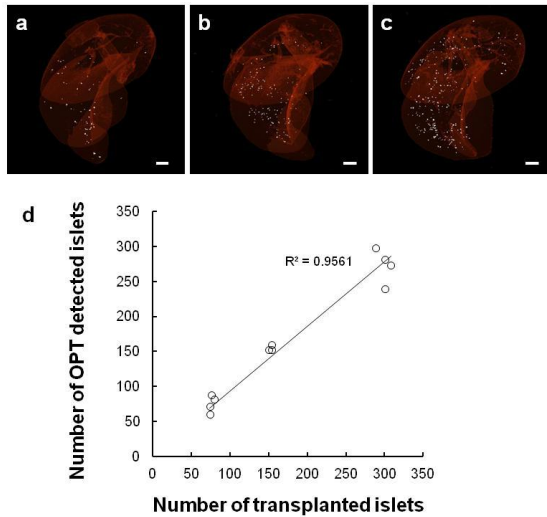


図 2. (a)移植膵島の OPT 画像および(b)移植膵島の数と OPT 解析膵島数の関係。移植膵島数:a)75、b)150、c)300

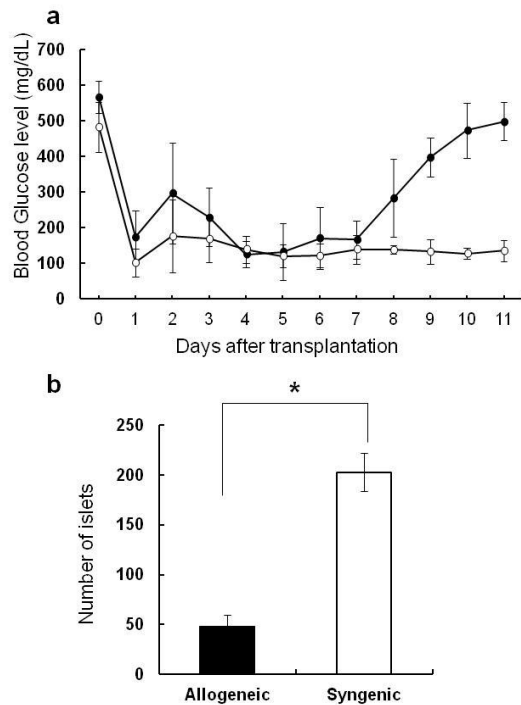


図 3 a) 膵島移植後の血糖値の変化: ○同種同系移植、●同種異系移植 b) 移植 11 日後の残存移植膵島数

これまで PET では移植膵島の定量化は可能であったが、膵島レベルでの解析はその分解能の低さから不可能であった。また、通常の免疫染色法では分解能は高いが、切片化する必要があるため三次元的な構築は困難であった。しかしながら、本研究では、OPTを用いることで経門脈的に移植した膵島を膵島レベルで観察・解析することに成功した。

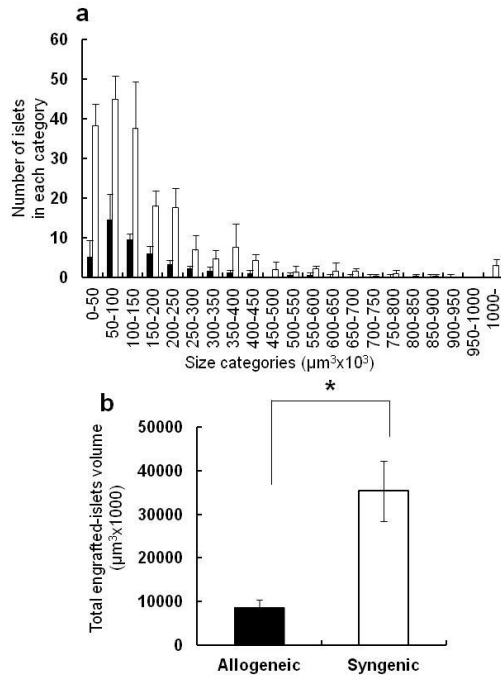


図 4 a) 移植膵島の大きさのヒストグラム(白: 同種同系移植、黒: 同種異系移植) b) 移植 11 後の移植膵島の量

以上のことより、OPT を用いた三次元解析方法は、移植膵島の詳細な解析に非常に有用な手法であり、今後の膵島移植研究に新たな知見を与えるものと考えられる。

## 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)

Fujimoto, H., Toyoda, K., Okitsu, T., Liu, X., Mukai, E., Zhuang, X.-T., Uemoto, S., Mochizuki, N., and Inagaki N. Three dimensional ex vivo imaging and analysis of intraportal islet transplants. *Transpl. International* 査読有り 24, 2011, 839-844. doi: 10.1111/j.1432-2277.2011.01271.x.

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① Fujimoto, H., Toyoda, K., Kimura, H., Ogawa, Y., Mukai, E., Xiaotong, Z., Kawashima, H., Matsuda, H., Hirao, K., Saji, H., Inagaki, N. Non-Invasive SPECT Imaging of Pancreatic Islets Targeting Glucagon-Like Peptide-1 Receptors. American Diabetes Association 71th Scientific Sessions 2011.6.26 サンディエ

- ゴ (アメリカ)
- ② Toyoda K, Kimura H, Fujimoto H, Xiaotong Z, Mukai E, Ogawa E, Hirao K, Matsuda H, Kawashima H, Ueda M, Temma T, Saji H and Inagaki N. Development of Non-Invasive PET Probe for Quantifying Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass Using Fluorine-18-Labeled Exendin-4. American Diabetes Association 71th Scientific Sessions 2011.6.25 サンディエゴ (アメリカ)
  - ③ Kimura H, Ogawa Y, Kawashima H, Toyoda K, Mukai E, Fujimoto H, Ono M, Hirao K, Inagaki N, Saji H. Radiosynthesis and evaluation of F-18 Exendin-4 derivatives as a PET tracer for the imaging of GLP-1 receptors on pancreatic  $\beta$ -cells. SNM 2011 Annual Meeting 2011.6.6 テキサス (アメリカ)
  - ④ Ogawa Y, Kimura H, Kawashima H, Toyoda K, Mukai E, Fujimoto H, Hirao K, Ono M, Inagaki N, Saji H. Development of <sup>123</sup>I labeled Exendin derivatives for the imaging of GLP-1 receptors on pancreatic  $\beta$ -cell with SPECT. SNM 2011 Annual Meeting 2011.6.6 テキサス (アメリカ)
  - ⑤ 藤本裕之、豊田健太郎、木村寛之、小川有、向英里、庄暁桐、河嶋秀和、平尾佳、松田洋和、佐治英郎、稲垣暢也 GLP-1受容体を標的とするSPECT用膵島イメージングプローブの開発 第53回日本糖尿病学会年次集会 2011. 5.21 札幌
  - ⑥ 庄暁桐、豊田健太郎、劉喜宝、向英里、藤本裕之、酒井芳紀、古屋敷智之、松本邦夫、成宮周、稲垣暢也 マウス同系膵島移植において、ONO-1301はPGI<sub>2</sub>受容体を介する膵 $\beta$ 細胞保護作用によって膵島生着を改善する 第53回日本糖尿病学会年次集会 2011. 5.21 札幌
  - ⑦ 豊田健太郎、木村寛之、藤本裕之、小川佑、向英里、庄暁桐、河嶋秀和、平尾佳、松田洋和、佐治英郎、稲垣暢也 GLP-1受容体を標的とする非侵襲的膵島イメージングのためのPET用プローブの開発 第53回日本糖尿病学会年次集会 2011. 5.19 札幌
  - ⑧ 藤本裕之 豊田健太郎 向英里、庄暁桐 稲垣暢也 移植膵島の新規三次元イメージング技術の確立 第52回日本糖尿病学会年次集会 2010.5.29 岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤本 裕之 (FUJIMOTO HIROYUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50437274