

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 15 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591866

研究課題名(和文)二層法と希少糖を駆使した膵島移植成績向上のための研究

研究課題名(英文) A study for improvement of pancreatic islet transplantation outcome by using two-layer method and rare sugar

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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000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。本実験では希少糖D-アロースを膵島の培養時に併用し、膵島機能を改善できるか検討した。ラットの分離後膵島の培養液にD-アロースを添加して一晚培養すると、D-アロース非添加コントロール群と比較しインスリン分泌能が有意に改善した。またD-アロース添加培養した膵島を1型糖尿病モデルマウスに移植すると、コントロール群と比較し糖尿病治癒率が有意に高くなった。D-アロース添加培養群の膵島の酸化ストレスマーカーが有意に低かったことから、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た。

研究成果の概要(英文)：Islet transplantation is a curative treatment option for Type-1 diabetes. Improving islet function after isolation would result in better clinical outcomes of islet transplantation. In this study, we examined whether addition of D-allose, one of rare sugars, to islet culture medium had a beneficial effect on rat islet viability and function. As results, insulin secretion increased in the group with D-allose in overnight culture compared to the control without D-allose. In addition, diabetic nude mice transplanted islets after co-culture with D-allose demonstrated significantly higher cure rate of diabetes compared to the control. Because an oxidative stress marker (malondialdehyde) of islets was significantly reduced by co-culture with D-allose, this rare sugar possibly has an antioxidative effect.

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：希少糖 膵島移植

1. 研究開始当初の背景

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 プロトコール) 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。しかし膵島移植にはまだいくつかの問題点が残されている。

現在日本での膵島移植の一部は脳死ドナーから摘出した膵臓から実施できるが、多くの膵島移植は、心停止ドナーから摘出する温阻血傷害を受けた膵臓から実施される。この温阻血傷害により viable な膵島の収量は激減し、分離膵島収量が Recipient 体重 (kg) あたり 6,000IEQ 以上の移植条件をクリアできるのは、分離件数の約 50%にとどまっている。また、膵島の機能も落ちているため、一人の 1 型糖尿病患者をインスリンフリーにするには、2 ~ 3 人のドナーが必要である。膵島収量や機能のさらなる改善を図っていくことが今後の課題である。

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。

今回の課題「二層法と希少糖を駆使した膵島移植成績向上のための研究」では、すでに膵島分離前の膵保存法として有用性が証明され臨床で使用されている二層法に、希少糖 D-アロースを併用・駆使して膵島移植成績の向上を図る目的である。その前段階として、膵島分離から移植に至る各ステップでの D-アロースの有効性を検討する実験から始める。

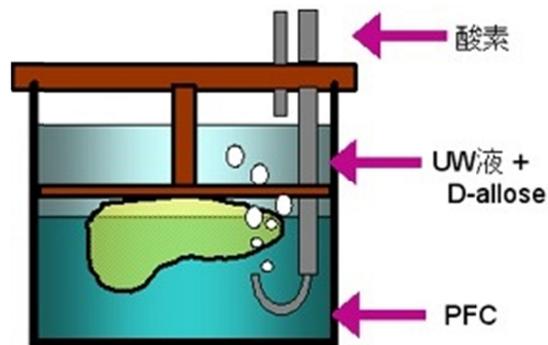
2. 研究の目的

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 (1) 二層法による膵保存の際に保存液に D-アロースを添加することで分離膵島の収量を改善できるか、(2) 分離後膵島の培養の際に D-アロースを添加することで膵島機能を改善できるか、の 2 項目についてまず明らかにし、膵島移植における D-アロースの有効性の有無を検討することとした。またその有効性が明らかになった場合、(3) 実際に膵島移植を行って in vivo での有効性についても検討を行い、(4) その機序の検討も行うこととした。

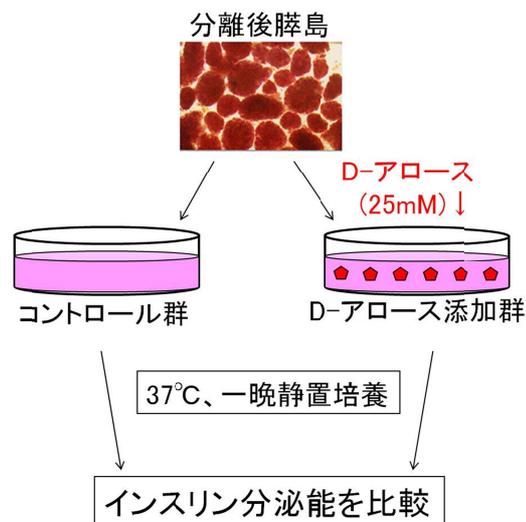
3. 研究の方法

(1) 二層法に使用する UW 液に D-アロースを添

加してラットの摘出臓を保存し (下図)、その後コラゲナーゼを用いて膵を消化、ヒストパーク 1077 による比重遠心分離法を用いて膵島を分離純化し、その収量を計測した。D-アロースを添加せずに膵保存したコントロール群の膵島収量と比較した。



(2) ラットから膵を摘出後、保存せずすぐに膵島分離を行い、分離後膵島を D-アロース入りの RPMI1640 培地で一晚培養してインスリン分泌能を計測した (下図)。D-アロースを添加せずに一晚培養したコントロール群のそれと比較した。



具体的には一晚培養後の膵島を低濃度グルコース (3.3mM) 及び高濃度グルコース (20mM) に設定した培地で各々 1 時間ずつ培養し、培地中のインスリン濃度を ELISA キットを用いて計測した。インスリン分泌能の指標として、高濃度グルコース負荷時のインスリン濃度を低濃度グルコース負荷時のインスリン濃度で除した stimulation index (SI) を算出しこれも比較した。

ラットからの膵摘出時に 30 分の温阻血傷害を加えて摘出した膵から分離した膵島でも同様の実験を行い、D-アロース添加により、30 分温阻血で障害を受けた膵島がどの程度まで回復するのか、その効果の度合いも確認した。

(3)前述した(1)・(2)の実験のうち、良い結果が出た方法を採用して用意した膵島を用いて実際に膵島移植実験を行い、1型糖尿病モデルヌードマウスの糖尿病治癒率を比較検討した。1型糖尿病モデルヌードマウスはストレプトゾトシン 220mg/kg BWを腹腔内投与して作成し、随時血糖が2日以上連続して350mg/dlを超えたものをモデルマウスとした。膵島移植を受けたモデルマウスは週3回血糖測定を行い、糖尿病治癒の定義は移植後の随時血糖が連続3回以上200mg/dl未満とした。なお膵島移植前のモデルマウスの随時血糖及び体重には、2群間で差は無かった。

(4)D-アロースの効果の機序について、これまでに報告されている通り抗酸化作用による機序を考え、脂質過酸化反応の指標であるmalondialdehyde(MDA)の測定を行って比較検討した。

4. 研究成果

(1)二層法による膵保存の際のD-アロースの効果については、D-アロース添加保存群の膵島収量(2094.5±1085.2 IEQ)とコントロール群の膵島収量(2114.1±1078.4 IEQ)の間に有意差を認めなかった(p=0.97)ため、効果無しと判断した。

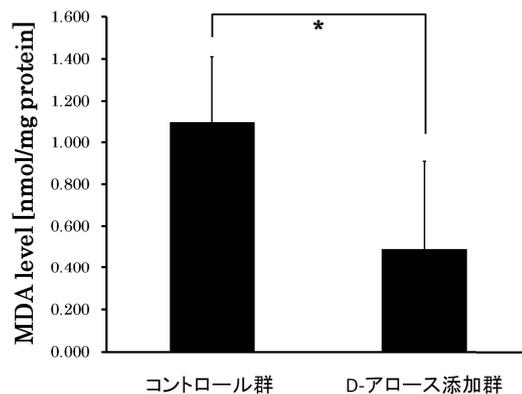
(2)分離後膵島の保存培養では、D-アロース添加培養群の膵島は高グルコース負荷時のインスリン分泌(5.18±2.14 ng/ml)がコントロール群(4.15±1.86 ng/ml)よりも有意に高値で(p<0.001)、それによってD-アロース添加培養群のSI(13.5±6.7)はコントロール群のSI(11.3±5.5)よりも有意に高くなり(p<0.01)、D-アロースの添加培養によって膵島のインスリン分泌能が有意に改善されることが判明した。

また30分の温阻血傷害を加えた膵臓から分離した膵島でも同様に、高グルコース負荷時のインスリン分泌がD-アロース添加培養群(3.58±2.37 ng/ml)はコントロール群(2.61±1.37 ng/ml)よりも有意に高値であり(P<0.05)、D-アロース添加培養群のSI(11.0±7.8)はコントロール群のSI(8.6±5.1)よりも有意に高かった(p<0.01)。さらに30分温阻血傷害膵から分離しD-アロース添加培養を行った膵島のSI(11.0±7.8)は、新鮮膵から分離したコントロール群のSI(11.3±5.5)と比較して有意差無く(p=0.91)、D-アロースによる膵島機能回復の程度は30分の温阻血傷害から回復しうる程度であることが判明した。

(3)上記結果を受けて、分離後に一晚D-アロース添加培養を行った膵島180個をストレプトゾトシン投与により1型糖尿病を誘発したヌードマウスの腎被膜下に移植し、糖尿病治癒率を計測した。コントロール群は培地のみ

で一晚培養した膵島180個を同様に移植して糖尿病治癒率を計測した。D-アロース添加培養群の糖尿病治癒率(72.7%)は、コントロール群の糖尿病治癒率(9.1%)よりも有意に高かった(P<0.01)。すなわち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。

(4)D-アロースの有効性の機序の検討として、一晚培養した膵島中のMDA量を測定し比較検討した。結果を下図グラフに示した。



D-アロース添加培養群の膵島中のMDA量(0.49±0.42 nmol/mg protein)はコントロール群のMDA量(1.10±0.31 nmol/mg protein)と比較し有意に低値であった(p<0.05)。従ってD-アロース添加培養による分離後膵島のインスリン分泌能の改善効果の機序の一端は、D-アロースの持つ抗酸化作用によるものである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

柏木裕貴、膵島移植における希少糖D-アロースの有用性の検討、第41回膵・膵島移植研究会、2014年3月7日、愛知県

柏木裕貴、膵島移植における希少糖D-アロースの可能性、第40回膵・膵島移植研究会、2013年3月1日、香川県

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 康之 (SUZUKI, Yasuyuki)
香川大学・医学部消化器外科・教授
研究者番号: 40304092

(2)研究分担者

柏木 裕貴 (KASHIWAGI, Hirotaka)
香川大学・医学部付属病院・病院助教
研究者番号: 20464365

浅野 栄介 (ASANO, Eisuke)
香川大学・医学部付属病院・病院助教
研究者番号: 90467837

徳田 雅明 (TOKUDA, Masaaki)
香川大学・医学部細胞情報生理学・教授
研究者番号：10163974

岡野 圭一 (OKANO, Keiichi)
香川大学・医学部附属病院・準教授
研究者番号：20314916

M・A ホセイン (M・A, Hossain)
香川大学・医学部・研究員
研究者番号：20294754