

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861151

研究課題名(和文) 絹タンパク質sericinを用いた無血清培地によるラット長期膵島培養の検討

研究課題名(英文) Rat islet long-term culture in serum-free medium containing silk protein sericin and albumin

研究代表者

森川 充洋 (MORIKAWA, MITSUHIRO)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20569131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵島移植の無血清培地の開発として以前にsericin培地で14日培養し牛胎児血清(FBS)培地と同等の成績を得た。今回は長期培養のためにalbumin(BSA)を添加し効果を検討した。ラット膵島を FBS sericin BSA sericin+BSA FBS+sericin培地で培養し、結果は35日、77日に全て死滅し、120日生存率は24%、24%、13%であった。でinsulin release assayを施行し両群は同等のインスリン分泌量であった。の60日培養膵島を糖尿病ラットに移植し、全て28日間良好な血糖値を得た。グラフトを摘出し良好な組織学的形態を確認した。

研究成果の概要(英文)：We reported islets can be short-term cultured for 14 days using serum-free medium containing sericin instead of FBS. The study evaluated the use of the medium containing sericin and albumin for islet long-term culture. Twenty rat islets were cultured in medium containing FBS, sericin, bovine serum albumin(BSA), sericin+BSA, FBS+sericin. The cultured islets in and were disappeared for either 35 and 77days. The survival rates for 120 days of , and were either 24,24,and 13%. Insulin secretions of the and were measured by static incubation on the day120, and no significant differences in stimulated insulin secretion were noted between the groups. In vivo function of cultured islets of and were tested by syngeneic transplantation for diabetes rats, and both recipients were maintained normal glycemc control for 28 days after transplantation. Histologically, islets after transplantation with was displayed well-preserved structure and strong insulin staining.

研究分野：医歯薬学

キーワード：sericin 膵島移植 膵島培養 ラット 無血清培地

1. 研究開始当初の背景

インスリン依存型糖尿病の治療として行われている膵島移植の普及のために膵島保存の発展は重要な課題である。実験的には牛胎児血清 (FBS) 等を用いて膵島保存が行われるが、臨床的には使用が困難であり分離後にすぐに移植を行うことが一般的である。無血清培地による長期培養、あるいは凍結保存が望まれいくつかの報告がなされているが臨床応用は難しい状況にある。

以前より当科ではカイコ繭由来の sericin に着目し、膵島保存への応用について研究を行ってきた。FBS の代用に sericin を用いた膵島培養を行い、無血清培地としてその培養効果について比較検討を行った。その結果、FBS と sericin を含んだ無血清培地を使用し比較したところ、短期間の膵島培養においてほぼ同等の成績が確認された。しかし、その研究の際に、1 ヶ月以上の培養を FBS による培養群と sericin による培養群で行い比較したところ、FBS 群は 1 ヶ月以上の培養が可能であったが、sericin 群は培養不可能であった。

そこで、短期培養の後に凍結保存を行うことで、長期保存を可能とすることを試みた。FBS を含んだ凍結・解凍液、sericin を含んだ無血清の凍結・解凍液をそれぞれ用いて凍結保存を行い比較検討した。その結果、凍結保存においても sericin は FBS に匹敵する結果が得られた。しかし問題として、いずれの群も凍結・解凍の後に 2 週間で残存する膵島は 50% と減少した。そのため、長期培養保存の方法について検討した。

2. 研究の目的

前回長期培養が行えなかった原因としては、FBS に含まれる albumin, hormones, transferrin 等の培養に必要とされる物質の不足に起因すると推察した。今まで海外で報告される無血清培地において、albumin, transferrin, その他 growth hormone 等の hormones を培地に混入することで、長期培養を行うことが可能であったとされている。いずれの培地においても albumin を使用しており、その必要性が考えられた。

以上より、以前に研究した sericin 培地に albumin を加えることで、以前証明された無血清培地による膵島培養を、より長期

間行うことが可能になると推察され検討を行った。

3. 研究の方法

実験動物：ドナー、レシピエントともに 8-10 週齢の雄性 Lewis rat を用いた。レシピエントは streptozocin で糖尿病を誘発した。collagenaseL + dispaseII を膵管内に注入し膵を消化し Histopaque を用いて膵島を純化回収した。回収した膵島を 37 °C・5%CO₂ 下に RPMI1640+抗生剤+10mM nicotinamide に下記を添加した培養液を用いて培養した。

- A. 10% FBS
- B. 0.1% sericin
- C. 0.1% bovine serum albumin (BSA)
- D. 0.1% sericin+ 0.1% BSA
- E. 10% FBS+0.1% sericin

(1) 生存個数の比較：分離した膵島 20 個ずつを上記培地で培養し生存個数を比較した (n=6)。

(2) 形態の比較：培養中に倒立顕微鏡にて、形態の変化を比較した。

(3) インスリン分泌量の比較：培養した膵島の機能評価として 7 日目と 60 日目のインスリン分泌量の比較を行った。それぞれの培養膵島 10 個ずつを用いて、3.3mM (Lo1)、20mM (Hi)、3.3mM glucose (Lo2) の培地の順に 1 時間ずつ培養後に培地のインスリン量を測定する insulin release assay を行い比較した (n=6)。Stimulation Index を Hi/Lo1 で計算し比較した。

(4) 移植効果：60 日間培養した膵島 800 個を糖尿病ラット (随時血糖 350mg/dl 以上) の腎被膜下に移植した (同種同系移植)。レシピエントの血糖の推移を、移植後 28 日間比較し、その後に移植片を摘出し血糖の再上昇を確認した (n=3)。

(5) 移植膵島の組織学的評価：生着した膵島の組織は、AMeX 固定法にてパラフィン包埋後、HE 染色および抗インスリン抗体にて免疫染色し組織学的に生着を観察した。

4. 研究成果

(1) 生存個数の比較：それぞれの 50%生存期間は，55日 26日 50日 74日 39日の結果で，D 群が最も良好な結果であった．B 群は35日以内，C 群は77日に全て死滅した．120日の時点での生存率は，24% 24% 13%の結果であり，A,D 群が同等で良好な結果であった．(図1) 以上より，生存個数において sericin と albumin を添加した培地で120日間比較した結果，FBS を添加した培地と同等の膵島培養が可能であった．

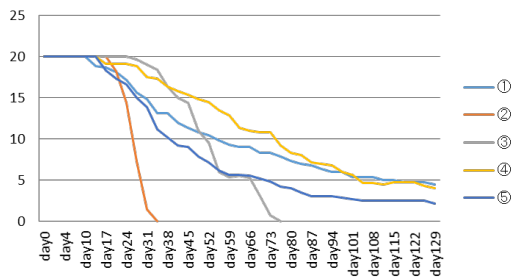


図1：生存個数の比較

(2) 形態の比較：120日間培養後の倒立顕微鏡の写真を示すが，その間，A. FBS 群と D. sericin+BSA 群の2群ともに残存する膵島は良好な形態を保っていた．(図2)

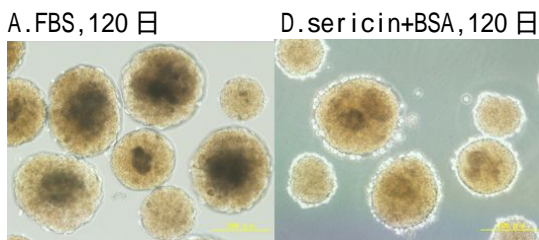


図2：120日間培養した膵島の形態

(3) インスリン分泌量の比較：良好な生存個数が得られた A. FBS 群と D. sericin+BSA 群の2群で insulin release assay を行った．stimulation index は，7日目では 2.16 ± 0.56 ・ 2.28 ± 0.74 で差はなく，60日目でも 1.99 ± 0.58 ・ 2.08 ± 0.88 と差は認められなかった．インスリン分泌量も両群に差は認められなかったが，day7 と比較し day60 のインスリン分泌量は両群ともに減少傾向を示していた．(図3)

Experimental groups	Stimulant (glucose)			Stimulation index
	3.3mM	16.6mM	3.3mM	
FBS group(day7)	2.26 ± 0.76	5.08 ± 2.45	2.11 ± 0.66	2.16 ± 0.56
sericin group(day7)	2.04 ± 0.62	4.47 ± 1.25	2.29 ± 0.65	2.28 ± 0.74
FBS group(day60)	1.43 ± 0.24	3.08 ± 0.92	1.58 ± 0.48	1.99 ± 0.58
sericin group(day60)	1.62 ± 0.95	3.15 ± 2.01	1.72 ± 0.65	2.08 ± 0.88

図3：insulin release assay の比較

(4) 移植効果：良好な生存個数が得られた A. FBS 群と D. sericin+BSA 群の2群で移植効果を検討した．レシピエントの血糖の推移を移植後28日間比較したが，全てのラットにおいて良好な血糖コントロールが得られていた(血糖 200mg/dl 以下)．28日経過後に，膵島を移植した腎を摘出すると全てのラットの血糖は 400mg/dl 以上に再上昇し，移植した膵島の血糖降下作用が確認された．(図4)

A-1,2,3: FBS, D-1,2,3: sericin+BSA

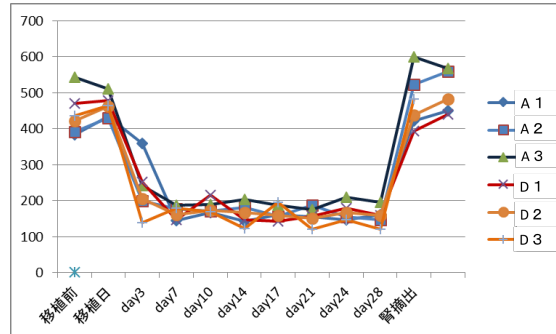


図4：膵島移植した糖尿病ラットの血糖の推移

(5) 摘出した腎に生着した D. sericin+BSA 群の膵島の組織は，HE 染色で良好な形態を呈していることが確認された．抗インスリン抗体による免疫染色においても移植した膵島は強陽性を示しており，移植した膵島のインスリン分泌能が確認された．(図5)

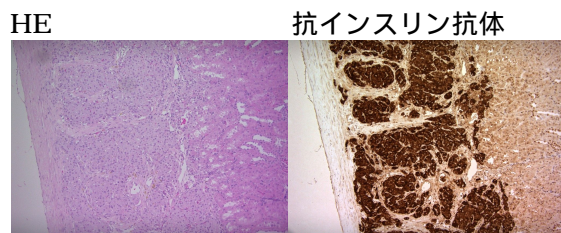


図5：移植膵島の組織学的評価

以上の結果より，sericin と albumin を添加した無血清培地で膵島培養を行った結果，60日間の培養において FBS を添加した培地と同等の培養効果が得られた．

< 引用文献 >

Rat islet culture in serum-free medium containing silk protein sericin.
Mitsuhiro Morikawa, et al,
Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 16(2):223-228, 2009

Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets .

Kenji Oonishi K, et al,
Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences, 19: 354-360, 2012

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)

[学会発表] (計 2 件)

横井繁周, 村上 真, 森川充洋, 藤本大裕,
澤井利次, 小練研司, 廣野靖夫, 五井孝憲,
飯田 敦, 片山寛次, 山口明夫
膵島分離におけるセリシンの有用性
第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会
2013, 6, 12-14
ホテル東日本宇都宮/ 栃木県総合文化センター
(宇都宮市)

横井繁周, 村上 真, 森川充洋, 藤本大裕,
澤井利次, 小練研司, 廣野靖夫, 五井孝憲,
飯田 敦, 片山寛次, 山口明夫
膵島消化・純化におけるセリシンの有用性
第 113 回日本外科学会定期学術集会
2013, 4, 11-13
福岡国際会議場/ 福岡サンパレス/ 福岡マリンメッセ(福岡市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森川 充洋 (MORIKAWA, MITSUHIRO)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 20569131