

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861208

研究課題名(和文) イオンチャネル制御と小胞体ストレス応答制御による膵島の恒常性維持とその応用

研究課題名(英文) Protection of pancreatic islets by controlling both the volume-sensitive chloride channel and endoplasmic reticulum stress response

研究代表者

穴澤 貴行 (Anazawa, Takayuki)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90566811

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)：膵島分離・移植プロセスにおいて、Cl⁻イオンチャネルによる細胞容積調節および小胞体ストレス応答の両機構を制御し、膵島喪失を回避することを目的とした。膵消化の過程ではCl⁻イオン流入阻害により細胞死は抑制されるが、培養過程では細胞死抑制効果はなく、細胞周囲環境によってCl⁻イオンチャネルに対する制御法は異なることが示唆された。一方、本実験系では小胞体ストレスの強い応答変化は捉えられなかった。Microarrayを用いて分離後膵島にかかるストレスを網羅的に解析したところ、IL1 β やTNFを上流制御因子とする変化が確認され、これら炎症性サイトカインが引き起こすストレス経路の制御の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to protect pancreatic islets during isolation/transplantation procedures by controlling both the volume-sensitive chloride channel and endoplasmic reticulum (ER) stress response. Our results indicated that inhibition of Cl⁻ influx into the cells reduced the cell damage during pancreas digestion, however, inhibition of Cl⁻ influx did not reduce the damage during islet culture. Whereas the ER stress responses had not changed in our experiment, IL1 β and TNF were identified as the top upstream regulators during islet isolation and culture by analyzing microarray data. Regulating inflammatory response induced by inflammatory cytokines in isolated/cultured islets might be necessary to improve the efficacy of islet transplantation.

研究分野：医学

キーワード：移植・再生医療 糖尿病 外科

1. 研究開始当初の背景

脳死または心停止後に提供された膵臓から分離された膵島組織を門脈内に移植する膵島移植は、インスリン依存状態糖尿病の根治可能性を有する理想的な低侵襲移植療法として、その確立が望まれている。移植される膵島は、膵臓の摘出・保存、膵島分離・培養、そして門脈内移植という過程により虚血、低酸素、浸透圧変化、酸化ストレス、および炎症反応といった様々な障害を受ける。膵島移植がその臨床効果を発揮するには、Viability が維持された多くの分離膵島が必要であるが、これらの障害を制御し膵島を保護する方法は依然として確立しておらず、提供膵から分離膵島が移植基準を満たすことは本邦でも海外でも 50%程度で、一人のレシピエントに複数のドナーが必要となる大きな要因となっている。膵島分離・移植プロセスにおける膵島障害の回避は膵島移植医療の一般化に向けて最大の課題であり、解決には斬新かつ効果的なアプローチが必要である。

2. 研究の目的

膵島分離・移植プロセスでの膵島障害による膵島の喪失が回避であることは、膵島移植が一般的な治療として定着するための大きな障害となっている。近年、細胞の「恒常性維持」のシステムが破綻すると細胞死を促進する機構が明らかになりつつあり、その機構に Cl⁻ イオンチャンネルによる細胞容積調節および小胞体ストレス応答が関与していることが示されている。膵島分離プロセスにおける Cl⁻ イオンチャンネルによる細胞容積調節および小胞体ストレス応答の両機構を把握・制御し、膵島細胞の「恒常性維持」を達成し膵島の細胞死および喪失を回避することを目的とする。

3. 研究の方法

Cl⁻ イオンインディケーターを用いた共晶点

レーザー顕微鏡下での連続的な観察を中心に、ラット膵島分離・培養各ステップにおける、Cl⁻ イオンの移動に注目した細胞容積変化と細胞死の出現を明らかにする。また、膵島分離・培養各ステップでの小胞体ストレス応答反応を、分子生化学的手法を中心に用いて明らかにする。どのステップで Cl⁻ イオンチャンネルの制御、あるいは小胞体ストレス応答の制御を加えれば細胞死を回避し、恒常性が維持されるのかを明らかにする。その検証は *in vitro* での検証に加え、恒常性維持が達成された膵島を糖尿病マウスに移植する *in vivo* の系によっても行う。

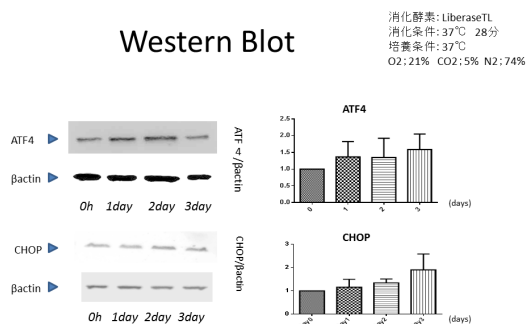
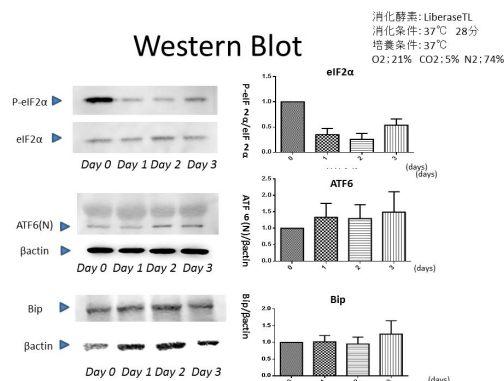
4. 研究成果

Cl⁻ イオンインディケーター (MQAE) を用いた共晶点レーザー顕微鏡下での連続的な観察により、膵島分離過程における消化の過程では Cl⁻ イオンの細胞内流入と、ネクローシス型細胞死が起こりえることが確認された。また、その過程で Cl⁻ イオンの流入を阻害する環境 (Cl⁻ イオンフリー溶液、または Cl⁻ イオンチャンネル阻害剤の添付) を作成すると、通常のラット膵島分離モデルでも、心停止 30 分ラット膵島分離モデルでも、細胞死の抑制が得られることが明らかとなった。一方、培養液に Cl⁻ イオンチャンネル阻害剤の添付を行うと、細胞死抑制効果はなく、むしろ膵島生存率は低下する傾向となった。この結果は、Cl⁻ イオンの流入阻害は、細胞膜が強い障害を受ける場合には、細胞死を防ぐうえで有効であるが、培養条件といった、ある程度細胞の恒常性が保たれる条件においては有効に作用しない、という可能性を示唆したものであり、「恒常性維持」という点への着目の重要性が確認された。

続いて、膵島分離から培養へ至るステップでの小胞体ストレス応答反応を明らかにする試みを行った。小胞体ストレスセンサーとして同定されている小胞体膜貫通タンパク質

に注目し、Western blot 法や免疫染色にて小胞体ストレスシグナルの活性化の有無を捉えようと試みた。eIF2 α の発現は、分離直後より培養することで、その発現はやや減弱するが、そのほかの小胞体ストレス関連蛋白は分離から短期培養の経過の中で、それらの発現に明らかな変化を認めなかった(図)。PERK- eIF2 α を介する小胞体ストレスは分離操作で惹起され、その後収束し、培養では惹起されない可能性はあると思われたが、その他の経路の小胞体ストレスは、今回の実験系では変化を示さないものと思われた。

【図】



低酸素培養により、さらに小胞体へのストレスを強化しても小胞体ストレスの明らかな惹起は確認されず、本実験系で惹起される小胞体ストレスは、当初の仮説よりも小さな変化にとどまっているものと思われた。

小胞体ストレス以外のストレスが、膵島分離・培養の経過において強く関わっていると考え、分離後膵島の mRNA を抽出して

Microarray を実施し、網羅的遺伝子発現解析により、膵島分離から培養の経過に膵島が被るストレスの把握を行うこととした。Microarray にて Fold change >2 以上の変化を示した遺伝子群に注目して解析すると、膵からの分離・培養の経過により膵島には cell death and survival, immune cell trafficking, および inflammatory response に関わる遺伝子群の発現が最も増加した。これらの変化の上流制御因子として IL1 β と TNF が予測され、これら炎症性サイトカインが引き起こすストレスの制御の重要性を示唆する結果であると思われた。現在の臨床膵島移植では、移植時に TNF 阻害作用を持つ薬剤を使用するが、IL1 β の阻害を加えることの必要性も示唆するものと思われた。

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 4 件)

- 1) Anazawa T, Saito T, Goto M, Kenmochi T, Uemoto S, Itoh T, Yasunami Y, Kenjo A, Kimura T, Ise K, Tsuchiya T, Gotoh M. Long-term outcomes of clinical transplantation of pancreatic islets with uncontrolled donors after cardiac death: a multicenter experience in Japan. *Transplant Proc.* 2014;46(6):1980-4. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.06.006.
- 2) Loganathan G, Graham ML, Radosevich DM, Soltani SM, Tiwari M, Anazawa T, Papas KK, Sutherland DE, Hering BJ, Balamurugan AN. Factors affecting transplant outcomes in diabetic nude mice receiving human, porcine, and nonhuman primate islets: analysis of 335 transplantations. *Transplantation.* 2013;95(12):1439-47. doi:10.1097/TP.0b013e318293b7b8

3) 穴澤貴行、見城 明、木村 隆、芳賀淳一郎、佐藤直哉、伊勢一哉、清水裕史、齋藤拓朗、後藤満一。 膵島移植。消化器外科

2014;102(10):1259-1266

4) 穴澤貴行、後藤満一。膵島移植。診断と治療 2014;37(8)1543-1548

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Anazawa T, Kenjo A, Kimura T, Ise K, Haga J, Sato N, Tsuchiya T, Saito T, Gotoh M. Long-term Outcomes of Clinical Islet Transplantation Using Donors After Cardiac Death: A Multicenter Experience in Japan. 14th World congress of International pancreas and islet transplantation association 2013.9.24-27, Monterey, CA USA.

2) 穴澤貴行、見城 明、木村 隆、伊勢一哉、土屋貴男、佐藤直哉、齋藤拓朗、後藤満一。脳死ドナ - 膵の allocation の確立における膵島移植の意義と課題。第 50 回日本移植学会総会 2014.9.10-12 東京

3) 穴澤貴行、見城 明、木村 隆、佐藤直哉、齋藤拓朗、後藤満一。膵島移植法の臨床展開における問題点と展望。第 41 回日本臓器保存生物医学会学術集会 2014.11.28-29 大阪

4) 穴澤貴行、見城 明、伊勢一哉、木村 隆、芳賀淳一郎、佐藤直哉、齋藤拓朗、後藤満一。再生医学研究が変える膵島移植医療の近未来。第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013.4.11-13 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
穴澤 貴行 (TAKAYUKI ANAZAWA)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号： 90566811