

91. 第四世代膵島分離法を用いた膵島移植の前臨床試験

野口 洋文

琉球大学 大学院医学研究科 再生医学講座

Key words : 膵島移植, 膵島分離, JNK 抑制剤, HN-1 溶液, 連続比重・密度勾配

緒言

膵島移植は1型糖尿病や膵摘出後の膵性糖尿病の患者に対して行われる移植療法であり、移植により血糖を正常化することが可能である^{1,2)}。膵島移植は、局所麻酔下にて膵臓から分離した膵島を経門脈的に注入するため、膵臓移植に比べ低侵襲であり、現在までに欧米で1,000例近くの移植報告がなされている。日本でも我々のグループが2004年に日本初となる臨床膵島移植を実施し、現在までに40例以上の移植が報告されている。しかしながら現在の膵島分離技術では、1名のドナー膵で完全にインスリン離脱をすることは難しく、通常2~3名のドナー膵を用いてインスリン離脱するケースがほとんどである。また、膵島分離技術は非常に複雑であるため、移植成績の施設間格差が大きいことがエドモントンプロトコール発表後に行われたマルチセンタートライアルで示されている。われわれは、この問題点を改善するために、a) 膵管保護、b) 二層法保存、c) 新規臓器保存液、d) 比重コントロールによる膵島純化、e) 膵島追加純化、f) 分離膵島低温保存という6つの技術改変を行い、第3世代膵島分離法を確立した。通常の膵島分離法では、移植率(膵島分離を行って移植に至った割合)が30~50%、インスリン離脱率が2~3回の移植で80%であることが報告されているが、われわれが米国ベイラー研究所で第三世代膵島分離法を導入したところ、移植率は80%以上となり、インスリン離脱率が1回のみでの移植で100%となった。

本研究では、g) 膵管保護溶液にJNK抑制ペプチドを添加、h) 新規臓器保存液(HN-1溶液)の使用、i) 連続比重・密度勾配による純化、という3つの技術改変をさらに加えた第四世代膵島分離法を確立し、この技術を臨床応用化することを目指し、前臨床試験としてブタ膵を用いた大動物実験を実施した。

方法

1. ブタ膵島分離

生後3年のブタ(n=18)より膵臓を摘出し、バックテーブルにて膵管にカニューレションを行った。膵重量を測定したのち1 mL/g膵重量の割合で新規臓器保存液を注入した(膵管保護)³⁾。膵臓は二層法で保存し、膵島分離施設に運ばれたのち、以下の通り膵島分離を行った。まず摘出膵を除菌後、膵管よりコラゲナーゼ(Liberase MTF (1.4 mg/mL) + thermolysin (0.075 mg/mL))を圧コントロールのもと注入した。膵膨化後、膵臓を7-9個にカットし、リコルディチャンバー内へ投入した。リコルディチャンバーを振りながら溶液の温度を37℃に上げ、コラゲナーゼを活性化させ膵消化を行った。その後、希釈液を加えながら膵組織を回収した。回収した組織はUW溶液で洗浄を行った。膵組織の比重を測定後、純化溶液の比重・密度をコントロールし膵島純化を行った⁴⁻⁶⁾。第三世代膵島分離法においては、a) 膵管保護、b) 二層法保存、c) 新規臓器保存液、d) 比重コントロールによる膵島純化、e) 膵島追加純化、f) 分離膵島低温保存という6つの技術を導入し、第四世代膵島分離法においては、先の6つの技術に加え、g) 膵管保護溶液にJNK抑制ペプチドを添加、h) 新規臓器保存液(HN-1溶液)の使用、i) 連続比重・密度勾配による純化、という3つの技術改変をさらに加えた。

2. 膵島の評価

膵島の評価はジチゾン染色(最終濃度2 mg/mL)で行った。膵島数やサイズをカウントし、islet equivalents (IE)を算出した(膵島は大きささまざまであり、サイズによって機能が異なるため、150 μmの膵島を1 IEと規定し、それぞれ

のサイズの膵島を換算式を用いて IE 変換した) 7)。また、膵島の形状 (flat vs. spherical)、境界 (irregular vs. well-rounded)、統合性 (fragmented vs. soli/compact)、染色の均一性 (not uniform vs. perfectly uniform)、および膵島サイズ (least desirable: all cells < 100 μm/most desirable: more than 10% of the cells > 200 μm) で膵島の評価を行った (膵島スコア) 7)。fluorescein diacetate と propidium iodide (FDA/PI) での二重染色を行い、細胞の生死を確認した^{1,2,7)}。

膵島機能を評価するために、グルコース応答性試験を行った^{1,2)}。1,200 IE の膵島細胞を 2.8 mM もしくは 25 mM のグルコース溶液に入れ、2 時間細胞培養を行った。培養上清を回収し ELISA にてインスリン濃度を測定した。stimulation index は、高グルコース培養液内のインスリン量を低グルコース培養液内のインスリン量で割ることにより算出した。

3. 糖尿病マウスへの移植

6 週齢の免疫不全マウス (nude mice) (n = 18) に streptozotocin を投与 (20 mg/kg) することにより糖尿病マウスを作製した。1,500 IE のブタ膵島を、糖尿病マウスの腎被膜下に移植した^{8,9)}。30 日間血糖値を測定し、血糖改善効果を確認した。

4. 統計解析

データは平均値 ± SE で提示した。2 群間の解析は Student' s t-test で行い、P values が 0.05 未満である場合に有意差ありと判定した。

結 果

1. ブタ膵島分離成績

本実験では第三世代膵島分離法と第四世代膵島分離法との比較を行った。ブタ膵島分離の結果を表 1 に示す。ブタ膵の大きさ、手術時間、温阻血時間、冷阻血時間に有意差は認められなかった。フェーズ I (膵消化開始から膵組織回収開始までの時間) およびフェーズ II (膵組織回収開始時間から終了時間) の時間も 2 群間で有意差はなかった。

純化前の膵島収量は、第四世代膵島分離法 (n = 9) のほうが第三世代膵島分離法 (n = 9) と比べて有意に多かった (第三世代: 334,395 ± 59,775 IE、3,273 ± 571 IE/g; 第四世代: 597,453 ± 56,247 IE、5,575 ± 673 IE/g; p < 0.05) (図 1)。また、純化後においても第四世代膵島分離法のほうが、有意に膵島収量が多かった (第三世代: 231,483 ± 36,147 IE、2,276 ± 333 IE/g; 第四世代: 469,888 ± 63,961 IE、4,475 ± 719 IE/g; p < 0.05) (図 2)。膵島収量以外のデータを表 1 に示す。それ以外のデータに関しては 2 群間に有意差は認められなかった。

表 1. 膵島分離データ

	第三世代 (n = 9)	第四世代 (n = 9)
膵重量 (g)	102.7 ± 6.6	110.1 ± 4.6
手術時間 (分)	5.4 ± 0.5	6.3 ± 0.9
温阻血時間 (分)	28.0 ± 0.9	27.1 ± 0.9
冷阻血時間 (分)	1101.7 ± 8.2	1121.6 ± 9.1
フェーズ I (分)	11.9 ± 0.5	11.1 ± 0.5
フェーズ II (分)	37.8 ± 1.2	38.8 ± 2.6
未消化膵組織 (g)	10.9 ± 2.0	9.1 ± 1.3
外分泌腺を含む膵島の割合 (%)	19.4 ± 4.7	17.1 ± 3.6
生存細胞数 (%)	96.3 ± 0.3	96.7 ± 0.3
スコア	9.1 ± 0.2	9.3 ± 0.1
純度 (%)	56.9 ± 5.7	51.1 ± 4.5
純化効率 (%)	73.2 ± 4.8	77.9 ± 5.4
グルコース応答性	1.78 ± 0.17	1.98 ± 0.09

ブタ膵島分離データを示す。

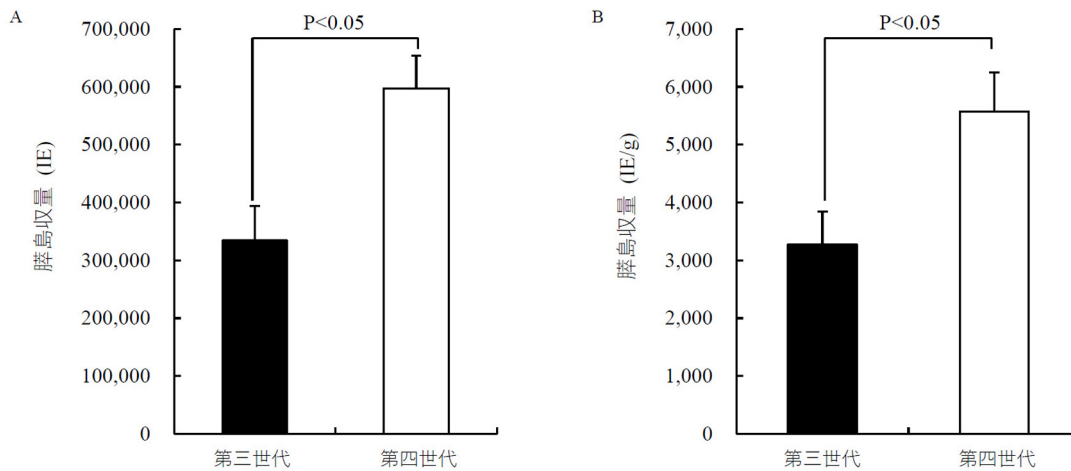


図1. 純化前の膵島収量

A) 膵島総収量、B) 膵重量当たりの膵島収量。

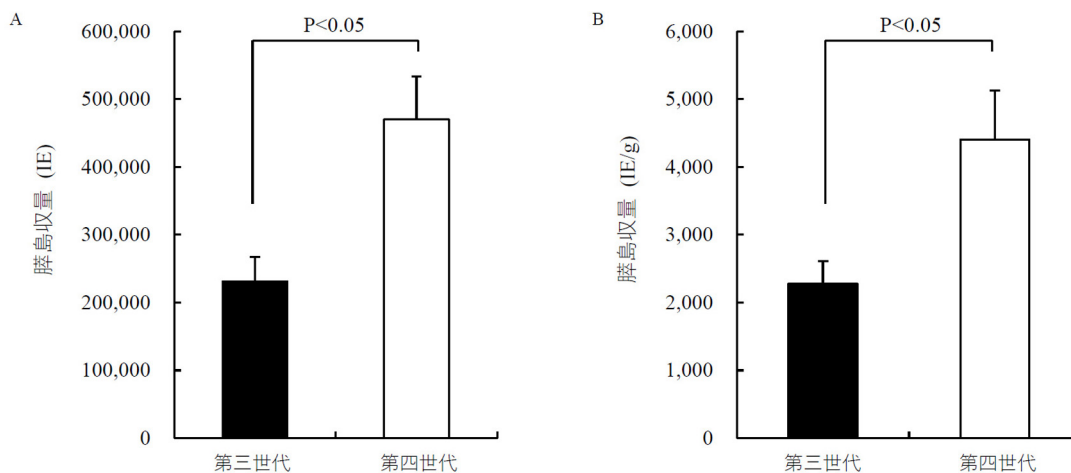


図2. 純化後の膵島収量

A) 膵島総収量、B) 膵重量当たりの膵島収量。

2. 膵島の機能評価

膵島スコアを測定したが、2群間で有意差は認められなかった。また、FDA/PIで細胞の生死を確認したが、2群間で有意差は認められなかった。膵島の機能評価としてグルコース応答性試験を実施したが、いずれの群もグルコース応答性が認められ、良好な膵島が分離できていると考えられた。

3. 糖尿病マウスへの移植

糖尿病化した免疫不全マウス (nude mice) の腎被膜下に、マージナルナンバー (1,500 IE: 一般的な分離法で回収した膵島を移植した場合、血糖改善率が約50%となる膵島数) のブタ膵島を移植した。第三世代分離法を用いた膵島 (n = 9) では血糖改善率が55.6%であったのに対し、第四世代分離法を用いた膵島 (n = 9) では改善率が77.8%であった。

考 察

本研究では、前臨床試験として第四世代膵島分離法を用いたブタ膵島分離を実施した。第三世代膵島分離法と比較して、有意に膵島収量が多いことが確認され、それ以外のデータにおいても、有意差はないものの第四世代膵島分離法のほうが良い傾向が認められた。日本でも臓器移植法改正により脳死ドナーが増えつつあるが、欧米に比べてドナーはいまだ少なく、ドナー不足の状況が続いている。高い確率での移植の実施、および少ないドナー数でのインスリン離脱が達成できれば、多くの患者への治療が可能となる。移植率向上、少ないドナー膵でのインスリン離脱、分離技術向上によるドナー適応拡大などにより、膵島移植をより多くの患者へ提供できるようになるため、本研究の意義は大きい。

現在、われわれは膵島移植認定4施設（京都大学、大阪大学、千葉東病院、信州大学）とネットワークを構築しており、これらの施設での第四世代膵島分離法の導入を考えている。膵島移植認定施設同士でネットワークを構築することにより、複数施設で高い膵島分離技術を提供することが可能となる。また、日本では深刻なドナー不足が続いており、1施設における膵島分離回数はかなり少ないのが現状である。各施設の膵島分離実務者が複数施設の膵島分離を携わることにより、臨床の膵島分離経験数を積むことができ、分離技術の安定化を図ることが可能である。本研究により、現在停滞している日本の膵島移植医療を発展させることが期待でき、将来、この技術は日本の膵島移植の成績向上に寄与できるものと考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、膵島移植認定4施設（京都大学、大阪大学、千葉東病院、信州大学）の膵島分離スタッフである。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000;343(4):230-8. PMID:10911004 DOI:10.1056/NEJM200007273430401.
- 2) Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbutt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med.* 2006;355(13):1318-30. PMID:17005949 DOI: 10.1056/NEJMoa061267.
- 3) Noguchi H, Ueda M, Hayashi S, Kobayashi N, Okitsu T, Iwanaga Y, Nagata H, Nakai Y, Matsumoto S. Ductal injection of preservation solution increases islet yields in islet isolation and improves islet graft function. *Cell Transplant.* 2008;17(1-2):69-81. PMID:18468237.
- 4) Noguchi H, Ikemoto T, Naziruddin B, Jackson A, Shimoda M, Fujita Y, Chujo D, Takita M, Kobayashi N, Onaca N, Levy MF, Matsumoto S. Iodixanol-controlled density gradient during islet purification improves recovery rate in human islet isolation. *Transplantation.* 2009;87(11):1629-35. doi:10.1097/TP.0b013e3181a5515c.
- 5) Noguchi H, Naziruddin B, Shimoda M, Chujo D, Takita M, Sugimoto K, Itoh T, Onaca N, Levy MF, Matsumoto S. A Combined Continuous Density/Osmolality Gradient for Supplemental Purification of Human Islets. *Cell Med.* 2012;3(1-3):33-41. PMID: 28058179 PMCID: PMC5196925 DOI: 10.3727/215517912X639388.
- 6) Noguchi H, Naziruddin B, Shimoda M, Fujita Y, Chujo D, Takita M, Peng H, Sugimoto K, Itoh T, Kobayashi N, Onaca N, Levy MF, Matsumoto S. Evaluation of osmolality of density gradient for human islet purification. *Cell Transplant.* 2012;21(2-3):493-500. doi:10.3727/096368911X605402.
- 7) Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, Kaufman DB, Warnock GL, Kneteman NM, Lake SP, London NJ, Soggi C, Alejandro R, et al. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat.* 1990;27(3):185-95. PMID:2075782.
- 8) Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, Moriwaki A, Tomizawa K, Kang S, Li ST, Kobayashi N, Matsumoto S, Tanaka K, Tanaka N, Matsui H. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med.* 2004;10(3):305-9. PMID:14770176 DOI: 10.1038/nm994.
- 9) Noguchi H, Naziruddin B, Jackson A, Shimoda M, Ikemoto T, Fujita Y, Chujo D, Takita M, Peng H, Sugimoto K, Itoh T, Kobayashi N, Onaca N, Levy MF, Matsumoto S. Fresh islets are more effective for islet transplantation than cultured islets. *Cell Transplant.* 2012;21(2-3):517-23. PMID:22793060 DOI: 10.3727/096368911X605439.