

学位論文題名

Effects of Synthetic Antifreeze Glycoprotein Analogue on Islet Cell Survival and Function during Cryopreservation.

(合成不凍糖タンパク質をもちいた膵島凍結保存法の開発)

学位論文内容の要旨

【背景】

重症糖尿病に対する膵島移植の成績は、細胞培養法や免疫抑制法の進歩により飛躍的に改善している。また、臓器と異なり、膵島は凍結保存がより容易であると考えられてはいるものの、臨床応用上の要件を満足する膵島凍結保存法は存在しないのが現状である。一方、膵島移植自体もドナーの絶対的不足と複数ドナーからの膵島が必要なことが普及の障害となっており、オンデマンド供給の可能な膵島の効率的な凍結保存法開発が求められている。

不凍糖タンパク質は南極や北極近海の水温が零下になる極洋の魚が保有している機能性タンパク質である。魚は通常 -0.7°C 程で凍結してしまうが、不凍タンパク質をもつ魚は -2°C 以下まで海水温が下がっても凍結しない、このことによって、極洋でも生存が可能になっているのである。従来、入手困難な希少タンパク質であったが、今回、共同研究者らによって合成に成功し、大量供給可能となった(4)。細胞や組織の凍結保存で最大の問題は細胞内外の水分が氷晶化することによって細胞破壊がおきることである。不凍糖タンパク質には氷結晶成長抑制作用があり、この性質を膵島の凍結保存に応用することを試み良好な結果を得た。

【方法】

8週齢雄性 Wistar ラットより膵管内コラゲナーゼ消化法、Ficoll-Conray 比重遠心法にて膵島を単離。RPMI1640 10%FCS 37°C 5% CO_2 にて24時間前培養後、2M DMSO RPMI1640 10%FCS に合成不凍糖タンパク質を $0\sim 1000\mu\text{g/ml}$ の各濃度にて添加、プログラムフリーザーを用い $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ にて植氷を -5.5°C にて行い、 -40°C まで緩徐凍結、その後、液体窒素中(気相)に1週間保存した。凍結膵島は 37°C ウォーターバスにて急速解凍し、0.75M スクロース RPMI1640

にて DMSO を除去した後、RPMI1640 10%FCS 37℃ 5% CO₂にて 24 時間培養後、評価をおこなった。さらに、凍結過程は低温顕微鏡を用いリアルタイム観察した。

【結果】

凍結前後の膵島回復率（凍結後膵島数/凍結前膵島数）は、合成不凍糖タンパク質 500 μg/ml にて 85.0±2.6% (mean±SEM) ともっとも良好で、非添加群では 63.3±5.8% であった ($p < 0.05$)。グルコース応答性インスリン分泌能 (Static Stimulation Index) は合成不凍糖タンパク 500 μg/ml にて 3.86±0.43% ともっとも良好で、非添加群では 2.98±0.22% であった ($p < 0.05$)。低温顕微鏡による凍結過程の観察によって合成不凍糖タンパク質 500 μg/ml のときにもっとも氷晶形成抑制を認めた。逆に高濃度 (1000 μg/ml 以上) の場合、針状結晶を形成し凍結時に膵島を破壊した。

【結論】

合成不凍糖タンパクは 500 μg/ml という、ある定まった濃度において膵島の凍結解凍保護効果を認めた。

本研究の成果を受け、合成不凍糖タンパク質を用いた、氷晶形成抑制という観点から、より効率的な膵島凍結保存法の新たな方法論が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Effects of Synthetic Antifreeze Glycoprotein Analogue on Islet Cell Survival and Function during Cryopreservation.

(合成不凍糖タンパク質をもちいた膵島凍結保存法の開発)

重症糖尿病に対する膵島細胞移植の成績は、膵島分離法や免疫抑制法の進歩により飛躍的に改善している。また、臓器と異なり、小組織である膵島は凍結保存が可能ではないかと期待されているが、臨床応用上の要件を満たす凍結保存法は存在しないのが現状である。一方、ドナーの絶対的不足と複数ドナーからの膵島が必要なことが普及の障害となっており、オンデマンド供給可能な膵島の効率的凍結保存法が求められている。

不凍糖タンパク質は南極や北極近海の水温が零下になる極洋の魚が保有している氷晶成長抑制を特徴とする機能性タンパク質である。魚は通常 -0.7°C 程で凍結してしまうが、不凍蛋白をもつ魚は -2°C 以下まで海水温が下がっても凍結しない、このことによって、極洋でも生存が可能になっているのである。従来、入手困難な希少タンパクであったが、今回、共同研究者らによって合成に成功し、大量供給可能となった。

細胞の凍結保存で最大の問題は細胞内外の水分が氷晶化することによって細胞破壊がおきることである。不凍糖タンパク質には氷結晶成長抑制作用があり、この性質をラット膵島の凍結保存に応用することを試みた。

8週齢雄性 Wistar ラットより膵管内コラゲナーゼ消化法、Ficoll-Conray 比重遠心法にて膵島を単離。RPMI1640 10%FCS 37°C 5% CO_2 にて 24 時間前培養後、2M DMSO RPMI1640 10%FCS に合成不凍糖タンパクを $0\sim 1000\ \mu\text{g/ml}$ の各濃度にて添加、プログラムフリーザーを用い $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ にて植氷を -5.5°C にて行い、 -40°C まで緩徐凍結、その後、液体窒素中(気相)に 1 週間保存した。凍結膵島は 37°C ウォーターバスにて急速解凍し、0.75M スクロース RPMI1640 にて DMSO を除去した後、RPMI1640 10%FCS 37°C 5% CO_2 にて 24 時間培養後、評価をおこなった。さらに、凍結過程を低温顕微鏡にて観察した。

凍結前後の膵島回復率（凍結後膵島数/凍結前膵島数）は、合成不凍糖タンパク 500 μ g/ml にて 85.0 \pm 2.6%(mean \pm SEM)ともしっかり良好で、非添加群では 63.3 \pm 5.8%であった(p<0.05)。グルコース応答性インスリン分泌能(Static Stimulation Index)は合成不凍糖タンパク 500 μ g/ml にて 3.86 \pm 0.43%ともしっかり良好で、非添加群では 2.98 \pm 0.22%であった(p<0.05)。低温顕微鏡による凍結過程の観察によって合成不凍糖タンパク 500 μ g/ml のときにもしっかり膵島に対し保護的な氷晶形成抑制を認めた。逆に高濃度(1000 μ g/ml 以上)の場合、針状結晶を形成し凍結時膵島を破壊した。

合成不凍糖タンパクは 500 μ g/ml という、ある定まった濃度において凍結解凍時、膵島に対し保護効果を認めたが、高濃度(1000 μ g/ml 以上)ではむしろ破壊的に働くことが明らかになった。

本論文内容は、今後、オンデマンド供給可能な膵島のより効率的な凍結保存法への臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。