

学位論文題名

Donor pretreatment with DHMEQ
improves islet transplantation(新規 NF- κ B 阻害剤, DHMEQ のドナー投与による
膵島移植成績改善効果の検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】膵島移植は膵臓より膵島のみ分離し経皮的に細胞を肝臓内に移植する治療法で、臓器移植と異なり低侵襲であり繰り返し移植が可能であるため、今日 1 型糖尿病における治療手段として注目されている。ただし、1 人の 1 型糖尿病患者の血糖を正常化するためには 2 人以上のドナーが必要とされており、また治療成績も膵移植より劣っており、様々な改良が求められている。問題点の 1 つに、移植前に半数以上の膵島組織が失われていることが挙げられる。これは、膵島分離から移植までの間に機能が保存された膵島が移植できていないことによる。膵島は膵組織の保存から消化、膵島分離の過程までに虚血などの様々なストレスに晒されアポトーシスに至ると考えられ、膵島組織の損失の大部分の原因と考えられている。膵島のアポトーシスに関与する機序はいまだ完全に解明されていないが、細胞内シグナルの核内転写因子の一つ NF- κ B が分離後の膵島内 β 細胞のアポトーシスに関与していると考えられている。NF- κ B は膵島内においても培養中に活性化され、膵島内からサイトカインを産生し、アポトーシスを促進すると考えられている。また NF- κ B は、アポトーシス関連遺伝子の調節因子でもある。

新規 NF- κ B 阻害剤、dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) は、*Amycolatopsis* sp より分離された epoxyquinomicin C 誘導体で、NF- κ B の活性化を核への移行レベルで抑制しその他の蛋白のリン酸化などに関与しないため、NF- κ B の阻害に特異的である。DHMEQ はこれまで、様々な細胞で NF- κ B の阻害作用とサイトカイン産生抑制作用を示してきたため、炎症性疾患に対する治療薬として有望である。

今回我々は、膵島分離後に膵島内 NF- κ B が活性するか、NF- κ B 阻害剤の DHMEQ をドナーに投与することで分離後膵島内 NF- κ B を抑制し、サイトカインの産生、あるいはアポトーシス関連遺伝子の活性化を抑制し、膵島のアポトーシスを抑制できるか、さらに同種同系統移植モデルを用いて膵島移植成績が改善するかを検討した。

【材料と方法】C57BL/6J マウスを用いた。レシピエントは移植 7 日前に STZ を腹腔内投与した糖尿病マウスを用いた。DHMEQ は DMSO に溶解した後、CMC に懸濁した。

1) 膵島分離

治療群に DHMEQ を 12mg/kg の投与量で、対照群には DMSO と CMC の懸濁したものを分離 2 時間前に腹腔内投与した後、コラゲナーゼを用いて膵を消化し、比重遠心法にて膵島を分離した。

2) In vitro 試験

膵島分離後 30 分で膵島内の NF- κ B 活性を ELISA 法にて測定した。分離後の機能を確認するため、分離後膵島を低濃度、高濃度のグルコース内で培養しインシュリン産生量を測定した(グルコース刺激試験)。3~6 時間培養後の膵島から RNA を抽出しサイトカ

イン、アポトーシス関連遺伝子を Real-time PCR 法にて測定した。分離後膵島を 24~48 時間培養後、膵島内 Caspase3/7 活性を測定し、膵島を TUNEL 染色し膵島内アポトーシスを評価した。

3) In vivo 試験

膵島移植は同種同系統の marginal model を用いた。分離後膵島を一晩培養後、marginal の 160 個の膵島を STZ 糖尿病マウスに経門脈投与にて移植した。対照群は n=16、治療群は n=12 とした。評価項目は血糖測定によるグラフト生着率、グルコース負荷後の耐糖能、グラフト内インシュリン含量、摘出後グラフトの組織学的評価とした。

【結果】

1) 膵島内 NF- κ B 活性

分離後膵島内 NF- κ B が早期に活性化されるのを確認したのと同時に、治療群で有意に NF- κ B の活性が抑制されているのを確認した。

2) グルコース刺激試験

膵島分離後時間経過とともに高濃度グルコースに対する反応が両群とも低下していたが両群間で有意差はなかった。

3) 膵島内サイトカイン発現

膵島分離後 6 時間での MCP-1 発現は、治療群でやや低いものの有意ではなかった。IL-1 β の発現は治療群で有意に発現が抑制されていた。

4) 膵島内アポトーシス関連遺伝子発現

アポトーシス遺伝子 Bax は分離 6 時間後に治療群で有意に発現が抑制された。抗アポトーシス遺伝子 Bcl-2 は両群間で差を認めなかった。

5) アポトーシス評価(TUNEL, Caspase3/7 activity)

分離 48 時間後の膵島内のアポトーシスを全細胞数で除して apoptotic index として比較したところ、治療群で有意差に低かった。また分離 24,48 時間後の caspase3/7 活性は、有意に治療群で低下していた。

6) 膵島移植後グラフト生着率

血糖 200mg/dl 以下をグラフト生着とし 60 日間観察したところ、対照群で 31%であるのに対し、治療群では 83.3%であり有意にグラフト生着を改善した。

7) グルコース耐糖能

移植 1 ヶ月後の耐糖能を比較したところ、AUC において明らかに治療群で改善した。

8) グラフト内インシュリン含量

移植 60 日後に摘出したグラフト内インシュリンは、治療群で有意に多く保持されていた。

9) グラフト組織学的評価

グラフト内の膵島壊死領域は有意に治療群で小さく、TUNEL 染色でも膵島内のアポトーシスは対照群で観察されるのに対し、治療群ではほとんど認められず、インシュリン染色にもよく染まっていた。

【考察】1 人のドナーによる膵島移植が成り立つには相当量の膵島が必要であるが、移植前にアポトーシスにより半数以上が失われているのが現状である。分離後培養中に NF- κ B が活性化し膵島機能不全、膵島炎に関与していると考えられているが、分離直後に NF- κ B が活性しているかは知られていない。今回我々は、ドナーに DHMEQ を投与することで、膵島分離直後の NF- κ B の活性化を抑制した。さらに、Bax 遺伝子の活性を抑制することで、Caspase3 経路を抑制し膵島内アポトーシスを抑制することができ、膵島移植成績の改善に寄与したと考えられる。

膵島移植においても、NF- κ B を抑制する治療法が成績改善の治療戦略と考えられており、各種の方法で NF- κ B を抑制する試みがなされているが、それらは遺伝子操作を必要とする、あるいは大量投与にて初めて抑制効果を示すものである。またその作用は非特異的で副作用も報告されている中、DHMEQ は核内への移行のみを選択的に阻害するため NF- κ B 特異的であり、これまでの動物実験レベルで副作用は認められていない。また低分子量であるため drug delivery に優れており、現在臨床応用に向けて開発中である。膵島移植において、

NF- κ B を抑制する効果的な治療法を同定することは、 β 細胞の損失を抑制するばかりでなく、1型糖尿病患者の血糖正常化に必要な膵島数を減らすためにも重要である。

【結論】DHMEQ は分離に伴うアポトーシスから膵島を保護するため膵島移植にとって有望な薬剤であり、ドナーに投与することで膵島移植成績の改善に寄与する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Donor pretreatment with DHMEQ improves islet transplantation

(新規 NF- κ B 阻害剤, DHMEQ のドナー投与による
膵島移植成績改善効果の検討)

膵島移植は低侵襲で繰り返し移植が可能であるが、治療成績は膵移植より劣り、様々な改良が求められている。膵島は膵島分離の過程で虚血等のストレスによりアポトーシスに至るが、核内転写因子の NF- κ B が関与していると考えられている。新規 NF- κ B 阻害剤、dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)は、NF- κ B の活性化を核内への移行レベルで抑制し特異的であることから、本研究では、DHMEQ をドナーマウスに投与することで膵島内 NF- κ B とアポトーシスを抑制できるか、抑制機序、さらに同種同系統膵島移植モデルを用いて膵島移植成績の改善効果を検討した。

膵島分離 2 時間前に DHMEQ 12mg/kg (対照群には Vehicle)を C57BL/6J マウスへ腹腔内投与し、膵島内 NF- κ B 活性を測定した所、分離早期の膵島内での活性化を確認したのと同時に、治療群で有意に NF- κ B の活性が抑制されていた。膵島機能評価のグルコース刺激試験では両群間で有意差はなかった。膵島内サイトカイン発現を確認した所、IL-1 β の発現が治療群で有意に抑制されていた。膵島内アポトーシス関連遺伝子 Bax は分離 6 時間後に治療群で有意に発現が抑制された。抗アポトーシス遺伝子 Bcl-2 は両群間で差を認めなかった。アポトーシス評価として TUNEL 染色しところ、治療群で有意差に抑制されていた。分離 24,48 時間後の caspase3/7 活性は、有意に治療群で低下していた。

膵島移植では、グラフト生着率は対照群で 31%であるのに対し、治療群では 83.3%と有意にグラフト生着を改善した。グルコース耐糖能は、AUC において明らかに治療群で改善した。移植 60 日後グラフト内インシュリン含量は治療群で有意に多く保持されていた。グラフト摘出後の組織学的評価では、グラフト内の膵島壊死領域は有意に治療群で小さく、アポトーシスも対照群では TUNEL 染色で観察されるのに対し、治療群でほとんど認めず、インシュリン染色にもよく染まっていた。

以上より、ドナーに DHMEQ を投与することで、膵島分離直後の NF- κ B の活性化を抑制し、Bax 遺伝子の活性の抑制と Caspase3 経路の抑制により膵島内アポトーシスを抑制することができ、膵島移植成績の改善に寄与したと考えられる。

膵島移植において NF- κ B を抑制する効果的な治療法を同定することは、 β 細胞を保持するばかりでなく、1 型糖尿病患者の血糖正常化に必要な膵島数を減らすためにも重要である。

公開發表後、まず副査の野々村教授より 1) human にドナー投与を適応する場合の投与方法について、2) 複数のドナーが必要な現状で、この DHMEQ によりどの程度臨床成績の改善が見込まれるかについて質問があった。申請者は 1) 膵管内注入という方法でアポトーシ

スを抑制して human ですすでに開始している、2) 膵管内注入により膵島収量も 2 倍に増加し臨床膵島移植の criteria を one donor でクリアできている、と回答した。続いて主査の小池教授より 1) 膵島収量を上げる方法として collagenase を用いた方法以外にあるか、2) overnight culture は必要かについて質問があったが、1) 自己消化する前に処理する必要がある、膵外分泌組織からの分離方法として collagenase が迅速で妥当であること、2) culture により分離直後の様々な mediator を除去でき、apoptosis あるいは primary non function の膵島を多く除去して移植できる利点があると述べるなどいずれの質問にも妥当な回答をなした。最後に藤堂教授より 1) 今後改善するためには何が必要であるか、2) 膵島移植と自然免疫反応との関係は、についての質問があったが、1) 膵島の viability を改善すること、2) マクロファージからの cytokine 産生による膵島炎を抑制するために DHMEQ は有望であると回答し、藤堂教授より自然免疫反応において HMGB1 の産生を抑えることが重要であること、その産生と allo の免疫反応の両者に対し NF- κ B が関与しており DHMEQ は抑制できるとのコメントがなされた。いずれの質問に対しても、申請者は概ね妥当に回答した。

本研究により、新規 NF- κ B 抑制剤 DHMEQ が膵島分離に伴うアポトーシスをドナーに投与することで分離前より抑制し、膵島移植成績の改善に貢献したことが証明された。本論文は、ドナーの虚血状態、摘出後の臓器保護の程度によって移植成績に影響することを示唆する点で高く評価され、今後の臨床応用として期待される。

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。