

## 博士論文審査の結果の要旨

氏名	山中 貴寛
学位名	博士 (学術)
学位番号	甲 第 92 号
論文題目	Cryopreservation and transplantation of rat pancreatic islets for diabetes therapy model (糖尿病治療モデル確立に向けたラット膵ランゲルハンス島の超低温保存と移植に関する研究)
論文審査委員	主査 保地 眞一 玉田 靖 堀江 智明 秋山 佳丈 枝重 圭祐 (高知大学)

(博士論文審査の結果の要旨)

本論文は、インスリン依存性の1型糖尿病の新規治療法として注目されている膵ランゲルハンス島(膵島)移植の普及に向け、ラットをモデル系にして移植に供しうる膵島の超低温保存技術を確認しようとしたものである。

第1章では研究の背景について紹介している。正常なインスリン分泌能を保持したまま膵島を長期保存できれば、慢性的な移植ドナー不足問題が解消されるだけでなく、患者-ドナー間の移植適合性を評価するための時間も確保できるようになる。しかし複数種類の細胞集団が複雑に入り組んで構成されている膵島の保存は技術的に難しく、これまでの技術で超低温保存後にインスリン分泌能が著しく低下した膵島を糖尿病患者に移植しても血糖値の正常化は望めない。

第2章では、一般的な細胞凍結法とガラス化法との間で膵島保存適性の直接比較を行っている。ガラス化法の中でもとくに超高速に冷却できるクライオトップをデバイスにした方法は、これまでに未受精卵子のような超低温保存が困難だった細胞種に対しても有効性が示され、ヒトの不妊治療を加速させた実績がある。凍結融解直後あるいはガラス化加温直後の膵島生存率は変わらなかったが、ガラス化膵島からは傷害を受けた外側の細胞層が培養につれて剥離され、インスリン分泌能やβ細胞関連遺伝子発現は凍結膵島と比べて高くなることがわかった。超急速ガラス化法が数千の細胞からなる膵島の超低温保存法として適していることを明らかにした。

第3章では、ガラス化デバイスに一度に搭載可能な膵島量を増やす試みを行っている。一般に、個々の膵島を顕微鏡下でキャピラリー操作することを通して細胞毒性の高いガラス化保存液への曝露時間を必要最小限に制御するため、一度に最大10個程度の膵島しか扱えない。そこでナイロンメッシュ(NM)を三角錐の展開図様に加工した、NM裏面から培地を吸引・除去交換することでキャピラリー操作を不要にできる新規デバイスを考案した。10個単位の膵島をガラス化・加温したときの生存率やインスリン分泌能にクライオトップとNMデバイス間で差はなく、NMデバイスに一度に100個もの膵島を搭載してガラス化・加温してもそれらのインスリン分泌機能は正常に保たれた。大容量ガラス化デバイスの開発に新たに成功したことの意義は大きい。

第4章では、NMデバイス上で大容量ガラス化保存した膵島を糖尿病モデルラットに移植し、血糖値の正常化能力を確認している。ストレプトゾトシンの静脈内投与によって糖尿病誘発を行い、麻酔下でレシピエントラット当たり800個の膵島を左腎臓のカプセル被膜下に移植したところ、新鮮対照区では8匹中7匹、ガラス化区では6匹中5匹の血糖値が移植から3週間以内に正常レベル(200mg/dl以下)に戻った。移植片を摘出後にはレシピエントの血糖値が再び上昇したことから、血糖値制御は移植膵島から分泌されたインスリンによる効果であると示唆された。

第5章では、学術的意義をまとめることに加えて、ラットモデルにおける本結果が膵島移植の臨床応用を加速する可能性、さらに克服しなければならない問題点の整理を行い、結論としている。

本論文は、ラット膵島の超低温保存には超急速ガラス化法が凍結保存法よりも適していること、NMデバイスを使えば一度に多くの膵島を搭載してガラス化・加温できること、そして、NM上でガラス化・加温した膵島は糖尿病誘発モデルラットの腎被膜下移植により血糖値の正常化に貢献できること、を示す実験結果を取り纏めたものである。In vitroの生理学的・分子生物学的実験に加えて、高度な手

術を伴い時間がかかる In vivo の動物実験の結果までを包含しており、学術的意義のみならず臨床応用の可能性に向けた示唆にも富んでいる。以上のことから、本論文は学位論文として十分に認められるものと判断した。

(公表主要論文名)

1. Takahiro Yamanaka, Kazuya Tashima, Rio Takahashi, Seiji Takashima, Teppei Goto, Masumi Hirabayashi, Shinichi Hochi, "Direct comparison of Cryotop<sup>®</sup> vitrification and Bicell<sup>®</sup> freezing on recovery of functional rat pancreatic islets", *Cryobiology* 誌 第 73 卷 (3 号) 376 頁～382 頁 (2016 年 6 月発行に掲載)
2. Takahiro Yamanaka, Teppei Goto, Masumi Hirabayashi, Shinichi Hochi, "Nylon mesh device for vitrification of large quantities of rat pancreatic islets", *Biopreservation and Biobanking* 誌 第 15 卷 (5 号) 457 頁～462 頁 (2017 年 10 月発行に掲載)
3. Kenyu Nakayama-Iwatsuki, Takahiro Yamanaka, Jun Negishi, Junki Teshima, Yasushi Tamada, Masumi Hirabayashi, Shinichi Hochi, "Transplantation of rat pancreatic islets vitrified-warmed on the nylon mesh device and the silk fibroin sponge disc", *Islets* 誌 第 12 卷 (6 号) 145 頁～155 頁 (2020 年 12 月発行に掲載)