

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461907

研究課題名(和文) Nrf2経路を活性化した凍結保存膵島の移植への利用法の確立

研究課題名(英文) The exploration of cytoprotective effect of dimethyl fumarate on human islet

研究代表者

増田 雄一 (MASUDA, Yuichi)

信州大学・医学部附属病院・助教(診療)

研究者番号：60467149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵島凍結前にdimethyl fumarate (DMF)を添加しNrf2経路を活性化した。解凍前後の膵島において抗酸化ストレス酵素のmRNA発現がDMF非添加群に比較して上昇した。解凍後膵島を用いたインスリン分泌試験では、両群に有意差を認めなかった。ストレプトゾシン誘導糖尿病ヌードマウスへのラット凍結解凍後膵島移植では、移植後1、2、4、7日目の血糖がDMF添加群において有意に低下した。カナダアルバータ大学よりヒト膵島の提供を受け検討を行ったところ、DMF添加群では非添加群より移植後血糖の平均値は低下した。膵島凍結保存時のDMF添加の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The islets are known to be vulnerable to oxidative stress because of containing less quantity of anti-oxidant enzymes. Oxidative stress will be given to islets during the process of freeze and thaw. Nrf2 is a key transcriptional factor to regulate the anti-oxidant genes expression. Dimethyl fumarate (DMF) is known as one of Nrf2 activators. The aim of this work is to investigate the cryoprotective effect of dimethyl fumarate (DMF) on rat and human islets. On rat and human thawed islets treated with DMF, anti-oxidant enzyme mRNA expressions were significantly higher, and the percentage of 7-aminoactinomycin D positive cells were lower than those without DMF. On rat islet transplant to nude mouse model, the levels of blood glucose were significantly lower in DMF group (n=4 in each). On human islets transplanted to nude mice model, the average of the blood glucose in DMF group was low (n=2 in each).

研究分野：移植

キーワード：膵島 移植 Nrf2経路 酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

2000年にCanadaのEdmonton大学(文献1)から膵島移植による糖尿病治療の成績が報告されて以降、膵島移植術は1型糖尿病患者にとって有効な治療手段として認識されている。近年の報告(文献2)によると、膵島分離技術や、周期免疫抑制療法の改善により、膵島移植後のインスリン離脱率は術後3年で44%と向上している。膵島移植成功の鍵は、膵臓から十分量の膵島を分離し移植することとされている。分離の過程では虚血による酸化ストレスで膵島が失われ、移植に十分量の膵島が採取できないことがある。その場合移植を断念せざるを得ない状況となる。1ドナーから十分量の膵島細胞が分離できなかった場合でも、膵島の凍結保存・解凍利用が可能であれば、複数のドナーから分離し凍結保存した膵島を使用し、貴重な提供臓器の移植への使用ができる可能性がある。凍結保存の問題点の一つは、解凍時の酸化ストレスにより、膵島のviability・機能性が低下することである。アスコルビン酸を添加し凍結・解凍を行うと、添加しない場合に比較し、インスリンの分泌能が有意に良好に保たれることが報告されており、このことは抗酸化ストレス酵素の誘導が、凍結保存膵島の機能保持に有用である可能性を示唆している(文献3)。転写因子の一つであるNuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)は、細胞質から核内に移行した後、antioxidant responsive element(ARE)に結合し、heme oxygenase-1(HO-1)、NAD(P)Hキノン還元酵素(NQO-1)などの抗酸化や解毒代謝を担う遺伝子群の転写を活性化させる中心的な転写因子であると報告されている(文献4)。本研究代表者(増田)は、ヒト膵島に対してbardoxolone methyl analogを用いることによりNrf2経路が活性化されることを明らかにし、論文報告した(文献5)。

### 2. 研究の目的

本研究では(目的1)分離後膵島にNrf2活性化剤であるdimethyl fumarate(DMF)を用いてNrf2経路を活性化した後の、膵島のviability、インスリン分泌能を検討する。(目的2)DMF添加の有無による凍結・解凍後膵島のviability、インスリン分泌能の差異について検討する。(目的3)凍結・解凍した膵島を移植し、DMFを用いないものと比較し、ストレプトゾシンによる糖尿病誘発マウスへの膵島移植成績を検討する。

### 3. 研究の方法

#### ラットからの膵島分離

DMFを非添加、添加し分離膵島を培養

DMFを非添加、添加し分離膵島を凍結、解凍

解凍後膵島のviability、機能性を評価する。-1 7AADを用いて細胞死をフローサイトメータにて評価 -2 RT-PCR法を用いて、

抗酸化ストレス酵素のmRNAの発現を検討

ストレプトゾシンによる糖尿病誘発マウスへのラット膵島移植

ヒト膵島の入手

ヒト膵島において上記 - を行う。

ストレプトゾシンによる糖尿病誘発マウスへのヒト膵島移植

### 4. 研究成果

SDラット(250g程度)からcollagenase(type V)を用いて、膵島分離を行い毎回1200IEQ/匹程度の安定した収量が得られた。

分離後DMF 20 $\mu$ Mを添加・非添加して膵島をovernightで培養した(37 $\cdot$ 5%CO<sub>2</sub>)。

DMF添加・非添加でovernightで培養した膵島をstem cell keep内に移し、液体窒素を用い凍結し、そのまま液体窒素内で保存した。解凍は37の恒温槽内にて行った。

-1:DMF添加群において7AAD陰性細胞の割合は65.0 $\pm$ 2.0%であったのに対して、非添加群においては35.7 $\pm$ 13.7%と有意にDMF添加群において低値であった。-2:NQO1 mRNAの発現は分離後(凍結前)の発現を1としたとき、DMF非添加群の解凍後では5.9倍、DMF添加群の解凍後では76倍であった。HO-1 mRNAの発現は同様に非添加群で292倍、添加群で760倍であった。いずれのmRNAの発現も添加群において有意に高値であった。

移植には凍結前150-200 $\mu$ mの膵島500個を用いた(n=4)。DMF添加群において術後1、2、7日目の血糖値(mg/dL)(212 $\pm$ 55、186 $\pm$ 107、221 $\pm$ 30)が、非添加群(444 $\pm$ 93、517 $\pm$ 68、427 $\pm$ 120)に比較して有意に低値であった。

ヒト膵島はAlberta University, Canadaにて分離された検体を空輸することにより、提供を受けた。

-1:DMF添加群において7AAD陰性細胞の割合は63%であったのに対して、非添加群においては52%であった。-2:NQO1 mRNAの発現は凍結前の発現を1としたとき、DMF非添加群の解凍後では1.2倍、DMF添加群の解凍後では2.0倍で有意に高値であった。HO-1 mRNAの発現は非添加群で0.5倍、添加群で0.3倍であり、添加群において有意に低値であった。

ヒト膵島2500IEQ(凍結前)を用いて移植を行った。DMF添加群において術後7日目の血糖値(mg/dL)は(345)、非添加群(580)であったが、両群のそれぞれの平均値は200mg/dLより低下することはなかった(n=2)。  
<引用文献>

(文献1)Shapiro AM, et al., N Engl J Med. 2000; 343(4):230-238.

(文献2)Barton FB, et al., Diabetes Care. 2012; 35(7):1436-1445.

(文献3)Arata T, et al., Artif Organs. 2004; 28(6):529-536.

(文献4)Itoh K, et al., Biochem Biophys Res Commun. 1997; 236(2):313-223.

(文献5) Masuda Y, et al., Plos One 2015 Jun 25;10(6):e0131012

#### 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10件)

1. C型肝炎に対する肝移植後長期経過症例に対する経口抗ウイルス薬療法の経験. 細田清孝, 増田雄一, 小山誠, 大野康成, 三田篤義, 浦田浩一, 中澤勇一, 小林聡, 池上俊彦, 宮川眞一. 移植 Vol. 52(2017) No. 1 P81-86 (査読あり)

2. Synthetic Triterpenoid RTA dh404 (CDDO-dhTFEA) Ameliorates Acute Pancreatitis. Robles L, Vaziri ND, Li S, Masuda Y, Takasu C, Takasu M, Vo K, Farzaneh SH, Stamos MJ, Ichii H. Pancreas. 45:720-729, 2016 (査読あり)

3. インスリン依存状態糖尿病に対する膵移植・膵島移植. 三田篤義, 宮川眞一. 日本医事新報. 4787 :52, 2016 (査読無し)

4. FISH法により末梢血中にドナーリンパ球を同定した脳死肝移植後溶血性貧血の1例 山本 悠太, 増田 雄一, 井出 裕一郎, 松田和之, 小嶋 俊介, 石川 伸介, 大野 康成, 三田 篤義, 浦田 浩一, 中澤 勇一, 小林聡, 池上 俊彦, 宮川 眞一 移植 Vol. 50(2015) No. 4-5 P429-433 (査読あり)

5. Pharmacological activation of Nrf2 pathway improves pancreatic islet isolation and transplantation. Li S, Vaziri ND, Masuda Y, Hajighasemi-Ossareh M, Robles L, Le A, Vo K, Chan JY, Foster CE, Stamos MJ, Ichii H. Cell Transplant. 2015; 24(11): 2273-2283 PMID: 25581574 (査読あり)

6. The effect of Nrf2 pathway activation on human pancreatic islet cells. Masuda Y, Vaziri ND, Li S, Le A, Hajighasemi-Ossareh M, Robles L, Foster CE, Stamos MJ, Al-Abodullah I, Ricordi C, Ichii H. PLoS One. 2015 Jun 25;10(6):e0131012. doi: 10.1371/journal.pone.0131012. eCollection 2015. (査読あり)

7. Dimethyl fumarate protects pancreatic islet cells and non-endocrine tissue in L-arginine-induced chronic pancreatitis. Robles L, Vaziri ND, Li S, Masuda Y, Takasu C, Takasu M, Vo K, Farzaneh SH, Stamos MJ, Ichii H. PLoS One. 2014 Sep 8;9(9):e107111. doi: 10.1371/journal.pone.0107111. eCollection 2014. PMID: 25198679 (査読あり)

8. Mita, A.; Ikegami, T.; Masuda, Y.; Katsuyama, Y.; Ohno, Y.; Urata, K.; Nakazawa, Y.; Kobayashi, A.; Miyagawa, S. Optimal Initial Dose of Orally

Administered Once-daily Extended-release Tacrolimus Following Intravenous Tacrolimus Therapy After Liver Transplantation. Transplantation Proceedings 46(3):794-796; 2014. (査読あり)

9. Ohno, Y.; Mita, A.; Ikegami, T.; Masuda, Y.; Urata, K.; Nakazawa, Y.; Kobayashi, A.; Miyagawa, S. Successful Active Immunization Using a Hepatitis B Virus Vaccination Protocol for a Recipient With Hepatitis B Core Antibody-Positive Liver Graft. Transplantation Proceedings 46(3):721-725; 2014. (査読あり)

10. Salutary effect of pre-treatment with an Nrf2 inducer on ischemia reperfusion injury in the rat liver. Masuda Y, Vaziri ND, Takasu C, Li S, Robles L, Pham C, Le A, Vo K, Farzaneh SH, Stamos MJ, Ichii H. Gastroenterol Hepatol (Que). 2014;1(1):1-7. PMID: 25558293 (査読あり)

[学会発表](計7件)

1. Living donor liver transplantation using a graft procured from an advanced age-donor. Mita A, Urata K, Masuda Y, Ohno Y, Nakazawa Y, Kobayashi A, Ikegami T, Miyagawa S; 26th International Congress of the Transplantation Society, 2017/8 Hong Kong

2. 膵島凍結保存時におけるNrf2-Keap1経路活性化の検討. 増田 雄一, 大野 康成, 三田 篤義, 浦田 浩一, 小林 聡, 池上 俊彦, 宮川 眞一 第52回日本移植学会総会 東京 2016年9月29日~10月1日

3. Living Donor Liver Transplantation for Adolescent Patients with Biliary Atresia Yuichi Masuda, Koichi Urata, Nao Shimada, Yasunari Ohno, Atsuyoshi Mita, Yuichi Nakazawa, Akira Kobayashi, Toshihiko Ikegami, Shin-ichi Miyagawa, DDW, 2016.5, San Diego

4. ラット膵島凍結保存時におけるNrf2-Keap1経路活性化の検討. 増田 雄一, 三田 篤義, 大野 康成, 浦田 浩一, 小林 聡, 佐藤 吉彦, 池上 俊彦, 宮川 眞一 第43回日本膵島移植研究会 広島 2016年3月4-5日.

5. De Novo Neoplasm Following Living Donor Liver Transplantation: A Single Center Experience. (Poster), Mita A, Ikegami T, Masuda, Y, Ohno Y, Urata K, Nakazawa Y, Kobayashi A, Terada M, Miyagawa S. World Transplant Congress 2014 2014/7 San-Francisco, USA

6. Exploring the Protective Effect of Nrf2 Activator On Ischemia Reperfusion Injury in Rat Liver. (Poster), Y. Masuda, C. Takasu, C. Pham, A. Le, S. Li, L. Robles, N. Vaziri, M. Stamos, H. Ichii. World

Transplant Congress 2014 2014/7  
San-Francisco, USA

7. Liver Replantation Long-Term  
After Living Donor Liver Transplantation:  
A Single-Center Experience. (Poster), Y.  
Masuda, T. Ikegami, Y. Ohno, A. Mita, K.  
Urata, Y. Nakazawa, A., Kobayashi, S.  
Miyagawa. World Transplant Congress 2014  
2014/7 San-Francisco, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

増田 雄一 (MASUDA, Yuichi)

信州大学・医学部附属病院・助教(診療)

研究者番号 : 60467149

(2)研究分担者

三田 篤義 (MITA, Atsuyoshi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属  
病院)・講師

研究者番号 : 60419398