

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 枝村 一弥

犬の糖尿病のほとんどはインスリン依存型糖尿病 (IDDM) で、血糖コントロールに毎日のインスリン投与を必要とする。しかし、インスリン注射のみでは細小血管の合併症の進展は防ぐことができないことから、移植による膵内分泌機能の回復が IDDM の唯一の根治療法と考えられる。一方、犬をドナーとして用いることは倫理上の問題があり、またブタインスリンのアミノ酸配列は犬と同一であることから、ブタ膵島は糖尿病犬の理想的なドナー源となり得る。最近、膵島細胞を封入したチャンパー型のバイオ人工膵島 (Bio-artificial endocrine pancreas; Bio-AEP) が開発され、マウス由来のインスリン分泌腫瘍細胞の移植によって免疫抑制なしに実験的糖尿病ラットの長期の血糖正常化が報告された。

本研究では、ブタ膵島細胞の異種移植による犬、さらにはヒトの糖尿病の根治を最終目標とし、その前段階として移植成功率を向上させるための様々な要因に関し実験を行うと同時に、予備的ではあるが実験的糖尿病犬に対しても移植を行い、その将来性を検討した。

第一に、異種移植の最大の障壁である拒絶反応に関し、細胞分離後の長期培養保存期間における PE-cell の抗原性の低下について検討した。その結果、細胞性拒絶反応に関与する swine leukocyte antigen (SLA) class II、液性の超急性拒絶反応に関与する糖鎖 Gal α の発現は低下を認めたが、同様の糖鎖である GlcNAc の発現は増加し、長期培養によるこれらの完全な消失はできなかった。

次に、分離後の長期保存時における PE-cell の機能維持に効果的な培養基質 (ECM) を検討した。その結果、ラミニンを用いた培養時がインスリン分泌能と糖応答性に最も優れており、最も適当な ECM であることが示唆された。

さらに Bio-AEP 内の培養基質の犬における生体適合性を検討したところ、ラミニン等を含む Matrigel を用いた Bio-AEP は犬の腹腔内で早期に破壊されたことから、従来から用いられている抗原低下処理をした I 型コラーゲンがより生体適合性に優れていることが示唆された。

以上の結果を踏まえ、 $1.3\sim 1.8\times 10^7/\text{kg}$ の PE-cell を入れた I 型コラーゲンを ECM とする Bio-AEP を膵全摘犬の腹腔内に異種移植し、その血糖降下作用および正常血糖維持に必要なインスリン要求量の変化について検討した。その結果、対照群の膵全摘犬では、試験期間中にインスリン要求量の減少は認められなかったが、移植群では全頭で移植後 3~17 週、インスリン要求量が減少した。すなわち、Bio-AEP は超急性拒絶反応を防止し、かつ一定期間の明らかな血糖降下効果を示した。しかし、血糖再上昇時には、Bio-AEP の破壊ならびに PE-cell の低酸素が原因と考えられる壊死が見られ、Bio-AEP の構造や PE-cell に対する酸素および栄養の供給など、多くの解決すべき問題が残されていることが明らかとなった。

この結果をもとに Bio-AEP を改善し、3 頭の自然発症 II 型糖尿病カニクイザルに異種移植した。その結果、1 頭で免疫抑制剤やインスリン投与なしに 27 週以上空腹時血糖が正常化し、か

つその間の血糖維持の指標であるヘモグロビン A1c (HbA1c) も減少した。これは、拡散チャンバー型 Bio-AEP による自然発症糖尿病猿の初めての異種移植成功例と思われる。他の 2 頭においても、インスリン離脱はできなかったが HbA1c の低下を認め、この方式の異種移植が犬あるいはヒトの糖尿病治療へ応用可能であることを示すものと思われた。

ブタ細胞の移植ではレシピエントにおけるブタ内在性レトロウイルス(PERV)感染の可能性が示唆されるため、日本のブタの各品種における PERV proviral DNA の保有状況と臓器分布を調査した。さらに、前章までに用いた Bio-AEP 移植犬および猿の末梢血および脾臓を用いて、その感染の有無を確認した。その結果、検査したブタ品種のすべておよびその臓器、ならびに実験に用いた PE-cell に PERV proviral DNA が検出された。しかし、PE-cell 異種移植動物においてはいずれも PERV のマイクロキメリズム、感染およびウイルス血症は認められなかった。したがって、免疫抑制剤を用いずに PE-cell の封入された拡散チャンバー型 Bio-AEP を移植した場合、PERV 感染の可能性は極めて低いことが示された。

最後に、将来の移植細胞源として幹細胞から膵内分泌細胞への分化について予備的に検討した。その結果、新生子ブタ膵管をニコチンアミドおよび肝細胞増殖因子添加のもとに三次元培養することにより、この分化が生じる可能性が示された。

以上要するに、本研究はブタ膵島細胞を用いた拡散チャンバー型人工膵島の異種移植の将来における応用を目指し、その基礎的検討を行ったものであり、学術上、応用上その貢献するところは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の博士論文として価値あるものと思われた。