HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	NF-κB阻害剤DHMEQはHMGB1を抑制することによりマウス膵島移植後早期グラフト傷害を抑制する
Author(s)	藏谷, 大輔
Description	配架番号：2185
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11955号
Issue Date	2015-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11955
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59970
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Kuraya.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

NF-κB 阻害剤 DHMEQ は HMGB1 を抑制することにより マウス膵島移植後早期グラフト傷害を抑制する (DHMEQ, a NF-κB inhibitor, prevents early islet graft damage by suppressing HMGB1 in murine pancreatic islet transplantation)

2015 年 9 月

北　海　道　大　学

藏　谷　大　輔

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6 頁
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7 頁
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・23 頁
総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kuraya D, Watanabe M, Koshizuka Y, Ogura M, Yoshida T, Asahi Y, Kamachi H, Nakamura T, Harashima H, Ozaki M, Umezawa K, Matsushita M, Yamashita K, Todo S
Efficacy of DHMEQ, a NF-κB inhibitor, in islet transplantation: I. HMGB1 suppression by DHMEQ prevents early islet graft damage.
Transplantation. 15; 96(5):445-53. 2013.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 蔵谷 大輔, 蒲池 浩文, 渡辺 正明, 腰塚 靖之, 山下 健一郎, 尾崎 倫孝, 古川 博之, 松下 通明, 梅澤 一夫, 藤堂 省.
新規 NF-κB 阻害剤 DHMEQ によるマウス膵島移植早期グラフト障害抑制効果.
日本移植学会. 東京. 2009.

2. 蔵谷 大輔, 山下 健一郎, 渡辺 正明, 蒲池 浩文, 腰塚 靖之, 小倉 正臣, 吉田 雅, 尾崎 倫孝, 古川 博之, 松下 通明, 梅澤 一夫, 藤堂 省.
新規 NF-κB 阻害剤 DHMEQ によるマウス膵島移植後早期グラフト障害抑制効果.
日本外科学会. 名古屋. 2010.

3. 蔵谷 大輔, 蒲池 浩文, 渡辺 正明, 小倉 正臣, 吉田 雅, 腰塚 靖之, 中木村 繁, 山下 健一郎, 鈴木 友己, 尾崎 倫孝, 古川 博之, 松下 通明, 梅澤 一夫, 藤堂 省.
NF-κB 阻害によるマウス膵島移植後早期グラフト傷害抑制効果.
日本移植学会. 京都. 2010.

4. Daisuke Kuraya, Kenichiro Yamashita , Masaaki Watanabe , Yasuyuki Koshizuka, Masaomi Ogura, Tadashi Yoshida, Hirofumi Kamachi, Michiaki Matsushita, Michitaka Ozaki, Kazuo Umezawa, and Satoru Todo
Prevention of graft failure caused by IBMIR with a novel NF−kB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) after intraportal islet transplantation in mice
American Transplant Congress, Boston, Massachusetts, 2009

緒言

1 型糖尿病治療としての膵島移植

糖尿病は、全世界で患者数が最も多い慢性疾患のひとつである。2000 年の統計では、糖尿病患者は世界人口の 2.8%、1 億 7100 万人に上る[1]。特に 1 型糖尿病では、膵 β 細胞の特異的障害のためインスリンの絶対的欠乏をきたし、著しい高血糖からケトアシドーシスや昏睡に至る。1 型糖尿病患者の多くは若年で発症し、地域により差はあるものの、14 歳以下での罹患率は 10 万人あたり年間 0.1～36.8 人、本邦においては 1.0～2.2 人[2]であり、糖尿病患者全体の 5～10%を占める[3]。

1 型糖尿病の治療の主体はインスリン注射である。インスリン投与によって糖尿病の死亡率は激減し、網膜症、腎症、神経障害の発症や進行を遅らせることができる[4]が、一方で患者は重度の、時に致死的な低血糖発作の危険にさらされることになる[5]。

長期間の血糖値の安定化と恒常性が得られる治療法として、膵移植が行われている。膵移植により、80%以上の患者で 1 年以上のインスリン離脱を達成する[6]。また糖尿病患者の生活の質や[7]、糖尿病性合併症をも改善する[8]。一方で、膵移植は依然、高い手術合併症率と治療関連死を伴う治療法である[9]。このため膵移植は若年患者や、合併症を発症していない患者に対しては通常行われない。膵移植の代替治療として膵島移植、つまりドナーの膵から膵島のみを分離し、経門脈的に肝に移植する方法がある。膵島移植の手技は膵移植と比較して、より簡便・安全であるため、糖尿病性合併症を有するコントロール困難な成人患者のみならず、子供を含めた若年者に対する糖尿病性合併症発症前の治療としても期待されている[10]。

膵島移植の歴史

1972 年代前半に、糖尿病ラットに対する同種同系膵島移植によって、糖尿病が改善したという報告が相次いだ[11-13]。その後、大動物を用いたモデルによる膵島移植が試みられたが、血糖正常化のために十分な量の膵島を分離することができず、望ましい結果は得られなかった。1970 年代後半になると、分離された膵島ではなく、膵の断片を移植する試みがなされ、イヌ用いた実験で成功を収めた[14,15]。そして 1977 年ミネソタ大学において Najarian らは膵島移植の臨床導入を行った[16]。この結果、患者がインスリン離脱に至ることはなく、少数の症例で短期間のみインスリン所要量が減っただけであった。また多量の組織を門脈内に注入するため、門脈塞栓や門脈圧亢進症のような重篤な合併症から死亡する症例も出た[17,18]。膵島移植を安全な治療とするためには、より精製された純度の高い膵島が必要であった。

Ricordi らは、酵素によって徐々に消化される膵島を、過消化に至る前に採取する方法によって膵島収量の増加を図った[19]。Robertson らは、濃度勾配の連続した比

重遠心法を用いることで、膵島の純度を高めた [20]。また主膵管に酵素を注入する際の圧を一定にすることや [21]、酵素をそれまで用いられ、製品によって効果が一定しない collagenase から、より精度が高く効果が安定した Liberase に変えることも [22]、膵島収量や質の向上に貢献した。このような進歩にも関わらず、臨床での成績は依然不良であった。1974 年から 1990 年にかけて、1 型糖尿病患者に対する 450 例以上の同種膵島移植が Islet Transplant Registry に報告されたが、1 年以上のインスリン離脱に至った患者はわずか 10%以下であった [23,24]。

膵島移植が臨床での成功に至らない原因として、移植膵島量や免疫抑制が不十分であること、膵島に対する自己免疫の再燃、β 細胞傷害性や糖尿病原性を持つ薬剤の使用が考えられた [25-27]。これらを考慮した新しいプロトコルがカナダのエドモントンで適用された。その要点は、質の高い膵島を十分量、複数回にわたり移植したこと。そして sirolimus、低用量 tacrolimus、抗 interleukin (IL)-2 受容体モノクローナル抗体を組み合わせた、ステロイドを使用しない新しい免疫抑制療法によって、糖尿病原性が低く抑えられたことである [28]。エドモントンプロトコルの導入により、全例で血糖正常化が得られ、膵島移植 1 年後においても、観察された全ての患者がインスリン離脱を持続していた [28]。この結果を受け、世界中でさらなる症例が蓄積された。アルバータ大学では、エドモントンプロトコルに従い、17 人の患者が膵島移植を受けた [29]。その全例で 1 人の患者に対し 2～3 回の移植が必要であった。初回移植から 1 年以上のインスリン離脱率は 80%であった。HbA1c は正常化し、糖尿病性合併症の著明な悪化を認めず、治療関連死も認めなかった [29]。各国 9 施設でエドモントンプロトコルの追試が行われ、施設間の差はあったが、高いレベルでの成功率が証明された [30]。膵島移植は膵移植に匹敵する効果を有する治療となり、血糖値が不安定で低血糖発作を繰り返すような 1 型糖尿病患者に対し、実現可能な治療選択肢のひとつとなったのである。

膵島分離の効率化

膵島分離法の改善、移植手技、移植後の免疫抑制等、あらゆる分野で臨床膵島移植の進歩は続いた。特に同種膵島グラフトは脳死あるいは心臓死ドナーからの提供に限られるため、ドナーから効率よく膵島を分離する技術の向上が重要である。膵島分離には多くの労力、コストを要し、しかも得られる膵島収量は一定しない。最高と考えられる技術を用いてさえ、理論的に可能な収量の 20～50%しか得られていないのである [31]。ドナーの膵の質は、年齢、BMI、血糖値、血行動態などのドナー側の因子に大きく依存する [32] が、摘出の際に体内で膵を急速に冷却し、温阻血時間を最小限とすることで、膵島収量と viability が改善した [33]。ドナーから摘出された膵は、膵島分離が可能な施設まで輸送されるが、膵摘出から膵島分離までの冷阻血時間も膵島分離に大きな影響を与える因子である [34-36]。この問題を解決するため、高い酸素

親和性を持つ perfluorocarbons と UW solution を用いた two-layer method が導入された[37]。この方法により、温阻血によって生じる膵島のダメージが軽減し[38]、膵島の収量と質が改善した[39,40]。これらの進歩により、ドナーの条件が悪く、使われなかったかもしれない膵からも、膵島を得られる可能性が高まった。

膵島移植後グラフト傷害

膵島分離、精製の過程での進歩により、ドナーから得られる膵島の収量は、徐々に向上している。しかし 1 人の患者がインスリンから離脱するために、2～3 人のドナーから得られた十分な量の膵島が必要である。これは同種膵島グラフトが経門脈的に肝臓へと移植された直後に、大部分が破壊されることが主な原因である。この移植直後のグラフト喪失を防止する戦略が、移植成績を改善するために極めて重要である。

分離された膵島グラフトが門脈内で血液と接触するとき、血小板凝集、補体・凝固系の活性化のカスケードが起こる[41,42]。さらにこの反応は、tissue factor[43]、monocyte chemotactic protein (MCP)-1[44]、tumor necrosis factor (TNF)-α[45]、high mobility group box 1 (HMGB1)[46]などのメディエーターにより、細胞傷害性の炎症反応や自然免疫反応を引き起こし、続いて膵島グラフトへ好中球や単球が浸潤する[47-49]。マクロファージや、類洞内のクッパー細胞は、膵島移植後に活性化され、これらの反応において重要な役割を果たす[50,51]。活性化したこれらのマクロファージは、IL-1β、IL-6、TNF-α、interferon (IFN)-γ などの炎症性サイトカインを分泌し、膵島グラフトを直接傷害する[52]。膵島内のマクロファージも、TNF-α や IFN-γ に反応し、IL-1[53]や誘導型一酸化窒素[54]を合成することが知られている。これらの結果、移植された膵島は、移植後 72 時間で、その 50～70%が破壊される[55-57]。近年、膵島移植後早期のグラフト傷害に対するいくつかの戦略が報告されている。例えば、げっ歯類の門脈内膵島移植でのマクロファージ抑制療法[52]、マウス膵島に対する TNF-α 受容体抗体による抗炎症療法[58]、nicotinamide による抗酸化療法[59]、抗コレステロール薬 pravastatin[60]や simvastatin[61]、ビタミン D3[62]、pentoxiphylline[63]が動物実験または in vitro 実験において好成績を収めている。

膵島移植後グラフト傷害におけるマクロファージ、NF-κB とHMGB1

nuclear factor kappa B (NF-κB)は、Rel ファミリーに属する p65 (Rel-A)、p50、p52、c-Rel および Rel-B から構成される転写因子である。NF-κB のホモまたはヘテロ二量体は、核内に移行することによって様々な細胞が活性化、増殖、成熟する際に重要な種々の遺伝子の転写を促す[64,65]。膵島移植において早期グラフト傷害に関わるマクロファージ、単球、血小板などにとっても、NF-κB は重要な役割を果たす[66]。TNF-α、IL-1、lipopolysaccharide (LPS)や、様々な内因性の傷害関連分子によっ

て NF-κB 経路を経てマクロファージが活性化すると、TNF-α、IL-1、IL-6、IL-12 などの遺伝子の転写が NF-κB に依存して起こり、これらの炎症性サイトカインを放出する [67,68]。また NF-κB は膵島細胞のアポトーシスにも関わっており、炎症性サイトカインが惹起する膵島細胞のアポトーシスは、NF-κB を阻害することによって抑制される [69]。

HMGB1 は、組織の損傷や炎症の際にマクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞などの免疫細胞が分泌する核タンパクである [70,71]。HMGB1 が toll-like receptor (TLR) 2、TLR4、receptor for advanced glycation end products (RAGE)と結合すると、NF-κB を介するシグナル伝達が起こり [72,73]、免疫細胞が活性化し、それに引き続き起こる炎症反応が促進される [74,75]。また HMGB1 はマクロファージなどの免疫細胞から分泌されるだけでなく、β 細胞を始めとする細胞や組織が損傷した際にも放出される [74]。特に膵島は甲状腺、肺、脾臓、肝臓などの他の臓器と比較して 20 倍もの HMGB1 を含み、膵島移植後のグラフト傷害においてその血中濃度が増加する [46]。

本研究の目的

本研究においては、NF-κB の核内移行を遮断する [76,77] 新規低分子 NF-κB 阻害剤 dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)を用いて、拒絶反応が起こらない同種同系マウスの膵島移植において、NF-κB 阻害が炎症反応を抑制し、移植後早期の膵島グラフトの喪失を防ぐという仮説を検証した。

その結果、DHMEQ による NF-κB 阻害が膵島移植後早期グラフト傷害を抑制し、血糖正常化率を改善することが示された。活性化したマクロファージが産生し、破壊された膵島からも放出される HMGB1 が、さらにマクロファージを活性化し、マクロファージが分泌する炎症性サイトカインによって膵島の破壊が引き起こされるというフィードバックループにおいて、DHMEQ による NF-κB 阻害がマクロファージの活性化を抑制することで膵島の破壊を防止するという機序が明らかになった [78]。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである

CMC carboxymethylcellulose
DHMEQ dehydroxymethylepoxyquinomicin
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO dimethylsulfoxide
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HMGB1 high mobility group box 1
IFN interferon
IL interleukin
IPGTT intraperitoneal glucose tolerance test
Lipo- DHMEQ liposomal dehydroxymethylepoxyquinomicin
LPS lipopolysaccharide
MCP monocyte chemotactic protein
MIP macrophage inflammatory protein
NF-κB nuclear factor kappa B
PBS phosphate buffered saline
RAGE receptor for advanced glycation end products
SPF specific pathogen free
STZ streptozotocin
TLR toll-like receptor
TNF tumor necrosis factor

実験方法

動物

全ての動物実験は、『北海道大学動物実験に関する規定』に従った。雄 C57BL/6 (H-2^b)マウスを SLC (静岡県)から購入した。specific pathogen free (SPF)環境で飼育された週齢 12～15 週の雄マウスを実験に使用した。

薬剤

DHMEQ は共同研究者である梅澤らにより開発合成されたものを使用した。DHMEQ の製法については既に報告されているが [79]、その概略を示す。合成経路を図 1 に示す。市販の 2,5-dimethoxyaniline および acetylsalicyloyl chloride からなるサリチルアミドを合成する。これをヨードベンゼンジアセタートとメタノールで処理し、bisdimethylacetal を形成する。続いて vinylogous amide dimethylacetal group の加水分解により quinone を得る。これを過酸化水素と水酸化ナトリウム溶液でエポキシ化し epoxyquinonedimethylacetal を得る。さらにジクロロメタンイド中で三フッ化ジエチルエーテル錯体により処理し epoxyquinone を得る。これを水素化トリアセトキシホウ素ナトリウムで還元し、DHMEQ を得る。

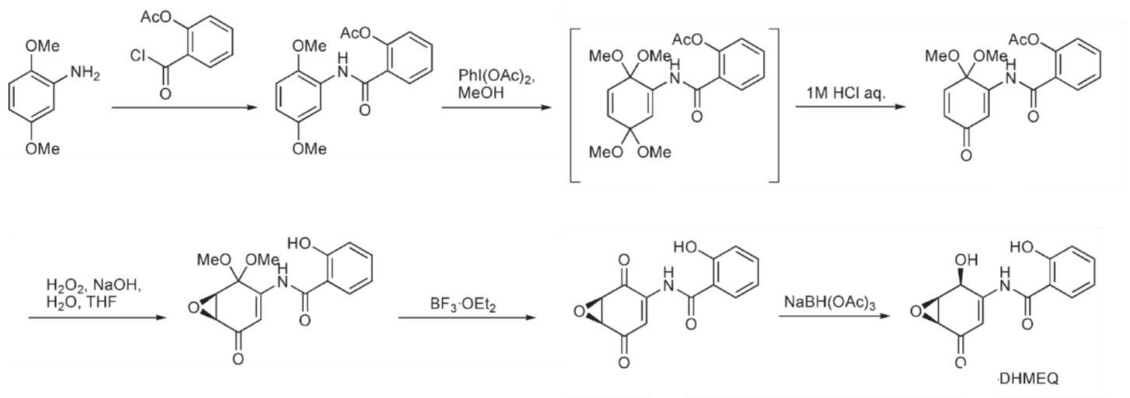


図1．DHMEQ の合成経路(文献 79 より引用)

DHMEQ は DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)で溶解し、-80℃で保存した。これを 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) (Sigma-Aldrich)で溶解して使用した。

Liposomal DHMEQ は、共同研究者である中村、原島らにより作製されたものを使用した。その製法の概略を示す。Cholesterol、1,2 -distearoyl-*sn*-glycero-3-

phosphocholine および N-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamine (NOF、東京都)を 3:6:1 のモル比でエタノールに溶解する。これに DHMEQ を添加し、65℃で完全に溶解するまで混和する。溶媒を蒸発させてできた脂質薄膜に食塩水を添加し、室温で 20 分かけて水和する。これを超音波処理し、liposome を生成する。Liposome に取り込まれずに残った DHMEQ を遠心分離で除去し、Liposomal DHMEQ を得る。

HMGB1 はシノテスト(神奈川県)から、リコンビナントマウス IFN-γ、TNF-α、IL-1ß は Sigma-Aldrich から購入した。

Hanks 溶液は、Hank's Balanced Salts (9.7g/L) (Sigma-Aldrich)に滅菌精製水を添加し作製した。コラゲナーゼ溶液は Collagenase, Type2、(Worthington, NJ, Lakewood)を Hanks 溶液で 0.2%に溶解した。

Ficoll- Conray 液は、Ficoll400, type400 (Sigma-Aldrich) 20g、コンレイ 400 注 (第一製薬、東京都) 40ml、Phenol red (Sigma-Aldrich) 2.4ml、10%グルコース 2.4ml、炭酸水素ナトリウム注 (大塚製薬、東京都) 2.4ml に合計 240ml となるように滅菌精製水を添加して作製。さらに比重遠心法に用いるため、比重が 1.095g/ml、1.084g/ml、1.072g/ml、1.048g/ml となるように滅菌精製水で希釈した。

膵島分離

C57BL/6 マウスの膵島を過去の報告と同様に分離した [80]。すなわち、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、速やかに腹部に十字切開を置いた。胸骨剣状突起を切除し肝を頭側胸壁上に脱転し、十二指腸を左に脱転すると総胆管を視認できた。十二指腸を Kocher 鉗子で遮断。総胆管前壁を開窓し、細く引き延ばした PE10 チューブ (ハギテック、千葉県) を 1 cm 程度挿入(図 2A)。コラゲナーゼ溶液を約 2 ml 注入し、膵を膨化させた後、膵臓と脾臓を一塊に摘除した(図 2B)。脾臓と異物を除去した後、ディッシュ上で米粒大になるまで細かく切離し、37℃で 20 分間消化した。Hanks 溶液で消化を停止し、ピペッティングで粉砕した。1400rpm、1 分間の遠心分離を 3 回行い、茶漉しで濾過した。上清を捨て、沈殿物に比重 1.095g/ml の Ficoll- Conray 液 4ml を添加して攪拌した。その上に比重 1.084g/ml、1.072g/ml、1.048g/ml の順にそれぞれ 2ml の Ficoll- Conray 液を注ぎ、2200rpm、10 分間で比重遠心した。比重 1.072g/ml と 1.048g/ml の層の間に集蔟する膵島を採取した(図 2C)。Hanks 溶液で 2 回遠心分離し、acinar 細胞などの異物を除去した後、10% ウシ胎児血清、penicillin 100 単位/ml、amphotericin B 0.25μg/ml を添加した RPMI 1640 培地 (Sigma-Aldrich) に入れ、炭酸ガス 5%、湿度 95%、37 度の培養器で保存した(図 2D)。精製された膵島のうち、直径 150～200μm のものを後の実験に使用した。

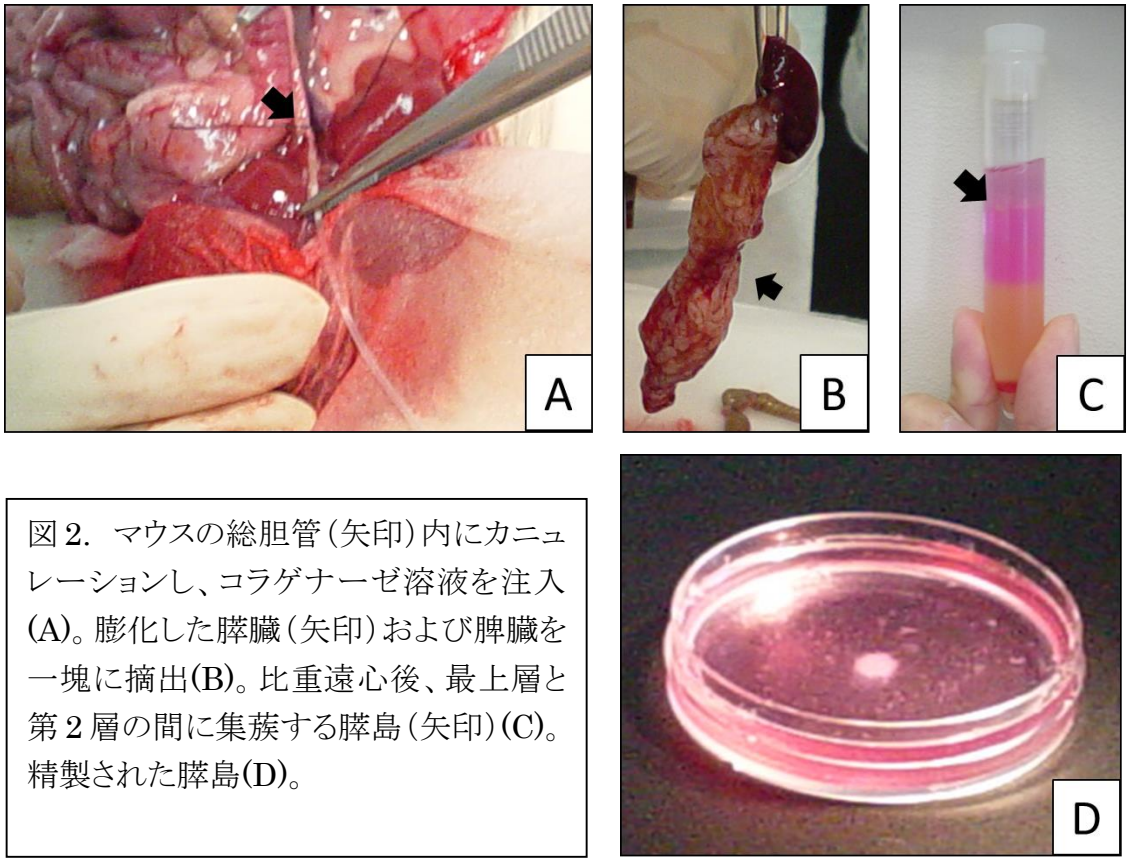


図 2. マウスの総胆管（矢印）内にカニュレーションし、コラゲナーゼ溶液を注入(A)。膨化した膵臓（矢印）および脾臓を一塊に摘出(B)。比重遠心後、最上層と第 2 層の間に集蔟する膵島（矢印）(C)。精製された膵島(D)。

細胞刺激、共培養

マウスマクロファージ類似細胞株、RAW 264.7 細胞を American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した。ウシ血清由来の 2%アルブミン、penicillin 100 単位/ml、streptomycin 10µg/ml、amphotericin B 0.25µg/ml を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) 培地で培養した。細胞を 96 well のプレートに入れ、HMGB1 (20µg/ml) を添加。2 時間後に phosphate buffered saline (PBS)で 3 回洗浄。2×10^6 cell/ml に調整し、C57BL/6 マウスから分離した膵島 200 個とともに、総量 1.5ml となるように 35mm ディッシュに入れ、炭酸ガス 5%、湿度 95%、37 度の培養器で培養した。ディッシュの上清を採取し、HMGB1、TNF-α および IL-6 タンパク量を測定した。また、前述の DMEM 培地中に IFN-γ、TNF-α、IL-1ß (各 20ng/ml) を添加し、RAW 264.7 細胞を加えずに、マウス膵島 200 個のみを分散し、同様の条件で培養した。培養後の膵島の viability を評価するため、MTT Formazan (Sigma-Aldrich) 1mg/ml を膵島に添加。37℃で 2 時間保存後、上清を除去し、DMSO 200µl を添加。室温で 5 分間攪拌し、570nm で吸光度を測定した。分離直後の膵島 0 個、20 個、50 個、100 個、150 個、200 個を同様に処理し、得られた吸光度から検量線を作成。これから膵島の viability を計算した。

蛍光免疫染色

前述の DMEM 培地中で、RAW264.7 細胞をチャンバースライドグラス内にサブコンフルエントになるまで培養した。HMGB1（20μg/ml）もしくは LPS を添加し、炭酸ガス 5%、湿度 95%、37 度の培養器で培養した。PBS で 3 回洗浄した後、3.7%ホルムアルデヒド(Sigma-Aldrich)を添加した PBS を注ぎ、室温にて 30 分固定した。PBS で 2 回洗浄し、マイナス 20℃のアセトン(Sigma-Aldrich)を滴下。0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)を添加した PBS を注入し、室温にて 30 分静置した。続いて 3%ウシ血清アルブミンを添加した PBS で中和し、30 分静置。一次抗体として NF-κB p65 (C22B4) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)を滴下し、PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体として Goat Anti-rabbit IgG (Alexia Fluor 488)（abcam, Cambridge, MA）を滴下した。十分に乾燥させ、ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI(ライフテクノロジーズジャパン、東京都)を滴下した。共焦点顕微鏡を用いて観察した。

糖尿病誘導

膵島移植の 5～7 日前に、レシピエントとなる C57BL/6 マウスに 180mg/kg の streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich) を腹腔内投与した。尾静脈から血液を採取し、Accu-Chek blood glucose monitor (Roche Diagnostics K.K.、東京都)で血糖値を測定した。2 日連続で血糖値 450mg/dl 以上となったマウスをレシピエントとして使用した。

膵島移植および治療

10%ウシ胎児血清を添加した RPMI 培地に分離した膵島を入れ、膵島をレシピエントの肝内に経門脈的に注入した。手技の詳細を以下に示す。

膵島移植のレシピエントとなる C57BL/6 マウスにネンブタール注射液(大日本住友製薬、東京都) 50～75mg/kg を腹腔内投与し麻酔した。腹部正中切開で開腹し、肝臓を頭側に脱転した。膵島数をカウントし、翼状針 27G 針長 13mm (テルモ、東京都)のチューブ内に充填。マイクロスコープ下に翼状針を膵頭部の門脈に穿刺し、チューブ内の膵島を注入した(図 3A,B)。刺入部を圧迫止血した後、4-0 または 5-0 の縫合糸で閉腹した。

膵島を移植されたレシピエントに DHMEQ (20mg/kg) を 1 日 1 回腹腔内投与した。DHMEQ 1×群は移植直後に 1 回、DHMEQ 2×群は移植直後と 1 日後の 2 回、DHMEQ 3×群は移植直後と 1、2 日後の 3 回、DHMEQ 4×群は移植直後、1～3 日後の 4 回投与した。対照群には DHMEQ を含有しない vehicle (CMC＋DMSO) を移植直後、1～3 日後の 4 回投与した。また Lipo-DHMEQ 群には、経

静脈投与可能な製剤である、Liposomal DHMEQ (20mg/kg) を移植直後に 1 回、陰茎静脈内に投与した。2 日連続で血糖値が 200mg/dl を下回った場合を血糖正常化とした。

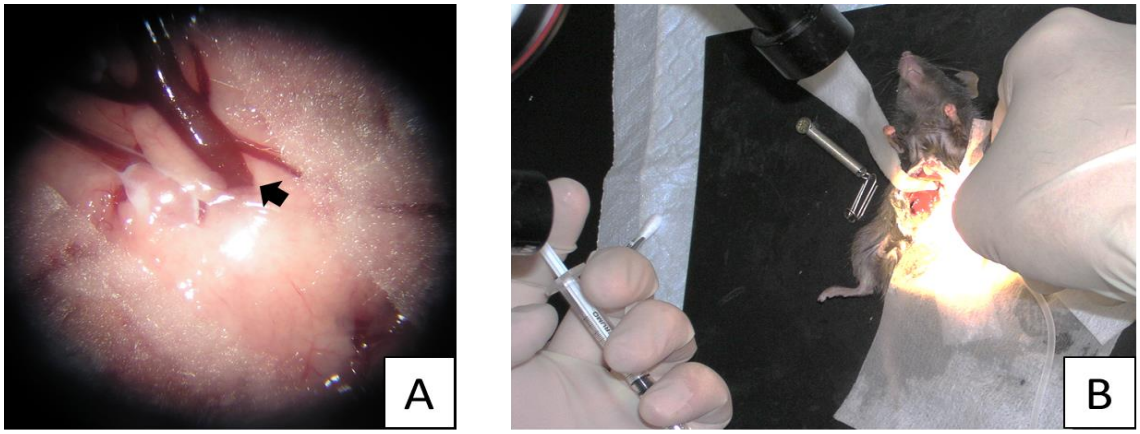


図 3. C57BL/6 マウスを腹部正中切開で開腹し、肝臓を頭側に脱転した。マイクロスコープ下に膵頭部の門脈(A)を同定。門脈に翼状針を穿刺し、膵島を注入した(B)。

ブドウ糖負荷試験

膵島移植後 14 日目に腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) を行った。6 時間の絶食の後、2g/kg のブドウ糖溶液を腹腔内投与し、投与直前、投与 30、60、90、120 および 180 分後に血糖値を測定した。Naïve C57BL/6 マウスを対照群として用いた。

炎症性サイトカインと HMGB1 の測定

培養上清中の IL-6、TNF-α タンパク量を OptEIA Sets (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。すべての検体を duplicate で測定した。マウス血清および培養上清中の HMGB1 濃度を、シノテスト社に依頼し ELISA 法で測定した [81]。

Real-time PCR

膵島移植後に DHMEQ を腹腔内投与されたマウスの肝臓を、移植から 12 時間後に摘出し、液体窒素で急速凍結した後、-80℃で保存した。Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて組織サンプルから total RNA を抽出した。

cDNA は Omniscript RT Kit (Qiagen, Valencia, CA) と oligo(dT)-20 primer (東洋紡、大阪) を用いて、total RNA 1μg から合成した。生成された cDNA は、PCR での相対定量のため、0.5μM の特異的プライマー (Invitrogen) とともに QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) を用いて、LightCycler (version 1.4) で解析した。PCR の条件は、94℃15 秒、続いて 94℃15 秒 40 サイクル、60℃20 秒、72℃30 秒とした。目的とする遺伝子である IL-1β、IL-6、TNF-α、macrophage inflammatory protein (MIP)-1β、MCP-1 の mRNA 相対発現量を、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を内部標準として用いた標準曲線法で定量した。健常マウスの肝臓を対照として用いた。

以下の primer を用いた:

mouse TNF-α forward 5′-ACCCTCACACTCAGATCATC-3′,
and reverse 5′-GAGTAGACAAGGTACAACCC-3′;
mouse IL-1β forward 5′-GGATGAGGACATGAGCACCT-3′,
and reverse 5′-AGCTCATATGGGTCCGACAG-3′;
mouse MCP-1 forward 5′-TCCCAATGAGTAGGCTGGAG-3′,
and reverse; 5′-TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3′;
mouse IL-6 forward 5′-CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG-3′,
and reverse 5′-GCCACTCCTTCTGTGACTCC-3′;
mouse MIP-1β forward 5′-CCCACTTCCTGCTGTTTCTC-3′,
and reverse 5′-GTCTGCCTCTTTTGGTCAGG-3′;
mouse GAPDH forward 5′-TACACTGAGGACCAGGTTGT-3′,
and reverse 5′-CTGTAGCCGTATTCATTGTC-3’。

統計

各群間の血糖正常化率は Kaplan-Meier 法を用い、log-rank test で比較した。定量的結果は平均値±標準偏差で表記した。統計学的解析は Student の t 検定を用い、$p<0.05$ を有意とした。

実験結果

同種同系膵島移植における移植膵島数の確定

NF-κB 阻害剤 DHMEQ による血糖正常化率改善効果の検証に先立ち、大部分が移植後に血糖正常化しないが、治療により血糖正常化しうる移植膵島数を検索した。C57BL/6 マウスから得られた膵島 50、100、150、175、200、300、400、500 個を糖尿病化したレシピエントマウスに移植した。膵島 50、100、150、175 個を移植した群では、全例移植 14 日後までに血糖正常化しなかった。膵島 200 個を移植した群では 17%、膵島 300 個では 50%、膵島 400 個では 67%、膵島 500 個では 50%、600 個では 100%で、移植 14 日後までに血糖正常化した（図 4）。膵島 175 個のモデルが適切と考え、後の実験に用いた。

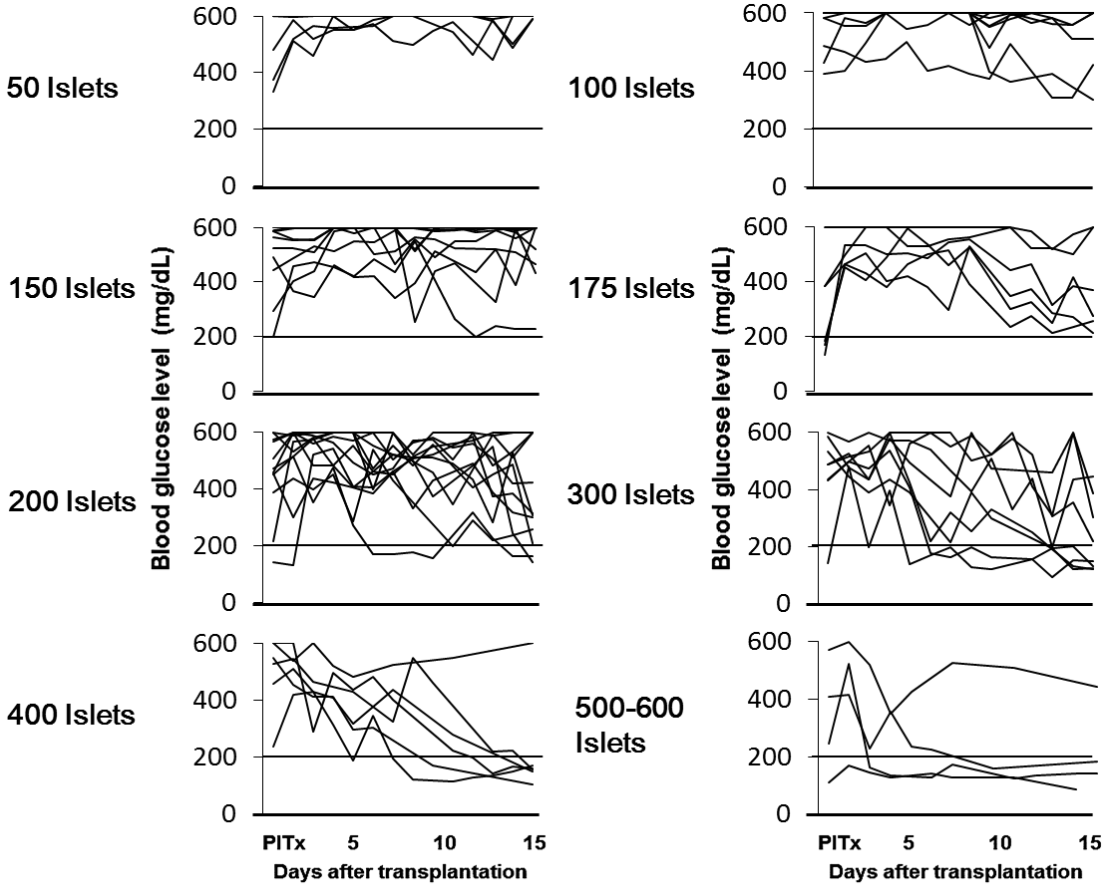
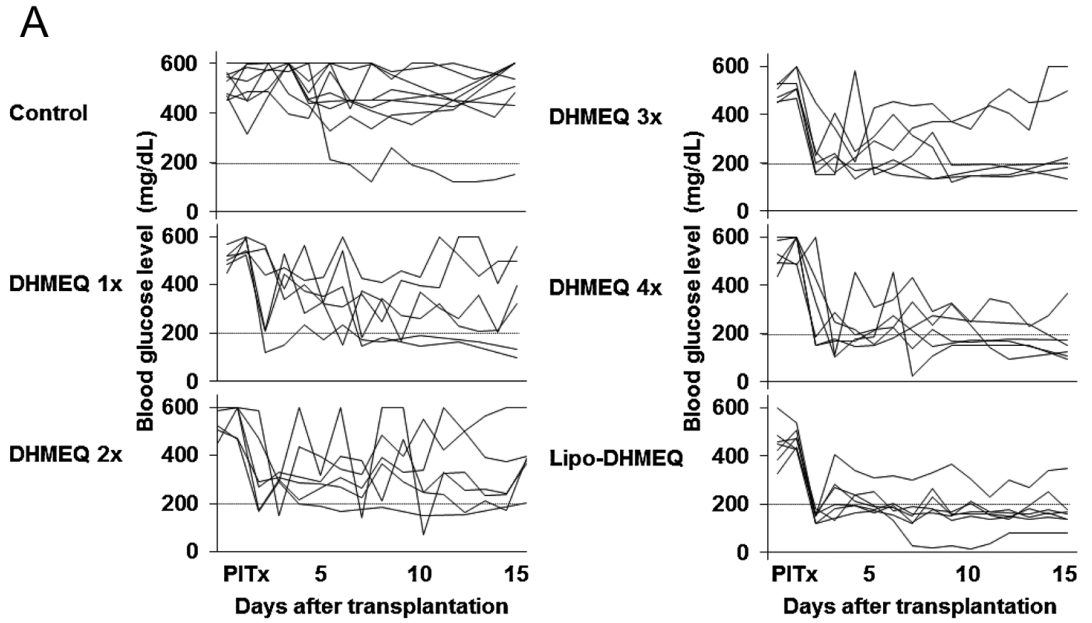


図 4. C57BL/6 マウスから得られた膵島 50、100、150、175、200、300、400、500 個を糖尿病化したレシピエントマウスに移植した。膵島 50、100、150、175 個を移植した群では、全例移植 14 日後までに血糖正常化しなかった。膵島 200 個を移植した群では 17%、膵島 300 個では 50%、膵島 400 個では 67%、膵島 500-600 個では 75%で、移植 14 日後までに血糖正常化した

DHMEQ はマウスの門脈内膵島移植モデルで血糖正常化率を改善した

膵島移植における NF-κB 阻害剤 DHMEQ の効果を検証するため、大部分が移植後に血糖正常化しない移植膵島数のモデルにおいて DHMEQ を使用した。ドナーおよびレシピエントには、拒絶反応が起こらない同種同系マウスを用いた。C57BL/6 マウスから得られた 175 個の膵島を糖尿病化したレシピエントマウスに移植した後、腹腔内にDHMEQを、または静脈内にLiposomal DHMEQを20mg/kg投与した。対照群にvehicle（CMC＋DMSO）を腹腔内投与したところ、血糖正常化率は 11.1%であった。一方、DHMEQ 投与群では投与量依存性に血糖正常化率が改善し、DHMEQ 3×群では 66.7%、DHMEQ 4×群では 83.3%と、有意に改善した。Liposomal DHMEQ 投与群では、単回のみの静脈内投与により 85.7%で血糖正常化した（図 5A,B）。この実験において、全てのマウスに明らかな副作用を認めなかった。



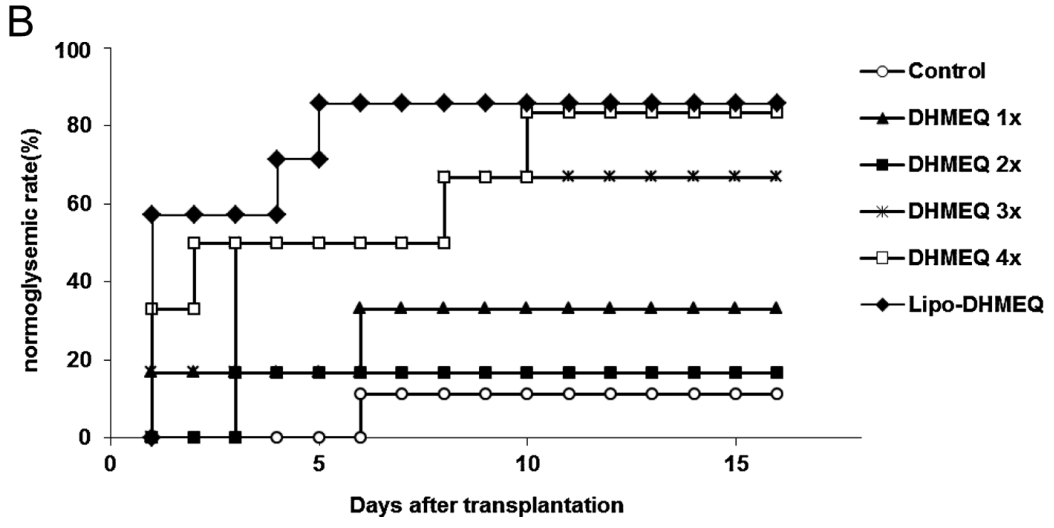
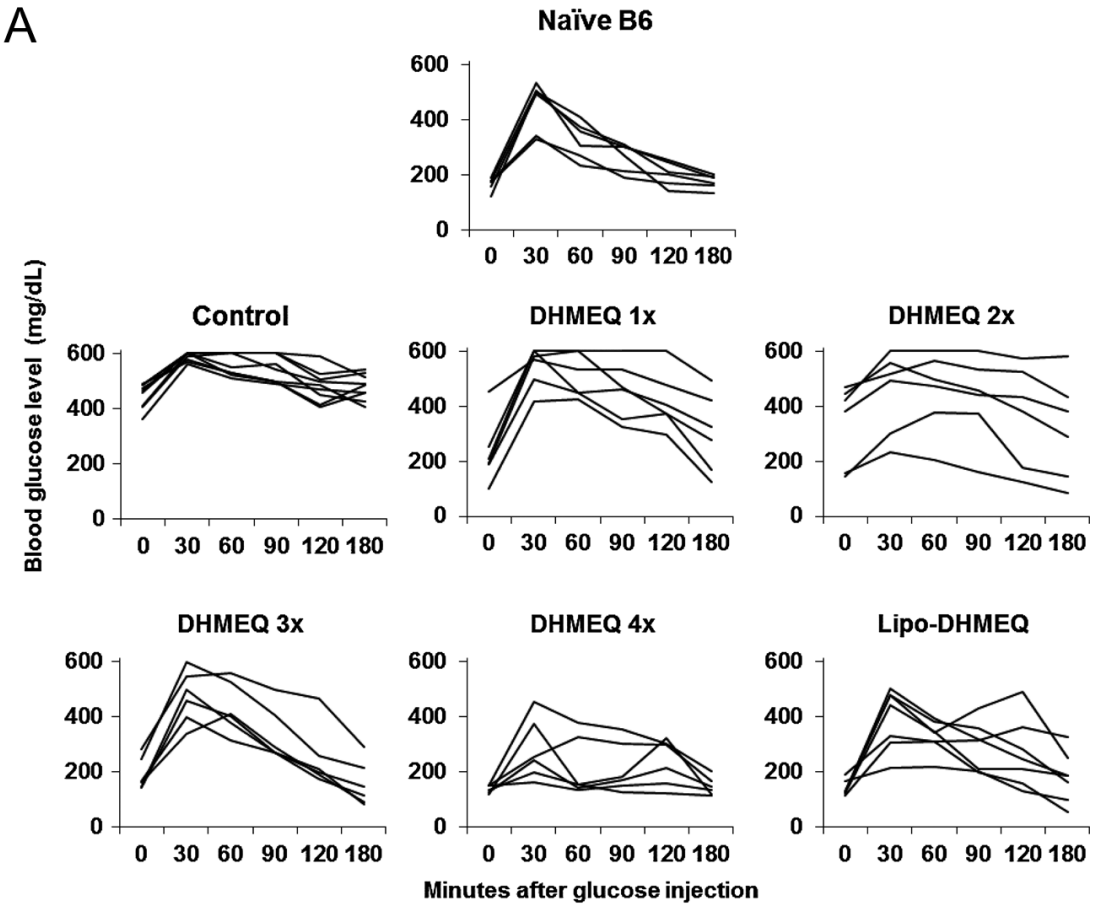


図 5. 175 個の膵島を糖尿病化したレシピエントマウスに移植した後、DHMEQ を投与した。対照群の血糖正常化率は 11.1%であった。DHMEQ 投与群では投与量依存性に血糖正常化率が改善し、DHMEQ 3×群では 66.7%、DHMEQ 4×群では 83.3%と、有意に改善した。Liposomal DHMEQ 投与群では、単回のみの静脈内投与により 85.7%で血糖正常化した(A)。移植後日数と血糖正常化率(B)(文献 78、FIGURE 1 より引用、一部改変)。

DHMEQ はマウス膵島移植における膵島グラフト機能を改善した

膵島グラフトの機能を評価するため、移植後 14 日目に IPGTT を施行した。DHMEQ 治療群では、IPGTT は正常のパターンを呈し、いずれの時点においても対照群より低い血糖値を示した(図 6A)。DHMEQ 3×群、DHMEQ 4×群および Liposomal DHMEQ 群では、対照群と比較して有意に膵島機能が改善した(図 6B)。



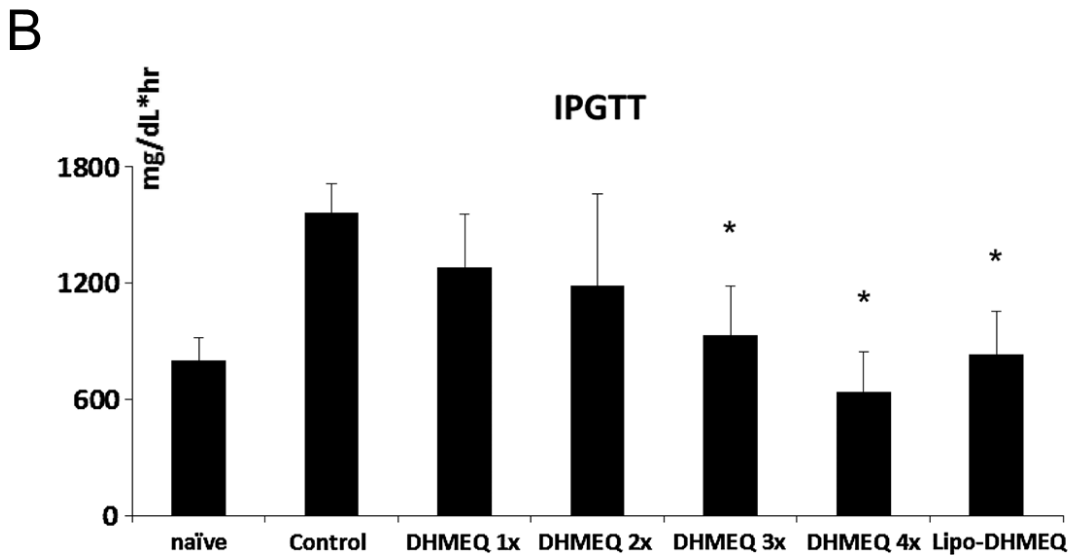
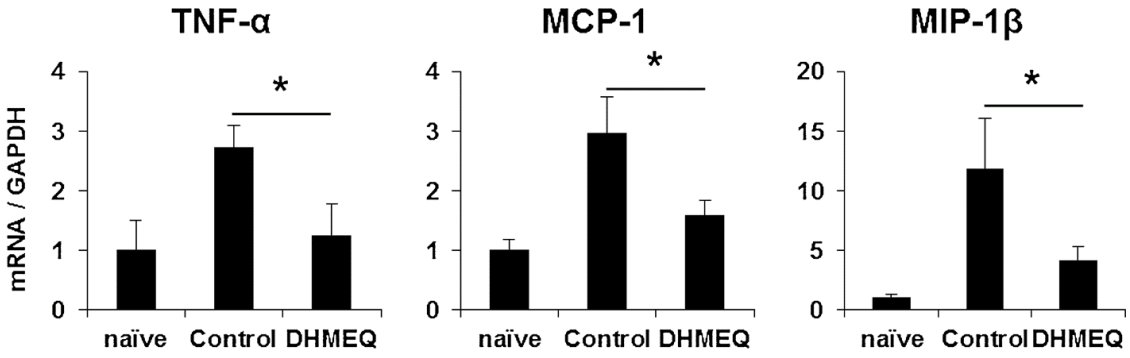


図 6. IPGTT のいずれの時点においても、治療群では正常の血糖パターンを示した(A)。DHMEQ 3×群、DHMEQ 4×群および Liposomal DHMEQ 群の血糖値は対照群と比較して有意に低値であった(B)。（* P<0.05 vs. control）（文献 78、FIGURE 2 より引用、一部改変）

DHMEQ は膵島移植後の肝内の炎症反応を抑制した

膵島移植の移植部位の炎症反応を評価するため、レシピエントマウスの肝臓を移植 12 時間後に採取し、炎症性サイトカインの mRNA 発現量を real-time PCR で測定した。移植後肝内の TNF-α、MCP-1、MIP-1ß、IL-1ß、IL-6 の mRNA 発現量は、対照群と比較して DHMEQ 治療群において有意に抑制された（図 7）。



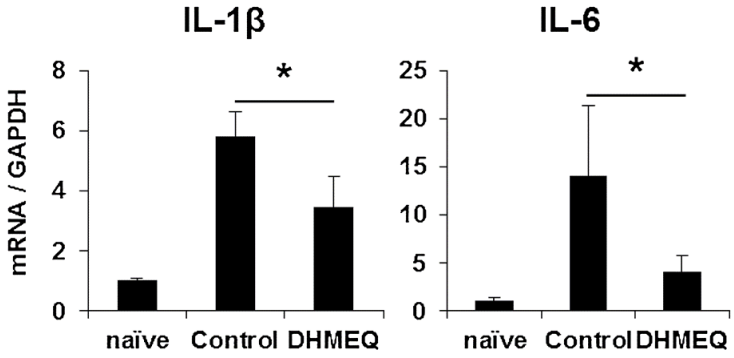


図 7. 膵島移植 12 時間後の肝内の TNF-α、MCP-1、MIP-1ß、IL-1ß、IL-6 mRNA 発現量は、対照群と比較し有意に低値であった。(*P<0.05 vs. control、各 n=5) (文献 78、FIGURE 3 より引用、一部改変)

DHMEQ は移植後マウスの血清 HMGB1 濃度を低下した

HMGB1 は損傷を受けた組織や細胞から放出されたる核タンパクで [71,74]、活性化したマクロファージからも産生され、炎症反応の引き金となる [73]。それゆえ、膵島移植における NF-κB 阻害の影響を評価するため、血清の HMGB-1 濃度を測定した。STZ で糖尿病を誘導したマウスの膵島移植 12 時間後の血清 HMGB1 濃度は、移植を受けていない糖尿病化マウスと比較して有意に上昇した。一方、DHMEQ 投与群では移植後の HMGB1 濃度上昇が有意に抑制された(図 8)。

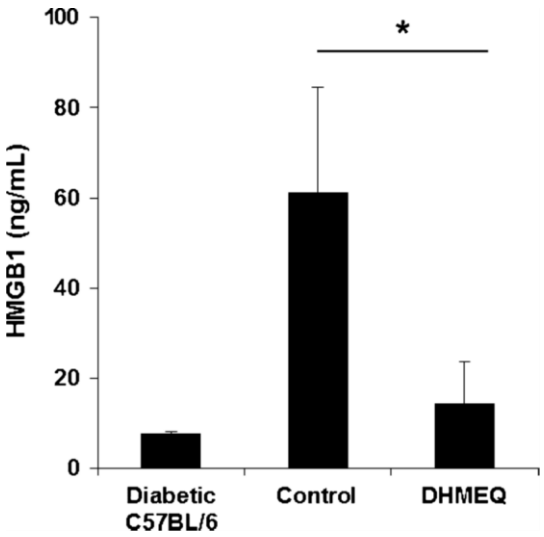


図 8. STZ で糖尿病を誘導したマウスの膵島移植 12 時間後の血清 HMGB1 濃度は、移植を受けていない糖尿病化マウスと比較して有意に上昇した。一方、DHMEQ 投与群では HMGB1 濃度上昇が有意に抑制された。(*P<0.05 vs. control、各 n=5) (文献 78、FIGURE 4 より引用)

DHMEQ は HMGB1 刺激によるマクロファージ細胞株の TNF-α 産生を抑制した

動物実験モデルにおいて、移植直後からの DHMEQ 投与によって、肝内の炎症性サイトカイン低下、血清 HMGB1 濃度の低下を伴う血糖正常化率およびグラフト機能の改善を認めた。ここで膵島移植後早期の膵島傷害で重要な役割を示すマクロファージに対し、DHMEQ がどのように影響するかを検証した。まずマクロファージの細胞株である RAW 264.7 細胞を DHMEQ 2.5～10μg/ml の存在下で培養し、HMGB1（20μg/ml）で刺激したところ、DHMEQ の用量依存性に RAW 264.7 細胞の活性化が抑制され、培養上清中の TNF-α 濃度が有意に低下した（図 9）。

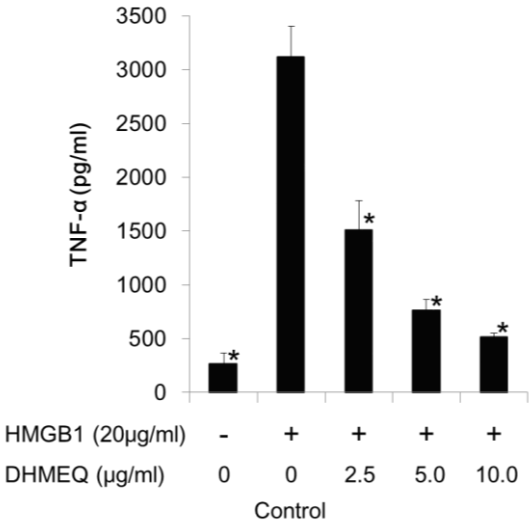


図 9. RAW 264.7 細胞を DHMEQ 2.5～10μg/ml の存在下で培養し、HMGB1（20μg/ml）で刺激したところ、DHMEQ の用量依存性に RAW 264.7 細胞の活性化が抑制され、培養上清中の TNF-α 濃度が有意に低下した。(*P<0.05 vs. control、各 n=3)

DHMEQ による NF-κB 核内移行阻害

DHMEQ は、TNF-α 刺激による NF-κB の核内移行を阻害する[77,79]。RAW264.7 細胞においては、LPS 刺激による NF-κB の核内移行が DHMEQ によって抑制される[82]。HMGB1 刺激によっても、DHMEQ が同様の機序で TNF-α 産生を抑制するかについて、NF-κB、p65 サブユニットの蛍光免疫染色によって検証を試みた。

条件設定のために RAW264.7 細胞を LPS 1μg/ml で 30 分間刺激し、一次抗体 1 時間もしくは 2 時間、二次抗体 15 分、30 分、45 分、60 分間暴露したところ、一次抗体、二次抗体とも、長時間の暴露で強い蛍光を発した。この条件では LPS 刺激による p65 の核内移行は起こらなかった。

続いて LPS 5μg/ml で 60 分間刺激し、一次抗体 2 時間もしくは 6 時間、二次抗体 45 分間もしくは 2 時間暴露したところ、一次抗体、二次抗体とも 2 時間暴露で良好に蛍光を発した。また LPS 刺激により p65 は細胞質から核内へと移行した。

これを踏まえ、LPS 5 または 10μg/ml で 60 分間、HMGB1 20μg/ml で 60 分間または 24 時間刺激した後、一次抗体 2 時間、二次抗体 2 時間暴露した。LPS 刺激では 5 および 10μg/ml いずれにおいても p65 の核内移行を惹起したが、HMGB1 刺激では60分間の刺激でわずかに核内移行を認めるのみであった（図 10）。さらに HMGB1 刺激時間の条件設定の後、DHMEQ の効果を検討するためには、高価な HMGB1 の試薬を用い、繰り返し実験する必要があると考えられた。

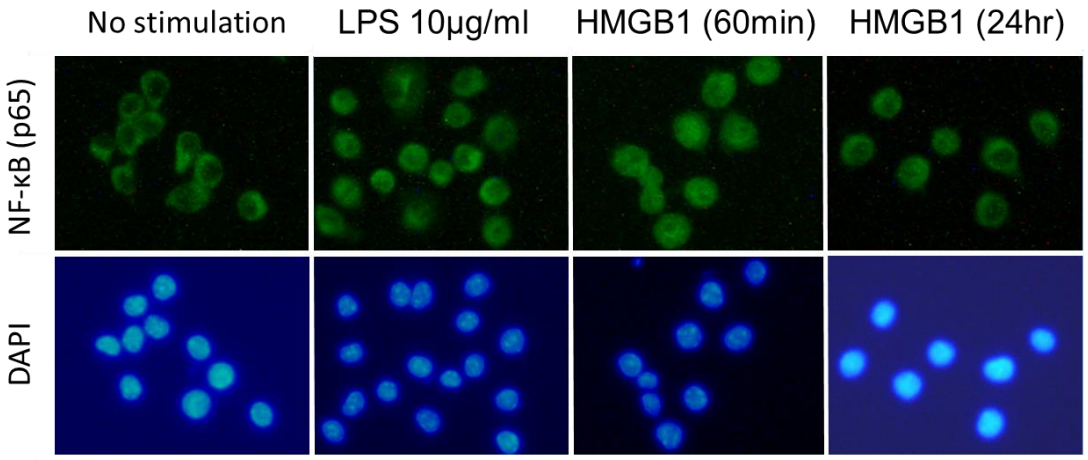


図 10. RAW 264.7 細胞を LPS 10μg/ml で 60 分、HMGB1 20μg/ml で 60 分もしくは 24 時間刺激した。LPS 刺激により p65 は核内に移行したが、HMGB1 刺激による p65 の核内移行は不十分であった。

NF-κB は、TNF-α、IL-1、LPS、紫外線、ホルボールエステル[83]や、HMGB1[84]によって活性化する。TNF-α は、HMGB1 が主に RAGE と結合することで、NF-κB 経路を介して産生される[84]。また DHMEQ が NF-κB に対する高い選択的結合性[85]を持つことから、HMGB1 刺激によっても NF-κB の核内移行を阻害するという機序で TNF-α を抑制したと考えられるため、これ以上の検索を試みなかった。

DHMEQ は HMGB1 によって活性化したマクロファージから膵島を保護した

活性化したマクロファージは膵島移植後早期のグラフト傷害で中心的な役割を果たす[44,52]。活性化マクロファージが引き起こす膵島傷害に対する、DHMEQ による NF-κB 阻害効果を検証するため、膵島とマクロファージの共培養モデルを用いた。分離されたマウス膵島 200 個を、事前に HMGB1 で刺激した RAW 264.7 細胞と共培養した。24 時間後、膵島のみを培養した群における膵島数は不変であった。HMGB1 で刺激された RAW 264.7 細胞と共培養した対照群(vehicle 添加)では、12 時間後および 24 時間後に膵島数がそれぞれ 189±7.3 個、133±15 個に減少していた。一

方、DHMEQ 添加により、膵島数の減少は有意に抑制され、24 時間後においても 194±2.8 個であった(図 11A)。また DHMEQ 添加により培養上清中の HMGB1、TNF-α、IL-6 のタンパク量は vehicle 添加群と比較して有意に減少した(図 11B,C,D)。

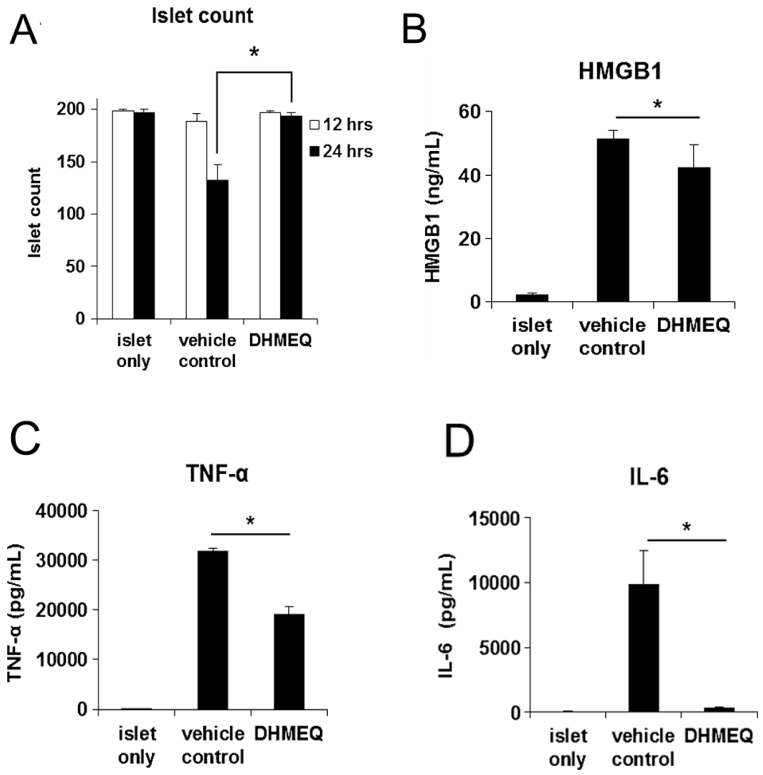


図 11. 分離されたマウス膵島を、事前に HMGB1 で刺激した RAW 264.7 細胞と共培養した。24 時間後、膵島のみを培養した群における膵島数は不変であった。HMGB1 で刺激された RAW 264.7 細胞と共培養した対照群では、12 時間後および 24 時間後に膵島数がそれぞれ 189±7.3 個、133±15 個に減少していた。一方、DHMEQ 添加により、膵島数の減少は有意に抑制され、24 時間後においても 194±2.8 個であった(A)。DHMEQ 添加により培養上清中の HMGB1 (B)、TNF-α (C)、IL-6 (D)のタンパク量は vehicle 添加群と比較して有意に減少した(*P<0.05 vs. control、各 n=4)(文献 78、FIGURE 5 より引用、一部改変)。

炎症性サイトカインにより破壊された膵島からの HMGB1 放出

マクロファージが産生する炎症性サイトカインによる膵島傷害と HMGB1 との関係を検証した。まず膵島 200 個を IFN-γ、TNF-α、IL-1β (各 20ng/ml)を添加した培地 200μlで 24 時間培養した。MTT によって求めた膵島の viability は、対照群が 146±22 個相当であったのに対し、サイトカイン添加群では 80±1.8 個相当と有意に低下していた(図 12A)。しかし、この時の培養上清中の HMGB1 は両群とも著明に上昇しており、有意差を認めなかった(図 12B)。

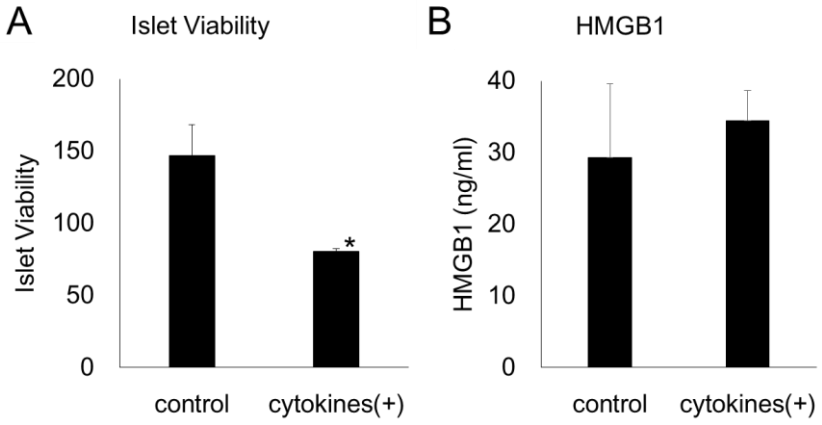


図 12. 膵島 200 個を IFN-γ、TNF-α、IL-1β (各 20ng/ml)を添加した培地 200μlで 24 時間培養した。MTT によって求めた膵島の viability は、対照群が 146±22 個相当であったのに対し、サイトカイン添加群では 80±1.8 個相当と有意に低下していた(A)。しかし、この時の培養上清中の HMGB1 は両群とも著明に上昇しており、有意差を認めなかった(B)。(*P<0.05 vs. control)

サイトカインを添加していない対照群において、24 時間培養後の膵島が相当数破壊されていることから、対照群においても上清中の HMGB1 濃度が上昇した。これは膵島数に対して培地の量が不十分だったためと考えられた。Wachlin らの報告 [86] を参考とし、膵島 200 個に対し培地の量を 1.5ml とした。

次に、IFN-γ、TNF-α、IL-1β (各 20ng/ml) の存在下で DHMEQ を添加して膵島 200 個を培養した。これらの炎症性サイトカインによる刺激により、膵島は上清中の HMGB1 の有意な上昇を伴って破壊された。しかし、培地への DHMEQ 添加の有無は破壊された膵島数や上清中の HMGB1 の濃度上昇を用量依存性に抑制する傾向を認めたが、有意ではなかった(図 13A,B)。これは DHMEQ が、添加された炎症性サイトカインにより、膵島内に存在するドナー由来のマクロファージの活性化を抑制するためと考えられた。

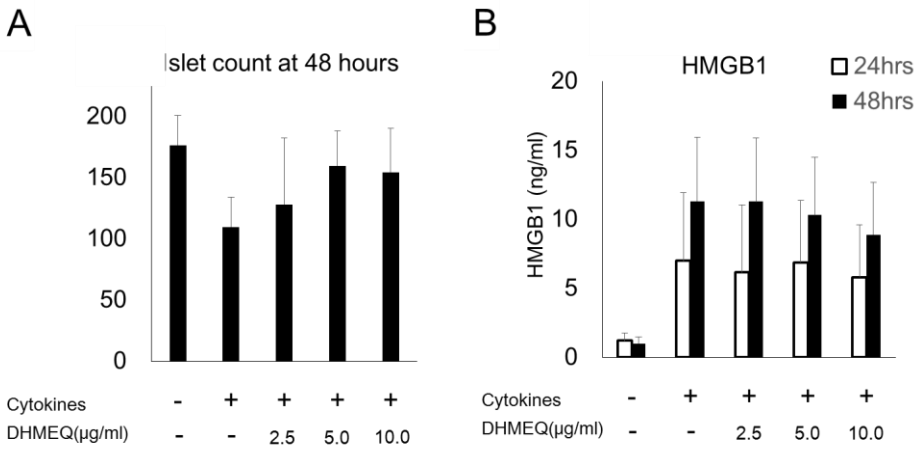


図 13. IFN-γ、TNF-α、IL-1β（各 20ng/ml）の存在下で DHMEQ を添加して膵島を培養した。これらの炎症性サイトカインによる刺激の後、膵島は上清中の HMGB1 の上昇を伴って破壊された。しかし、培地への DHMEQ 添加の有無は破壊された膵島数や培養上清中の HMGB1 の濃度に影響を与えなかった。（各 n=3）

考察

本研究において、NF-κB 阻害剤として、抗生物質 epoxyquinomicin から誘導された[76]低分子物質であるDHMEQを用いた。DHMEQは核内移行のレベルでNF-κBを阻害するが、この過程はIκBやc-Jun N-terminal kinase、caspaseの活性経路には影響を及ぼさない[77]。さらにDHMEQはp65、cRel、RelB、p50のような、DNA結合に重要なRelファミリーの成分に直接結合する[87]。このことがDHMEQのNF-κBに対する高い選択的阻害性と低い毒性の理由と考えられる。DHMEQの抗炎症効果により、ラットの腸管虚血再灌流モデルにおいてTNF-αおよびIL-6の産生を抑制し、生存率を著明に改善する[88]。またヒト滑膜細胞[89]や角化細胞[90]、マウスにおける関節炎[91]、ぶどう膜炎[92]、腸炎モデル[93]においても抗炎症効果を有する。さらにβ細胞の細胞株であるINS-1細胞において、DHMEQがTNF-αによって引き起こされる細胞障害を防止する[94]。

本研究で、わずか175個の膵島を移植するマウス膵島移植モデルにおいて、移植直後の短期間DHMEQを投与することが、血糖正常化率を改善することを示した。この効果は膵島を移植されたレシピエントの肝内で、膵島に傷害を引き起こすことが知られている[74,95]炎症性サイトカインのmRNAを有意に減少させたことと関連していた。

またマウス膵島移植後早期のレシピエントにおいて、肝内の炎症性サイトカインの増加に加えて血清HMGB1濃度上昇が起こっていた。これはHMGB1が移植直後に血中へと放出され、抗HMGB1特異的抗体により早期グラフト傷害が抑制されることを示したMatsuokaらの報告[46]と類似する。さらにGaoらは、抗HMGB1モノクローナル抗体がTNF-αとIL-1β産生を減少させ、膵島のviabilityを改善する[96]と報告した。本研究では、膵島移植におけるDHMEQによる効果を解明するため、HMGB1とマクロファージの活性化に着目した。HMGB1はマクロファージなどの免疫細胞から分泌されるだけでなく、β細胞を始めとする細胞や組織が損傷した際にも放出される[74]。すなわち活性化した免疫細胞から分泌されるものと、傷害された膵島グラフトから放出されるものの両方が、膵島移植後の血清HMGB1上昇の原因である。

本研究では、同種同系マウスの膵島移植モデルにおいて、DHMEQが有意に移植後早期の血清HMGB1濃度を低下させ、血糖正常化率とグラフト機能を改善したことを示した。この結果に基づき、次にHMGB1とマクロファージによる膵島傷害との関連について示した。まずHMGB1（20μg/ml）添加によるマクロファージの活性化がDHMEQで抑制されるか検証しところ、HMGB1で刺激したマクロファージ細胞株RAW 264.7細胞において、DHMEQ 2.5～10μg/mlを添加することにより、TNF-α分泌が有意に抑制された。この結果は、LPSで刺激したRAW 264.7細胞と骨髄由来のマクロファージにおいて、DHMEQ添加が炎症性サイトカインおよび誘導型一

酸化窒素合成、貪食作用を阻害するというSuzukiらの報告[82,97]と一致する。また活性化したマクロファージが分泌する炎症性サイトカインであるIL-1は、膵β細胞の壊死とHMGB1放出を引き起こす[74]。さらにTNF-αおよびIFN-γが、マクロファージの殺作用を増強する炎症性サイトカイン分泌を促進する[98,99]。本研究では活性化マクロファージが引き起こす膵島傷害に対するDHMEQの効果を検証するため、HMGB1で刺激したRAW 264.7細胞と膵島との共培養モデルを用いた。DHMEQは膵島の減少を防止し、同時に培養上清中のHMGB1、IL-6、TNF-αを有意に抑制した。

培養された膵島がDHMEQによって直接保護されないことを明らかにするため、RAW 264.7細胞が存在しない環境において、IFN-γ、TNF-α、IL-1β（各20ng/ml）の存在下でDHMEQを添加して膵島を培養した。これらの炎症性サイトカインによる刺激の後、膵島は上清中のHMGB1の上昇を伴って破壊された。しかし、培地へのDHMEQ添加の有無は膵島破壊の程度や培養上清中のHMGB1濃度に有意な影響を与えなかった。

以上の結果より、肝内に膵島が移植された後、活性化マクロファージが分泌する炎症性サイトカインにより膵島グラフトが傷害され、破壊される。破壊された膵島から放出されたものに加え、マクロファージ自体が分泌するHMGB1は、さらにマクロファージを活性化し、早期グラフト傷害を助長する。DHMEQは、HMGB1が誘発するマクロファージの活性化を阻害し、活性化マクロファージが分泌する炎症性サイトカインによる傷害から膵島を保護することで、血糖正常化率を改善することが示唆された。

本研究では、静注用製剤であるLiposomal DHMEQも使用した。Liposomal DHMEQで治療されたマウスは、膵島移植後、より早く血糖正常化した。DHMEQ 4×腹腔内投与において膵島グラフトの機能が維持されたが、血糖正常化率（p=0.915）、IPGTTでの血糖値（p=0.142）のいずれにおいても、Liposomal DHMEQ群との有意差を認めなかった。しかしながら、DHMEQの総投与量は、Liposomal DHMEQ群が20mg/kgであるのに対し、DHMEQ 4×群では80mg/kgと多く、Liposomal DHMEQ製剤の方がより強い効果を持つと考えられた。Liposomeは生体内でマクロファージなどの単核貪食細胞に取り込まれる[100,101]。炎症反応におけるマクロファージの重要な役割である貪食作用[101]によって、liposome製剤が直接マクロファージに取り込まれることが、高い有効性の理由と考えられる。DHMEQの臨床応用に際しては、製剤による薬物動態と投与経路の違いを認識することが重要である。

本研究の結果は、NF-κB阻害によりマクロファージの活性を制御することにより、門脈内膵島移植で生じる傷害から膵島を保護することを示している。NF-κB阻害という治療戦略は、HMGB1とマクロファージによるフィードバックループを遮断し、より少ない膵島で膵島移植を成功させるために不可欠であると考える。

総括および結論

・新規低分子 NF-κB 阻害剤 DHMEQ は、同種同系マウスの門脈内膵島移植モデルにおいて、血糖正常化率を改善した。
・DHMEQ はマウス膵島移植における膵島グラフト機能を改善した。
・DHMEQ は膵島移植後の肝内の炎症性サイトカイン（TNF-α、MCP-1、MIP-1β、IL-1β、IL-6）の発現を抑制した。
・DHMEQ は膵島移植後のレシピエントの血清 HMGB1 濃度を低下させた。
・DHMEQ は HMGB1 刺激によるマクロファージ細胞株の TNF-α 産生を抑制した。
・DHMEQ はマクロファージ細胞株と膵島との共培養において、HMGB1 によって引き起こされる膵島の喪失を抑制し、培養上清中の HMGB1、IL-6、TNF-α タンパクを低下させた。
・マクロファージが産生する TNF-α、IL-1β、IFN-γ は、膵島を破壊し、培養上清中の HMGB1 を増加させた。マクロファージ細胞株の非存在下では、DHMEQ による膵島破壊抑制効果および HMGB1 低下効果を認めなかった。

本研究により、DHMEQ による NF-κB 阻害が、マウス同種同系膵島移植における早期グラフト傷害を抑制することが示された。活性化したマクロファージが産生し、破壊された膵島からも放出される HMGB1 がさらにマクロファージを活性化し、マクロファージが分泌する炎症性サイトカインによって膵島の破壊が引き起こされ HMGB1 が放出されるというフィードバックループにおいて、DHMEQ による NF-κB 阻害がマクロファージの活性化を抑制することで膵島の破壊を防止するという機序が明らかになった。

NF-κB は膵島移植後早期のグラフト傷害のみならず、その後に起こる拒絶反応の中心となる免疫担当細胞の機能においても極めて重要な役割を有する。既にマウスの同種異系膵島移植モデルにおいて、DHMEQ の免疫抑制効果によって、長期のグラフト生存が得られることが示されている。今後、炎症反応および免疫機構がよりヒトに近い大動物での研究が待たれる。最終的には臨床において、DHMEQ が 1 人のドナーから得られた膵島のみで長期のインスリン離脱を可能とする画期的な治療となることが期待される。

謝辞

本研究にあたり、北海道大学大学院医学研究科移植外科学講座、山下健一郎特任教授ならびに、北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I、藤堂省前教授（現、社会医療法人雪の聖母会聖マリア病院研究所所長）には、多大なるご指導を頂き、心から感謝申し上げます。また基礎論文の作成、動物実験の遂行に大変熱心なご指導、ご協力頂きましたカロリンスカ大学病院移植外科学分野クリニカルフェロー・博士研究員、渡辺正明先生に深く感謝申し上げます。本論文作成にあたり、あたたかく激励、ご指導頂きました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I、武冨紹信教授に深謝申し上げます。本研究になくてはならない DHMEQ を開発、提供して下さった、愛知医科大学分子標的医薬探索寄付講座、梅澤一夫教授、Liposomal DHMEQ を作製して下さった北海道大学大学院薬学研究院、中村孝司助教、同じく薬学研究院、原島秀吉教授に深くお礼申し上げます。早朝から深夜まで実験に協力して下さった北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I、腰塚靖之先生、吉田雅先生、小倉正臣先生、日々貴重なご意見を下さった消化器外科 I 大学院生の皆様に感謝の気持ちを申し上げ、謝辞にかえさせていただきます。

引用文献

1 Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H., Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053 (2004).

2 Karvonen, M. *et al.*, Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* 23, 1516-1526 (2000).

3 Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32 Suppl. 1, S62-67 (2009).

4 The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N. Engl. J. Med.* 329, 977-986 (1993).

5 Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes* 46, 271-286 (1997).

6 Sutherland, D.E., Gruessner, R.W., & Gruessner, A.C., Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. *World J. Surg.* 25, 487-496 (2001).

7 Secchi, A. *et al.*, Effect of pancreas transplantation on life expectancy, kidney function and quality of life in uraemic type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 34 Suppl. 1, S141-144 (1991).

8 Fioretto, P., Steffes, M.W., Sutherland, D.E., Goetz, F.C., & Mauer, M., Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N. Engl. J. Med.* 339, 69-75 (1998).

9 Stratta, R.J., Mortality after vascularized pancreas transplantation. *Surgery* 124, 823-830 (1998).

10 Hathout, E., Lakey, J., & Shapiro, J., Islet transplant: an option for childhood diabetes? *Arch. Dis. Child* 88, 591-594 (2003).

11 Ballinger, W.F. & Lacy, P.E., Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72, 175-186 (1972).

12 Reckard, C.R., Ziegler, M.M., & Barker, C.F., Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets. *Surgery* 74, 91-99 (1973).

13 Kemp, C.B., Knight, M.J., Scharp, D.W., Ballinger, W.F., & Lacy, P.E.,

Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia* 9, 486-491 (1973).

14 Lorenz, D. *et al.*, Transplantation of isolated islets of Langerhans in diabetic dogs. I. Results after allogeneic intraportal islet transplantation. *J. Surg. Res.* 27, 181-192 (1979).

15 Mirkovitch, V. & Campiche, M., Successful intrasplenic autotransplantation of pancreatic tissue in totally pancreatectomised dogs. *Transplantation* 21, 265-269 (1976).

16 Najarian, J.S., Islet cell transplantation in treatment of diabetes. *Hosp. Pract.* 12, 63-69 (1977).

17 Froberg, M.K., Leone, J.P., Jessurun, J., & Sutherland, D.E., Fatal disseminated intravascular coagulation after autologous islet transplantation. *Hum. Pathol.* 28, 1295-1298 (1997).

18 Walsh, T.J., Eggleston, J.C., & Cameron, J.L., Portal hypertension, hepatic infarction, and liver failure complicating pancreatic islet autotransplantation. *Surgery* 91, 485-487 (1982).

19 Ricordi, C., Lacy, P.E., Finke, E.H., Olack, B.J., & Scharp, D.W., Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37, 413-420 (1988).

20 Robertson, G.S., Chadwick, D.R., Contractor, H., James, R.F., & London, N.J., The optimization of large-scale density gradient isolation of human islets. *Acta Diabetol.* 30, 93-98 (1993).

21 Lakey, J.R. *et al.*, Intraductal collagenase delivery into the human pancreas using syringe loading or controlled perfusion. *Cell Transplant.* 8, 285-292 (1999).

22 Linetsky, E. *et al.*, Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes* 46, 1120-1123 (1997).

23 International Islet Transplant Registry Newsletter. 7 (1996).

24 Boker, A. *et al.*, Human islet transplantation: update. *World J. Surg.* 25, 481-486 (2001).

25 Kaufman, D.B. *et al.*, Beneficial and detrimental effects of RBC-adsorbed antilymphocyte globulin and prednisone on purified canine islet autograft and allograft function. *Transplantation* 51, 37-42 (1991).

26 Rilo, H.L. *et al.*, Acceleration of chronic failure of intrahepatic canine islet autografts by a short course of prednisone. *Transplantation* 57, 181-187 (1994).

[27] Zeng, Y. *et al.*, The effect of prednisone on pancreatic islet autografts in dogs. *Surgery* 113, 98-102 (1993).

[28] Shapiro, A.M. *et al.*, Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343, 230-238 (2000).

[29] Ryan, E.A. *et al.*, Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 51, 2148-2157 (2002).

[30] Shapiro, A.M., Ricordi, C., & Hering, B., Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. *Lancet* 362, 1242 (2003).

[31] Ricordi, C., Lakey, J.R., & Hering, B.J., Challenges toward standardization of islet isolation technology. *Transplant. Proc.* 33, 1709 (2001).

[32] Benhamou, P.Y. *et al.*, Human islet isolation in 104 consecutive cases. Factors affecting isolation success. *Transplantation* 57, 1804-1810 (1994).

[33] Lakey, J.R. *et al.*, Effect of core pancreas temperature during cadaveric procurement on human islet isolation and functional viability. *Transplantation* 73, 1106-1110 (2002).

[34] Zeng, Y., Torre, M.A., Karrison, T., & Thistlethwaite, J.R., The correlation between donor characteristics and the success of human islet isolation. *Transplantation* 57, 954-958 (1994).

[35] Ketchum, R.J. *et al.*, Analysis of donor age and cold ischemia time as factors in cadaveric human islet isolation. *Transplant. Proc.* 26, 596-597 (1994).

[36] Lakey, J.R., Rajotte, R.V., Warnock, G.L., & Kneteman, N.M., Human pancreas preservation prior to islet isolation. Cold ischemic tolerance. *Transplantation* 59, 689-694 (1995).

[37] Kuroda, Y. *et al.*, Oxygenation of the human pancreas during preservation by a two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold-storage method. *Transplantation* 54, 561-562 (1992).

[38] Deai, T., Tanioka, Y., Suzuki, Y., & Kuroda, Y., The effect of the two-layer cold storage method on islet isolation from ischemically damaged pancreas. *Kobe J. Med. Sci.* 45, 191-199 (1999).

[39] Matsumoto, S. *et al.*, Effect of the two-layer (University of Wisconsin solution-perfluorochemical plus O2) method of pancreas preservation

on human islet isolation, as assessed by the Edmonton Isolation Protocol. *Transplantation* 74, 1414-1419 (2002).

40 Matsumoto, S. *et al.*, Efficacy of the oxygen-charged static two-layer method for short-term pancreas preservation and islet isolation from nonhuman primate and human pancreata. *Cell Transplant.* 11, 769-777 (2002).

41 Bennet, W. *et al.*, Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? *Diabetes* 48, 1907-1914 (1999).

42 Titus, T.T. *et al.*, Adverse outcome of human islet-allogeneic blood interaction. *Transplantation* 75, 1317-1322 (2003).

43 Johansson, H. *et al.*, Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes* 54, 1755-1762 (2005).

44 Piemonti, L. *et al.*, Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes* 51, 55-65 (2002).

45 Satoh, M. *et al.*, Successful islet transplantation to two recipients from a single donor by targeting proinflammatory cytokines in mice. *Transplantation* 83, 1085-1092 (2007).

46 Matsuoka, N. *et al.*, High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 735-743.

47 Ozmen, L. *et al.*, Inhibition of thrombin abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction triggered by isolated human islets: possible application of the thrombin inhibitor melagatran in clinical islet transplantation. *Diabetes* 51, 1779-1784 (2002).

48 Moberg, L., Korsgren, O., & Nilsson, B., Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood. *Clin. Exp. Immunol.* 142, 125-131 (2005).

49 Cui, W. *et al.*, Thrombomodulin improves early outcomes after intraportal islet transplantation. *Am. J. Transplant.* 9, 1308-1316 (2009).

50 Clayton, H.A., Davies, J.E., Sutton, C.D., Bell, P.R., & Dennison, A.R., A coculture model of intrahepatic islet transplantation: activation of Kupffer cells by islets and acinar tissue. *Cell Transplant.* 10, 101-108 (2001).

[51] Barshes, N.R., Wyllie, S., & Goss, J.A., Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J. Leukoc. Biol.* 77, 587-597 (2005).

[52] Bottino, R. *et al.*, Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes* 47, 316-323 (1998).

[53] Arnush, M. *et al.*, IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *J. Clin. Invest.* 102, 516-526 (1998).

[54] Heitmeier, M.R., Scarim, A.L., & Corbett, J.A., Interferon-gamma increases the sensitivity of islets of Langerhans for inducible nitric-oxide synthase expression induced by interleukin 1. *J. Biol. Chem.* 272, 13697-13704 (1997).

[55] Moberg, L. *et al.*, Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet* 360, 2039-2045 (2002).

[56] Contreras, J.L. *et al.*, Activated protein C preserves functional islet mass after intraportal transplantation: a novel link between endothelial cell activation, thrombosis, inflammation, and islet cell death. *Diabetes* 53, 2804-2814 (2004).

[57] Yin, D. *et al.*, Liver ischemia contributes to early islet failure following intraportal transplantation: benefits of liver ischemic-preconditioning. *Am. J. Transplant.* 6, 60-68 (2006).

[58] Farney, A.C. *et al.*, Inhibition of pancreatic islet beta cell function by tumor necrosis factor is blocked by a soluble tumor necrosis factor receptor. *Transplant. Proc.* 25, 865-866 (1993).

[59] Brandhorst, D., Brandhorst, H., Zwolinski, A., Nahidi, F., & Bretzel, R.G., High-dosed nicotinamide decreases early graft failure after pig to nude rat intraportal islet transplantation. *Transplantation* 73, 74-79 (2002).

[60] Arita, S. *et al.*, Prevention of primary nonfunction of canine islet autografts by treatment with pravastatin. *Transplantation* 73, 7-12 (2002).

[61] Contreras, J.L. *et al.*, Simvastatin induces activation of the serine-threonine protein kinase AKT and increases survival of isolated human pancreatic islets. *Transplantation* 74, 1063-1069 (2002).

62 Riachy, R. *et al.*, Beneficial effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on cytokine-treated human pancreatic islets. *J. Endocrinol.* 169, 161-168 (2001).

63 Juang, J.H., Kuo, C.H., & Hsu, B.R., Beneficial effects of pentoxiphylline on islet transplantation. *Transplant. Proc.* 32, 1073-1075 (2000).

64 Chen, Z.J., Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* 7, 758-765 (2005).

65 Zhang, L. *et al.*, Cysteine methylation disrupts ubiquitin-chain sensing in NF-kappaB activation. *Nature* 481, 204-208 (2012).

66 Hayden, M.S., West, A.P., & Ghosh, S., NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-6780 (2006).

67 Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G.Y., Nizet, V., & Karin, M., IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434, 1138-1143 (2005).

68 Karin, M. & Greten, F.R., NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749-759 (2005).

69 Takahashi, T. *et al.*, Donor pretreatment with DHMEQ improves islet transplantation. *J. Surg. Res.* 163, e23-34.

70 Dumitriu, I.E. *et al.*, Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J. Immunol.* 174, 7506-7515 (2005).

71 Lotze, M.T. & Tracey, K.J., High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 331-342 (2005).

72 Palumbo, R. *et al.*, Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *J. Cell Biol.* 179, 33-40 (2007).

73 Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M.E., Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195 (2002).

74 Steer, S.A., Scarim, A.L., Chambers, K.T., & Corbett, J.A., Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1. *PLoS Med.* 3, e17 (2006).

75 Bianchi, M.E. & Manfredi, A.A., High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity.

Immunol Rev. 220, 35-46 (2007).

76 Matsumoto, N. *et al.*, Synthesis of NF-kappaB activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 865-869 (2000).

77 Ariga, A., Namekawa, J., Matsumoto, N., Inoue, J., & Umezawa, K., Inhibition of tumor necrosis factor-alpha -induced nuclear translocation and activation of NF-kappa B by dehydroxymethylepoxyquinomicin. *J. Biol. Chem.* 277, 24625-24630 (2002).

78 Kuraya, D. *et al.*, Efficacy of DHMEQ, a NF-kappaB inhibitor, in islet transplantation: I. HMGB1 suppression by DHMEQ prevents early islet graft damage. *Transplantation* 96, 445-453.

79 Suzuki Y, S.C., Ohno O, et al., Preparation and biological activities of optically active dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel NF-κB inhibitor. *Tetrahedron* 60 (2004).

80 Takahashi, T. *et al.*, Donor pretreatment with DHMEQ improves islet transplantation. *J. Surg. Res.* 163, e23-34 (2010).

81 Yamada, S., Yakabe, K., Ishii, J., Imaizumi, H., & Maruyama, I., New high mobility group box 1 assay system. *Clin. Chim. Acta.* 372, 173-178 (2006).

82 Suzuki, E. & Umezawa, K., Inhibition of macrophage activation and phagocytosis by a novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Biomed. Pharmacother.* 60, 578-586 (2006).

83 Sen, R. & Baltimore, D., Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716 (1986).

84 Kokkola, R. *et al.*, RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand. J. Immunol.* 61, 1-9 (2005).

85 Yamamoto, M., Hirano, S., Vogel, C.F., Cui, X., & Matsumura, F., Selective activation of NF-kappaB and E2F by low concentration of arsenite in U937 human monocytic leukemia cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 22, 136-146 (2008).

86 Wachlin, G. *et al.*, IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. *J. Autoimmun.* 20, 303-312 (2003).

87 Yamamoto, M., Horie, R., Takeiri, M., Kozawa, I., & Umezawa, K.,

Inactivation of NF-kappaB components by covalent binding of (-)-dehydroxymethylepoxyquinomicin to specific cysteine residues. *J. Med. Chem.* 51, 5780-5788 (2008).

88 Suzuki, T. *et al.*, The novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, prevents local and remote organ injury following intestinal ischemia/reperfusion in rats. *J. Surg. Res.* 149, 69-75 (2008).

89 Wakamatsu, K., Nanki, T., Miyasaka, N., Umezawa, K., & Kubota, T., Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor-kappaB nuclear translocation in a murine model of arthritis and cultured human synovial cells. *Arthritis Res. Ther.* 7, R1348-1359 (2005).

90 Cardile, V. *et al.*, Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor-kappaB inhibitor, prevents inflammatory injury induced by interferon-gamma and histamine in NCTC 2544 keratinocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, 679-683 (2010).

91 Kubota, T. *et al.*, NF-kappaB inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin suppresses osteoclastogenesis and expression of NFATc1 in mouse arthritis without affecting expression of RANKL, osteoprotegerin or macrophage colony-stimulating factor. *Arthritis Res. Ther.* 9, R97 (2007).

92 Iwata, D. *et al.*, Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis with nuclear factor-{kappa}B Inhibitor dehydroxy methyl epoxyquinomicin in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2077-2084 (2010).

93 Funakoshi, T. *et al.*, A novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice. *J. Crohns Colitis.* 6, 215-225 (2012).

94 Saisho, Y. *et al.*, Effects of DHMEQ, a novel nuclear factor-kappab inhibitor, on beta cell dysfunction in INS-1 cells. *Endocr. J.* 55, 433-438 (2008).

95 Saldeen, J., Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* 141, 2003-2010 (2000).

96 Gao, Q. *et al.*, TLR4 mediates early graft failure after intraportal islet transplantation. *Am. J. Transplant.* 10, 1588-1596.

97 Suzuki, E., Sugiyama, C., & Umezawa, K., Inhibition of inflammatory mediator secretion by (-)-DHMEQ in mouse bone marrow-derived

macrophages. *Biomed. Pharmacother* 63, 351-358 (2009).

98 Dale, D.C., Boxer, L., & Liles, W.C., The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112, 935-945 (2008).

99 O'Shea, J.J. & Murray, P.J., Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28, 477-487 (2008).

100 Kelly, C., Jefferies, C., & Cryan, S.A., Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. *J. Drug. Deliv.* 2011, 727241 (2011).

101 Ravichandran, K.S. & Lorenz, U., Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 964-974 (2007).