

タクロリムスが移植膵島の血管新生へ及ぼす影響に関する研究

著者	西村 隆一
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54514

博士論文

タクロリムスが移植膵島の血管新生へ及ぼす影響
に関する研究

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座先進外科学分野

西村 隆一

1. 要約

膵島移植は、重症1型糖尿病に対する治療法として既に臨床応用が開始されている。この新しい細胞移植療法は、従来行なわれてきた膵臓移植と比べ、安全・簡便・低侵襲などの利点を有しているが、現状では克服すべき課題も多い。

膵島移植の中でも、同種膵島移植は自家膵島移植に比べて長期的な膵島の機能やインスリン離脱率が低いことが報告されている。この結果に影響を及ぼす因子はいくつか考えられるが、自家膵島移植では使用せず、同種膵島移植で使用される免疫抑制剤もその1つに挙げられる。膵島移植の代表的な免疫抑制療法であるエドモントンプロトコールの主要要素であるラパマイシンは、血管新生抑制効果を有することが最近明らかになってきたが、現在膵島移植で標準的に使用されているタクロリムスが移植膵島の血管新生に及ぼす影響に関しては、これまで十分な検討が実施されていない。そこで本研究においては、**dorsal skinfold chamber** モデルと二光子顕微鏡を組み合わせた高感度イメージングシステムを用いて、タクロリムスが移植膵島の血管新生に及ぼす影響について検証した。また、レーザーマイクロダイセクション技術を導入し、ハイスループットリアルタイム PCR アレイを施行することにより、移植膵島の遺伝子発現の変化を解析した。

C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウスから分離された膵島を、dorsal skinfold chamber が装着されたレシピエントマウスへ移植した。レシピエントは、コントロール群 (n=9) とタクロリムス投与群 (n=7) の 2 群に分けて比較検証を行った。移植膵島に対する新生血管の変化を二光子顕微鏡で観察し、取得した画像は画像解析ソフト Volocity で 3D 構築し、新生血管体積を測定した。移植膵島の遺伝子発現については、BioMark 48.48 dynamic gene expression system を使用して解析を行った。

移植した膵島に対する血管新生は移植後 14 日以内に完了した。タクロリムス投与群の移植膵島に対する新生血管体積は、コントロール群に比べて有意に低値を示した ($P < 0.05$)。移植膵島の遺伝子発現に関しては、タクロリムス投与により血管誘導因子である *Vegfa* の上昇が確認されたが、細胞周期への影響は確認されなかった。

本研究により、タクロリムスは移植膵島からの血管誘導因子の放出制御を介さずに血管新生を抑制することが明らかとなった。移植膵島の血管新生への影響を考慮した免疫抑制療法の至適化が、同種膵島移植の成績を改善することが示唆された。

2. 研究背景

インスリンを分泌する膵ランゲルハンス島 B 細胞の機能不全によって引き起こされる 1 型糖尿病に対して、膵島移植は有効な治療法として確立されようとしている(1)。膵島移植はドナー膵臓からインスリンを分泌する膵島のみを分離し、レシピエントへ移植することによって移植膵島を生着させ、血糖をコントロールすることを目的としている。これまで 1 型糖尿病に対する移植療法として臓器そのものを移植する膵臓移植が主流であったが、手術侵襲が大きいという欠点を有している。これに比し、膵島移植は安全・簡便・低侵襲といった多くの魅力を備えている。

1970 年代から研究されてきた膵島移植は、近年の技術進歩に伴い実験的段階から臨床応用へと発展をとげた。特に 2000 年にカナダのアルバータ大学により開発されたエドモントンプロトコールは、糖尿病患者のインスリン離脱を可能にし、世界のスタンダードとなるに至っている(1)。その特徴として、ステロイド剤を用いない新規免疫抑制プロトコールの開発、新規消化酵素剤の使用、一人の患者に対し複数回の移植を施行、分離直後に移植する新鮮膵島移植の導入などの新しい方法を取り入れたことが挙げられる。しかし、目覚ましい技術の進歩にもかかわらず、一人の患者を治療するために複数のドナーを必要とし、

また、5年後のインスリン離脱率は10–15%に過ぎず、いまだ十分な成績に至っていないのが現状である(2)。膵島移植が今後医療として広く普及していくためには、一つの臓器で一人の患者を治癒するいわゆる“One-to-One”を確立させ、貴重な臓器提供を有効利用することが重要である。

膵島移植の中でも、膵動静脈奇形や慢性膵炎といった膵臓全摘を伴う良性疾患が対象となる自家膵島移植は、同種膵島移植に比べて少ないグラフト量で、長期に渡るグラフト生着や高いインスリン離脱率を得られるということがよく知られている(3, 4)。同種膵島移植の成績が劣る理由として、膵島分離に至るまでの冷保存時間が自家移植に比べて長いこと(5)、純化工程が必要であること(6)、また膵島グラフトに対する免疫反応を抑制するための免疫抑制剤の使用といった様々な要因が考えられるが、その中でも特に免疫抑制剤の影響が大きいと推察される(7-9)。免疫抑制剤が膵島移植へ及ぼす影響としては、アポトーシスやオートファジー誘導(10)、耐糖能障害(11)、炎症性メディエーター誘導によるviability低下(12)、細胞周期の制御(13)、移植膵島に対する新生血管抑制などが挙げられるが、これらの中でも特に新生血管抑制は、移植膵島生着にとって大きな障害となりうる。膵島移植では、膵島分離工程において消化酵素により膵島周囲の血管網が失われるため、膵臓移植と異なり、移植後、グラフトは無血管環境下に晒される。したがって、移植膵島が生着して機能するためには、早

急な血管網の構築が極めて重要である(14-16)。新生血管の組成については、ドナー膵島由来の血管内皮細胞よりもホスト由来の血管内皮細胞が重要な役割を担っているとの報告がある一方(17, 18)、新生血管の内皮細胞の約 30~40%はドナー膵島由来で、ドナー膵島由来の血管内皮細胞も重要な役割を担っているとの報告もあり(19, 20)、ドナー由来の血管内皮細胞の役割に関しては、いまだ一定の見解を得るに至っていない。いずれにしても、ホスト由来の血管内皮細胞は血管新生において重要な役割を担っている。

近年の様々な報告により、エドモンストンプロコールの主要免疫抑制剤であるラパマイシンが、腫瘍血管の制御のみならず、移植膵島の生死の鍵を握る血管新生を強く抑制することが明らかとなってきた(1, 21-24)。この結果をふまえて、現在欧米では、ラパマイシンの代わりに新生血管抑制効果がないと信じられているタクロリムスを中心としたプロトコールが標準療法となっており、今後日本で開始される高度医療制度を活用する臨床試験においても同様のプロトコールが用いられる予定である。しかし、膵島移植や膵臓移植で現在標準的に使用されているタクロリムスの新生血管抑制効果については報告がほとんどなく、解明が急務である。

移植膵島周囲の血管新生網は、これまでの免疫染色による形態観察などにより、移植後 10~14 日程度で完成することが報告されている(17, 25-27)。従来の

血管新生観察モデルは、移植膵島に対する血管新生評価を可能にした点で意義深い。移植した部位の組織から切片を作製して観察するため、同一動物での経時的な評価は困難であった。また、Mengerらは、ハムスターの背部に Dorsal skinfold chamber (DSC) を装着して血管新生過程を観察する、皮下移植モデルを報告し(28)、同一動物に移植した同一膵島を経時的に観察することが可能となった。しかし、新生血管の評価法が、血管の分枝数や血管径を測定するなどの主観的な方法であり、検者の違いによって結果に影響が出る可能性が考えられる。

2008年、Speierらは、マウスの眼球に膵島を移植して、深部まで観察が可能であるが、組織へのダメージは少ない二光子顕微鏡を使用して、同一動物に移植した同一膵島への血管新生を経時的に観察可能な anterior chamber モデルを報告した(29, 30)。しかし、この眼球の anterior chamber は、血管新生観察モデルとして確かに画期的であるが、臨床への応用を考えた場合に現実的ではない。

現状においては、臨床膵島移植は経門脈的に肝臓へ移植するのが標準的であるが、肝臓は出血や塞栓などの合併症に加え、グラフトが新鮮血流に晒されることにより自然免疫反応を惹起する危険性を伴うため、必ずしも最適の移植部位とは言えない(31, 32)。膵島移植の移植部位については、肝臓以外にも腎被膜

下や筋膜下、皮下、脾臓、膵臓、大網など、様々な部位が報告されている(33)。これらの移植部位の中で、低侵襲でアクセスが容易であることから将来的に臨床応用の可能性が強く期待される部位として皮下が挙げられる。皮下移植モデルは、DSC 技術を導入することにより、Speier らが提案した二光子顕微鏡を観察に使用することが可能である。そこで、本研究においては、タクロリムスの血管新生に及ぼす影響を、今後臨床展開が望める皮下移植モデルを用いて検討した。

3. 研究目的

本研究は臨床応用を念頭において、皮下に移植した膵島の血管新生に対するタクロリムスの影響を、DSC と二光子顕微鏡を組み合わせた高感度イメージングシステムを用いて解明することを目的とした。また、移植膵島自体へのタクロリムスの影響を解析するために、レーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いて、移植膵島の遺伝子発現の状態を解析することも試みた。

4. 実験方法

I 実験動物

本研究における動物実験は、東北大学医学系研究科動物実験委員会により承認を受け、米国の National Institutes of Health により発行された“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996 年改訂版)” に基づき施行した。経時的な膵島の観察を容易にするため、緑色蛍光蛋白質 (GFP :green fluorescent protein) 遺伝子を導入した、生後 9~12 週、25~30g の雄性 C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウス (Slc, Japan) をドナーとして使用した。また、レシピエントには生後 8~12 週、体重 25~28g の雄性 Balb/c nu/nu マウス (Slc, Japan) を使用し、皮下移植モデルとして DSC モデルを採用した。

II レシピエントマウスへの DSC 装着

生後 8~12 週、体重 25~28g の雄性 Balb/c nu/nu マウス (Slc, Japan) の腹腔内に 2,2,2-Tribromethanol 溶液を投与して麻酔を行った(250mg/kg)。
2,2,2-Tribromethanol 溶液は 2,2,2-Tribromethanol(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)2g を 2-methyl-2-butanol(Wako, Osaka, Japan)2ml で溶解して stock solution を作製し、その stock solution のうち 1ml を 39ml のリン酸緩衝生理食

塩水(PBS)で希釈して使用した (最終濃度 25mg/ml)。

まず、マウスの頸部と腰部に支持糸を通し、背部皮膚をひろげ (図 1 A)、術者側と反対側の皮膚にチャンバーフレームの一方を 3-0 絹糸で仮固定した。その後、透過光をあてながら観察窓 (図 1 B-a) をマーキングし、術者側の皮膚を全層切除し、反対側の皮膚の筋膜は生体顕微鏡下に切除した。術者側からもう 1 枚のチャンバーフレームをかぶせ、ビスとリングで 3 か所固定し (図 1 B-a)、観察窓を生理食塩水で満たしてカバーガラスをかけ、C リングという専用のリングで固定した。最後に、3-0 絹糸でチャンバーフレームと皮膚を 4 か所固定した (図 1 B-c)。チャンバーはポリアセタールレジジン樹脂製 (grade M90-44, Polyplastics Co.,Ltd., Tokyo, Japan) で、従来使用されてきた金属製チャンバーよりも約 40%軽量化されているため、マウスに対する長期装着のストレスは軽減されると考えられる(34) (図 1 C)。本研究においては、チャンバー装着上の技術的観点から、レシピエントとして Balb/c nu/nu mice を使用したが、それにより比較的長い期間の観察が可能になった。また、特異的免疫反応の関与が除外され、薬剤自体の影響を検証することが可能となった。

III 臍島分離および培養方法

麻酔はイソフルレン (Abbott Japan Co. , Ltd. , Tokyo, Japan) の吸入麻酔で

行った。1g/L の濃度で collagenase (Sigma type V; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) を溶解した cold Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS) を顕微鏡下に総胆管より注入し、膵臓を拡張させた後、膵臓摘出を行った。10 mL の HBSS を加えた後、37°C 下で 16 分間温浴させることにより膵臓を消化した。引き続き Histopaque-1119 (Sigma Diagnostics, U.S.A) と Lymphoprep™ (Nycomed Pharma AS, Norway) を用いた濃度勾配遠心を行い、膵島が存在する層の溶液を回収した。その後、マウス 1 匹から分離した約 200~300IEQs(islet equivalents)の膵島を、5.5 mmol/L グルコース及び 10% 胎児ウシ血清を添加した RPMI-1640 5ml とともに 50mm ペトリディッシュ (Sterilin, Cambridge, UK)に入れ、37°C、5% CO₂ 下で 3 時間培養した(35)。

IV DSC への移植

DSC 装着済のレシピエントマウスをアクリル樹脂製の筒に入れ、その筒をアクリル樹脂製のプレートに固定した。イソフルレン (Abbott Japan Co., Ltd.) で吸入麻酔後、保持リングおよびカバーガラスを外し、分離した膵島をハンドピックアップで 2~10 個移植した。移植後は空気が入らないように生理食塩水で満たしながらカバーガラスをかけ、保持リングで固定して移植を終了した。

IV 実験群

膵島を移植したレシピエントマウスを、コントロール群 (n=9 : 6 匹のマウスに移植した 9 つの膵島) とタクロリムス (Astellas, Deerfield, IL, USA) 投与群 (0.5mg/kg/日) (n=7 : 4 匹のマウスに移植した 7 つの膵島、7 つの膵島のうち 2 つはチャンバートラブルのため、移植後 11 日目までしか観察できなかった) の 2 群に分けて比較検証した(36)。タクロリムスはマウス背部の皮下に埋め込んだ MICRO-OSMOTIC PUMP (Model 1002, Alzet, Cupertino, CA, USA) を使用して、14 日間持続投与した。

V タクロリムス血中濃度測定

移植後 7 日目に下大静脈から血液サンプルを採取し、使用するまで -80°C で凍結保存した。血中タクロリムス濃度は Dimension TACRO (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Newark, DE, USA) を使用して測定した。

VI マウス膵島グラフトに対する新生血管の観察および測定

血管造影のために、移植後 1、4、7、11、14、18、21 日目に Texas Red® (10 mg/mL; Invitrogen, Leek, Netherlands) 0.1mL を尾静脈から経静脈的に投与した。イソフルレンで麻酔をかけ、アクリル樹脂製の筒にマウスを入れてプレー

トに固定し、水浸レンズ (OLYMPUS XLPLN25XWMP NA1.05) を備えつけた二光子顕微鏡 (FluoView FV1000MPE; OLYMPUS) で観察した (図 1 D)。最小限のレーザー出力とスキャン時間で観察を行った。本研究を通して、移植膵島および周囲の血管に対する観察によるダメージは確認されなかった。GFP と Texas Red は、890nm の波長のレーザーで励起した。二光子顕微鏡で取得した画像を画像解析ソフト Volocity (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて 3 次元構築し、各々の体積を測定した(29, 30)。新生血管体積は移植後 1 日目の体積を $0 \mu\text{m}^3$ として、移植後 x 日目の血管体積は、(移植後 x 日目の血管体積 - 移植後 1 日目の血管体積) で表した。また、各観察ポイントにおける新生血管体積増加率は、(移植後 x 日目の血管体積 - 移植後 1 日目の血管体積) \div (移植後 1 日目の血管体積) で表した。

VII レーザーマイクロダイセクション (LMD)

移植後 7 日目に膵島を移植した部位の皮膚を摘出し、液体窒素で凍結後、 -80°C で保存した。コントロール群の膵島 (n=6)、タクロリムス投与群の膵島 (n=6)、および膵島分離後、移植せずに凍結させた移植前膵島 (n=6) の 3 群で比較検討を行った。これらのサンプルから $10\mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。レーザーによる凍結切片からの膵島切り抜き (LMD 処理) を行う直前に凍結切片を 30 秒間

アセトン固定し、脱水後、乾燥させた。LMD 処理は LMD 7000 (Leica, Bensheim, Germany) を使用して実施した。切除した膵島は細胞溶解液を添加し、液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。

VIII ハイスループット定量 polymerase chain reaction (PCR) 法

膵島サンプルの mRNA 精製には、RNeasy Micro Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いた。逆転写反応には、Quantitect Reverse Transcription (QIAGEN) を使用し、反応プロトコールに基づいて、調製を行った。精製したテンプレート RNA にゲノム DNA 除去試薬を加え、42°C で 2 min インキュベートすることで、ゲノム DNA を除去した。ゲノム DNA 除去後、逆転写酵素、プライマー、緩衝液を氷上で加え、混合した。42°C で 30 min (逆転写反応)、95°C で 3 min (逆転写酵素の失活)、サーマルサイクラーにて反応を行った。作製した cDNA は -30°C で保存した。遺伝子発現は BioMark 48.48 dynamic gene expression system (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) を使用して解析した。前増幅した cDNA は TE バッファー (1:5) で希釈し、定量 PCR に使用した。膵島移植における炎症や糖代謝、細胞周期、血管新生などに関係すると考えられる 48 種類の遺伝子を選択し、BioMark Real-Time PCR Analysis Software Version 2.0 (Fluidigm) を使用して解析した。ハウスキーピング遺伝子として、

Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)(*Actb*) を使用し、比較 CT 法を用いて解析した。比較 CT 法とは基準となるサンプルと比較して、未知サンプルが何サイクル早く、あるいは何サイクル遅く閾値 (CT 値) に達するかに注目して相対定量する方法である(37)。計算過程を下記に示す。比較 Ct 法では、1 サイクルの検出の違いが 2 倍量の差になる。つまり、(式 1) で増幅効率を 1 と仮定すると、PCR の 1 サイクルで反応生成物量は 2 倍になる。(式 2) と (式 3) により ΔCtA と ΔCtB を算出し、(式 4) から $\Delta\Delta Ct$ を算出する。さらに (式 5) により相対定量値が算出できる。この値は ΔCtA や ΔCtB で、内在性コントロール遺伝子の発現量を基準としたターゲット遺伝子の発現量を示しており、各ターゲット遺伝子間の発現量の差を比較できる。

$$(式1) \text{ PCR産物量} = \text{鋳型初期量}(1 + \text{PCR効率})^{\text{サイクル数}}$$

$$(式2) \Delta CtA = \text{参照試料中のターゲット遺伝子のCt} - \text{内在性コントロール遺伝子のCt}$$

$$(式3) \Delta CtB = \text{目的試料中のターゲット遺伝子のCt} - \text{内在性コントロール遺伝子のCt}$$

$$(式4) \Delta\Delta Ct = \Delta CtB - \Delta CtA$$

$$(式5) 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

IX 統計学的処理

全ての測定値は、平均値±標準誤差で表示した。コントロール群とタクロリムス投与群の2群間の新生血管増加率の比較には Unpaired Student's *t*-test、2群間の新生血管体積の経時的変化の比較は Two-way Factorial ANOVA を行った。また、移植前膵島群とコントロール群、タクロリムス投与群の3群における遺伝子発現の比較は One-way Factorial ANOVA および多重比較検定 (Bonferroni) を行った。p < 0.05 を統計学的有意と判定した。

5. 実験結果

I 移植膵島周囲の新生血管体積の経時的変化

コントロール群の移植膵島周囲の新生血管体積は、移植後14日目まで経時的にはほぼ一定の割合で増加していき、その後はプラトーとなった (図2)。

II 移植膵島および新生血管の経時的形態変化

コントロール群、タクロリムス投与群とも、移植後4日目には血管の芽を認め、移植後7日目には、これらの芽が相互に連結していった。その後、新生血

管網は経時的に大きくなっていった (図 3)。

Ⅲ タクロリムス血中濃度

タクロリムス血中濃度は 7.9 ± 0.4 ng/mL (n=6) であった。

Ⅳ 血管新生に対するタクロリムスの抑制効果

タクロリムス投与群の移植膵島に対する新生血管の体積は、コントロール群に比べて有意に低値を示した ($P < 0.05$; 図 4)。

移植後 1 日目に対する新生血管体積の増加率は、14 日目においてコントロール群 (189.2 ± 42.3 %) が、タクロリムス投与群 (70.0 ± 26.7 %) より有意に高値を示した ($P < 0.05$; 図 5)。

Ⅴ 移植膵島における遺伝子発現

48 種類の遺伝子について解析を試み、35 種類の遺伝子で PCR が成功した (表 1)。その 35 種類の遺伝子の中で特に、炎症や糖代謝、細胞周期、血管新生に係る代表的な 12 種類の遺伝子の発現について解析した (表 2)。移植前膵島に比べて、vascular endothelial growth factor A (*Vegfa*) ($p < 0.01$)、tissue factor (*F3*) ($p < 0.01$)、G1/S-specific cyclin-D1 (*Ccnd1*) ($p < 0.01$)、Cell division protein

kinase 4(*Cdk4*) ($p<0.01$)の発現が、コントロール群の膵島では抑制されていた(図6)。反対に、matrix metalloproteinase-14 (*Mmp14*)はコントロール群で上昇していた($p<0.01$)。また、コントロール群とタクロリムス投与群の比較では、*Vegfa* ($p<0.05$)と *Ccnd1*($p<0.05$) がタクロリムス投与群で有意に高値を示したが、その他の遺伝子発現には差が認められなかった。

6. 考察

近年の劇的な膵島分離技術の進歩にもかかわらず(38-41)、同種膵島移植の成績は自家膵島移植の成績に大きく劣っている(3)。これには、様々な因子が寄与していると考えられるが、同種膵島移植における免疫抑制剤の使用は重要な要因の1つである。タクロリムスは、副作用として耐糖能障害や神経毒性、腎毒性が報告されているが(42)、膵島グラフトに対しての重篤な副作用がほとんどないと考えられ、現在、膵島移植および膵臓移植の両方で標準的な免疫抑制剤として、世界中で広く使用されている(43, 44)。

Turgut らは、角膜におけるタクロリムスの血管新生抑制効果を報告しているが(45)、タクロリムスが膵島移植にとって死活的に重要である新生血管構築へ及

ばす影響については、十分な研究が実施されておらず、その解明が強く望まれる。十分な検討が実施されてこなかった理由として、有用な解析法の欠如が挙げられる。ラパマイシンのように、強力な血管構築阻害作用を有する薬剤に関しては、従来法である免疫組織化学染色による断片的な新生血管マーカーの染色でも十分評価が可能であると思われるが、阻害作用の幅がラパマイシンほど大きくはない多くの薬剤においては、より鋭敏であり、かつ半定量化が可能となる高感度システムの確立が不可欠である。そのため、本研究では DSC と二光子顕微鏡を組み合わせ、有用かつ実用的な高感度イメージングシステムを構築し(46)、タクロリムスが移植膵島に及ぼす影響について検証した。その結果、タクロリムスが移植膵島に対する血管新生を有意に抑制することが、初めて明らかとなった。本研究は、皮下移植モデルによる検討のため、現在臨床で行われている肝臓への移植とは膵島を取りまく環境が同一ではない。肝臓への移植に比べて、皮下への移植は膵島の生着が悪く、糖尿病を治癒するためにはより多くの膵島を必要とすることが報告されているが、この原因の一つとして、皮下の乏しい血管構築が考えられている(33, 47)。しかし、肝臓内に移植された膵島も、膵臓内の膵島に比べると組織酸素分圧が著しく低いことが報告されており(48)、膵島が生着し、機能するためには早急な新生血管網の構築が必須である。その点からも、本研究におけるタクロリムスの新生血管抑制効果は大きな意義

も持つと考えられる。

本研究で構築した高感度イメージングシステムの長所の一つとして、組織切片を要せず、同一動物で繰り返し、同じ腓島を経時的に観察できる点が挙げられる。さらに、レシピエントとしてヌードマウスを用いることで、より長期の観察が可能となった。このシステムの活用により、移植腓島に対する新生血管網の構築がほぼ 14 日以内に完成することが明らかとなったが、この所見は組織切片を用いて検証されたこれまでの様々な報告と一致する(17, 25-27, 49, 50)。このことは、この観察所見が正確であることを示すとともに、本開発システムが移植腓島への血管新生過程を解析するための有用な方法となり得ることを示している。

本研究では、さらに、移植された腓島自体の遺伝子発現の状態を解析するために、レーザーマイクロダイセクション技術を導入し、ハイスループットリアルタイム PCR アレイ解析を行った。前述の高感度イメージングシステムにレーザーマイクロダイセクションおよびリアルタイム PCR を組み合わせた本方法によって、タクロリムスが血管新生の過程に及ぼす影響だけでなく、腓島グラフト自体への影響も同時に評価することが可能となった。この新しいシステムは、高感度イメージングという視覚情報と、細胞が保持する遺伝子（あるいはタンパク組成）という分子情報を、同時に取得することを可能とする点で極めて画

期的である。一つの細胞に関する情報を多角的に入手することにより、現象を多面的に捉えることが可能となるため、本システムは、癌細胞や各種幹細胞の血管新生や生着の研究にも有用な手法になると思われる。

リアルタイム PCR 解析において、コントロール群の臍島では *Vegfa* や *F3*、*Ccnd1*、*Cdk4* が移植前臍島に比べて有意に抑制されていた。さらに予想外なことに、低酸素で誘導される hypoxia-inducible factor-1 α (*Hif1a*) の発現にも上昇は確認されなかった。これまでの様々な研究により、皮下に移植したグラフトは虚血に陥り易いとされているが(47)、*Hif1a* のデータは、皮下が予想しているよりも低酸素状態ではないことを示唆している。しかし、本研究では、血管新生構築により生存している臍島のみが解析されており、また DSC 内に数個しか移植していないため、臍島周囲に血管新生のための十分なスペースがあった点も十分考慮し、今後、臨床移植と同等のグラフト量を使用する検証が望まれる。

一方、タクロリムス投与群の臍島においては、コントロール群と比べて、*Vegfa* と *Ccnd1* が有意に高値を示した。血管内皮細胞の増殖や遊走、管腔形成を誘導することによって血管新生を強く惹起する *Vegfa*(51-53)が有意に高値を示していることから、タクロリムスによって血管新生が抑制されたために、臍島が反応性に血管新生のシグナルを放出したと考えられる。しかし、同じく血管誘導

因子であり、細胞外マトリックスの分解を介して血管新生促進や改善を引き起こす *Mmp14* は上昇しておらず(54, 55)、ドナー臍島が出す basic fibroblast growth factor (bFGF) や hepatocyte growth factor(HGF)などの他の重要な血管誘導因子についても今後包括的に検証していく必要があると思われる (56, 57)。

ラパマイシンは FKBP12(FK506-binding protein 12)受容体と結合し、mTOR(mammalian target of rapamycin;哺乳類標的蛋白質)の活性を抑制することにより、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p27 が上昇し、細胞増殖周期が休止期に切り替わり、血管平滑筋の増殖が抑えられることが報告されている(13, 58)。しかし、本研究で検証したタクロリムスにおいては、細胞周期調節への抑制効果は確認されておらず、異なる作用機序を有する事が示唆された。

Lopez-Talavera らは齧歯動物において、0.5mg/kg/日のタクロリムスを投与すると、薬剤投与直前の最低血中薬物濃度であるトラフ値がヒトに対するエドモンソンプロトコールと近い 6.0 ± 1.5 ng/mL になることを報告した(36)。したがって、本研究においては、0.5mg/kg/日をタクロリムス投与群の用量として設定したが、実際持続投与中の血中濃度は 7.9 ± 0.4 ng/mL であり、トラフ値ではないことを考慮すると、目的とした臨床濃度に近い条件をほぼ達成できたものと考えられる。本研究において、臨床に近い用量のタクロリムス投与で移植臍

島の血管新生が抑制されたことは、特記に値する。さらに驚くべきことに、Shapiro らは、免疫抑制剤の門脈内血中最高濃度が、全身の血中最高濃度の 2 倍以上に達することを報告している (59)。この報告と本研究の知見を照らし合わせると、現在の標準的な移植部位である肝臓におけるタクロリムスの膵島血管障害作用は、かなり強力であり、同種膵島移植におけるグラフト生着不良の主要因となっていることが推察される。

これらの結果が示すように、同種膵島移植の成績向上のためには、免疫抑制療法の至適化が極めて重要である。スフィンゴシン 1-リン酸受容体調節薬である FTY720 は、血管障害作用は有しないと考えられており、膵島移植において免疫反応を効果的に抑制することが既に知られているため、タクロリムスの有用な代替となる可能性を有している(60, 61)。本研究において構築された新しい評価システムは、こういった新規免疫抑制剤を含む血管構築促進プロトコールの至適化のためのスクリーニング手法として有用であると思われる。

7. 結論

本研究により、タクロリムスは、膵島グラフトからの血管誘導因子の放出制

御を介さずに、グラフトの血管新生を抑制することが明らかとなった。移植膵島の血管新生への影響を考慮した免疫抑制療法の最適化が、同種膵島移植の成績を改善することが示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、研究のご指導を頂いた東北大学先進外科の里見進先生および大内憲明先生、東北大学先進外科・東北大学未来科学技術共同研究センターの後藤昌史先生、小動物モデルの実験手技をご教示頂いた国立保健医療科学院の牛山明先生、大澤正子さん、データ測定にご協力頂いた東北大学病院薬剤部試験室の柳利樹さん、東北大学大学院環境科学研究科環境科学専攻の西岡翔さんに感謝致します。

8. 参考文献

1. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000 Jul 27;343(4):230-8.
2. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005

Jul;54(7):2060-9.

3. Sutherland DE, Gruessner AC, Carlson AM, Blondet JJ, Balamurugan AN, Reigstad KF, Beilman GJ, Bellin MD, Hering BJ. Islet autotransplant outcomes after total pancreatectomy: a contrast to islet allograft outcomes. *Transplantation* 2008 Dec 27;86(12):1799-802.

4. Oberholzer J, Triponez F, Mage R, Anderegg E, Buhler L, Cretin N, Fournier B, Goumaz C, Lou J, Philippe J, Morel P. Human islet transplantation: lessons from 13 autologous and 13 allogeneic transplantations. *Transplantation* 2000 Mar 27;69(6):1115-23.

5. Pileggi A, Ribeiro MM, Hogan AR, Molano RD, Cobianchi L, Ichii H, Embury J, Inverardi L, Fornoni A, Ricordi C, Pastori RL. Impact of pancreatic cold preservation on rat islet recovery and function. *Transplantation* 2009 May 27;87(10):1442-50.

6. Nikolic DM, Djordjevic PB, Dimitrijevic-Sreckovic V, Dzingalasevic M, Belijit S, Kalezic N. Influence of the purification of human adult pancreatic islets on insulin secretion. *Vojnosanit Pregl* 2010 Feb;67(2):128-31.

7. Ricordi C, Strom TB. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol* 2004 Apr;4(4):259-68.

8. Bellin MD, Sutherland DE, Beilman GJ, Hong-McAtee I, Balamurugan AN, Hering BJ, Moran A. Similar islet function in islet allotransplant and autotransplant recipients, despite lower islet mass in autotransplants. *Transplantation* 2011 Feb 15;91(3):367-72.

9. Ozbay LA, Smidt K, Mortensen DM, Carstens J, Jorgensen KA, Rungby J. Cyclosporin and tacrolimus impair insulin secretion and transcriptional regulation in INS-1E beta-cells. *Br J Pharmacol* 2011 Jan;162(1):136-46.

10. Tanemura M, Ohmura Y, Deguchi T, Machida T, Tsukamoto R, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Ito T, Nagano H, Mori M, Doki Y. Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. *Am J Transplant* 2012 Jan;12(1):102-14.

11. Yang SB, Lee HY, Young DM, Tien AC, Rowson-Baldwin A, Shu YY, Jan YN, Jan LY. Rapamycin induces glucose intolerance in mice by reducing islet mass, insulin content, and insulin sensitivity. *J Mol Med (Berl)* 2011 Nov 22.

12. Barshes NR, Wyllie S, Goss JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol* 2005 May;77(5):587-97.

13. Aronovitz A, Josefson J, Fisher A, Newman M, Hughes E, Chen F, Moons DS, Kiyokawa H, Lowe WL, Jr. Rapamycin inhibits growth factor-induced cell cycle

regulation in pancreatic beta cells. *J Investig Med*2008 Dec;56(8):985-96.

14. Ballian N, Brunicardi FC. Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J Surg*2007 Apr;31(4):705-14.

15. Carlsson PO, Palm F, Mattsson G. Low revascularization of experimentally transplanted human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab*2002 Dec;87(12):5418-23.

16. Jansson L, Carlsson PO. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia*2002 Jun;45(6):749-63.

17. Andersson A, Korsgren O, Jansson L. Intraportally transplanted pancreatic islets revascularized from hepatic arterial system. *Diabetes*1989 Jan;38 Suppl 1:192-5.

18. Henriksnas J, Lau J, Zang G, Berggren PO, Kohler M, Carlsson PO. Markedly decreased blood perfusion of pancreatic islets transplanted intraportally into the liver: disruption of islet integrity necessary for islet revascularization. *Diabetes*2012 Mar;61(3):665-73.

19. Linn T, Schneider K, Hammes HP, Preissner KT, Brandhorst H, Morgenstern E, Kiefer F, Bretzel RG. Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans. *FASEB J*2003 May;17(8):881-3.

20. Brissova M, Fowler M, Wiebe P, Shostak A, Shiota M, Radhika A, Lin PC, Gannon M, Powers AC. Intra-islet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets. *Diabetes*2004 May;53(5):1318-25.

21. Zhang N, Su D, Qu S, Tse T, Bottino R, Balamurugan AN, Xu J, Bromberg JS, Dong HH. Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function. *Diabetes*2006 Sep;55(9):2429-36.

22. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med*2002 Feb;8(2):128-35.

23. Stallone G, Schena A, Infante B, Di Paolo S, Loverre A, Maggio G, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G. Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*2005 Mar 31;352(13):1317-23.

24. Cantaluppi V, Biancone L, Romanazzi GM, Figliolini F, Beltramo S, Ninniri MS, Galimi F, Romagnoli R, Franchello A, Salizzoni M, Perin PC, Ricordi C, Segoloni GP, Camussi G. Antiangiogenic and immunomodulatory effects of rapamycin on islet endothelium: relevance for islet transplantation. *Am J Transplant*2006 Nov;6(11):2601-11.

25. Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B. Revascularization and microcirculation

of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg*2001 Apr;25(4):509-15.

26. Vajkoczy P, Olofsson AM, Lehr HA, Leiderer R, Hammersen F, Arfors KE, Menger MD. Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin. *Am J Pathol*1995 Jun;146(6):1397-405.

27. Mendola JF, Goity C, Fernandez-Alvarez J, Saenz A, Benarroch G, Fernandez-Cruz L, Gomis R. Immunocytochemical study of pancreatic islet revascularization in islet isograft. Effect of hyperglycemia of the recipient and of in vitro culture of islets. *Transplantation*1994 Mar 15;57(5):725-30.

28. Menger MD, Jaeger S, Walter P, Feifel G, Hammersen F, Messmer K. Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes*1989 Jan;38 Suppl 1:199-201.

29. Speier S, Nyqvist D, Cabrera O, Yu J, Molano RD, Pileggi A, Moede T, Kohler M, Wilbertz J, Leibiger B, Ricordi C, Leibiger IB, Caicedo A, Berggren PO. Noninvasive in vivo imaging of pancreatic islet cell biology. *Nat Med*2008 May;14(5):574-8.

30. Speier S, Nyqvist D, Kohler M, Caicedo A, Leibiger IB, Berggren PO. Noninvasive high-resolution in vivo imaging of cell biology in the anterior chamber of the mouse eye. *Nat Protoc*2008;3(8):1278-86.

31. Goto M, Johansson H, Maeda A, Elgue G, Korsgren O, Nilsson B. Low molecular weight dextran sulfate prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets. *Transplantation*2004 Mar 15;77(5):741-7.

32. Goto M, Tjernberg J, Dufrane D, Elgue G, Brandhorst D, Ekdahl KN, Brandhorst H, Wennberg L, Kurokawa Y, Satomi S, Lambris JD, Gianello P, Korsgren O, Nilsson B. Dissecting the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet xenotransplantation. *Xenotransplantation*2008 Jul;15(4):225-34.

33. Merani S, Toso C, Emamaullee J, Shapiro AM. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br J Surg*2008 Dec;95(12):1449-61.

34. Ushiyama A, Yamada S, Ohkubo C. Microcirculatory parameters measured in subcutaneous tissue of the mouse using a novel dorsal skinfold chamber. *Microvasc Res*2004 Sep;68(2):147-52.

35. Saito Y, Goto M, Maya K, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, Satomi S. Brain death in combination with warm ischemic stress during isolation procedures induces the expression of crucial inflammatory mediators in the isolated islets. *Cell Transplant*2010;19(6):775-82.

36. Lopez-Talavera JC, Garcia-Ocana A, Sipula I, Takane KK, Cozar-Castellano I,

Stewart AF. Hepatocyte growth factor gene therapy for pancreatic islets in diabetes: reducing the minimal islet transplant mass required in a glucocorticoid-free rat model of allogeneic portal vein islet transplantation. *Endocrinology*2004 Feb;145(2):467-74.

37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*2001 Dec;25(4):402-8.

38. Goto M, Eich TM, Felldin M, Foss A, Kallen R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Fujimori K, Engkvist M, Korsgren O. Refinement of the automated method for human islet isolation and presentation of a closed system for in vitro islet culture. *Transplantation*2004 Nov 15;78(9):1367-75.

39. Mita A, Ricordi C, Messinger S, Miki A, Misawa R, Barker S, Molano RD, Haertter R, Khan A, Miyagawa S, Pileggi A, Inverardi L, Alejandro R, Hering BJ, Ichii H. Antiproinflammatory effects of iodixanol (OptiPrep)-based density gradient purification on human islet preparations. *Cell Transplant*2010;19(12):1537-46.

40. Goto M, Eich TM, Stahle M, Malmborg A, Engkvist M, Korsgren O. Technical improvement of human pancreatic islet isolation. *Transplant Proc*2005 Mar;37(2):1313-4.

41. Ichii H, Pileggi A, Molano RD, Baidal DA, Khan A, Kuroda Y, Inverardi L, Goss JA, Alejandro R, Ricordi C. Rescue purification maximizes the use of human islet preparations for transplantation. *Am J Transplant*2005 Jan;5(1):21-30.

42. Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs*1997 Dec;54(6):925-75.

43. Reffet S, Thivolet C. Immunology of pancreatic islet transplantation. *Diabetes Metab*2006 Dec;32(5 Pt 2):523-6.

44. Singh RP, Stratta RJ. Advances in immunosuppression for pancreas transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*2008 Feb;13(1):79-84.

45. Turgut B, Guler M, Akpolat N, Demir T, Celiker U. The impact of tacrolimus on vascular endothelial growth factor in experimental corneal neovascularization. *Curr Eye Res*2011 Jan;36(1):34-40.

46. Nishimura R, Goto M, Sekiguchi S, Fujimori K, Ushiyama A, Satomi S. Assessment for revascularization of transplanted pancreatic islets at subcutaneous site in mice with a highly sensitive imaging system. *Transplant Proc*2011 Nov;43(9):3239-40.

47. Kemp CB, Knight MJ, Scharp DW, Ballinger WF, Lacy PE. Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia*1973 Dec;9(6):486-91.

48. Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes*2001 Mar;50(3):489-95.
49. Sandberg JO, Margulis B, Jansson L, Karlsten R, Korsgren O. Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic or normoglycemic nude mice. Evidence of a rapid engraftment process demonstrated by blood flow and heat shock protein 70 measurements. *Transplantation*1995 Jun 27;59(12):1665-9.
50. Merchant FA, Diller KR, Aggarwal SJ, Bovik AC. Angiogenesis in cultured and cryopreserved pancreatic islet grafts. *Transplantation*1997 Jun 15;63(11):1652-60.
51. Lai Y, Schneider D, Kiszun A, Hauck-Schmalenberger I, Breier G, Brandhorst D, Brandhorst H, Iken M, Brendel MD, Bretzel RG, Linn T. Vascular endothelial growth factor increases functional beta-cell mass by improvement of angiogenesis of isolated human and murine pancreatic islets. *Transplantation*2005 Jun 15;79(11):1530-6.
52. Zhang N, Richter A, Suriawinata J, Harbaran S, Altomonte J, Cong L, Zhang H, Song K, Meseck M, Bromberg J, Dong H. Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization. *Diabetes*2004 Apr;53(4):963-70.
53. Johansson A, Olerud J, Johansson M, Carlsson PO. Angiostatic factors normally restrict islet endothelial cell proliferation and migration: implications for islet transplantation. *Transpl Int*2009 Dec;22(12):1182-8.
54. Olsson R, Maxhuni A, Carlsson PO. Revascularization of transplanted pancreatic islets following culture with stimulators of angiogenesis. *Transplantation*2006 Aug 15;82(3):340-7.
55. Han KY, Fahd DC, Tshionyi M, Allemann N, Jain S, Chang JH, Azar DT. MT1-MMP Modulates bFGF-Induced VEGF-A Expression in Corneal Fibroblasts. *Protein Pept Lett*2012 Jun 4.
56. Vasir B, Reitz P, Xu G, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC. Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF-alpha, TGF-beta, bFGF and Vimentin) in cultured and transplanted rat islets. *Diabetologia*2000 Jun;43(6):763-72.
57. Watanabe H, Sumi S, Kitamura Y, Nio Y, Higami T. Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor, and their receptors, in transplanted islets in rats. *Surg Today*2003;33(11):854-60.
58. Moss SC, Lightell DJ, Jr., Marx SO, Marks AR, Woods TC. Rapamycin regulates endothelial cell migration through regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *J Biol Chem*2010 Apr 16;285(16):11991-7.

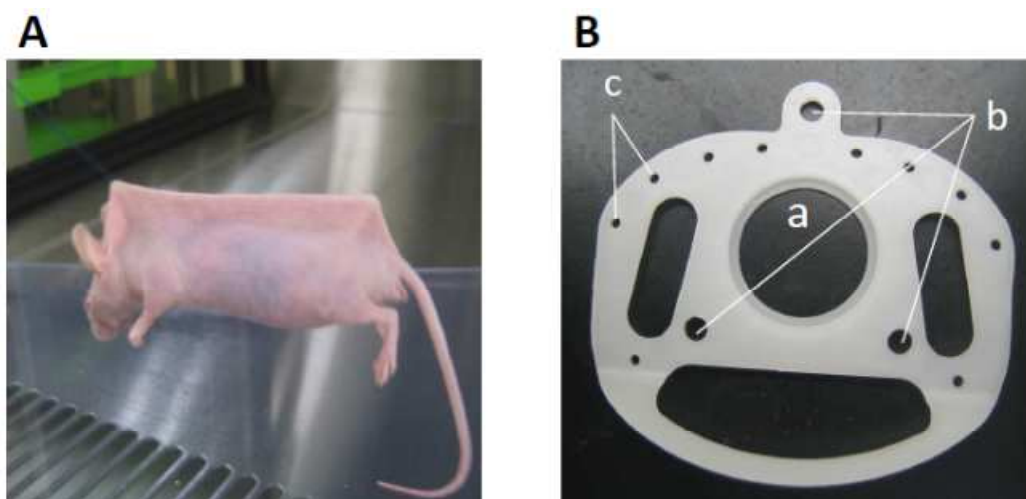
59. Shapiro AM, Gallant HL, Hao EG, Lakey JR, McCready T, Rajotte RV, Yatscoff RW, Kneteman NM. The portal immunosuppressive storm: relevance to islet transplantation? *Ther Drug Monit* 2005 Feb;27(1):35-7.

60. Maeda A, Goto M, Zhang J, Bennet W, Groth CG, Korsgren O, Wennberg L. Immunosuppression with FTY720 and cyclosporine A inhibits rejection of adult porcine islet xenografts in rats. *Transplantation* 2003 Apr 27;75(8):1409-14.

61. Shapiro AM, Lakey JR, Paty BW, Senior PA, Bigam DL, Ryan EA. Strategic opportunities in clinical islet transplantation. *Transplantation* 2005 May 27;79(10):1304-7.

9. 图表

图 1



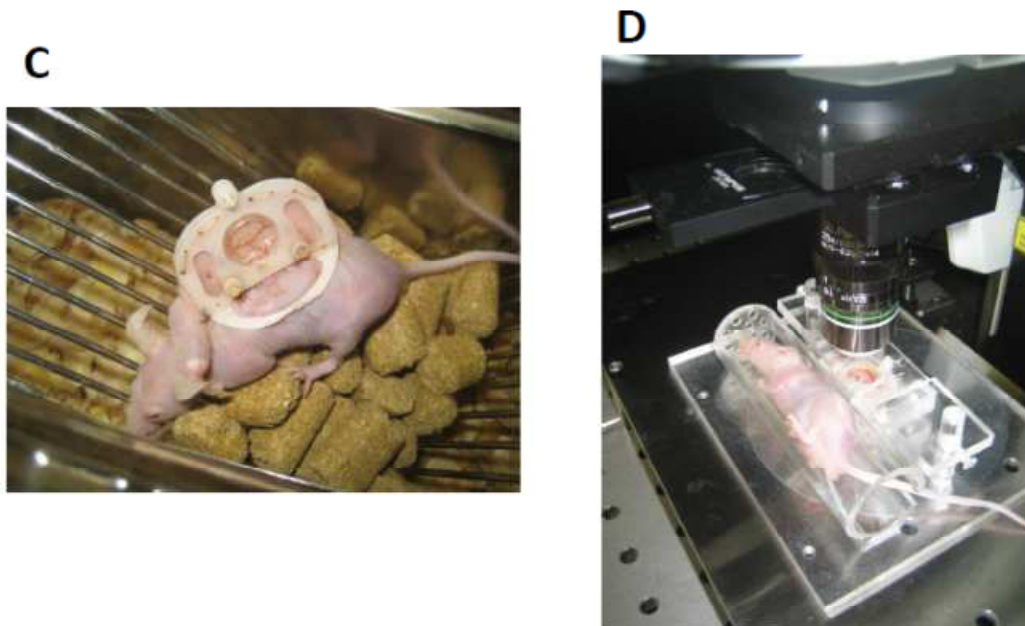


図 1 : (A)頸部と腰部に支持糸を通し、背部の皮膚をひろげた状態のマウス。(B)チャンバーフレーム。a.観察窓、b.ネジ穴、c.糸で固定する穴。(C) Dorsal skinfold chamber を装着した balb/c nu/nu マウス。(D) 観察中のマウスの固定（アクリル樹脂製の筒にマウスを入れて、プレートに固定）。

図2

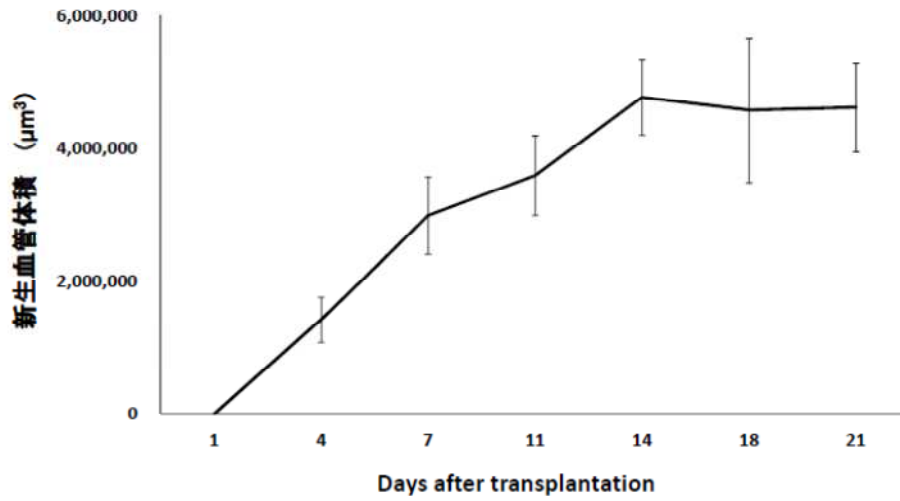


図 2 : コントロール群の移植膵島に対する新生血管体積の経時的変化。全ての値は、平均値 ± 標準誤差で示した (n=9 : 6 匹のマウスに移植した 9 つの膵島)。

図3

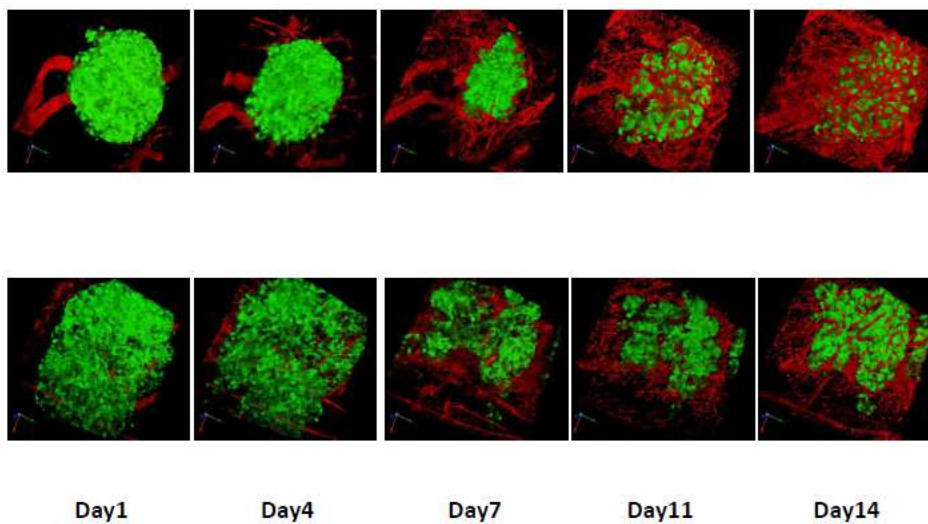


図3：移植膵島および膵島周囲の血管の経時的変化（×250倍）。膵島は緑、血管は赤で示した。上段：コントロール群、下段：タクロリムス投与群。GFPとTexas Redは890nmのレーザーで励起。スケール：1unit=51.0 μm/unit。

図4

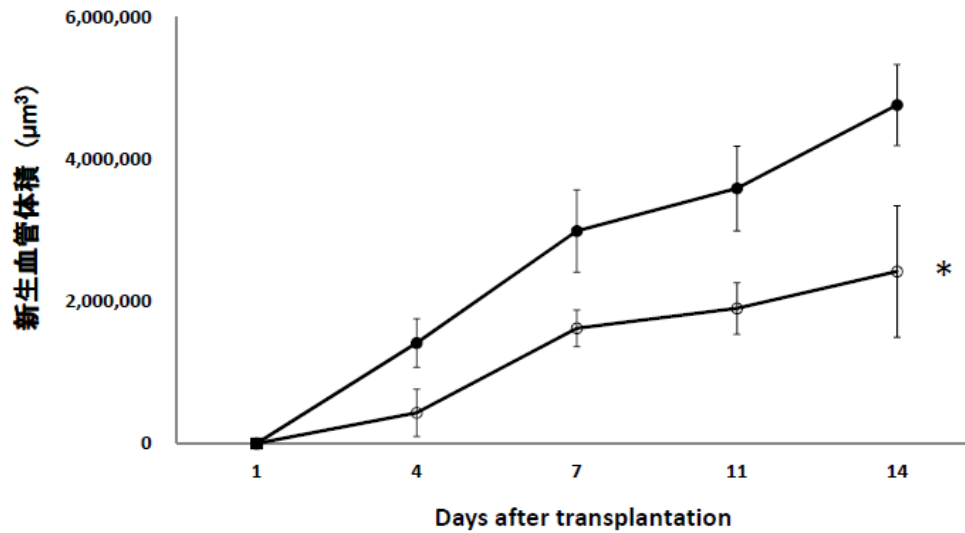


図4：コントロール群（●、n=9：6匹のマウスに移植した9つの膵島）およびタクロリムス投与群（○、n=7：4匹のマウスに移植した7つの膵島、7つの膵島のうち2つはチャンバートラブルのため、移植後11日目までしか観察できなかった）の膵島に対する新生血管体積の経時的変化。全ての値は平均値 ± 標準誤差で示した。*コントロール群に対して、 $P < 0.05$ 。

図5

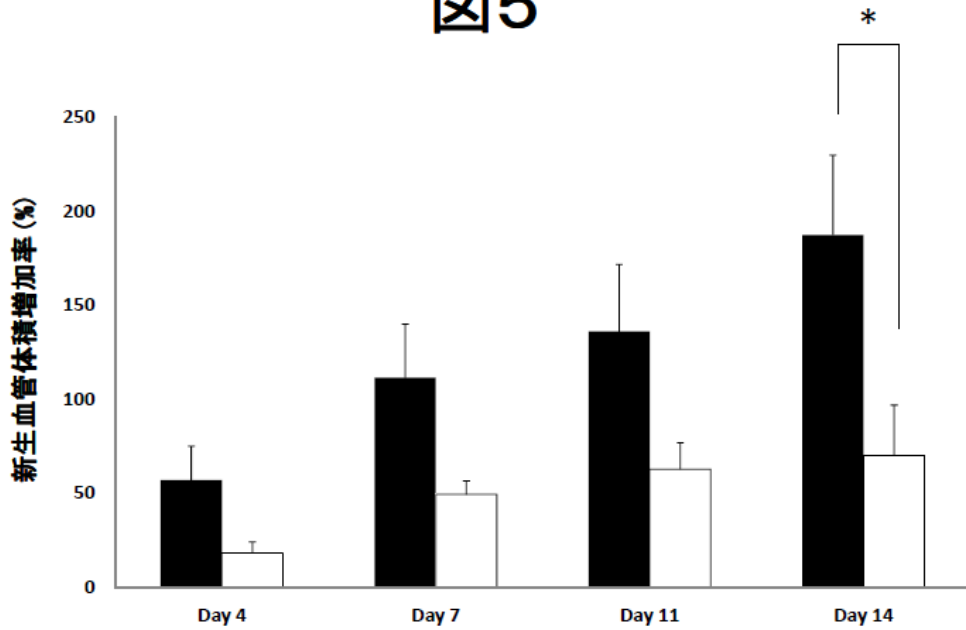
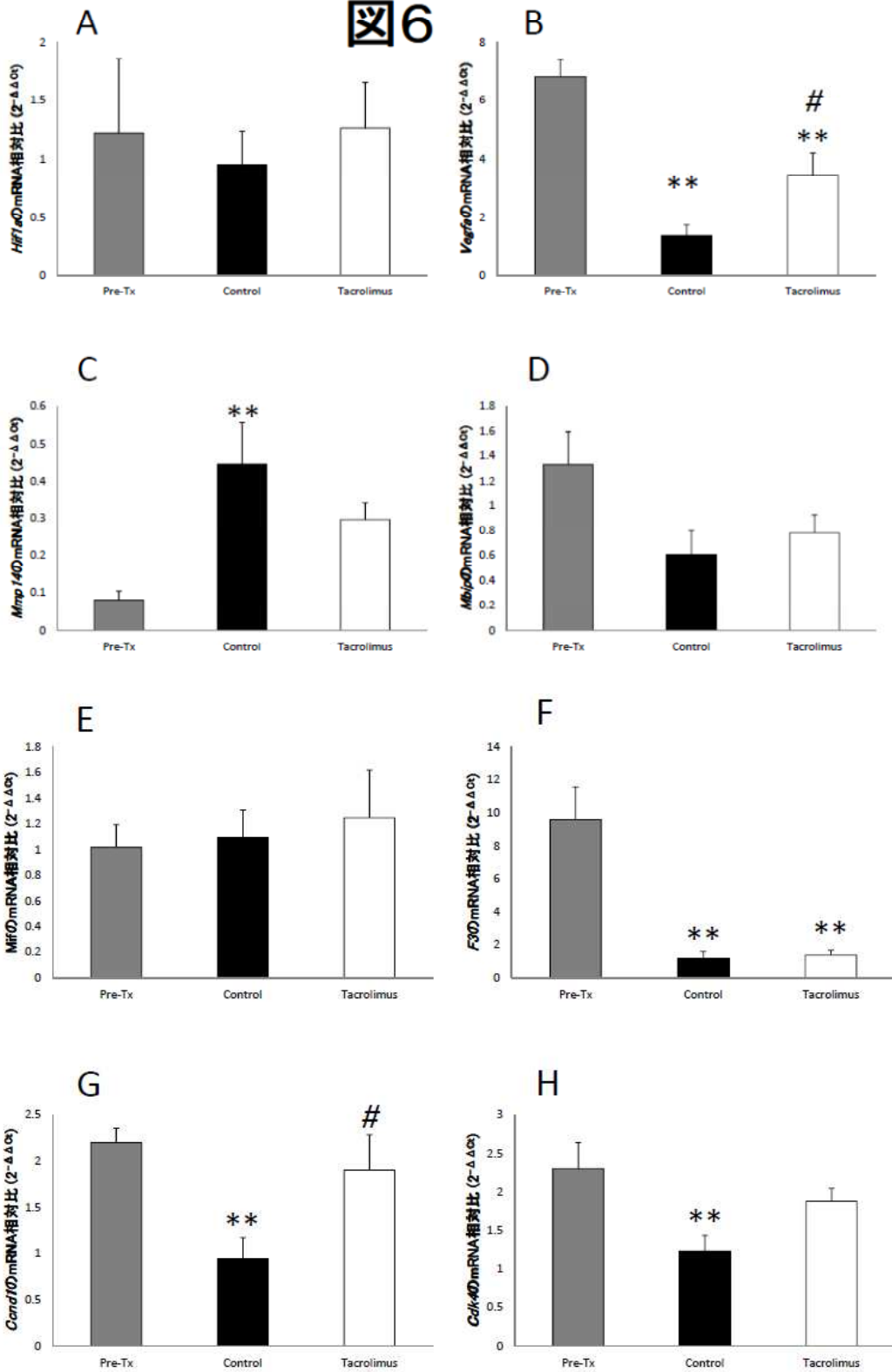


図5：コントロール群（黒、n=9：6匹のマウスに移植した9つの膵島）およびタクロリムス投与群（白、n=7：4匹のマウスに移植した7つの膵島、7つの膵島のうち2つはチャンバートラブルのため、移植後11日目までしか観察できなかった）の移植膵島において、移植後1日目に対する各時点での新生血管体積の増加率。全ての値は平均値 ± 標準誤差で示した。* P < 0.05。

图6



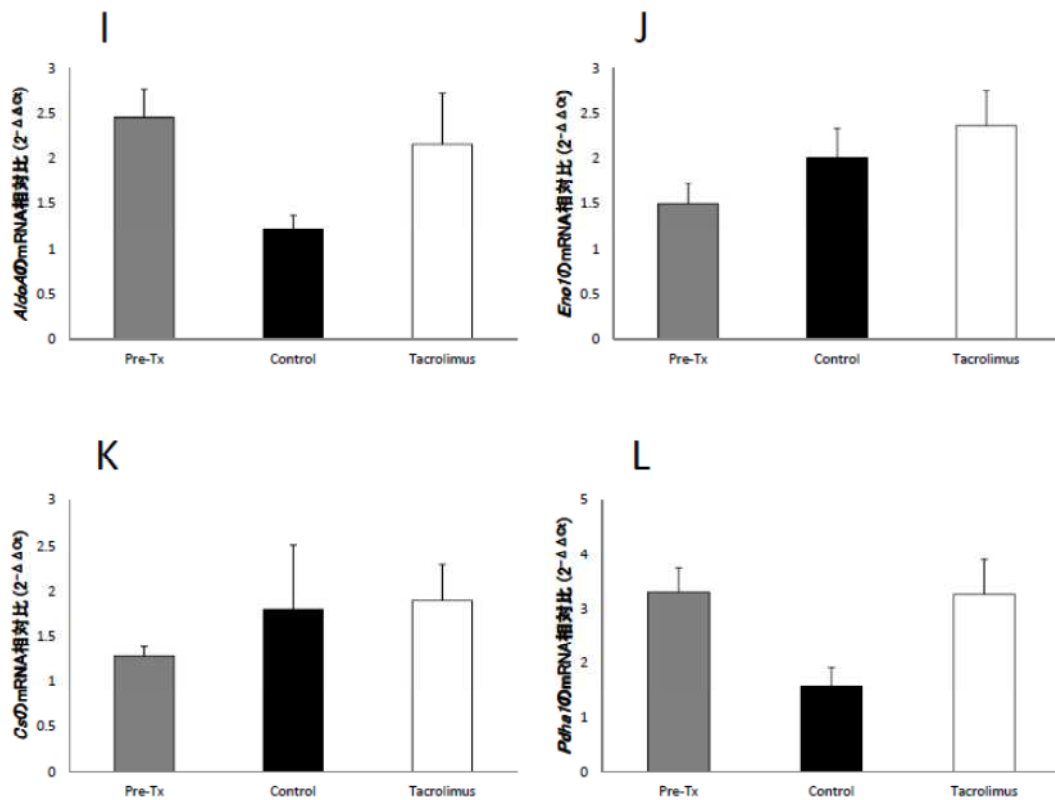


図 6 : 移植前 (灰色、n=6)、コントロール群 (黒、n=6)、およびタクロリムス投与群 (白、n=6) の膵島における *Hif1a* (A)、*Vegfa* (B)、*Mmp14* (C)、*Mbip* (D)、*Mif* (E)、*F3* (F)、*Ccnd1* (G)、*Cdk4* (H)、*Aldoa* (I)、*Eno1* (J)、*Cs* (K)、および *Pdha1* (L) の mRNA 相対比。*移植前膵島に対して P < 0.05、#コントロール群に対して P < 0.05、**移植前膵島に対して P < 0.01。

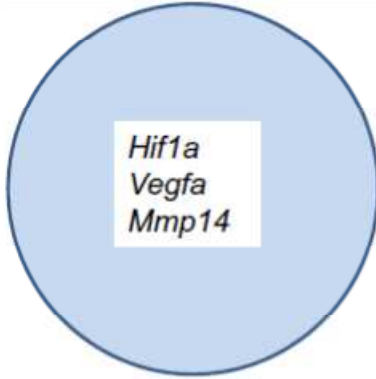
表1

gene symbol	gene name	Gene ID	Probe Number*	Left Primer	Right Primer
<i>Sox4l</i>	Hemoglobin locus with homologous protein 1	ENSMALST00000028208.3	#85	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Slfn</i>	Hypoxia-inducible factor 1 alpha	ENSMALST00000011501.6	#97	gacacagcctccatgagcctcc	gacacagcctccatgagcctcc
<i>Slfn2</i>	Protein-tyrosine phosphatase A	ENSMALST00000028544.4	#97	gacacagcctccatgagcctcc	gacacagcctccatgagcctcc
<i>Sox1</i>	Alpha-actinin	ENSMALST00000009585.5	#77	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox1b</i>	Protein-tyrosine phosphatase B	ENSMALST00000000501.6	#72	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox2</i>	Sox domain protein	ENSMALST00000051501.7	#4	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox3</i>	Hemoglobin activator inhibitor 1	ENSMALST000000041301.3	#65	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox4</i>	Matrix metalloproteinase 24	ENSMALST000000089481.3	#42	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox5</i>	11p15-specific protein-211	ENSMALST00000003962.3	#67	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox6</i>	Cell division protein kinase 4	ENSMALST00000006911.4	#52	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox7</i>	Vascular endothelial growth factor A	ENSMALST00000074521.4	#4	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox8</i>	Collagen alpha 1	ENSMALST00000072354.4	#105	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox9</i>	MAPK12-binding inhibitory protein 1	ENSMALST00000021416.6	#95	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox10</i>	Myocyte-specific protein inhibitor factor	ENSMALST00000003101.3	#104	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox11</i>	Proteoglycan 6	ENSMALST00000025865.6	#6	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox12</i>	DATA-like protein 3	ENSMALST000000115401.1	#1	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox13</i>	ERK3 activator protein like	ENSMALST00000004215.3	#18	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox14</i>	Protein tyrosine phosphatase 3	ENSMALST00000011875.1	#8	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox15</i>	Actin, cytoplasmic 1 (beta-actin)	ENSMALST00000015414.4	#6	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox16</i>	Sox16	ENSMALST00000079152.3	#29	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox17</i>	Hesagen	ENSMALST000000102712.2	#13	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox18</i>	Protein tyrosine phosphatase	ENSMALST00000004401.2	#53	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox19</i>	Protein tyrosine phosphatase	ENSMALST000000085511.3	#11	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox20</i>	Protein tyrosine phosphatase	ENSMALST00000059771.7	#18	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox21</i>	Sox21	ENSMALST00000005261.6	#101	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox22</i>	Protein tyrosine phosphatase E3 component subunit alpha	ENSMALST00000073462.7	#40	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox23</i>	Protein tyrosine phosphatase (SH2 domain) kinase domain 1	ENSMALST00000006601.4	#25	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox24</i>	Protein tyrosine phosphatase	ENSMALST00000010411.1	#27	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox25</i>	Vascular endothelial growth factor B	ENSMALST00000025944.6	#216	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox26</i>	Myogen activator protein kinase 34	ENSMALST00000014702.1	#227	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox27</i>	Proteoglycan 3	ENSMALST00000028811.6	#215	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox28</i>	Protein tyrosine phosphatase	ENSMALST00000051512.5	#16	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc
<i>Sox29</i>	11p15-specific protein-11	ENSMALST00000010402.2	#82	gagcctccatgagcctcc	gagcctccatgagcctcc

*Probe universal probe library

表 1：移植膵島における発現を確認した 35 種類の遺伝子。

低酸素応答/血管誘導因子



細胞周期

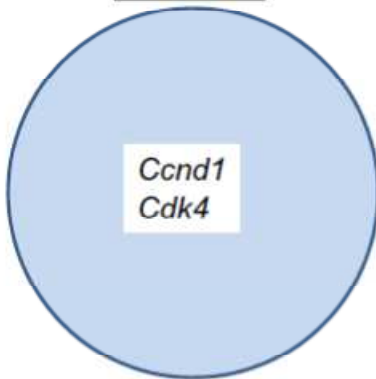
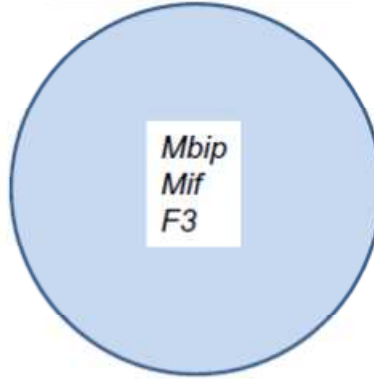


表2

炎症性メディエーター



解糖系酵素/グルコース代謝

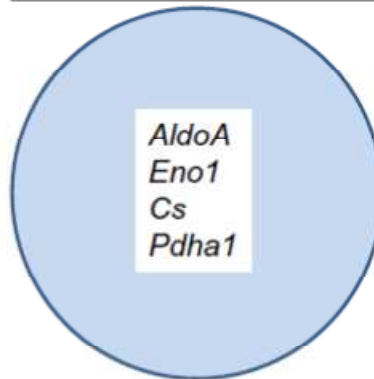


表 2 : 本研究で解析した血管新生や炎症、細胞周期、糖代謝に関する 15 種類の遺伝子。