

表 題 膵臓低温保存による膵島障害の機序の解明および
アポトーシス誘導遺伝子 BBC3 の関与について

論文の区分 論文博士

著 者 名 大森 恵子

所 属 Department of Translational Research and Cellular Therapeutics、
Diabetes and Metabolism Research Institute、
Beckman Research Institute of the City of Hope
Duarte, CA, U.S.A.

2016年08月15日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療学系 専攻 炎症免疫学 専攻科
職名・氏名 教授・高橋 将文

目次

1. 略語	2
2. 背景および研究目的	3
3. 実験材料と方法	7
4. 結果	13
5. 考察	32
6. まとめ	37
7. 謝辞	38
8. 参考文献	39

1. 略語

Atf4: Activating transcription factor 4

BBC3/Bbc3 : BCL2 binding component 3

BiP: Binding immunoglobulin protein

Chop: C/EBP homologous protein

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EM: electron microscope

ER: endoplasmic reticulum

ERK: extracellular signal-regulated kinases

FBS: fetal bovine serum

HMGB1: high-mobility group box 1 protein

HNE: hydroxynonenal

Hsp: heat shock protein

IRE1: inositol-requiring kinase 1

JNK: c-Jun N-terminal kinases

MAPK: mitogen-activated protein kinases

NF- κ B: nuclear factor kappa B

OsO₄: osmium tetroxide

Trb3: Tribbles 3

UPR: unfolded protein response

UW: University of Wisconsin

Xbp1s: spliced X box binding protein 1

2. 背景・研究目的

2.1 膵島細胞移植について

膵島細胞移植は、血糖コントロールの難しい1型糖尿病の治療として、2001年にカナダのエドモントングループでの成功を契機として同様のプロトコルを用いて、世界各国において多くの臨床治験が行われ始めた(1)。近年では、膵島移植は重症1型糖尿病の治療として安全で有用であると認められてきている。2015年の米国のグループによる報告では、移植後5年間で60%の患者において、血糖コントロールの指標となっているHbA_{1c}が7%以下に維持されたとともに、移植前に頻回に起こっていた自覚症状を伴わない低血糖発作が膵島移植によって有意に改善された(2)。しかし、膵島細胞移植の有効性が認められる一方、現在の膵島細胞移植は臓器提供ドナーに依存しているため、ドナー膵臓不足が膵島細胞移植の成功を左右する問題点の一つとして挙げられる。

2.2 膵臓低温保存時間と膵島移植の成功率の関連

長時間の膵臓低温保存は膵島細胞分離操作後の膵島の収率を低下させるとともに、膵島の生存率を低下させるため、膵島移植の成功率を有意に低下させると報告されている(3-6)。低温保存は臓器提供された病院から膵島分離施設までの輸送中の膵臓の細胞代謝活性を最小限に抑制し、虚血による細胞の障害を抑えるために必要な手段ではあるが、現在の保存法に限界があるため、長時間の保存において細胞生存率が著明に低下することが問題となっている。実際、低温保存時間が16時間を超えると膵島分離の成功率が低下するため、多くの膵島分離を行う施設では低温保存虚血が12-16時間を超えると予想される場合はドナー膵臓を受理しないことになっている(5, 7)。さらには、移植前の膵島培養中に膵島細胞生存率が著明に低下するため培養後の膵島細胞数が減少し移植に必要な十分な膵島を回収することができなくなる可能性が高まる(4)。よって、数多くの提供ドナー臓器が移植適応とならない原因の一つとなっている。

2.3 臓器低温保存後の細胞障害の機序

臓器移植における臓器低温保存-血液再灌流後におこる細胞障害（虚血後再灌流障害）の機序の研究はこれまでに数多くあり、その機序は主に、臓器保存中の 1) 低温保存が起因となって生じる細胞障害と 2) 低酸素が起因となって生じる細胞障害に引き続き、移植後の 3) 復温による細胞障害と 4) 再酸素化による細胞障害が混在して成り立つと考えられている(8, 9)。細胞の低温保存がイオンの恒常性を崩し浮腫をきたすとともに、細胞内 ATP が枯渇し、活性酸素の産生とそれにとまうミトコンドリア透過性の亢進により、細胞死が誘導される。さらに、再灌流時に種々の炎症反応が活性化され、細胞死を増加させる(8, 9)。低温保存による細胞死は一般に浮腫や細胞小器官の障害によるネクローシスと考えられているが、保存時間や細胞の種類によって、アポトーシスの関与も報告されている(10, 11)。低温保存時間により細胞内に残っている ATP 含有レベルが異なるため、ATP 量によって細胞がアポトーシスの過程を経るかもしくはネクローシスによって細胞死が誘導されるかが決まるとの報告もある(8, 10)。

膵島の障害は、臓器移植後に生じる低温保存後障害と異なり、膵島の回収から移植までの過程において始まる。膵臓低温保存後の障害は、初めに、膵臓細胞分離中の 37°Cでの消化酵素による膵組織分解中に起こり、続いて膵臓分離後の培養中にさらに細胞死が誘導されると考えられる(図1)。

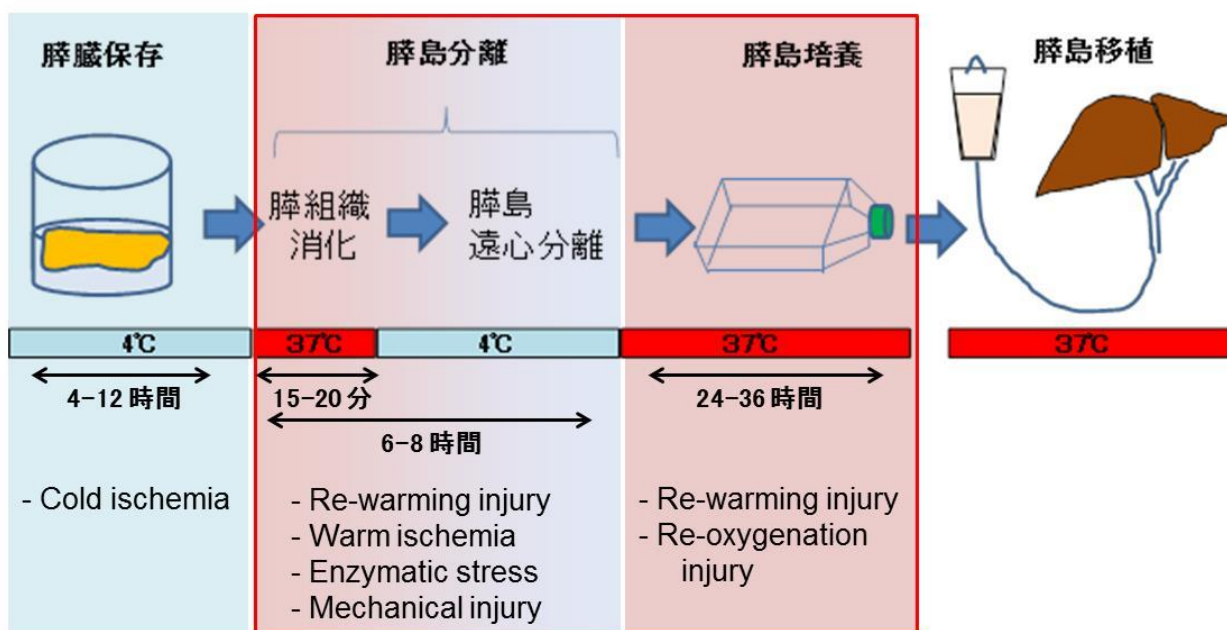


図1：膵臓保存から膵島移植に至るまでの温度変化と細胞障害

膵島分離中の細胞死機序の評価は、消化酵素や機械的ストレスによる細胞障害との区別が難しいこと、および、ヒトの脳死ドナー体内にはすでに酸化ストレスや炎症反応が存在し、その程度はドナーによってレベルが異なるため(12, 13)、低温保存に限定した細胞死の機序を解明するのは非常に困難となっている。

2.4 分離膵島中の炎症性カスケードの活性化と小胞体ストレス

分離したヒトの膵島細胞中に種々の炎症分子、p38 mitogen activated protein kinase (MAPK), c-Jun N-terminal Kinase (JNK), および Nuclear factor (NF)- κ B の活性が認められている(14, 15)。膵臓低温保存が p38MAPK や JNK を活性化することが分かっており、申請者の先行研究および他のグループの研究によると、p38MAPK 阻害剤や JNK 阻害剤を膵臓保存前に膵管から前投与すると、膵島分離後の膵島収穫率と膵島生存率が向上することが示された(16, 17)。p38 や JNK は酸化ストレスによって活性化されることより、膵臓低温保存中と酸化ストレスの関与が示唆されている。また、抗酸化作用のある Nicotinamide を膵島分離液に添加すると8時間膵臓保存後に分離した膵島の細胞死が抑制されることが示されたが(18)、その際の膵島内の p38 および JNK の活性の違いは明らかではない。p38 や JNK の活性に加え、分離したヒト膵島と小胞体ストレスの関与も報告されている(19)。小胞体ストレス応答がうまくいかないと小胞体ストレスによるアポトーシス誘導遺伝子が誘導され、細胞死につながるが、膵臓低温保存が小胞体ストレスを誘発し、細胞死に至るかどうかは分かっていない。

2.5 アポトーシス誘導遺伝子 BBC3 と膵島細胞死

アポトーシス誘導遺伝子 BBC3 (BCL2 binding component 3)、別名 PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) は β 細胞死をつかさどる重要な遺伝子である(図2)。先行研究ではヒト膵島中の BBC3 遺伝子および蛋白は、炎症性サイトカインである TNF- α もしくは TNF- α に加えた IFN- γ との相互作用によって発現が増強され、NF- κ B を活性化させ、ミトコンドリアを介した β 細胞のアポトーシスをきたすことを示した(20)。さらに、ヒト膵島中の BBC3 mRNA 発現レベルが膵島細胞移植後の膵島の機能と相関することを、免疫不全マウスにストレプトゾトシンで糖尿病を誘発したモデルを用いて証明した。BBC3 遺伝子による β 細胞死は他の炎症

性サイトカインである IL-1 β でも同様に誘導されるとともに、高血糖、酸化ストレス、小胞体ストレス、虚血など、種々の刺激で誘導されることが示されている(21-24) (図2)。BBC3 遺伝子と虚血再灌流障害の関連については、小腸細胞、心筋細胞、脳細胞中にアポトーシスを誘導することで示されているが(25-28)、膵臓低温保存による膵島細胞死とどのように関与しているかはいまだ明確ではない。

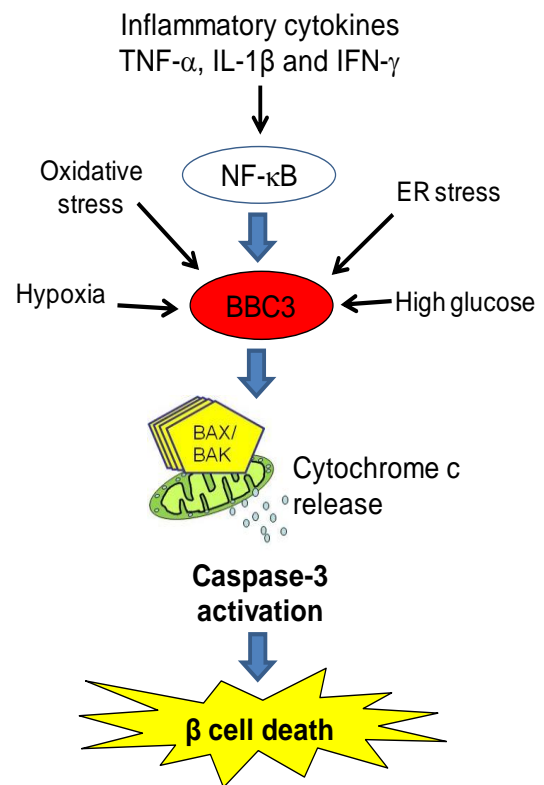


図2：多くの刺激で誘導される BBC3

2.6 本研究の目的

本研究では、1) ラットの膵臓保存モデルを用いて、長時間の膵臓低温保存に起因する膵島細胞死の機序を解明すること、2) 膵臓低温保存に起因する膵島細胞死における BBC3 の関与を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 実験材料と方法

3.1 動物

雄 Lewis (LEW) ラットは City of Hope 動物センターの繁殖コロニーもしくは Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) から入手した。ルシフェラーゼ遺伝子導入 LEW ラット (Firefly ラット) は Missouri 大学から入手し、City of Hope の繁殖コロニーで維持した。体重 300 g から 350 g のラットを臍島ドナーとして使用した。Bbc3 遺伝子ノックアウトマウス (C57BL/6-*Bbc3*^{tm1Ast}/J) は Jackson laboratory から購入し、City of Hope の繁殖コロニーで維持した。週齢 10 から 14 週、および性別がコントロール群と実験群とで一致したマウスを使用した。すべての動物実験プロトコールは City of Hope、Beckman Research Institute の Institutional Animal Care and Use Committee にて認可され、連邦国家、州および地域の規則に従って実施された。

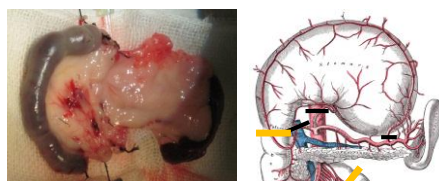
3.2 ラット膵臓摘出、低温保存

麻酔下にて、腹部大動脈（腹腔動脈分岐部近位から左腎動脈分岐部近位直上まで）とともに膵臓、十二指腸、脾臓を一塊として摘出した。摘出前に、膵管の十二指腸開口部から 24G 翼状カテーテルを挿入しておき、肝側は結紮した。臓器摘出直後、大動脈から 4°C に冷却した UW (University of Wisconsin) 液を 0.5 mL 灌流した後、UW 液の入った培養皿に浸し 4°C で 0 および 16 時間保存した (図 3)。

3.3 マウス膵臓摘出、低温保存

ラットと同様の手術を、マウスを用いて顕微鏡下で施行した。膵管は十二指腸開口部および肝側の両方を結紮した。臓器摘出後、UW 液を 0.2 mL 灌流し、UW 液

Rat *en bloc* pancreas preparation



Perfusion of UW through aorta

Pancreas preservation

(16h)

Enzyme injection through pancreatic duct



Islet isolation

Islet culture (up to 24h)

図 3：ラット膵臓摘出-低温保存-膵島分離-培養の流れ

のに入った培養皿に浸し、4°Cで0 および8 時間保存した。

3.4 膵島細胞分離、培養

膵管から Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 液で溶解したコラゲナーゼ (Clzyme RI、VitaCyte、Indianapolis、IN、USA) を注入し、膵臓を膨らませた後、50 mL のチューブに入れて 37°C の恒温槽にて 18 分間 (マウスは 16 分間) 振盪消化した。消化後、Histopaque-1077 を用いて遠心し、膵島を分離した。分離した膵島は顕微鏡下でハンドピック (ピペットで膵島を回収) しながら回収数を数えた。回収した膵島は Ham's F-12 培養液 (10% fetal bovine serum と 10 mM HEPES を含む) で、37°C で最長 24 時間培養した (図 3)。

3.5 膵島の形態観察と生存率評価

膵島の形態は顕微鏡 (Olympus IX50) 下で観察し、膵島を特異的に染色する Dithizon (DTZ) 染色により膵島を確認した。膵島の生存率の評価は膵島を Propidium iodide (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と Fluorescein diacetate (25 μM) で 5 分間染色した後、顕微鏡下で観察した (Olympus IX50)。画像を CellSens1.12Platform ソフトで解析し、Propidium Iodide (PI) で染色した面積を Fluorescein diacetate (FDA) で染色した膵島全体の面積で割り (細胞死率)、それをもとに生存率を計算した。

3.6 電子顕微鏡下での β 細胞の評価

分離した膵島を 6 時間培養後、2% glutaraldehyde を含む 0.1M Cacodylate buffer ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、pH7.2 にて 4°C で一晩固定した。さらに膵島を 0.1M Cacodylate buffer で洗浄し 1% の Osmium tetroxide (OsO_4) を含む 0.1M Cacodylate buffer で固定した後、0.1M Cacodylate buffer にて 3 回洗浄した。サンプルは ethanol と propylene oxide を用いて脱水し、64°C で 48 時間かけて固定後、Leica Ultra cut UCT ultramicrotome を用いて超薄片 (70 nm 厚) をカットした。2% の uranyl acetate で 10 分間染色後、Reynold's lead citrate で 1 分間染色し、透過型電子顕微鏡 (FEI Tecnai 12 transmission electron microscope) で観察し、Ultrascan 2K CCD camera で撮影した。

3.7 4-Hydroxynonenal (HNE) アッセイ

膵島細胞から細胞全蛋白を抽出し、サンプル中の蛋白濃度を Bradford 法によって測定し、10 μ g の蛋白をサンプルとして用いた。4-HNE 付加蛋白量を OxiSelect HNE Adduct Competitive ELISA kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を用いてプロトコールに従って測定した。

3.8 ウェスタンブロット法

膵臓、膵島分離中の膵組織、および膵島の細胞内総蛋白を抽出し、サンプル中の蛋白濃度を Bradford 法によって測定し、10 μ g の蛋白をウェスタンブロット法に使用した。Bbc3 (rodent specific)、BBC3、caspase-3、caspase-9 (rat specific)、p38、phosphor-p38、SAPK/JNK、phosphor SAPK/JNK、p44/42 MAPK (ERK1/2)、phosphor-p44/42 MAPK (ERK1/2)、Heat shock protein (HSP) 70、High mobility group box 1 protein (HMGB1)、 β -actin に対する 1 次抗体および抗ラビット IgG Horseradish peroxidase (HRP)-2 次抗体はすべて Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) から購入した。4-HNE に対する抗体は Cell Biolabs (San Diego, CA, USA) から購入した。X線フィルムに現像した画像は GS-900 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) と Image Lab Software (Bio-Rad) を用いて定量した。

3.9 リアルタイム RT-PCR 法

全 RNA は TRI REAGENT (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH) を用いて抽出され、1.0 μ g の RNA から Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて GeneAmp PCR system 9700 (Life Technologies, Carlsbad, CA) にて cDNA を合成した。BBC3/Bbc3 および ACTB/Actb の mRNA 発現レベルは TaqMan gene expression probes (Life Technologies) と TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) を用いて PCR7500 System (Life Technologies) にて測定した。Hsp70、Xbp1s、Bip、Trb3、Atf4、Chop および Actb は以前論文にて記載された PCR プライマー (29-31) を用いて SYBER Green PCR Master Mix を用いて PCR7500 System (Life Technologies) にて測定した。Primer の一覧は以下の表 1 に示した。測定値は $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法にて解析した。

遺伝子	Forward	Reverse	参考文献 #
Atf4	CTTCTCCAGGTGTTCTCTCGT	TGCTCAGCCCTCTTCTTCTG	(31)
Actb	AGGTCATCACTATCGGCAATGA	CACACTTCATGATGGAATTGAATG	(31)
Chop	GGAGAAGGAGCAGGAGAATGA	AGACAGACAGGAGGTGATGC	(31)
BiP	TCTGCTTGATGTGTGTCCTCTT	GTCGTTACCTTCGTAGACCT	(31)
Hsp70-1	TGGAGGAGTTCAAGAGGAAG	GTAGAAGTCGATGCCCTCG	(29)
Trb3	GGACAAGATGCGAGCCACAT	CCACAGCAGGTGACAAGTCT	(31)
Xbp1s	GAGTCCGCAGCAGGTG	GCGTCAGAATCCATGGGA	(30)

表 1 : 実験に用いた PCR プライマーの一覧

3.10 Firefly ラットを用いたバイオルミネッセンスイメージング

分離した腓島の代謝活性は、Firefly ラットを用いたバイオルミネッセンスイメージングにて評価した。種々の条件下で処置した腓島 60 個をハンドピックし、24 穴平底プレートに培養液とともに入れ、測定直前に D-luciferin 0.75 mg/mL (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を含む培養液を加え、ルミネッセンス量を Xenogen Imaging system (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) を用いて定量した。

3.11 Small interfering RNA (siRNA) トランスフェクション

腓島の Bbc3 遺伝子をノックダウンするため、Firefly ラット腓島を分離直後に 50 nM Bbc3 siRNA もしくは同濃度の non-targeting scrambled control siRNA (SMARTpool siRNA, GE Dharmacon, Lafayette, CO, USA) を DharmaFECT (GE Dharmacon) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションによる遺伝子ノックダウン率はトランスフェクション 24 時間後の腓島中の Bbc3 mRNA の発現レベルを PCR で測定することで確認した。

3.12 HMGB1 に対する ELISA 法

細胞死および炎症反応の指標とされている HMGB1 の腓島培養液中の濃度を HMGB1 detection assay kit (Chondrex Inc., Redmond, WA, USA) により定量した。ハンドピックした 50 個の

マウスの膵島を 300 μ L の培養液で 24 ウェルプレートにて 18 時間、37°C で培養し、培養液を回収後、1500 rpm で 1 分間遠心した上清をサンプルとして使用し、プロトコールに従って HMGB1 値を測定した。

3.13 ペリフュージョンシステムによるインスリン分泌アッセイ

マウスの膵島 100 個を分離後、前記の培養液にて 12 時間、37°C で培養後、培養液を 3.3 mM グルコースと 10% FBS を含む RPMI1640 に交換し、さらに 4 時間培養した。膵島は Cytodex ビーズ (Cytodex™ 1、GE Healthcare Bio-Sciences AB、Uppsala、Sweden) の間に挟んで小さな円柱カラム中に詰め、チューブと接続した一方をペリスタルティックポンプにつなげて、37°C 下で 3 mM グルコースを含む Krebs-Ringer 液にて 15 分、続いて 17 mM グルコースを含む Krebs-Ringer 液にて 15 分灌流させた。灌流液はフラクションコレクターにて毎分ごとに回収した (0.5 mL/分)。回収した灌流液サンプル中のインスリン濃度をマウスのインスリン ELISA キット (Merckodia、Winston Salem、NC、USA) を用いて測定した。3 mM グルコースおよび 17 mM グルコース灌流中のインスリン分泌量は曲線下面積を用いて計算した。高濃度グルコース刺激による第一相インスリン分泌量は、17 mM グルコースに変換後最初の 5 分間灌流中の総インスリン分泌量から同期間の 3 mM グルコースで灌流した平均インスリン分泌量を差し引いて計算した。

3.14 ヒト膵臓低温保存および膵島分離

ヒト膵臓および膵島の研究利用は Institutional Review Board of the Beckman Research Institute of the City of Hope で認可されたプロトコールで行った。膵島は Southern California Islet Resources Center、City of Hope の標準プロトコールに沿って分離した。膵組織および膵島のサンプルの回収は、1) 膵臓低温保存前と 2) 膵臓低温保存後、続いて 3) 膵島分離操作中の温消化の終わりと 4) 遠心分離前、および 5) 分離後膵島を 2 日間培養した後に行った。回収したサンプルは、細胞内総蛋白を抽出するまで -80°C で保存した。回収されたサンプルから抽出した蛋白を用いて、BBC3 の発現をウエスタンブロット法で評価した。本実験で使用した膵臓の平均低温虚血時間は 380 ± 53 分、平均温消化時間は 15 ± 1 分、平均冷消

化時間は 41 ± 1 分、ドナー年齢の中間値は 44 ± 3 歳、脳死期間 1 ± 0 日で、どの臍臓も温虚血時間はなかった。

3.15 ヒト臍島の低温保存と培養

上記施設で分離したヒト臍島は 3-5 日間培養後、研究用に分配された。臍島は 1.8 mL の密閉チューブに入れ、常酸素 UW 液もしくは、使用前に低酸素を含む空気 (1%酸素、94%窒素、5%二酸化炭素) を透過させた低酸素 UW 液にて、24 時間もしくは 48 時間 4°C で保存した。低温保存後、UW 液を除去し、培養液に換え、臍島を 6 穴平底プレートにて 37°C で培養した。一部の実験では、臍島と培養液の入った培養皿を密閉容器に入れ、低酸素空気を充満させ、 37°C で最長 48 時間培養した。種々の条件下で培養もしくは保存された臍島から RNA および蛋白を抽出し、RT-PCR およびウエスタンブロット法を用いて評価した。また、上記に示した Propidium iodide と Fluorescein diacetate 染色により、臍島の生存率の評価を行った。

3.16 統計

結果は平均値 \pm 標準誤差で表記した。統計的有意差の検定は Paired-T-test もしくは Unpaired-T-test にて評価し、 $P < 0.05$ を有意差ありと判断した。統計解析は Microsoft Excel および Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を用いた。

4. 結果

4.1 長時間の膵臓低温保存に起因する膵島細胞死の機序の解明

4.1.1 長時間の膵臓低温保存は膵島分離後の膵島数および生存率を減少させる

16 時間以上のドナー膵臓の低温保存はヒト膵島分離の成功率を低下させるという報告があるが(4)、当研究におけるラットの膵臓を用いた実験においても同様の結果が得られた。16 時間低温保存した膵臓 (16 時間低温保存膵臓 : 16h-cold) から分離した膵島数は膵臓摘出後に保存しなかった膵臓 (低温保存無し膵臓 : 0h-cold) に比較して有意に低かった (図 4A)。膵島分離後、膵島を 37°Cにて培養すると、16 時間低温保存膵臓から分離した膵島の細胞死は 6 時間後に著明に上昇したのに対し、低温保存無し膵臓から分離した膵島ではこの著明な細胞死の上昇は見られなかった (図 4B、4C)。さらに 24 時間の細胞培養では細胞死に至ったほとんどの細胞は破壊され細胞培養液中の粒子となったため、24 時間後に残った膵島の大部分は高い生存率を保っていた (図 4C)。

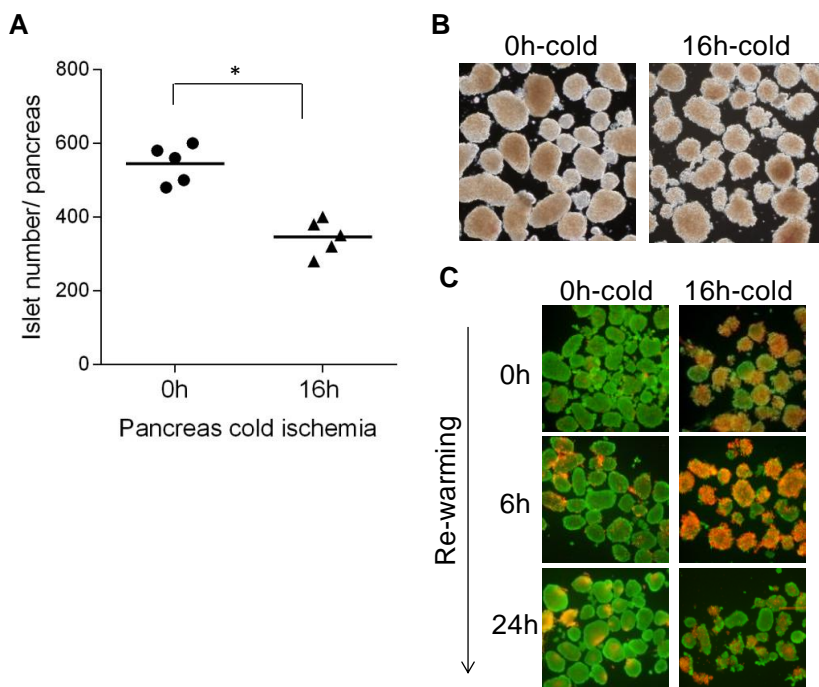


図 4: 膵臓長時間低温保存による膵島分離後の膵島数の低下および培養後の膵島細胞死の増加
0 または 16 時間低温保存した膵臓から膵島を分離し、A) 両群における膵島収率を比較した (N=5、*P<0.05)。両群における膵島の B) 培養 6 時間後の形態、および C) 培養 0、6、24 時間後の FDA(緑=生存)/PI(オレンジ=細胞死)染色による細胞死の代表的写真を示す。

4.1.2 膵島の低温保存およびそれに続く復温・培養は β 細胞の膜を破壊させる

次に、分離した膵島を6時間培養した後の β 細胞の形態を電子顕微鏡にて観察した。16時間低温保存膵臓から分離した膵島では β 細胞の著明な空胞化、ミトコンドリア膜の崩壊、そして小胞体のバルーン化現象が観察された (図5D, 5E, 5F)。細胞の浮腫および、細胞膜と細胞小器官膜の破壊も β 細胞内に観察され (図5C)、細胞ネクロシスの兆候が示されたのに反し、アポトーシスの特徴である染色質の凝縮は16時間低温保存および低温保存無し膵臓の両者から分離した膵島中には観察されなかった。低温保存無し膵臓から分離した膵島の β 細胞はほとんど正常な形態であったが (図5A)、軽度の小胞体のバルーン化現象が観察されたことから、低温保存の有無にかかわらず小胞体ストレスの存在が示唆された (図5B)。

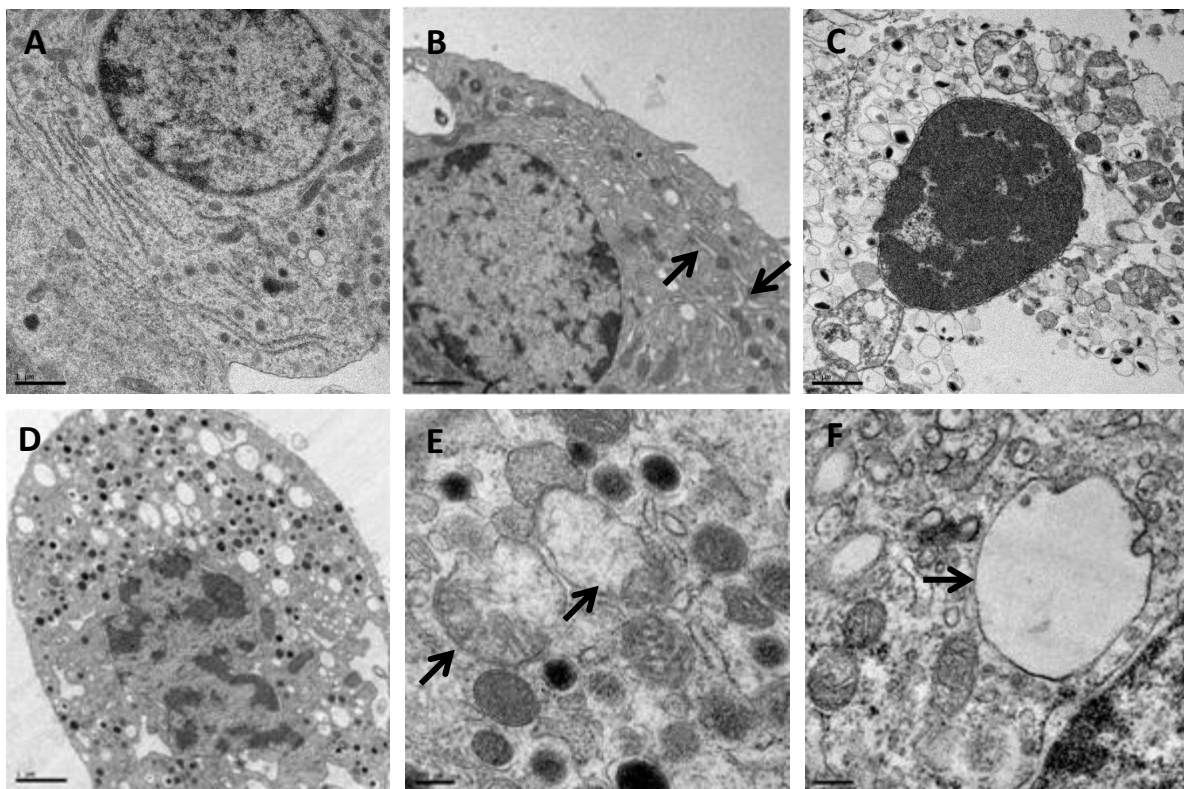


図5：電子顕微鏡による β 細胞の形態観察

低温保存無し膵臓から分離した膵島中の β 細胞の代表的形態として A) 正常な細胞構造および B) 軽度に拡張した小胞体 (矢印) を示す。16時間低温保存膵臓から分離した β 細胞の代表的形態として C) 細胞膜および細胞小器官膜が崩壊した細胞死、D) 細胞内の空胞化、E) ミトコンドリアの崩壊 (矢印) および F) 小胞体のバルーン化 (矢印) を示す。

スケール： A-D: 1 μ m, E-F: 200 nm

4.1.3 膵島の低温保存およびそれに続く復温・培養は膵島中の脂質過酸化反応の副産物および酸化ストレスによって誘導される関連シグナルを増加させる

細胞膜の破壊をきたす最も重要な機序の一つは、酸化ストレスによる細胞膜脂質の過酸化反応である(32)。酸化ストレスは、臓器低温保存後に細胞障害を誘導することが示されている(33)。したがって本研究においては、脂質過酸化反応の副産物である 4-HNE の膵島中の存在を評価した。16 時間低温保存膵臓から分離した膵島中の 4-HNE 付加蛋白量は、低温保存無し膵臓から分離した膵島にくらべ有意に上昇していた(図 6A)。次に、酸化ストレスによって誘導される細胞内シグナルの活性化を評価した。膵臓低温保存によって、膵島中の p38MAPK や JNK などの MAP キナーゼ・カスケードが活性化されるとの報告があるが(16, 34)、当研究においても p38MAPK、JNK さらには Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) が著明に活性化されることが示された。以前の報告に加え、本研究において新たに明らかになったことは、膵臓低温保存によって誘導された膵島分離直後の膵島内の JNK、ERK1/2 の活性化の上昇は一過性であり、6 時間の培養後には低温保存をしていない膵島内レベルと同等になったのに対し、p38MAPK の活性化は 6 時間の培養後も高く維持されていた(図 6B、6C、6D)。酸化ストレスとそれによって誘導された Heat shock protein (HSP) 70-1 および JNK の活性化における関連はすでに種々の細胞で報告されている(35-37)。HSP70 ファミリーの蛋白は蛋白質折りたたみを促進させ、細胞のストレスから守ることが知られている。本研究では、16 時間低温保存膵臓から分離した膵島において、6 時間の培養後に、低温保存無し膵島と比較して、HSP70-1 の mRNA と蛋白の両者がともに有意に上昇した(図 6E、6F)。

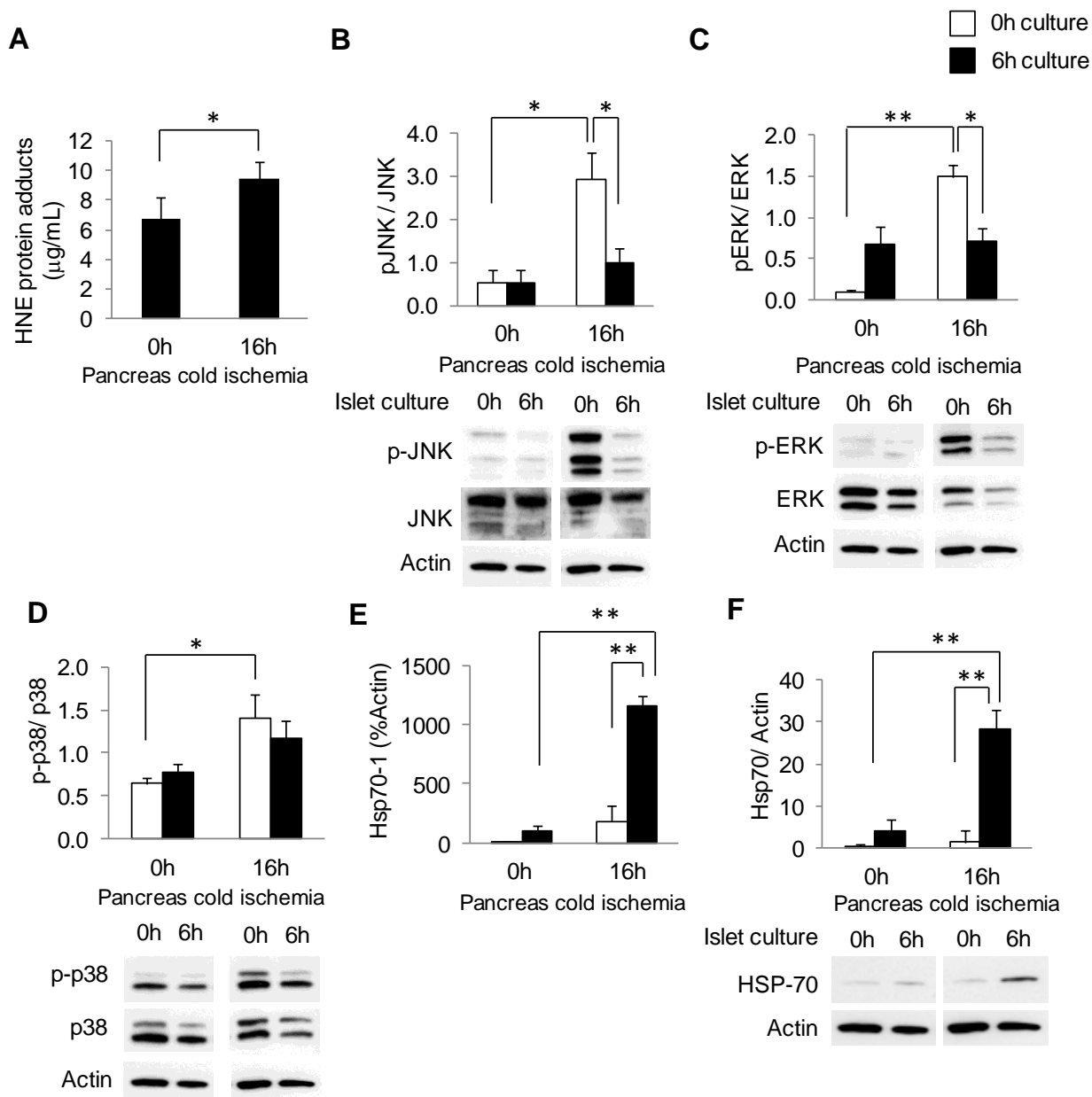


図6：膵臓低温保存によって誘導された脂質リン酸化の上昇と MAPK 活性および HSP-70 蛋白の上昇

A) 6 時間培養後の膵島中の 4-HNE 蛋白付加体量を ELISA にて測定した。0 および 16 時間低温保存した膵臓から分離した膵島の培養前および 6 時間培養後の B) JNK、C) ERK1/2、D) p38 の活性および F) HSP70 蛋白についてウエスタンブロット法を用いて評価した。JNK、ERK1/2、p38 のリン酸化(phosphorylation)はそれぞれの活性化を示し、p-JNK、p-ERK1/2、p-p38 で表現した。JNK、ERK1/2、p38 のリン酸化はそれぞれのリン酸化していない蛋白を、Hsp70 は β -actin を内部コントロールとして定量化した。E) HSP70-1 mRNA は RT-PCR 法で測定した (N=4、*P<0.05、**P<0.01)。

4.1.4 膵臓低温保存の有無に関わらず、膵島細胞分離は小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現を上昇させる

小胞体ストレスが、膵臓の低温保存による膵島細胞死と関連するかを検討するため、小胞体ストレス応答に関連する遺伝子の変化を RT-PCR 法を用いて評価した。小胞体ストレスに応答してスプライシングを受けた X-box binding protein 1 (Xbp1s) mRNA は低温保存時間に関係なく、分離後の膵島に高く発現していたが、6 時間の培養後には有意に低下した (図 7A)。この結果より、Inositol-requiring kinase 1 (IRE1)/Xbp1 系のカスケードが膵島分離中に活性化したと推測された。また、小胞体ストレスによって誘導されるアポトーシスに関連すると考えられている遺伝子、Tribbles 3 (Trb3)、C/EBP homologous protein (Chop) および Activated transcription factor 4 (Atf4) の発現は、膵臓低温保存の有無に関わらず、培養 6 時間後に有意に上昇しており、両グループ間の相違は認められなかった (図 7C、7D、7E)。小胞体シャペロン結合免疫グロブリン蛋白である Binding Immunoglobulin Protein (BiP) の mRNA は 16 時間低温保存膵臓から分離した膵島において、低温保存の無い膵島から分離した膵島に比較して、6 時間の培養後に有意に上昇した (図 7B)。

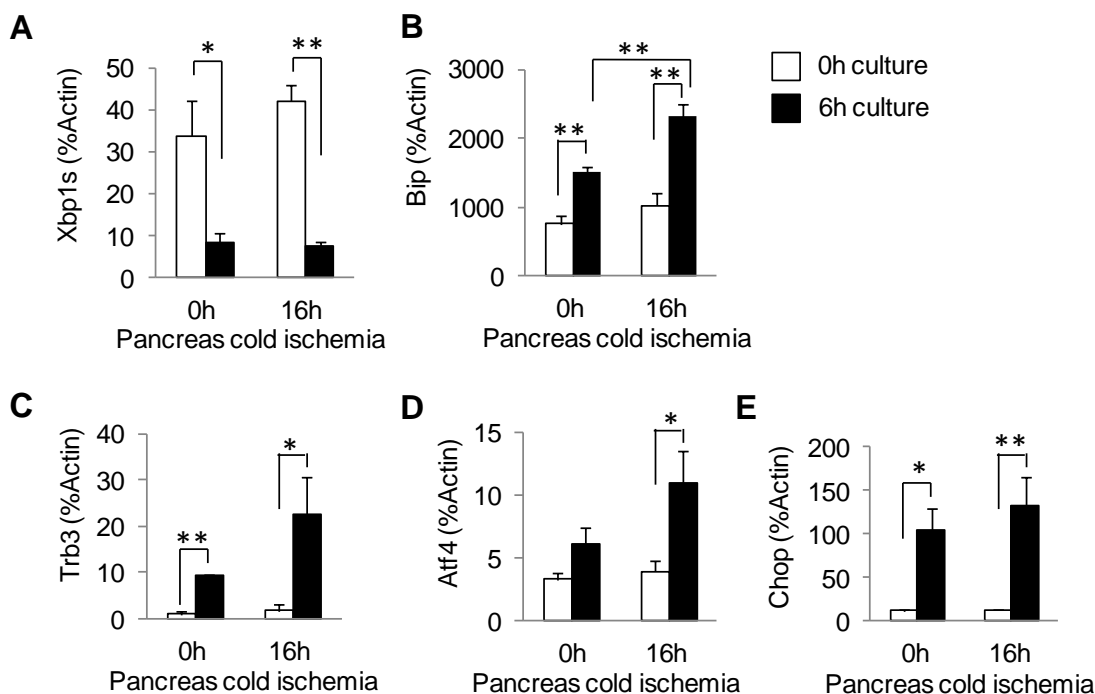


図 7：膵島分離によって活性化した膵島の小胞体ストレス応答

0 時間および 16 時間低温保存した膵臓から分離した膵島の培養前および 6 時間培養後における小胞体ストレス応答に関連する A) スプライシングを受けた Xbp1 (Xbp1s)、B) Bip、C) Trb3、D) Atf4、E) Chop の mRNA 発現レベルを RT-PCR 法にて測定した (N=4、*P<0.05、**P<0.01)。

4.1.5 膵臓低温保存による膵島細胞死に Caspase-3 の活性化と Bbc3 の上昇が関与する

続いて、膵臓の低温保存とそれに続く膵島の復温・培養によって誘導された膵島細胞死とアポトーシスの関与を評価した。膵島細胞死を司る重要な遺伝子 Bbc3 の膵島中の mRNA と蛋白発現を調べたところ、16 時間低温保存膵臓から分離した膵島においては両者とも保存無しの膵臓から分離した膵島に比較して、培養 6 時間後に有意な上昇が認められた (図 8A、8B)。Bbc3 遺伝子による Caspase-3 の活性化が予想されたことから、同検体 (16 時間低温保存膵臓から分離した膵島を 6 時間培養後) を用いて Caspase-3 の活性化を評価したが、予想に反して Caspase-3 の活性化は認めなかった。

さらに、膵島分離直後および培養 2 時間後の Caspase-3 の活性化を調べた。Caspase-3 の活性化は膵島分離直後の膵島で上昇傾向を示したが、検体によりばらつきがみられたため有意差はなかった。一方、この活性化は、培養 2 時間で有意に上昇していた (図 8C)。この結果より、分離した膵島は培養後早期に Caspase-3 の活性化を経由したアポトーシスによって細胞死を誘導することが示唆された。さらに、アポトーシスのシグナル伝達経路において、Caspase-3 よりも上流にある、ミトコンドリアを介したアポトーシスの指標となっている Caspase-9 の活性化を調べたところ、分離直後および培養 2 時間後の膵島の Caspase-9 の活性化に有意な差はなく、膵臓の低温保存の有無によっても変化を認めなかった (図 8D)。

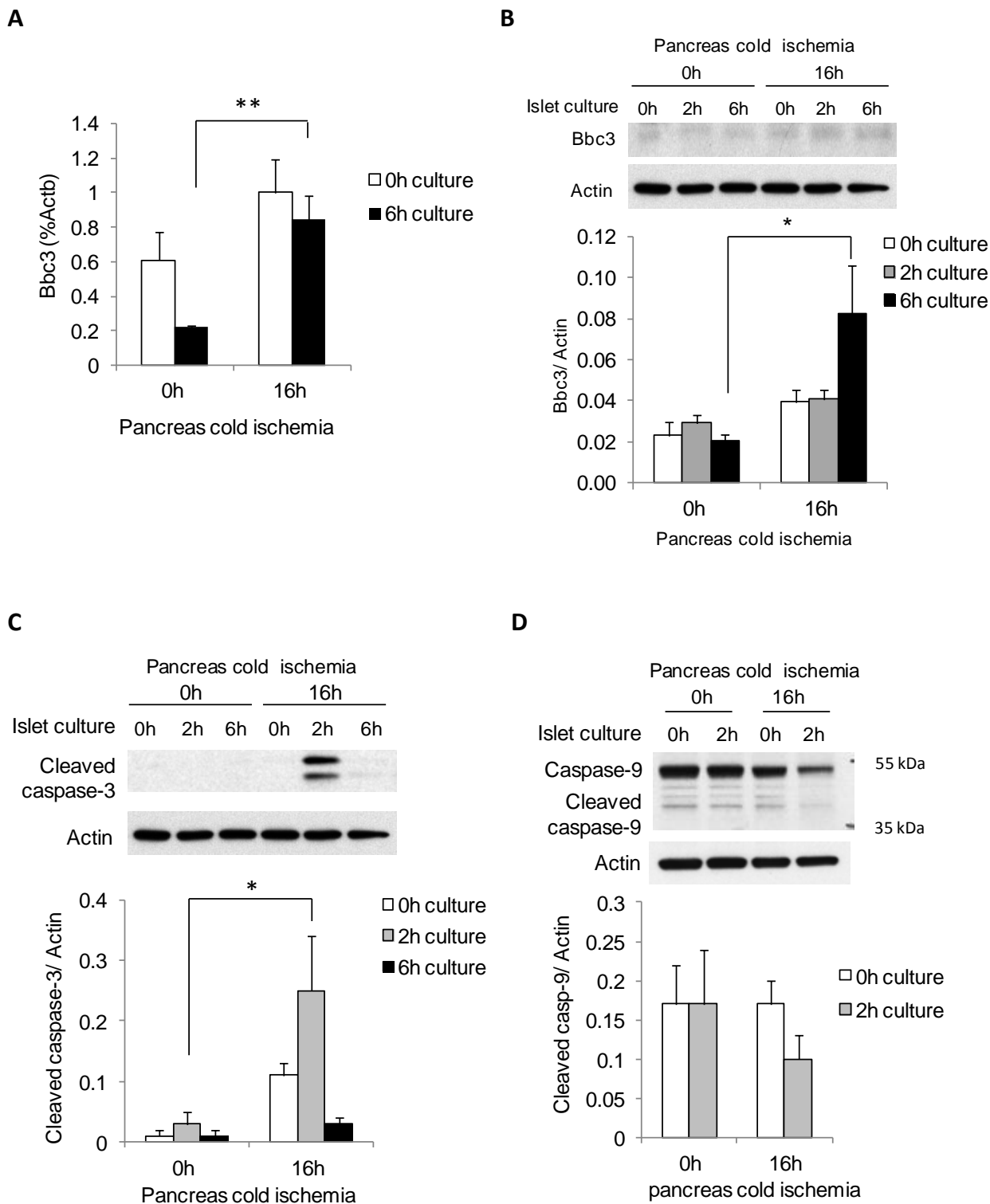


図8：膵臓低温保存による膵島細胞死と Bbc3 および Caspase-3 の関連

0 時間および 16 時間低温保存した膵臓から分離した膵島の培養前および 6 時間培養後における A) Bbc3 mRNA の発現レベルを RT-PCR 法にて測定した (N=4、**P<0.01)。同膵臓から分離した膵島の培養前、培養 2 時間後、培養 6 時間後の B) Bbc3 蛋白、C) Cleaved Caspase-3 蛋白 (17-kDa および 19-kDa)、D) Caspase-9 蛋白の発現レベルをウエスタンブロット法にて測定し、 β -actin を内部コントロールとしてそれぞれの蛋白を定量化した (N=4、*P<0.05)。

4.1.6 16時間の膵臓低温保存は膵臓中の Caspase-3 の活性化を誘導する

膵臓低温保存によって膵組織中にアポトーシスが誘導されるかを、Caspase-9 と Caspase-3 の活性化、および Bbc3 蛋白の発現を測定することによって評価した (図 9A)。16 時間低温保存膵臓の組織中の Caspase-3 の活性化は低温保存無しの膵組織に比べ有意に上昇していたが、Caspase-9 の活性化や Bbc3 蛋白の発現に差は見られなかった (図 9B、C、D)。

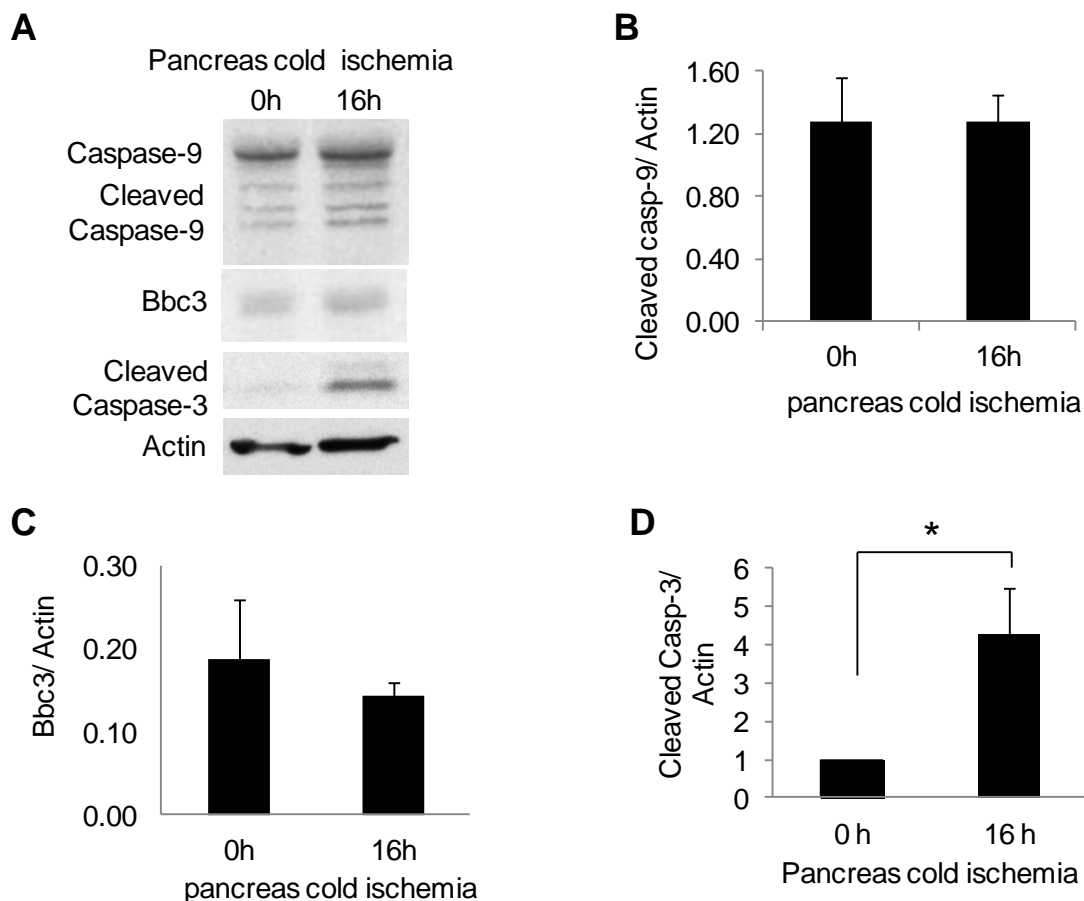


図 9 : 低温保存後膵臓中の Caspase-3 の活性化の上昇

0 時間および 16 時間低温保存後の膵臓中の A) Caspase-9、Cleaved Caspase-9、Bbc3、Cleaved Caspase-3 の代表的ウエスタンブロット、および内部コントロールとして β -actin を使用し定量測定した B) Cleaved Caspase-9、C) Bbc3、D) Cleaved Caspase-3 を示す (N=3、*P<0.05)。

4.2 低温保存に起因する膵島細胞死と Bbc3/BBC3 遺伝子との関連

4.2.1 膵島低温保存・復温により、膵島細胞活性が低下するとともに、Bbc3 mRNA の発現が上昇する

膵島における低温保存・復温障害を Firefly ラットの膵島を用いて評価した。ルシフェラーゼ遺伝子導入細胞は ATP と酸素の存在下でルシフェリンと反応し生物発光するため細胞活性や細胞内 ATP の評価に用いられており (38, 39)、低温保存された膵島の発光量は膵島生存率に関連すると報告されている (39)。本研究では、16 時間低温保存前後の膵島の生物発光を評価したところ、低温保存直後は保存前と比べ発光量に変化はなかったが、保存後 6 時間培養後には発光量が保存前の $35 \pm 4\%$ になり、有意に低下した。また、低温保存を行った膵島の培養 6 時間後の発光量は、低温保存なしの膵島と比較して有意に低下していた (図 10A, B)。次に、低温保存によって誘導された膵島障害と Bbc3 遺伝子の関連を評価するため、膵島保存前後および培養後の膵島における Bbc3 mRNA 発現を評価した。Bbc3 mRNA の発現は低温保存の前後で変化はなかったが、保存後 24 時間培養により、培養前に比較して有意に上昇していた (図 10C)。一方、低温保存なしの膵島では 48 時間の培養前後で Bbc3 mRNA の発現量に変化を認めなかった (図 10C)。

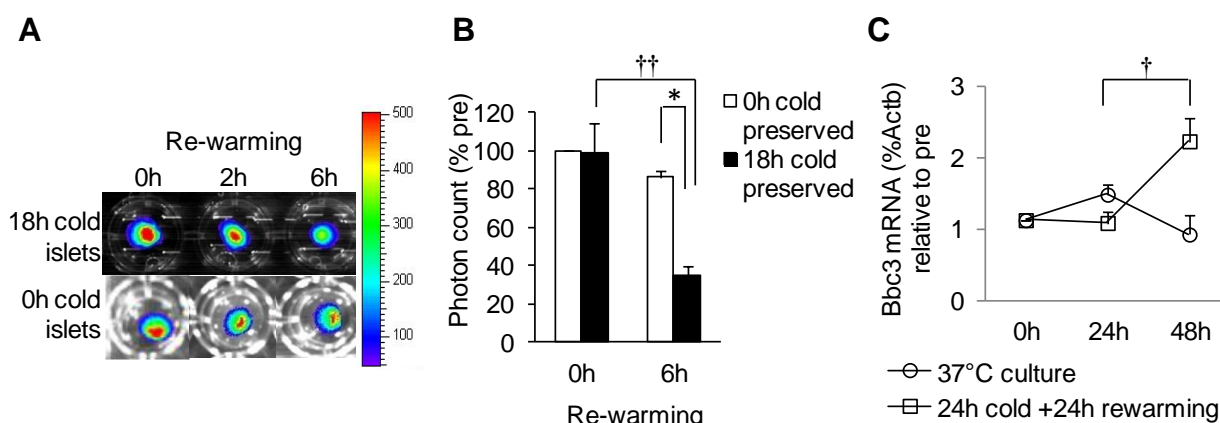


図 10 : 膵島低温保存-培養によるミトコンドリア活性の低下と Bbc3 遺伝子発現の上昇

A) 0 時間もしくは 18 時間低温保存に続く 6 時間培養前後の、Firefly ラット膵島のルシフェラーゼ-ルシフェリン反応の代表的画像を示す。B) 0 時間もしくは 16 時間低温保存した膵島の培養前後の発光量を定量し低温保存前の発光量と比較した (N=3、* $P < 0.05$ by un-paired t-test、†† $P < 0.01$ by paired t-test)。C) 24 時間低温保存した後、24 時間培養した膵島、および同時間 37°C で培養を続けた膵島の Bbc3 mRNA レベルの変化を経時的に測定した (N=3、† $P < 0.05$ by paired t-test)。

4.2.2 膵島の Bbc3 遺伝子ノックダウンはラットの膵島の低温保存・復温障害を減少させる

Bbc3 が膵島の障害に直接関わるかどうかを証明するため、低温保存前の Firefly ラットの膵島に Bbc3 siRNA をトランスフェクションした。Bbc3 siRNA をトランスフェクションした膵島中の Bbc3 mRNA の発現はコントロール siRNA をトランスフェクションした膵島に比較して 39.6%低下した (図 11A)。さらに両群の Firefly ラットの膵島を 18 時間低温保存後、6 時間培養した後の細胞活性をバイオイメージングにて評価すると、Bbc3 siRNA をトランスフェクションした膵島はコントロール siRNA をトランスフェクションした膵島に比較して、培養後の生物発光量が有意に高かった (図 11B、11C)。

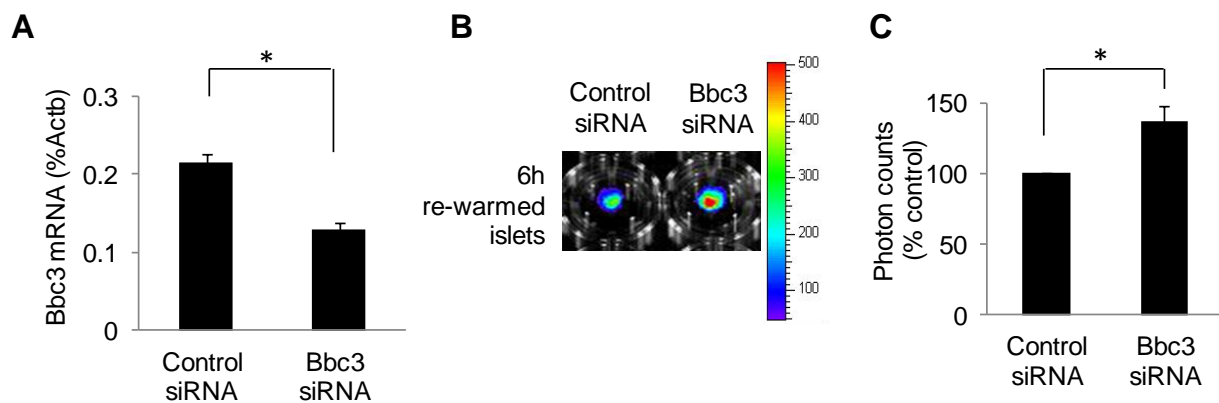


図 11 : Bbc3 遺伝子ノックダウンによる低温保存後膵島の細胞活性の向上

A) Firefly ラットの膵島を分離直後、Bbc3 およびコントロール siRNA を膵島にトランスフェクションし、24 時間後の Bbc3 mRNA レベルを RT-PCR 法にて測定した (N=3、*P<0.05)。B) Bbc3 およびコントロール siRNA をトランスフェクションした Firefly ラットの膵島を 18 時間低温保存後、6 時間培養した後の細胞活性をルシフェラーゼ-ルシフェリン反応にて評価した代表的画像を示す。C) Bbc3 siRNA をトランスフェクションした膵島の発光量を定量し、コントロール siRNA をトランスフェクションした膵島の発光量と比較した (N=3、*P<0.05)。

4.2.3 Bbc3 欠損マウスの臍島は野生型臍島に比較して、低温保存・復温障害に対する感受性が低い

Bbc3 遺伝子の有無が臍臓低温保存および、それに続く臍島分離、培養後の臍島の生存率とどのように関係するかを調べるため、Bbc3 欠損および野生型マウスの臍臓を用いて実験を行った。臍島分離直後の臍島回収数は、低温保存しなかった野生型臍臓群に比較すると、8 時間低温保存した Bbc3 欠損臍臓群および野生型臍臓群の両群にて有意に低下した (図 12A)。さらに臍島生存率を臍島培養 24 時間後に評価したところ、8 時間低温保存した野生型の臍臓から分離した臍島の生存率は、低温保存をしなかった臍臓から分離した臍島に比較して有意な低下を認めた。これに対し、同時間低温保存した Bbc3 欠損臍臓から分離した臍島では、臍島生存率の有意な低下は認められず、Bbc3 の欠損が臍臓低温保存によって誘導された細胞死を抑制することが明らかになった (図 12B、12C)。

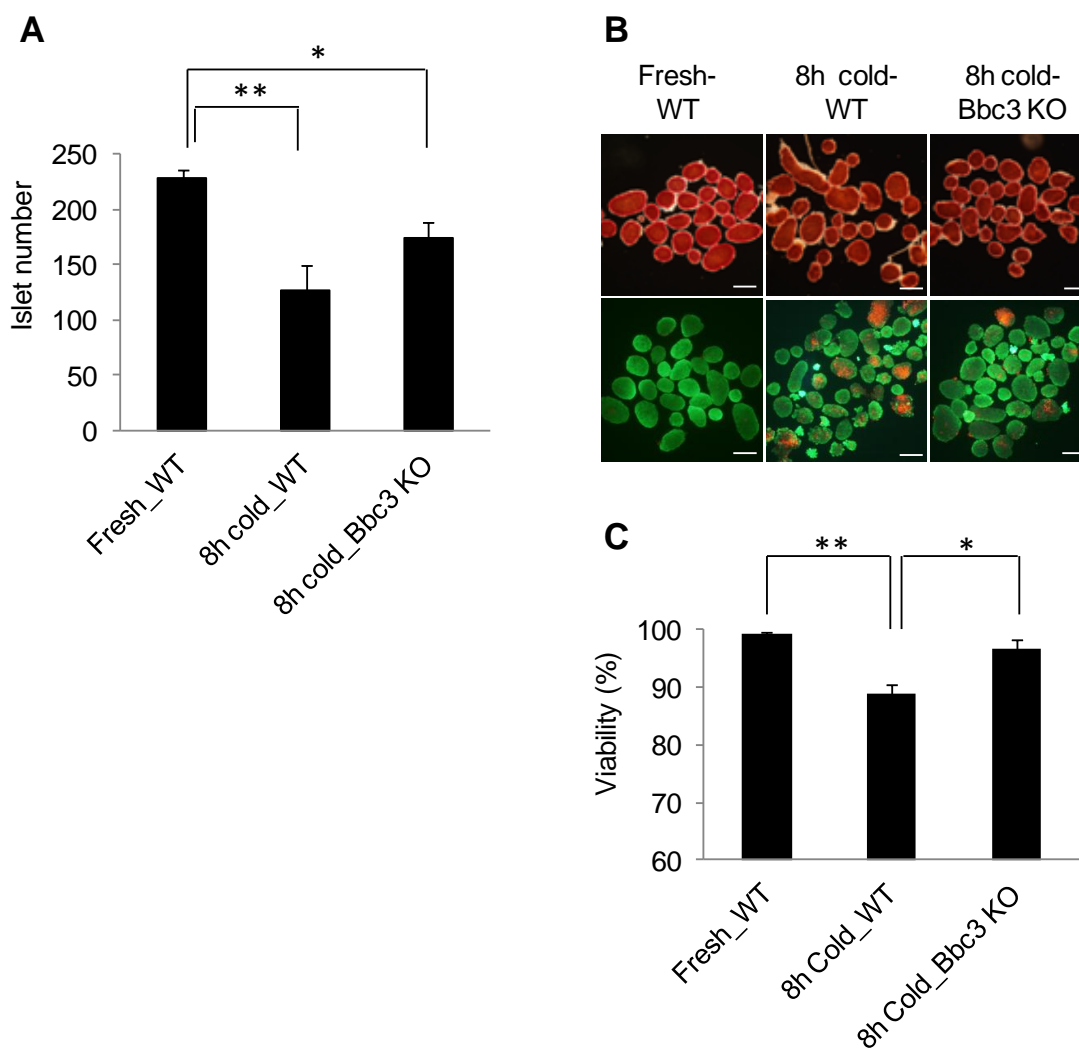


図 12：膵島分離後の膵島数と培養後の膵島生存率

0 時間および 8 時間低温保存した野生型マウスの膵臓および 8 時間低温保存した Bbc3 欠損マウスの膵臓から分離した A) 膵島回収数を示す。B) 24 時間培養後の膵島の DTZ 染色 (上段) と FDA (緑=生存)/PI (オレンジ=細胞死) 染色による生存率の評価 (下段) の代表的画像 (スケール=200 μm)、および C) 生存率を画像解析し定量化したグラフを示す (N=5、*P<0.05、**P<0.01)。

4.2.4 膵組織および膵島中の Bbc3 欠損は消化後の膵組織および培養後の膵島の HMGB1 の減少と関連する

膵島の Bbc3 を介した低温保存による細胞障害がどのような機序によって生じるかを調べるため、細胞死と Caspase-3 の活性および HMGB1 との関連を検討した。膵臓の低温保存・復温障害は 37°C で酵素消化を行うときに誘導されると考えられるため、消化後の膵組織中の Caspase-3 および HMGB1 の蛋白発現を Bbc3 発現と比較した (図 13A)。HMGB1 蛋白発現は 8 時間低温保存した野生型マウスの膵臓から消化された膵組織では、低温保存しなかった野生型マウスの膵臓の消化後膵組織に比較して有意に上昇した (図 13C)。同検体での Bbc3 蛋白の発現を調べたところ、HMGB1 蛋白の上昇と同様に 8 時間の低温保存による Bbc3 蛋白の上昇が確認された (図 13E)。一方、8 時間低温保存した Bbc3 遺伝子欠損マウスの消化後膵組織中の HMGB1 蛋白発現は、同時間低温保存した野生型膵組織に比べ有意に低く、低温保存のない野生型膵組織の HMGB1 蛋白発現と同等のレベルであった (図 13C)。次に、分離した膵島を 37°C で培養した後の膵島中の HMGB1 の発現を同様に評価したところ、8 時間低温保存した Bbc3 欠損マウス膵臓から分離した膵島では同条件下の野生型膵島に比較して有意に低く、低温保存のない野生型膵島と同等レベルであった (図 13B, 13D)。これらの膵島中の Bbc3 蛋白発現レベルは HMGB1 蛋白発現と同様の傾向を示した (図 13F)。さらに、8 時間低温保存した Bbc3 欠損マウス膵臓から分離した膵島の培養液中の HMGB1 分泌量は、野生型膵臓の低温保存の有無に関わらず両群から分離した膵島の培養液中の HMGB1 分泌に比較して有意な低値を示した (図 13G)。

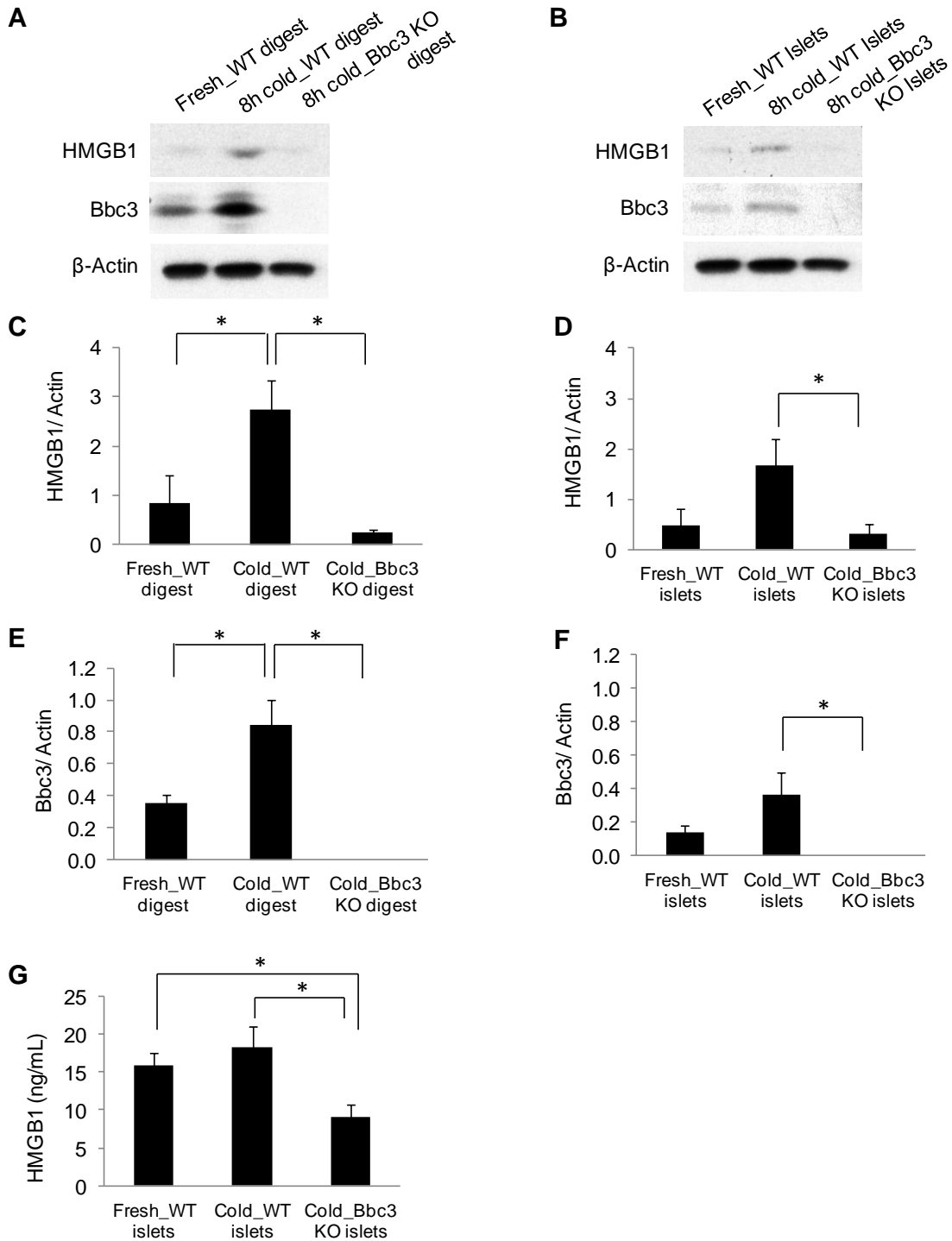


図 13 : 膵島内および膵島培養液中の HMGB1 量の評価

0 時間および 8 時間低温保存した野生型膵臓、および 8 時間低温保存した Bbc3 欠損膵臓の、消化後膵組織および 24 時間培養後の膵島の HMGB1 と Bbc3 の蛋白発現をウエスタンブロット法にて評価した。A) 消化後膵組織および B) 膵島の、HMGB1 と Bbc3 の代表的ウエスタンブロットを示した。消化後膵組織の C) HMGB1 および E) Bbc3 蛋白レベル、および、膵島の D) HMGB1 および F) Bbc3 蛋白レベルを、 β -actin を内部コントロールとして定量化した (N=3、*P<0.05)。G) 膵島培養液中の HMGB1 蛋白を ELISA 法にて測定した (N=6、*P<0.05)。

4.2.5 Bbc3 欠損は膵臓低温保存-膵島分離-培養後の膵島の脂質過酸化生成物を減少させる

膵臓の低温保存によって誘導される膵島の酸化ストレスと Bbc3 遺伝子の関与を、脂質リン酸化の副産物である 4-HNE 蛋白付加体を指標としたウエスタンブロット法で評価した。8 時間低温保存した Bbc3 遺伝子欠損膵臓から分離した膵島中の 4-HNE 蛋白付加体量は、同様に低温保存した野生型膵臓から分離した膵島に比較して有意に低かった (図 14B、14D)。一方、膵島分離中に回収した消化後の膵組織では、低温保存の有無にかかわらず、どの群においても相違を認めなかった (図 14A)。

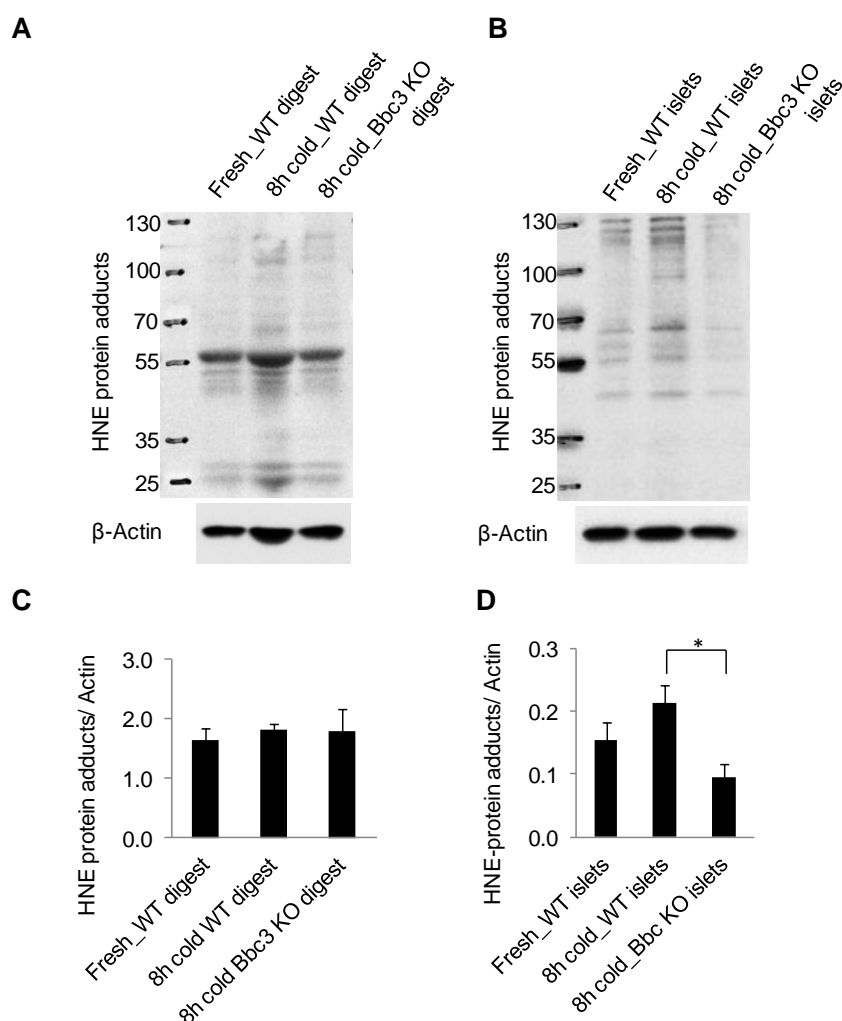


図 14 : 4-HNE 蛋白付加体の検出による酸化ストレスの評価

0 時間および 8 時間低温保存した野生型マウスの膵臓、および 8 時間低温保存した Bbc3 欠損マウスの膵臓の A) 消化後膵組織および B) 24 時間培養後の膵島内の 4-HNE 蛋白付加体のウエスタンブロットを示した。C) 消化後膵組織および D) 24 時間培養後の膵島内の 4-HNE 蛋白付加体量を β -actin を内部コントロールとして定量化した (N=3、*P<0.05)。

4.2.6 低温保存後膵臓から分離した Bbc3 欠損膵島の機能は野生型膵島に比べ高く維持されている

8 時間低温保存した野生型および Bbc3 遺伝子欠損膵臓から分離した培養後の膵島の機能を評価するため、ペリフュージョンシステムにて膵島のグルコース刺激反応性インスリン分泌能を測定した (図 15A)。3.3 mM (低) グルコース条件にて 15 分間、引き続き 17 mM (高) グルコース条件にて 15 分間灌流を行った際の総インスリン分泌量を低・高それぞれのグルコース下で比較したところ、野生型および Bbc3 欠損膵島群間に有意な差は見られなかった (図 15C)。一方、低グルコースから高グルコースに切り替えてから最初の 5 分間を第一相インスリン分泌とし、野生型膵島および Bbc3 欠損膵島間で比較すると、Bbc3 欠損膵島の第一相インスリン分泌量は野生型に比較して有意な高値を示した (図 15B)。

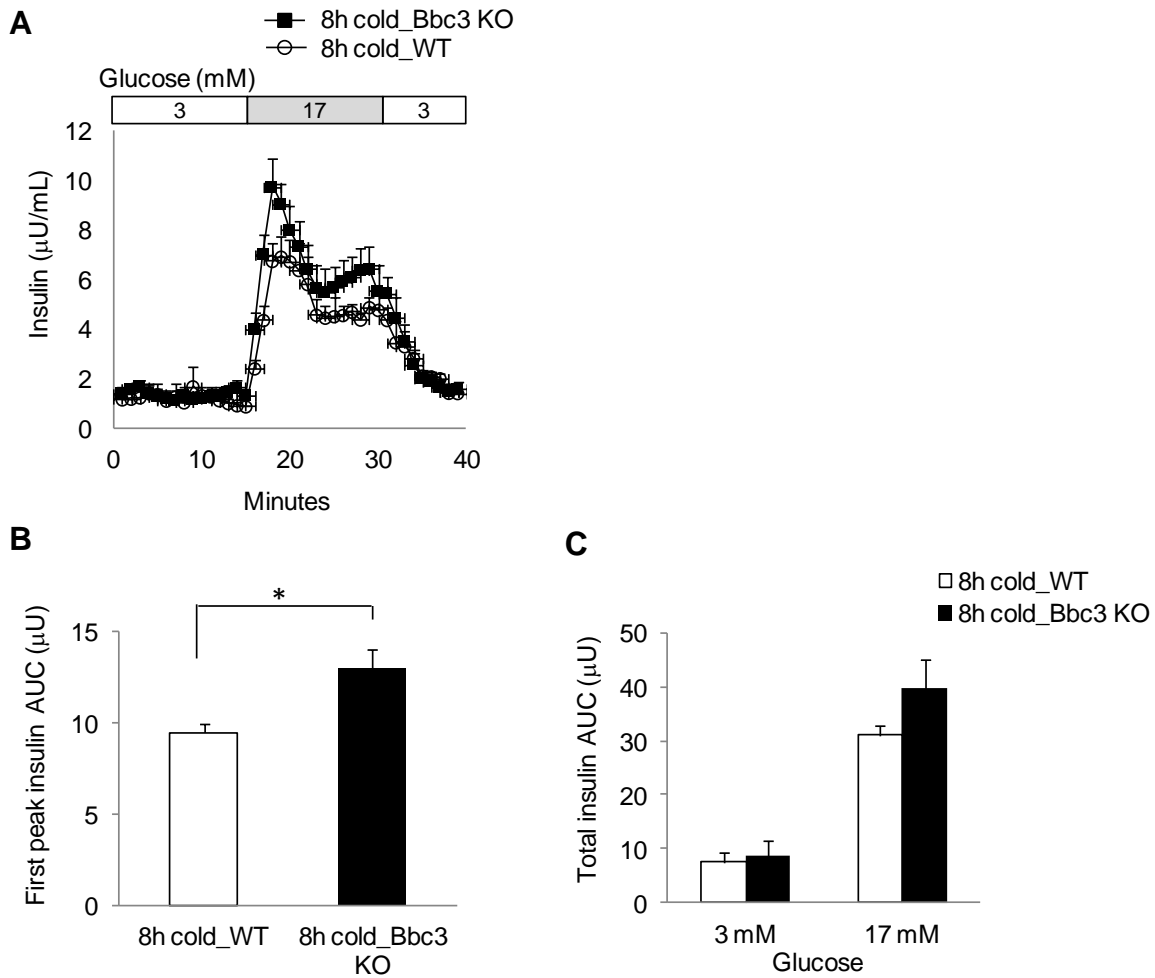


図 15：ペリフュージョンシステムにて測定した膵島のグルコース刺激反応性インスリン分泌能の評価

A) 8時間低温保存した野生型および Bbc3 遺伝子欠損膵臓から分離・培養した膵島の低濃度グルコース (3 mM) および高濃度グルコース (17 mM) に反応して分泌された平均インスリン濃度を示した (N=3)。B) 低グルコースから高グルコースに変換して直後 5 分間のインスリン分泌曲線下の総インスリン量 (第一相インスリン分泌) を野生型膵島と Bbc3 遺伝子欠損膵島で比較した (N=3、*P<0.05)。C) 15 分間の低グルコースに続く 15 分間の高グルコース灌流によるインスリン分泌曲線下の総インスリン量を、それぞれ野生型膵島と Bbc3 欠損膵島で比較した。

4.2.7 低温低酸素・復温後のヒト膵島中の BBC3 mRNA および蛋白の上昇は膵島生存率の低下と関連する

BBC3 がヒトの膵臓保存、膵島分離、復温・培養にどのように関わっているかを調べた。膵島分離中に回集された温消化後の膵組織中の BBC3 蛋白発現は、膵臓低温保存前に比較して有意に上昇した (図 16)。続いて、膵島を低温常酸素もしくは低温低酸素下で 24 時間保存後、37°C で培養した。低温低酸素で保存した膵島は 24 時間の培養後に BBC3 mRNA 発現が低温保存前、および低温保存直後に比較して有意に上昇した。さらに、低温低酸素保存に続く 24 時間培養後の BBC3 mRNA の発現レベルは、常酸素下での低温保存後に続く 24 時間培養後の BBC3 mRNA の発現レベルに比較して有意に高かった (図 17A)。同様に、24 時間低温低酸素にて保存後に 24 時間培養した後の BBC3 蛋白発現レベルは、保存前および低温保存せず同時間 (48 時間) 培養した後の BBC3 蛋白発現レベルに比較して有意に高かった (図 17B)。低温保存に続く 24 時間培養後の膵島の生存率を保存前と比較したところ、低温保存中の低酸素の有無にかかわらず、膵島生存率は有意に低下した。さらには、低温低酸素下で保存した膵島は低温常酸素下で保存した膵島に比較して膵島生存率の有意な低値を示した (図 17C)。

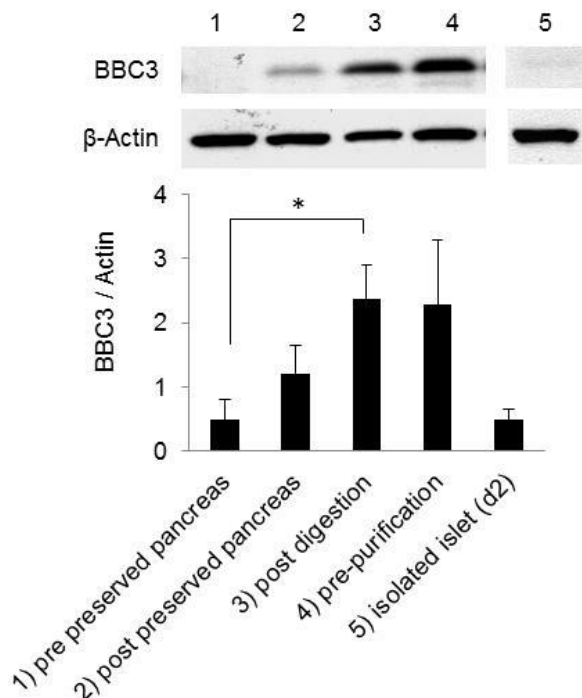


図 16 : ヒト膵臓温保存後の膵島分離中に上昇した BBC3 蛋白

1) ヒト膵臓低温保存前、2) 低温保存後、3) 37°C で消化酵素をもちいて膵臓を消化した後、4) 膵島遠心分離前、および 5) 膵島培養 48 時間後の BBC3 発現をウエスタンブロット法で評価し、膵島内の BBC 蛋白を β -actin を内部コントロールとして定量化した (N=3、*P<0.05)。

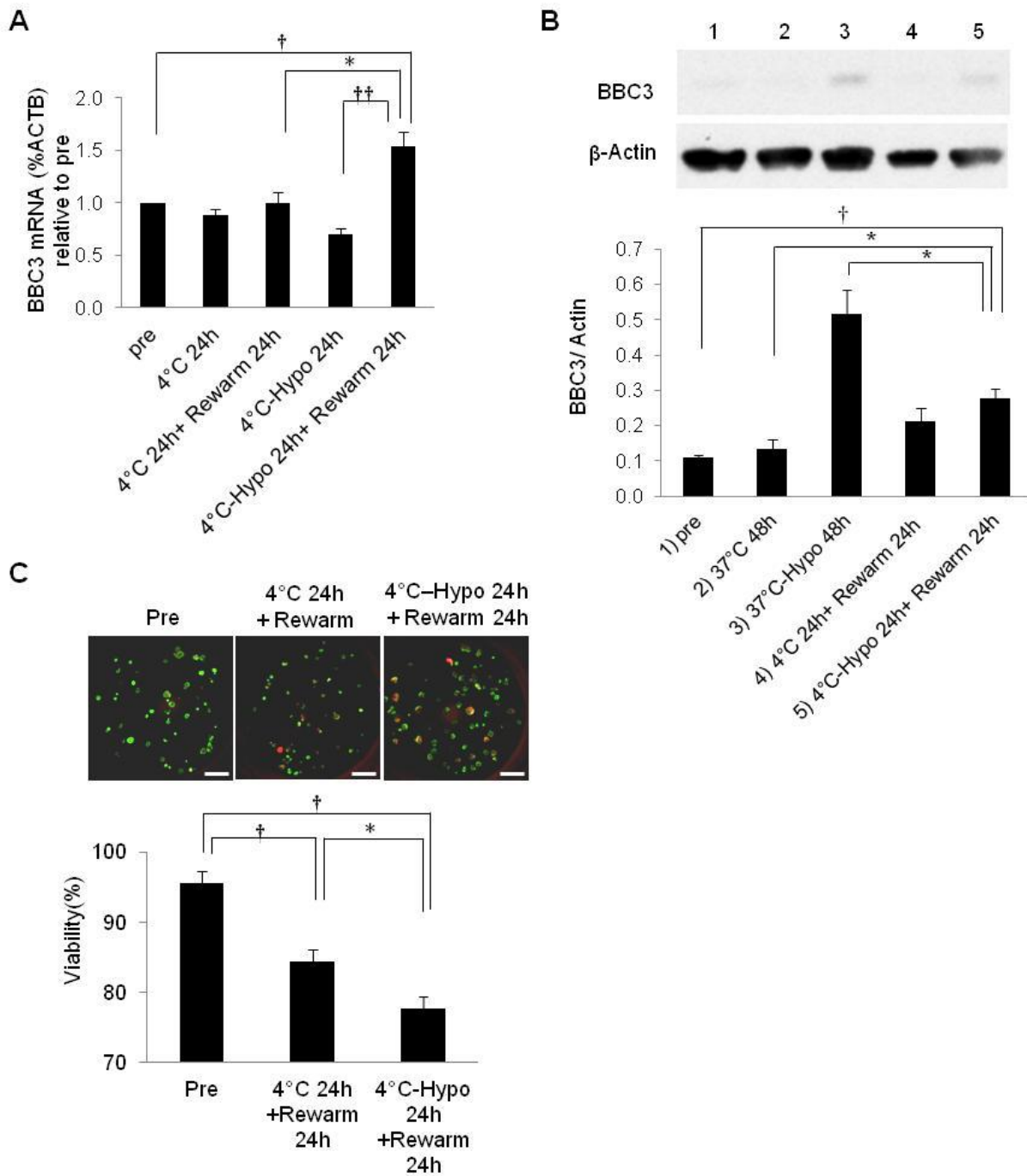


図 17：低温・低酸素保存による膵島の BBC3 遺伝子および蛋白の上昇と細胞生存率の低下

低酸素（1%）もしくは常酸素の条件下で 24 時間低温保存した直後、および引き続く 24 時間 37°C で培養した後のヒト膵島内の BBC3 mRNA レベルを RT-PCR 法にて評価した。B)、1) 保存・培養前、2) 48 時間培養後、3) 低酸素下で 48 時間培養後、4) 24 時間の低温常酸素保存に続く 24 時間培養後、5) 24 時間の低温低酸素保存に続く 24 時間培養後、の膵島内の BBC3 蛋白レベルをウエスタンブロット法にて評価し、 β -actin を内部コントロールとして定量化した。C) 低温保存前の膵島、24 時間低温保存後さらに 24 時間 37°C で培養した膵島、および 24 時間低温低酸素条件下で保存後、さらに 24 時間培養した膵島を FDA/PI 染色し、生存率を画像解析により定量して評価した (N=3、*P<0.05 by un-paired t-test、†P<0.05、††P<0.01 by paired t-test、スケール：1 mm)。

5. 考察

5.1 長時間の膵臓低温保存に起因する膵島細胞死の機序

移植臓器の低温虚血・再灌流障害に酸化ストレスが関与することは数多く報告されている(40, 41)。一方、脂質リン酸化の副産物である 4-HNE は、酸化ストレスによる細胞障害を評価する際の指標として広く用いられている。本研究において申請者は、16 時間の膵臓低温保存により膵島内の 4-HNE 量が低温保存無し膵臓から分離した膵島に比較して有意に上昇することを明らかにした。また、16 時間低温保存膵臓から分離した膵島の β 細胞では、細胞膜や細胞小器官膜、特にミトコンドリア膜の著明な破壊像を認めた。過去の報告では、脂質リン酸化が細胞膜および細胞小器官膜の構成を破壊し、プロテアーゼの漏出や Ca^{2+} の流入を誘導し、細胞のネクローシスをきたすことが示されている(42)。さらに、細胞虚血は、脂質リン酸化を上昇させて細胞膜障害の誘因となるが、つづく再酸素化により脂質リン酸化が停止されるにもかかわらず細胞膜の障害は残存することも報告されている(32)。これらのことから、本研究においては、膵臓低温保存による虚血が誘因となって膵島内 4-HNE を上昇させ、低温保存後の細胞膜およびミトコンドリア膜の破壊にいたる一因となったのではないかと考えられた。

続いて、膵臓低温保存による酸化ストレスが誘因となって膵島内のシグナル伝達系が活性化されることを示した。低温保存により主な 3 つの MAPK である、p38、JNK、ERK1/2 のすべてが分離直後の膵島にて活性化されていたが、培養により JNK と ERK の活性は低下したのに対し、p38MAPK の活性化は持続した。また、Hsp70 は酸化ストレスおよび熱ストレスによって誘導される細胞保護蛋白であるが、Hsp70 は JNK の活性化とそれに引き続くアポトーシス誘導シグナルを抑制することが報告されている(36, 37, 43)。よって、本研究で認められた低温保存膵臓から分離した膵島の培養後の JNK 活性化の低下は、培養後の HSP70 蛋白上昇と相関しており、HSP70 の抗アポトーシス作用によって JNK 活性化が低下したのではないかと考察した。一方、p38 は培養後も活性化が持続しており、JNK とは別の機序によるストレスの持続が推測されるが本研究においてはその機序を明確にすることは出来なかった。

酸化ストレスと小胞体ストレスは密接に関連していることから、その両者によって誘導されると報告されているアポトーシス誘導遺伝子 Bbc3 と膵臓低温保存・培養後の Caspase-3 活性

化の関与を調べた。Bbc3 は Caspase-3 の上流に存在し、Caspase-3 を活性化させてアポトーシスを誘導すると考えられている。本研究では、Bbc3 蛋白が培養 6 時間後に上昇したのに対し、Caspase-3 の活性化 (Cleaved Caspase-3 により評価) はそれより早く、培養 2 時間後にピークを示した。これらのピーク時間の違いの原因としては、Bbc3 蛋白と Cleaved caspase-3 蛋白の安定性の相違による可能性と、Bbc3 蛋白の上昇と Caspase-3 の活性化が全く別の機序で起こるといった可能性が考えられた。いずれにしても、本研究において、膵臓低温保存に起因する膵島細胞死の機序としてアポトーシスの関与が示唆された。低温保存とアポトーシスの関連は、他臓器においても報告されている。例えば、腎臓の遠位尿細管細胞の低温保存にはアポトーシスが関与しており、低温保存液に抗酸化物質を添加することによりミトコンドリアの膨張を抑制したとの報告がある(33)。同様に、膵島分離の実験においては、膵臓 8 時間低温保存後、抗酸化物質である Nicotinamide を膵島分離の灌流液に加えることにより膵島収率が改善することも報告されており(18)、酸化ストレスを減少させることで低温保存に起因した細胞死を低下できることが示されている。従って、低温保存に起因した Bbc3 および Caspase-3 の活性化の一因が酸化ストレスであるならば、抗酸化物質 Nicotinamide の投与により Bbc3 遺伝子、Bbc3 蛋白、および Caspase-3 の活性化が低下して、最終的にアポトーシスが抑制されることが予測される。

細胞死の機序は主にネクローシスとアポトーシスに分類される。低温保存後の細胞の ATP 量は低温虚血時間と相関すると一般に考えられており、細胞の残存 ATP 量によってネクローシスとなるかアポトーシスを介するかが決まる(8, 10)。本研究において、18 時間の膵臓低温保存により Caspase-3 が活性化されることから、アポトーシスの関与が示されたが、Caspase-9 および Bbc3 の関与は示唆されなかった。一方、細胞の浮腫、細胞膜や細胞小器官の破壊はネクローシスの指標となる所見であることから、16 時間低温保存膵臓から分離した膵島のネクローシスの存在も示された。しかし、本研究で認められたネクローシスの所見は評価するタイミングによりアポトーシスから二次的にネクローシスに至った所見である可能性もあり、どちらかに断定するのは困難であると考えられた。また、当研究においては検討しなかったが、細胞膜破壊の所見は酸化ストレスによるほか、Na/K-ATPase の抑制によるイオンバランスの不均衡(8)によるとも考えられる。

5.2 低温保存に起因する膵島細胞死と Bbc3/BBC3 遺伝子の関与

Bbc3 は虚血/低酸素や酸化ストレスにて発現が上昇し、 β 細胞のアポトーシスを誘導すると報告されている (21, 23, 44)。本研究では、Bbc3/BBC3 遺伝子が膵島の低温保存後の細胞死にどのように関与しているかを検証した。Firefly ラットを低温保存した実験において、低温保存-復温・培養後の細胞活性の低下に Bbc3 遺伝子が関与していることを示した。同様に、ヒトの膵島を低温保存すると、低酸素下にて低温保存した場合、復温・培養後に BBC3 遺伝子および蛋白が上昇したが、低温保存前および 24 時間低温保存直後の BBC3 遺伝子および蛋白の変化は認められなかった。低温保存中は細胞内代謝が抑制されているため、低酸素によってもたらされた影響が BBC3 遺伝子および蛋白の変化として現れないが、復温・培養中に細胞内代謝が上昇した際、低温・低酸素による細胞障害が増強し BBC3 遺伝子および蛋白が上昇したと考察された。一方、ヒトの膵島を低酸素条件なしで 24 時間低温保存-復温・培養を行うと、培養後に BBC3 遺伝子は上昇しなかったが、Firefly ラットを用いた実験では同時間の低温保存-復温・培養後に Bbc3 遺伝子が有意に上昇した。この相違はラットとヒトの種の違いによる、低温低酸素に対する膵島細胞の感受性の違いではないかと考えられた。低温保存した Bbc3 遺伝子欠損膵臓から分離した膵島では同時間低温保存した野生型膵臓から分離した膵島に比較して細胞死が有意に低く、それに伴い酸化ストレスの低下も認められた。神経細胞を用いた実験において、Bbc3 は酸化ストレスによって誘導されるミトコンドリア障害とそれに引き続くアポトーシスの主要因子であるとの報告があり (45)、当研究結果からも同様に、低温低酸素による酸化ストレスが Bbc3 を介して膵島障害を誘導していることが示唆された。

Bbc3 遺伝子欠損膵臓および野生型膵臓を 8 時間低温保存した実験において、Bbc3 遺伝子の欠損が膵島分離後の膵島回収数に及ぼす影響は少なく、野生型群と比較してもその数に有意な差はなかったのに対し、培養後の膵島生存率は Bbc3 遺伝子欠損膵臓にて有意に高かった。これらの結果より、膵島分離中の膵島の細胞障害と膵島培養中の膵島の細胞障害の機序に違いがあると推測された。膵島分離中の膵島の障害は、低温保存-復温による酸化ストレスなどの障害に加え、酵素による消化、消化中の 37°C での低酸素状態、および機械的障害が加わり、Bbc3 遺伝子以外の様々な機序により細胞死が誘導されることから、Bbc3 の寄与があまり大きくなかったと考えられる。一方、培養中の膵島の細胞死は上記の結果に示されたように、Bbc3 を

介した細胞障害が細胞死の一因となっていると示された。低温保存が誘因となる細胞死は、一般にネクローシスによると考えられているが、上記研究によって示されたようにアポトーシスも関与する。ネクローシスとアポトーシスの存在比率は低温保存時間に影響され、一般に低温保存時間が長くなるとネクローシスの割合が高まる。このことが、膵島分離後の回収数と Bbc3 遺伝子の関与が少なかった理由のひとつと考えられる。

細胞から漏出した HMGB1 は細胞障害の指標となることが、ヒトの腎臓や肝臓移植および膵島移植において報告されている(46-49)。本研究において、低温保存した Bbc3 欠損膵臓の消化後膵組織および膵島中の HMGB1 のレベルが、同条件下の野生型膵組織および膵島中の HMGB1 レベルに比較し有意に低いことを示した。また、Bbc3 欠損膵島の培養液では、膵島培養液中の HMGB1 レベルも野生型膵島の培養液に比較して有意に低いことを示した。アポトーシス誘導遺伝子である Bbc3 の欠損と HMGB1 の低下における関連機序は分かっていないが、HMGB1 と酸化ストレスが密接に関連していることが報告されている。HMGB1 はネクローシス過程の細胞から漏出するだけではなく、酸化ストレス下にある単細胞やマクロファージからも分泌される。分泌された、もしくは漏出した HMGB1 は炎症性シグナルを活性化させ、細胞内の酸化ストレスを上昇させると同時に、細胞死を促進する(50)。当研究では Bbc3 欠損膵臓から分離した膵島中の 4-HNE 付加蛋白量が、野生型膵島に比較して有意に低いことを示したが、この酸化ストレスの低下は膵島内の HMGB1 の低下に起因する可能性があるのではないかと考察された。また、Caspase-3 の活性化がどの検体からも検出できなかった理由として検体採取のタイミングによる影響も否定できない。

ヒト膵島分離中に BBC3 蛋白が消化後の膵組織にて上昇することを示したが、膵島は膵組織全体の 2-3%を占めるのみで大部分は膵外分泌細胞が占めることから、膵島分離中の BBC3 蛋白の上昇は膵外分泌細胞死の影響が大きいと考えられた。ヒト膵臓の BBC3 遺伝子を低温保存前に欠失させるのは手技的に制限があるため、ヒト膵臓低温保存による膵島内の BBC3 遺伝子に特異的な現象を評価することはできなかった。膵島移植に提供される膵臓は脳死ドナーから提供された膵臓であり、脳死に起因し膵臓中の炎症反応が上昇すると報告されている(12, 13)。さらには死因、脳死日数、入院期間、既存疾患などは、臓器の炎症反応および酸化ストレスと関連があると考えられており、これらの影響により膵臓・膵島内の BBC3 蛋白が増強される可

能性も考えられる。これらのことから、ヒト臍臓・臍島における BBC3 を介した低温保存障害は、Bbc3 遺伝子欠損マウスモデルで示した臍島の低温障害に比較して BBC3 の占める役割が大きいであろうと考察された。

6. まとめ

膵臓低温保存に起因する膵島分離および培養中の膵島細胞死は膜の破壊および脂質リン酸化をともなう酸化ストレスの上昇が原因の一部となっていることが明らかになった。また、低温保存の有無にかかわらず、膵島分離によって小胞体ストレスが誘導されたが、低温保存膵臓から分離した膵島では、小胞体分子シャペロン（BIP）の有意な上昇が認められ、低温保存による小胞体ストレスの増強が示唆された。さらに、培養後早期（2時間後）に Caspase-3 活性化はピークを示し、低温保存による膵島の細胞死にアポトーシスが関与していることも示唆された。

続いて、アポトーシス誘導遺伝子 BBC3/Bbc3 が膵臓および膵島の低温虚血・復温障害に関与していることを示した。Bbc3 を介した膵臓低温保存後の細胞死は膵島分離後の培養中の膵島の生存率に影響を与えたが、膵島分離後の膵島の収率にはほとんど影響を与えず、膵島分離中の細胞死と Bbc3 の関連は少ないことが示唆された。また、低温保存した Bbc3 遺伝子欠損膵臓から分離した膵島においては、HMGB1 蛋白の低下および 4-HNE 蛋白付加体の低下とともに、膵島生存率の向上が認められ、Bbc3 を介した細胞死と HMGB1 および酸化ストレスの関連が示唆された。しかしながら、その機序の解明については、今後、さらなる検証が必要である。

本研究の結果より、酸化ストレスの抑制および、それに続く細胞膜・細胞小器官膜の破壊を抑制させることが膵島生存率の上昇に貢献すると考えられた。今後の研究において、低温保存・復温障害を抑制する抗酸化化合物を同定し、その効果を評価したい。膵島低温保存障害を抑制し、移植可能な膵島数を上昇させる新たな保存法が開発できれば、現在よりも多くのドナー膵臓を移植に適応することができるようになり、膵島移植の成功に大きく貢献することが期待される。

7. 謝辞

本研究の実施にあたり、ご指導・ご協力いただきました小林英司教授（慶応義塾大学医学部臓器再生医学寄附講座）ならびに高橋将文教授（自治医科大学分子病態治療研究センター炎症・免疫研究部）に深く感謝いたします。また、寺谷工講師（自治医科大学再生医科学）と笠原尚哉先生（自治医科大学臨床外科学）には、膝島のバイオイメージングおよび動物実験のご協力を戴き、ここに感謝の意を表します。中田奈美子様（自治医科大学分子病態治療研究センター炎症・免疫研究部）と高橋千枝様（自治医科大学分子先端治療開発部門）にも、多々のご協力を戴きましたことを御礼申し上げます。

Yoko Mullen 教授（Diabetes and Metabolism Research Institute、Beckman Research Institute of the City of Hope）には長年に渡り多くのご指導、ご協力をいただきましたことを心より深く感謝し、ここに御礼申し上げます。小松弘武先生（Diabetes and Metabolism Research Institute）には当研究および論文を書くにあたりご指導いただきましたことを心より感謝いたします。

8. 参考文献

1. Ryan, E. A., Lakey, J. R., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., Kin, T., Imes, S., Rabinovitch, A., Elliott, J. F., Bigam, D., Kneteman, N. M., Warnock, G. L., Larsen, I., and Shapiro, A. M. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 50, 710-719, 2001
2. Hering, B. J., and Bellin, M. D. Transplantation: Sustained benefits of islet transplants for T1DM. *Nature reviews* 11, 572-574, 2015
3. Hilling, D. E., Bouwman, E., Terpstra, O. T., and Marang-van de Mheen, P. J. Effects of donor-, pancreas-, and isolation-related variables on human islet isolation outcome: a systematic review. *Cell Transplant* 23, 921-928, 2014
4. Lakey, J. R., Rajotte, R. V., Warnock, G. L., and Kneteman, N. M. Human pancreas preservation prior to islet isolation. Cold ischemic tolerance. *Transplantation* 59, 689-694, 1995
5. Lakey, J. R., Warnock, G. L., Rajotte, R. V., Suarez-Alamazor, M. E., Ao, Z., Shapiro, A. M., and Kneteman, N. M. Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation* 61, 1047-1053, 1996
6. Sabek, O. M., Cowan, P., Fraga, D. W., and Gaber, A. O. The effect of isolation methods and the use of different enzymes on islet yield and in vivo function. *Cell Transplant* 17, 785-792, 2008
7. Kin, T., Senior, P., O'Gorman, D., Richer, B., Salam, A., and Shapiro, A. M. Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 21, 1029-1035, 2008
8. Guibert, E. E., Petrenko, A. Y., Balaban, C. L., Somov, A. Y., Rodriguez, J. V., and Fuller, B. J. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfusion medicine and hemotherapy : offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 38, 125-142, 2011
9. Rauen, U., and de Groot, H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 52, 299-309, 2004

10. Fischer, S., Maclean, A. A., Liu, M., Cardella, J. A., Slutsky, A. S., Suga, M., Moreira, J. F., and Keshavjee, S. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 162, 1932-1939, 2000
11. Salahudeen, A. K., Joshi, M., and Jenkins, J. K. Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation* 72, 798-804, 2001
12. Contreras, J. L., Eckstein, C., Smyth, C. A., Sellers, M. T., Vilatoba, M., Bilbao, G., Rahemtulla, F. G., Young, C. J., Thompson, J. A., Chaudry, I. H., and Eckhoff, D. E. Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes* 52, 2935-2942, 2003
13. Rech, T. H., Crispim, D., Rheinheimer, J., Barkan, S. S., Osvaldt, A. B., Grezzana Filho, T. J., Kruehl, C. R., Martini, J., Gross, J. L., and Leitao, C. B. Brain death-induced inflammatory activity in human pancreatic tissue: a case-control study. *Transplantation* 97, 212-219, 2014
14. Abdelli, S., Ansite, J., Roduit, R., Borsello, T., Matsumoto, I., Sawada, T., Allaman-Pillet, N., Henry, H., Beckmann, J. S., Hering, B. J., and Bonny, C. Intracellular stress signaling pathways activated during human islet preparation and following acute cytokine exposure. *Diabetes* 53, 2815-2823, 2004
15. Cowley, M. J., Weinberg, A., Zammit, N. W., Walters, S. N., Hawthorne, W. J., Loudovaris, T., Thomas, H., Kay, T., Gunton, J. E., Alexander, S. I., Kaplan, W., Chapman, J., O'Connell, P. J., and Grey, S. T. Human islets express a marked proinflammatory molecular signature prior to transplantation. *Cell transplantation* 21, 2063-2078, 2012
16. Ito, T., Omori, K., Rawson, J., Todorov, I., Asari, S., Kuroda, A., Shintaku, J., Itakura, S., Ferreri, K., Kandeel, F., and Mullen, Y. Improvement of canine islet yield by donor pancreas infusion with a p38MAPK inhibitor. *Transplantation* 86, 321-329, 2008
17. Noguchi, H., Matsumoto, S., Onaca, N., Naziruddin, B., Jackson, A., Ikemoto, T., Shimoda, M., Fujita, Y., Chujo, D., Iwanaga, Y., Nagata, H., Okitsu, T., Kobayashi, N., Ueno, H., Chaussabel, D., Grayburn, P., Banchereau, J., and Levy, M. F. Ductal injection of JNK inhibitors before

- pancreas preservation prevents islet apoptosis and improves islet graft function. *Human gene therapy* 20, 73-85, 2009
18. Ichii, H., Wang, X., Messinger, S., Alvarez, A., Fraker, C., Khan, A., Kuroda, Y., Inverardi, L., Goss, J. A., Alejandro, R., and Ricordi, C. Improved human islet isolation using nicotinamide. *Am J Transplant* 6, 2060-2068, 2006
 19. Negi, S., Park, S. H., Jetha, A., Aikin, R., Tremblay, M., and Paraskevas, S. Evidence of endoplasmic reticulum stress mediating cell death in transplanted human islets. *Cell Transplant* 21, 889-900, 2012
 20. Omori, K., Mitsuhashi, M., Ishiyama, K., Nair, I., Rawson, J., Todorov, I., Kandeel, F., and Mullen, Y. mRNA of the pro-apoptotic gene BBC3 serves as a molecular marker for TNF-alpha-induced islet damage in humans. *Diabetologia* 54, 2056-2066, 2011
 21. Hughes, K. J., Meares, G. P., Hansen, P. A., and Corbett, J. A. FoxO1 and SIRT1 regulate beta-cell responses to nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 286, 8338-8348, 2011
 22. McKenzie, M. D., Jamieson, E., Jansen, E. S., Scott, C. L., Huang, D. C., Bouillet, P., Allison, J., Kay, T. W., Strasser, A., and Thomas, H. E. Glucose induces pancreatic islet cell apoptosis that requires the BH3-only proteins Bim and Puma and multi-BH domain protein Bax. *Diabetes* 59, 644-652, 2010
 23. Wali, J. A., Rondas, D., McKenzie, M. D., Zhao, Y., Elkerbout, L., Fynch, S., Gurzov, E. N., Akira, S., Mathieu, C., Kay, T. W., Overbergh, L., Strasser, A., and Thomas, H. E. The proapoptotic BH3-only proteins Bim and Puma are downstream of endoplasmic reticulum and mitochondrial oxidative stress in pancreatic islets in response to glucotoxicity. *Cell death & disease* 5, e1124, 2014
 24. Zheng, X., Zheng, X., Wang, X., Ma, Z., Gupta Sunkari, V., Botusan, I., Takeda, T., Bjorklund, A., Inoue, M., Catrina, S. B., Brismar, K., Poellinger, L., and Pereira, T. S. Acute hypoxia induces apoptosis of pancreatic beta-cell by activation of the unfolded protein response and upregulation of CHOP. *Cell Death Dis* 3, e322, 2012
 25. Pileggi, A., Ribeiro, M. M., Hogan, A. R., Molano, R. D., Embury, J. E., Ichii, H., Cobianchi, L.,

- Fornoni, A., Ricordi, C., and Pastori, R. L. Effects of pancreas cold ischemia on islet function and quality. *Transplant Proc* 41, 1808-1809, 2009
26. Li, Y., Lv, Z., Liu, X., Su, W., Wang, C., Li, N., Song, D., and Tao, T. Hypoxic postconditioning inhibits endoplasmic reticulum stress-mediated cardiomyocyte apoptosis by targeting PUMA. *Shock* 39, 299-303, 2013
 27. Webster, K. A. Puma joins the battery of BH3-only proteins that promote death and infarction during myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H20-22, 2006
 28. Wu, B., Qiu, W., Wang, P., Yu, H., Cheng, T., Zambetti, G. P., Zhang, L., and Yu, J. p53 independent induction of PUMA mediates intestinal apoptosis in response to ischaemia-reperfusion. *Gut* 56, 645-654, 2007
 29. Dressel, R., Grzeszik, C., Kreiss, M., Lindemann, D., Herrmann, T., Walter, L., and Gunther, E. Differential effect of acute and permanent heat shock protein 70 overexpression in tumor cells on lysability by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer research* 63, 8212-8220, 2003
 30. Miani, M., Colli, M. L., Ladriere, L., Cnop, M., and Eizirik, D. L. Mild endoplasmic reticulum stress augments the proinflammatory effect of IL-1beta in pancreatic rat beta-cells via the IRE1alpha/XBP1s pathway. *Endocrinology* 153, 3017-3028, 2012
 31. Zou, C. G., Cao, X. Z., Zhao, Y. S., Gao, S. Y., Li, S. D., Liu, X. Y., Zhang, Y., and Zhang, K. Q. The molecular mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in PC-12 neuronal cells: the protective effect of insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 150, 277-285, 2009
 32. Yajima, D., Motani, H., Hayakawa, M., Sato, Y., Sato, K., and Iwase, H. The relationship between cell membrane damage and lipid peroxidation under the condition of hypoxia-reoxygenation: analysis of the mechanism using antioxidants and electron transport inhibitors. *Cell biochemistry and function* 27, 338-343, 2009
 33. Salahudeen, A. K., Huang, H., Joshi, M., Moore, N. A., and Jenkins, J. K. Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am J Transplant* 3, 273-280, 2003
 34. Pileggi, A., Ribeiro, M. M., Hogan, A. R., Molano, R. D., Cobianchi, L., Ichii, H., Embury, J.,

- Inverardi, L., Fornoni, A., Ricordi, C., and Pastori, R. L. Impact of pancreatic cold preservation on rat islet recovery and function. *Transplantation* 87, 1442-1450, 2009
35. Bironaite, D., Brunk, U., and Venalis, A. Protective induction of Hsp70 in heat-stressed primary myoblasts: Involvement of MAPKs. *Journal of cellular biochemistry* 114, 2024-2031, 2013
36. Li, H., Liu, L., Xing, D., and Chen, W. R. Inhibition of the JNK/Bim pathway by Hsp70 prevents Bax activation in UV-induced apoptosis. *FEBS letters* 584, 4672-4678, 2010
37. Stankiewicz, A. R., Lachapelle, G., Foo, C. P., Radicioni, S. M., and Mosser, D. D. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *The Journal of biological chemistry* 280, 38729-38739, 2005
38. Inouye, S. Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 387-404, 2010
39. Negishi, K., Teratani, T., Iwasaki, J., Kanazawa, H., Kasahara, N., Lefor, A. T., Uemoto, S., Fujimoto, Y., and Kobayashi, E. Luminescence technology in preservation and transplantation for rat islet. *Islets* 3, 111-117, 2011
40. Bilzer, M., Paumgartner, G., and Gerbes, A. L. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology* 117, 200-210, 1999
41. Shiotani, S., Shimada, M., Suehiro, T., Soejima, Y., Yosizumi, T., Shimokawa, H., and Maehara, Y. Involvement of Rho-kinase in cold ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transplantation* 78, 375-382, 2004
42. Zong, W. X., and Thompson, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes & development* 20, 1-15, 2006
43. Giffard, R. G., Han, R. Q., Emery, J. F., Duan, M., and Pittet, J. F. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70. *Anesthesiology* 109, 339-348, 2008
44. Zheng, X., Wang, X., Ma, Z., Gupta Sunkari, V., Botusan, I., Takeda, T., Bjorklund, A., Inoue, M., Catrina, S. B., Brismar, K., Poellinger, L., and Pereira, T. S. Acute hypoxia induces apoptosis of pancreatic beta-cell by activation of the unfolded protein response and upregulation of CHOP.

45. Steckley, D., Karajgikar, M., Dale, L. B., Fuerth, B., Swan, P., Drummond-Main, C., Poulter, M. O., Ferguson, S. S., Strasser, A., and Cregan, S. P. Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 12989-12999, 2007
46. Ilmakunnas, M., Tukiainen, E. M., Rouhiainen, A., Rauvala, H., Arola, J., Nordin, A., Makisalo, H., Hockerstedt, K., and Isoniemi, H. High mobility group box 1 protein as a marker of hepatocellular injury in human liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 14, 1517-1525, 2008
47. Itoh, T., Takita, M., SoRelle, J. A., Shimoda, M., Sugimoto, K., Chujo, D., Qin, H., Naziruddin, B., Levy, M. F., and Matsumoto, S. Correlation of released HMGB1 levels with the degree of islet damage in mice and humans and with the outcomes of islet transplantation in mice. *Cell Transplant* 21, 1371-1381, 2012
48. Kruger, B., Krick, S., Dhillon, N., Lerner, S. M., Ames, S., Bromberg, J. S., Lin, M., Walsh, L., Vella, J., Fischereeder, M., Kramer, B. K., Colvin, R. B., Heeger, P. S., Murphy, B. T., and Schroppel, B. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3390-3395, 2009
49. Mera, T., Itoh, T., Kita, S., Kodama, S., Kojima, D., Nishinakamura, H., Okamoto, K., Ohkura, M., Nakai, J., Iyoda, T., Iwamoto, T., Matsuda, T., Baba, A., Omori, K., Ono, J., Watarai, H., Taniguchi, M., and Yasunami, Y. Pretreatment of donor islets with the Na(+)/Ca(2+) exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. *Am J Transplant* 13, 2154-2160, 2013
50. Tang, D., Kang, R., Zeh, H. J., 3rd, and Lotze, M. T. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxidants & redox signaling* 14, 1315-1335, 2011