

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 4 月 11 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10427

研究課題名(和文) 膵島移植における肝臓内免疫感作の解明と制御法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of intrahepatic immunization and development of intrahepatic immune control after islet transplantation

研究代表者

石山 宏平 (Ishiyama, Kohei)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：50437589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス経門脈的膵島移植モデルを用いて膵島移植後に肝臓内NK細胞の膵島に対する細胞傷害活性が増強して膵島グラフトが廃絶されることを報告し、移植後急性期の膵島傷害に関わるIBMIR環境下で肝臓内NK細胞が活性化することが移植膵島生着が膵島傷害の要因となることを証明した。肝臓内免疫応答活性を制御するために、細胞傷害活性抑制効果を有する間葉系幹細胞(MSCs)を炎症性サイトカインで活性化させた後に、膵島移植と同時移植することで、PGE2の産生能が増強して肝臓内NK細胞の活性化を制御することを証明した。更に、活性化MSCsの同時投与が膵島移植成績の著明な改善効果に寄与することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において膵島移植が普及するには移植効率の向上が必須であり、初回膵島移植後の肝臓内免疫細胞活性化メカニズムと、免疫感作に伴う再移植後の膵島傷害メカニズムを解明し、肝臓内免疫細胞活性を制御する治療戦略を確立することは有用と考えられる。本研究で、十分量の膵島と複数回の移植でのみ治療効果が認められていた膵島移植が、活性化間葉系幹細胞を同時投与することで、少量でも効果が期待できる可能性があることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Using the mouse intraportal islet transplantation model, we have reported that the cytotoxic activity of intrahepatic NK cells on the transplanted islets is enhanced after islet transplantation and it caused the islet graft destruction. We confirmed that activation of intrahepatic NK cells in the IBMIR environment, which involved in acute islet injury after islet transplantation, disturbed transplanted islet engraftment. In order to control intrahepatic immune activity, mesenchymal stem cells (MSCs), having a cytotoxic activity inhibitory effect by various soluble factors such as PGE2, are activated with inflammatory cytokines and then cotransplanted with islet transplantation. We demonstrated that the ability to produce PGE2 was well enhanced to regulate the intrahepatic NK cells activation after islet transplantation. Furthermore, we demonstrated that co-administration of activated MSCs contributes to a remarkable improvement effect on islet graft survival.

研究分野：膵島移植

キーワード：膵島移植 1型糖尿病 NK細胞 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

侵襲かつ簡便に施行可能な膵島移植は、1型糖尿病に対する次世代医療として期待されている。近年の膵島移植成績向上に伴い、欧米では腎不全発症前の1型糖尿病患者に対して膵臓単独移植よりも優先される機会が多くなっているが、膵島移植後のインスリン完全離脱の実現には通常2~3回の移植が必要であり、膵臓分離に伴う機能低下、グラフト血流障害、補体活性化および凝固反応に伴うIBMIR (instant blood mediated inflammatory reaction)、免疫抑制剤による細胞毒性など克服すべき多くの課題がある。更に、膵島移植後の自然免疫応答や膵島グラフトに対する抗原感作、再移植時の免疫賦活に関する詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

臓器提供が少ない本邦において膵島移植が普及するには移植効率の向上が必須である。我々は、マウス経門脈的膵島移植モデルを用いて膵島移植後に肝臓内 Natural Killer (NK)細胞の膵島に対する細胞傷害活性が増強し、細胞傷害分子 TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) を介して膵島グラフトが廃絶されることを報告しており、本研究では初回膵島移植後の肝臓内免疫細胞活性化メカニズムと免疫感作に伴う再移植後の膵島傷害メカニズムを解明し、肝臓内免疫細胞活性を制御する治療戦略の確立を目的とした。

3. 研究の方法

・膵島移植における肝臓内 NK 細胞活性化とメモリー機能獲得メカニズムの証明：

膵島移植後の肝臓内 NK 細胞活性化に IBMIR 環境が与える影響や、肝臓内 NK 細胞による再移植時の免疫感作機構について検討する。

・肝臓内 NK 細胞活性抑制に寄与する作用メカニズムの証明：

MSCs が産生する抑制因子の関与や、抑制刺激物質による肝臓内 NK 細胞活性制御メカニズムを検討すると同時に、膵島移植後の NK 細胞のメモリー化抑制メカニズムについて検討する。

・膵島移植が間葉系幹細胞の免疫抑制機能に与える影響の証明：

膵島移植後の免疫環境が MSCs 上の抑制性分子表出や、液性因子産生能に与える影響について免疫抑制メカニズムの検討を行う。

・間葉系幹細胞が膵島グラフト生着率向上に与える影響の証明：

MSCs が肝臓内免疫応答に与える効果をマウス膵島移植モデルにより検討する。

4. 研究成果

膵島移植後の NK 細胞活性化メカニズムは明らかでなく、移植後急性期の膵島傷害に関わる IBMIR との関連について検討した。IBMIR の主要サイトカイン存在下に肝臓内 NK 細胞を *in vitro* で培養すると同時に、膵島移植後急性期の肝臓内 NK 細胞活性について *in vivo* で検討を行ったところ、肝臓内 NK 細胞活性化メカニズムに IBMIR 環境が関与していることが示唆された。次に、膵島グラフト廃絶に関わる TRAIL 分子に注目し phenotype 解析を行ったところ、肝臓内 NK 細胞には TRAIL+ NK 細胞と TRAIL- NK 細胞が存在し、TRAIL+ NK 細胞はメモリー機能を有すると報告されている liver resident (DX5-)NK 細胞に一致していた。Liver resident NK 細胞は、naive な状態で circulating (DX5+)NK 細胞と比較して CD69、TRAIL、ケモカインレセプター CXCR3 の表出が強く、*in vivo* での膵島移植後急性期において liver resident NK 細胞の含有率が増大することを確認した。また、この liver resident NK 細胞の機能評価を行うために移植後 35 日までの肝臓内 NK 細胞の phenotype 変化を検証したところ、liver resident NK 細胞数の更なる増加、肝臓内 NK 細胞の活性化増強が確認できた。以上から、liver resident NK 細胞が IBMIR 環境下で活性化することで移植膵島生着が妨げられ、活性化が持続するために再移植時の膵島傷害の要因となり得ることが示唆され、膵島移植後の liver resident NK 細胞のメモリー機構の獲得メカニズムを解明できたことで移植効率向上に貢献できると考えられた。

更に、過去の研究から細胞傷害活性抑制効果を有する間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) による膵島移植成績向上が期待できるため、初回膵島移植、もしくは再移植時に MSCs 投与によってメモリー機能を有する liver resident NK 細胞活性を制御することで膵島グラフト傷害を回避することが可能か、*in vitro*、*in vivo* で MSCs による肝臓内免疫活性抑制メカニズム解析を行った。MSCs が抑制因子である生理活性物質 PGE2 (prostaglandin E2) を産生することを *in vitro* で確認した後に、NK 細胞との共培養を行い、NK 細胞上の TRAIL や活性化マーカーである CD69 の表出を減弱させる効果を認めることを証明した。更に、この効果は MSCs を IBMIR の際に産生される炎症性サイトカイン (IL-1, INF- γ , TNF- α) で刺激することで増強されることも証明された。

In vivo において、膵島移植実験を行ったところ、通常では生着困難な 300 個の同種同系経門脈的膵島移植において、活性化 MSCs の同時投与により、生着率の著明な改善効果が得られることを証明した。この効果は PGE2 k/o MSCs では認められなかったことから、PGE2 による NK 細胞活性抑制効果に関係しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Role of Natural Killer Cells in the Innate Immune System After Intraportal Islet Transplantation in Mice. Saeki Y, Ishiyama K, Ishida N, Tanaka Y, Ohdan H. *Transplant Proc.* 2017 Jan - Feb;49(1):139-144.
doi: 10.1016/j.transproceed.2016.10.010.
2. Cotransplantation of preactivated mesenchymal stem cells improves intraportal engraftment of islets by inhibiting liver natural killer cells in mice. Ishida N, Ishiyama K, Saeki Y, Tanaka Y, Ohdan H. *Am J Transplant.* 2019 Mar 12.
doi: 10.1111/ajt.15347.
3. Memory-like Liver Natural Killer Cells are Responsible for Islet Destruction in Secondary Islet Transplantation. Saeki Y, Ishiyama K, Ishida N, Tanaka Y, Ohdan H. *Sci Rep.* 2019 Jan 31;9(1):1022.
doi: 10.1038/s41598-018-37395-9.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. The depletion of liver natural killer cells lead to successful engraftment of intraportal transplanted islet when insufficient number of islets used for islet transplantation : Saeki Y, Ishiyama K, Ishida N, Tanaka Y, Ohdan H. : *Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2016 : Tokyo* 2016.4.8-9
2. 骨髄由来間葉系幹細胞による TRAIL-TRAIL 受容体を介した膵島グラフトに対する肝臓内 NK 細胞の傷害活性抑制効果 : 石田伸樹、石山宏平、佐伯吉弘、平田文宏、井手健太郎、大平真裕、田原裕之、清水誠一、谷峰直樹、坂井寛、矢野琢也、柳川泉一郎、中野亮介、田口和浩、田中友加、尾上隆司、田代裕尊、大段秀樹 : 第 116 回日本外科学会定期学術集会 : 大阪 2016.4.14-16
3. Liver DX5- memory natural killer cells sustain cytotoxicity against intraportally transplanted islet : 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 : 第 71 回日本消化器外科学会総会 : 徳島 2016.7.13-15
4. Cotransplantation of preactivated mesenchymal stem cells inhibits liver natural killer cell-induced islet graft injury during instant blood-mediated inflammatory reaction after syngeneic intraportal islet transplantation : Ishida N, Ohdan H, Ishiyama K, Saeki Y, Tanaka Y, Tahara H, Verma S, Saporbay D, Sasaki Y, Onoe T, Ohira M, Yano T, Yanagawa S, Taguchi K, Piao J, Tanaka A, Ide K, Shimizu S, Das L K, Nakano R. : *26th International Congress of the Transplantation Society : Hong Kong, China* 2016.8.18-23
5. 間葉系幹細胞同時投与が膵島移植後の血糖改善効果に与えるメカニズムの解析 : 石田伸樹、石山宏平、平田文宏、佐伯吉弘、田中友加、大段秀樹 : 第 52 回日本移植学会総会 : 東京 2016.9.29-10.1
6. 再膵島移植における肝臓内 memory Natural killer 細胞の機能評価 : 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 : 第 44 回日本膵・膵島移植研究会 : 京都 2017.3.10-11
7. 活性化間葉系幹細胞同時投与による膵島移植成績向上の検討 : 石田伸樹、石山宏平、佐伯吉弘、田中友加、大段秀樹 : 第 44 回日本膵・膵島移植研究会 : 京都 2017.3.10-11
8. 経門脈的膵島移植における肝臓内 NK 細胞の memory 機能評価 : 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 : 第 117 回日本外科学会定期学術集会 : 横浜 2017.4.27-29
9. Activation of liver-resident DX5- NK cells after intraportal islet transplantation prevent the engraftment of secondary transplanted islets : Ishiyama K, Yoshihiro Saeki, Nobuki Ishida, Yuka Tanaka, Hideki Ohdan : *Transplantation Science Symposium 2017 : Canada* 2017.5.24-26
10. Suppressing Liver Natural Killer Cells Activation by Cotransplantation of Preactivated Mesenchymal Stem Cells Contributes to Improvement of Islet Graft Survival : Ishida N, Kohei Ishiyama, Yoshihiro Saeki, Yuka Tanaka, Hideki Ohdan :

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。