

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10501

研究課題名(和文) 膵島移植における長期グラフト生着のための治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new strategy for long-term graft acceptance after pancreatic islet transplantation

研究代表者

渡辺 正明 (Watanabe, Masaaki)

北海道大学・医学研究院・特任講師

研究者番号：40789848

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)：本研究において、肝移植臨床試験で用いた方法に準じ、ドナー抗原特異的な免疫抑制性アナージー細胞の新しい誘導を見出し、報告した。(Cell Transplantation. 2018 Nov; 27(11): 1692-1704) マウス細胞における、免疫抑制性細胞の誘導を行うため、マウス脾臓細胞、抗CD80抗体、抗CD86抗体を用いて安定した誘導法を確立し、適切な誘導条件を見出すことができた。現在、誘導された細胞をマウス膵島、マウス肝細胞、Kupffer細胞と共培養し、その効果を検証するとともに、マウスモデルにて、膵島移植、細胞移植での効果を検証を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、我々が示したドナー抗原特異的な免疫抑制性アナージー細胞輸注療法により、肝臓移植患者に免疫寛容を誘導できるという知見に基づき、これまで達成されていない臨床膵島移植におけるアロ移植膵島の長期生着、ひいては、免疫寛容の誘導を検証するうえでの基礎試験である。我々の報告は、すぐに臨床応用可能である抗体を用いても免疫抑制効果を有する細胞集団を誘導できることを示した。さらに、膵島移植、肝細胞移植が確立された。誘導されたマウス免疫抑制性アナージー細胞を輸注することで、少ない膵島グラフト、肝臓細胞数で長期生着を得ることができれば、多くの患者の恩恵となると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, first, we discovered and reported a new induction of donor antigen-specific immunosuppressive anergy cells according to the method used in liver transplant clinical trials. (Cell Transplantation. 2018 Nov; 27(11): 1692-1704) For the application of our method in the field of cell transplantation, we established and reported the efficacy of spheroidal hepatocyte transplantation. Currently, the established induction method using mouse spleen cells, anti-CD80 antibody, and anti-CD86 antibody has been under evaluation by using the mouse transplantation models. The induced cells are also co-cultured with mouse pancreatic islets, mouse hepatocytes, and Kupffer cells, and the effect is verified, and the effect in pancreatic islet transplantation and cell transplantation is verified in a mouse model.

研究分野：移植

キーワード：膵島移植 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

膵臓移植は、膵臓移植と比較して圧倒的に低侵襲な1型糖尿病根治的治療法である。膵臓移植と遜色のない移植成績が得られつつあるものの、現状の免疫抑制法では、アロ(同種異形)膵臓の長期生着は得られていない。また、膵臓移植とともに、肝臓細胞移植といった細胞移植治療では、移植細胞や膵臓の単離精製過程での膵臓傷害、移植手技に伴う強い炎症反応が移植後早期に移植された膵臓や細胞の傷害を惹起し、これにより増強された獲得免疫応答が移植されたグラフトを拒絶する。傷害の軽減法、グラフト傷害の機序は未だ十分には開発・解明されておらず、長期生着をもたらす新たな治療法の確立にはその解明が不可欠である。

我々は、獲得免疫成立に重要な副刺激経路 CD40-CD154 に着目し、前臨床試験としてカニクイザル膵臓移植での抗 D40 抗体(ASKP1240)の効果を検証し、ASKP1240 投与が劇的なアロ膵臓の長期生着をもたらす、臨床膵臓移植での応用の可能性を示した。(Watanabe M et al, AJT 2014) さらに、移植直後の NF- κ B 阻害が、早期膵臓グラフト傷害の軽減のみならず、自然免疫と獲得免疫との橋渡しに重要な樹状細胞をも抑制し、タクロリムスと併用することにより、少ないアロ膵臓数でも血糖が長期にわたって正常化することを報告した。(Watanabe M et al, Transplantation 2013) しかし、既存の免疫抑制法では、その非特異性に起因する感染症、腎障害、糖尿病、発がんといった有害事象を避けることができず、アロ膵臓抗原特異的な免疫抑制状態を誘導し、既存の免疫抑制剤を使用することなく、移植膵臓や細胞の長期生着をもたらす新たな免疫抑制法の開発が必須である。我々の施設では新しい試みとしてレシピエントから生体肝移植前に得られたリンパ球をドナー細胞と共培養することで免疫抑制性の細胞集団、いわゆる免疫抑制性アナージー細胞を作成し、肝移植後に輸注する臨床研究を世界に先駆けて行った。結果、10例中7例が免疫抑制剤を完全に中止することができ、免疫寛容を誘導し得るという驚くべき結果を得た(Yamashita, Watanabe et al, Hepatology 2016)。霊長類腎臓移植、臨床肝臓移植において免疫寛容が誘導されたこれらの結果は、この細胞治療が膵臓移植、細胞移植にも応用し得る可能性が想起された。

2. 研究の目的

本研究では細胞移植における、グラフト傷害の機序を明らかにするとともに、膵臓、細胞移植の長期成績の劇的な向上をめざす新たな治療法として、ドナー抗原特異的な免疫抑制性細胞の治療効果を検討し、膵臓移植や細胞移植における臨床応用へ繋げる基礎研究である。

3. 研究の方法

臨床応用可能な、免疫抑制性効果の強いアナージー細胞の誘導法の確立：

我々の肝移植臨床試験では(Yamashita K, Watanabe M Hepatology 2016, Bashuda H, JCI 2005)、ドナー抗原特異的な免疫抑制性アナージー細胞を誘導し、肝臓移植後にレシピエントに輸注した。細胞誘導にあっては特に細胞数とドナー抗原細胞数の比率、使用する抗体、培養期間は誘導される細胞の特性に深くかわることが報告されている(Davies JK et al, Cell Transplant. 2012)。広く臨床応用可能な細胞誘導法を、ヒト末梢血リンパ球(PBMC)を用いて、誘導条件を検討し、検証した。我々が臨床試験で輸注した免疫抑制性アナージー細胞は、レシピエントから得られたリンパ球をドナー抗原、抗 CD80/86 抗体(2D10.4/IT2.2)と共培養し誘導された。これらの報告を踏まえ、広く臨床認可されうる免疫抑制性アナージー細胞誘導条件(臨床認可されている抗体、GMPグレードでの精製)の確立のため、2D10.4/IT2.2と同様に CD28-CD80/86 副刺激経路を遮断する CTLA4-Ig(既に臨床応用されている抗体)に着目し、CTLA4-Ig が 2D10.4/IT2.2 と同等な免疫抑制性アナージー細胞を誘導するかどうかを検証した。

ヒト末梢血リンパ球(PBMC)を用いて、抗 CD80/86 抗体(2D10.4/IT2.2)、もしくは CTLA4-Ig と共培養し、誘導された細胞の phenotype を FACS にて検証するとともに、免疫抑制効果を MLR を用いて検証した。

マウス細胞移植モデルの確立：

誘導された免疫抑制性細胞を移植モデルで検証するため、膵臓移植とともに、広く臨床応用が期待されている肝細胞移植モデルをマウスで確立した。レシピエントマウス(移植されるマウス)に apolipoprotein E KO マウスを用いることで、移植された肝細胞の生着を移植後の血中 apolipoprotein E 濃度で評価することができる。野生型マウスから肝細胞を誘導し、肝細胞もしくは、3D 培養した球状肝細胞を肝臓内に経門脈的に移植した。移植後に誘導された免疫抑制効果の有する細胞集団を移入し、その免疫抑制効果を検討する。

マウス移植モデルでの効果の検討：

マウス脾臓細胞を用い、CD80/86 抗体を用いて、免疫抑制効果の有する細胞の誘導条件を検討した上で、有効な誘導条件を見出す。培養期間、細胞濃度、抗体濃度等を検証し、誘導細胞の phenotype を FACS で解析し、混合リンパ球反応試験(MLR)、ELISA、ELISPOT で抗原特異性を比

較検証する。誘導された細胞を臍島、マクロファージ、Kupffer 細胞と共培養し、早期臍島グラフト傷害に対する効果を *in vitro* で検証する。さらに、誘導されたアナージー細胞を臍島、マクロファージ (RAW 264.7 cell) や、肝臓から単離した Kupffer 細胞と *in vitro* で共培養し、臍島数の変化、臍島障害の指標となる HMGB1、マクロファージ・Kupffer 細胞の活性の変化 (IL-6, IL-12, TNF- 産生) を FACS、ELISA、PCR で検証し、アナージー細胞の臍島、炎症担当細胞への影響、効果を検討する。ドナー抗原特異的な免疫抑制性細胞集団をマウスアロ臍島移植モデル、肝臓細胞移植でのレシピエントに輸注し、細胞グラフトの生着期間延長効果を検証する。

4. 研究成果

免疫抑制性効果の強いアナージー細胞の誘導法：

ヒト末梢血リンパ球 (PBMC) 5.0×10^6 細胞を 2.0×10^6 ドナー抗原と $40 \mu\text{g}/10^6$ cells 濃度の CTLA4-Ig を 14 日間の共培養条件し、ドナー抗原特異的な免疫抑制性アナージー細胞が誘導されるかどうかを検証した。Table 1 に示す条件で PBMC を用いて検討した。上記条件で誘導された細胞は、免疫抑制性効果のある phenotype が誘導され (図 1)、実際 *in vitro* の検証では、ドナー抗原特異的に免疫抑制効果を有する細胞集団を誘導することが確認された (図 2)。この検討により、効果的な免疫抑制性細胞を誘導するための培養細胞数、抗体濃度、培養期間の培養条件を見出した。これにより、これまで我々が示した、免疫抑制効果をもたらす方法が、広く臨床応用可能なプロトコルで作成可能であることを示した。(Masaaki W et al; Cell Transplantation. 2018 Nov; 27(11): 1692-1704.)

Table 1. Blood donor information: gender, blood group and number of mismatched human leukocyte antigen (HLA) type (HLA DR, A and B). Total: both HLA class I and class II. Class I: HLA A and B, Class II: HLA DR.

Pair	Gender			Blood type	HLA mismatch					
	Recipient	Donor	Third party		Recipient-donor			Recipient-the third party		
					Total	Class I	Class II	Total	Class I	Class II
#1	Male	Male	Male	A*/A*/O+	6	4	2	3	2	1
#2	Female	Male	Male	A*/A*/A*	6	4	2	4	2	2
#3	Male	Male	Male	A*/O*/A*	4	3	1	5	4	1
#4	Male	Male	Male	A*/A*/A*	6	4	2	5	3	2
#5	Female	Male	Male	A*/A*/A*	6	4	2	5	3	2
#6	Male	Male	Female	A*/A*/A*	5	3	2	5	3	2
#7	Male	Male	Female	A*/A*/A*	6	4	2	6	4	2
#8	Female	Male	Male	A*/A*/A*	4	2	2	6	4	2

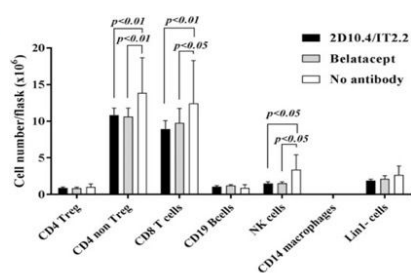


図 1

マウス肝臓細胞移植モデルの確立：

球状肝細胞の作成：C57B6/L マウス (H-2^b) 肝臓から体外式灌流ポンプを用いてコラゲナーゼを灌流し肝細胞を単離精製し、Hanging drop 法によって 3 次元培養し、均一な大きさの球状肝細胞を誘導した。単離されたマウス肝細胞を 3 次元培養することで球状肝細胞の誘導に成功した。(図 3)

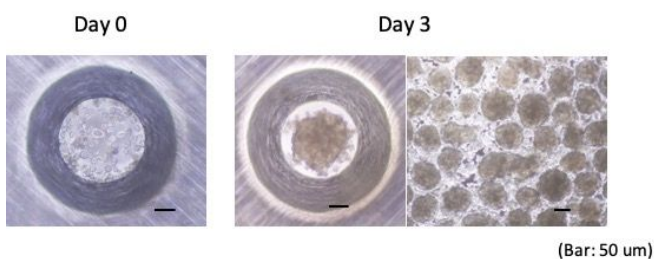


図 3

球状肝細胞の機能評価：

球状肝細胞の培養液中の Alb、尿素、AST、ALT、LDH、胆汁酸、蛍光染色による Viability、肝細胞内 mRNA (Alb, Apolipoprotein E, g6p, f7, f9, a1at, ldlr, etc) 発現で機能評価を行い、肝臓機能が維持されていることを確認した。

肝細胞移植 (同種同系移植)：

誘導された球状肝細胞を、Apolipoprotein E K0(-/-) マウス肝臓内に、経門脈的に移植した (同種同系移植; 図 4)。移植後の血中 Apolipoprotein E を測定することで、移植された球状肝細胞の生着を評価した。さらに移植後早期、および晚期に肝臓を採取し、病理組織学的に Apolipoprotein E 陽性細胞の存在を確認するとともに、移植後早期の肝臓の炎症を PCR (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) で評価した。球状肝細胞は移植後にも門脈内でその形態を維持し、単体での肝細胞移植と比較すると、移植後の炎症反応が低い傾向が認められた。(図 5; NL; 正常肝、fSH; 単体の肝細胞、

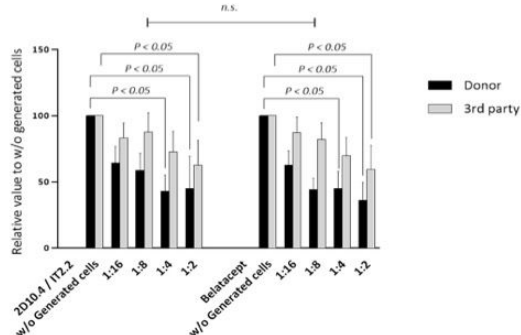


図 2

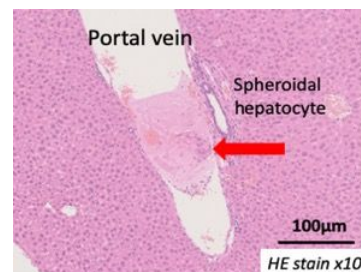


図 4

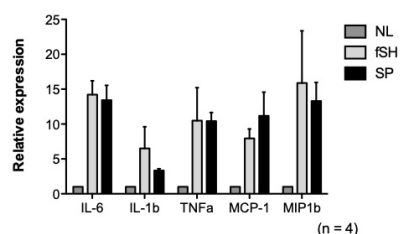


図 5

SP;球状肝細胞、図 4 ; 移植後の病理組織学的所見) (これらの結果は、America transplant congress, 2020、再生医療学会 2020 にてそれぞれ報告)

マウス移植モデルでの効果の検討 :

マウス脾臓細胞、CD80/86 抗体を用いて、免疫抑制効果のある細胞集団を誘導する。現在誘導された細胞を用いて、上記肝臓細胞移植、脾臓移植モデルを用いて移植された細胞グラフトの生着期間の延長効果について検証を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 K. Shibuya, M. Watanabe, Y. Ganchiku, R. Kanazawa, Y. Koshizuka, M. Zaitso, R. Goto, A. Taketomi
2. 発表標題 The efficacy of spheroidal hepatocytes for hepatocyte transplantation
3. 学会等名 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaaki Watanabe, Ryoichi Goto, Kenichiro Yamashita, Satoru Todo, Tsuyoshi Shimamura, and Akinobu Taketomi
2. 発表標題 Operational tolerance with a donor antigen specific immunomodulatory cell therapy in living donor liver transplantation
3. 学会等名 Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 正明 腰塚 靖之 後藤了一 川村典生 財津雅昭 山本真由美 柏浦愛美 太田稔 嶋村 剛 武富 紹信
2. 発表標題 当院における臍島移植の情報提供からみた臨床応用拡大への課題
3. 学会等名 日本臍島移植研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 正明 腰塚 靖之 渋谷 一陽 蔵谷 大輔 小倉 正臣 吉田 雅 旭 火華 後藤 了一 財津 雅昭 川村 典生 嶋村 剛 山下健一郎 藤堂 省 武富 紹信
2. 発表標題 臍島移植の成績改善に向けて 我々のこれまでの取り組みとこれからの展開
3. 学会等名 日本外科学会定期学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 渡辺 正明	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本糖尿病協会	5. 総ページ数 35
3. 書名 膵島移植の進歩と現状	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山下 健一郎 (Yamashita Kenichiro) (00399940)	北海道大学・医学研究院・特任教授 (10101)	
研究 分担者	後藤 了一 (Goto Ryoichi) (10645287)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	