

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390354  
 研究課題名（和文） 臨床膵島移植成功へのブレイクスルー：NKT細胞を  
 標的にした新規治療法開発  
 研究課題名（英文） Development of a novel procedure targeting NKT cells facilitating  
 successful clinical islet transplantation  
 研究代表者  
 安波 洋一（YASUNAMI YOHICHI）  
 福岡大学・医学部・教授  
 研究者番号：00166521

## 研究成果の概要：

現在の臨床膵島移植では1人の糖尿病レシピエントの治療に2～3人分のドナー膵臓が必要である。我々は移植早期(24時間以内)に発現する自然免疫拒絶反応による移植膵臓破壊がこの問題の本質であると考え、本研究課題を遂行した。その結果、NKT細胞、好中球、炎症性サイトカインが関与する拒絶反応の機序と制御法を明らかにすることができた。本研究成果は臨床膵島移植の成績向上に大きく寄与すると考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2007年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：インスリン依存糖尿病、膵島移植、自然免疫拒絶反応、NKT細胞、好中球

## 1. 研究開始当初の背景

近年、重症糖尿病の治療法として膵島移植が注目されている。膵島移植はインスリン産生細胞（膵島）を移植に用いる細胞移植で、臓器移植とは異なり、手技が簡便、侵襲が極めて少なく、安全な治療法である。実際の移植は局所麻酔下、超音波を用いて門脈を穿刺、単離膵島を肝内に移植する。移植後にはレシピエントの血糖は正常化し、移植前には治療困難で生命予後に重大な影響を及ぼす無自覚性低血糖発作（意識障害）は消失、更に糖尿病血管合併症は改善する。局所麻酔下での治

療法であるため、移植当日より経口摂取を開始でき、数日中には退院が可能である。このように膵島移植は画期的な重症糖尿病の治療法であり、今後の発展が切望されている。

臨床膵島移植は2000年にカナダのグループによる成功例が報告され(N Engl J Med 343:230, 2000)、米国、ヨーロッパを中心に実施例が増加している。我が国に於いても2004年に開始され、現在までに18例実施されている。臨床膵島移植の現在の最も重要な課題は一人の糖尿病レシピエントの治療成功に2-3回の膵島移植、すなわち2-3人

分のドナー膵臓を必要とする事が挙げられる。一人のドナー膵臓より得られた1回の膵島移植では生着する膵島数が少なく、移植膵島より分泌されるインスリンだけでは不十分で、減量できるもののインスリン注射を移植後に継続する必要がある。この問題が細胞移植である膵島移植が同じ目的で行われている膵臓器移植に比し、未だ実験的治療といわれる所以であり、その解決が臨床膵島移植の急務となっている。

## 2. 研究の目的

我々は先の研究に於いて移植膵島の生着に着目し、移植後早期に発現するグラフト膵島障害機序をマウス実験系で解析した。その結果、肝内に移植された膵島の50%以上が移植後24時間以内に破壊され、その過程に、近年新に見出された免疫担当細胞であるナチュラルキラー T (NKT) 細胞が必須の役割を担っていることを見出した。また、移植部位である肝臓内に移植後6時間をピークに好中球が集積、移植膵島内に浸潤し、インターフェロンを産生放出、移植膵島を破壊することが判明した。更に、集積した好中球の活性化にはNKT細胞の存在が必須で、NKT細胞を介して好中球がエフェクターとして機能していることが明らかになった。本研究では一人のドナーより一人、さらには二人以上へのレシピエントへの臨床膵島移植成功を達成する為に、上記知見で明らかになった移植早期膵島障害のメカニズムに基づき、NKT細胞を標的にした臨床応用可能な移植後膵島障害を制御する新規治療法を開発することを目的にした。

## 3. 研究の方法

(1)NKT細胞機能に関する血液凝固関連生理活性物質の検索

凝固作用あるいは抗凝固作用を有する血液凝固関連生理活性物質がNKT細胞を介した移植後膵島障害を増強あるいは軽減する作用を有するか、マウス膵島移植モデルで検討した。特に我々は近年、致死因子として注目されているHMGB1に着目し、膵島移植拒絶反応に於ける役割を明らかにした。

(2)NKT細胞以外の因子、特に好中球、炎症性サイトカインの役割解析

NKT細胞依存性に活性化される肝内集積好中球の動態を解析した。

(3)サルを用いた移植膵島障害の解析

前臨床試験として、サルを用いた膵島移植の予備実験を開始した。

(4)ヒト肝リンパ球の解析

外科的切除肝臓組織よりリンパ球を単離し、

サイトカイン産生を解析した。

## 4. 研究成果

(1)NKT細胞機能に関する血液凝固関連生理活性物質の検索

①抗HMGB1抗体の移植時1回の投与で自然免疫拒絶反応が制御でき、マウス実験系でone donor to one recipientの移植が実現できた。この知見はHMGB1が膵島移植自然免疫拒絶反応に必須の役割を担っていることを示している。

②HMGB1の免疫組織染色でHMGB1がナイーブ膵臓内の膵島細胞核に濃染されることが判明した。内分泌細胞外の外分泌細胞、膵管細胞は染色されなかった。単離膵島ではナイーブ膵臓内膵島と同様の所見を示した。肝内移植膵島では移植後3時間でHMGB1は移植膵島細胞核内にとどまらず、核外(細胞質)に染色された。

③膵島に於けるHMGB1の存在を確認する目的で膵島と各臓器(胸腺、肝臓、肺、膵臓)、肝単核球よりFACSで分離したT, B, NK, NKT, クッパー細胞、好中球のHMGB1含有量を測定した。その結果、HMGB1が膵島に豊富に含有されていることが判明した。膵島は他の臓器、細胞と比較し、50-100倍のHMGB1を含有していることがわかった。

④STZ糖尿病レシピエントマウスの膵島移植前後で血中HMGB1濃度を測定した。STZ静注で糖尿病を作成し、72時間後に同種同系膵島を経門脈の肝内に移植した。STZ静注24時間をピークに血中HMGB1濃度が有意に上昇した。72時間後には前値に戻った。移植後は6時間をピークに血中HMGB1濃度は上昇した。24時間で前値に戻った。

⑤単離膵島を炎症性サイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )の存在下で培養し、膵島障害を惹起するin vitroモデルでHMGB1と膵島障害の関連性を検討した。培養時間の経過と共に膵島はネクローシスにより障害され、比例して培地中HMGB1濃度は上昇した。

⑥HMGB1の肝単核球に対する直接作用を検討した。マウス(C57BL/6)肝臓より単核球を単離し、in vitro HMGB1で刺激し、サイトカイン産生を検討した。HMGB1刺激により肝単核球はNKT細胞依存性にIL-12, IFN- $\gamma$ , IL-6を産生した。FACS-sorted cellsを用いた解析によりIL-12とIL-6はそれぞれクッパー細胞、好中球より産生され、NKT細胞の存在下に産生量が著しく増加した。IFN- $\gamma$ はNKT細胞、好中球から産生された。

⑦IL-12とIL-6が実際に膵島移植後に必須の役割をしているかどうかを明らかにするため

に、抗IL-12, 抗IL-6抗体の効果を検討した。抗IL-12, 抗IL-6抗体の移植時1回の投与により移植膵島障害は制御でき、one donor to one recipientの移植が実現できた。

⑧HMGB1のin vivo作用を検討した。

HMGB1(100 $\mu$ g/injection/mouse)を静注し、2時間後に肝単核球を単離し、FACSで解析した。膵島移植後と同様にNKT細胞と好中球からIFN- $\gamma$ が、好中球からIL-6が産生されるのを確認できた。

⑨HMGB1の受容体はTLR-2, TLR4, RAGEとの報告があり、我々の膵島移植の系についてそれぞれのノックアウトマウスを使用し、検討した。肝単核球を用いたin vitro解析ではHMGB1刺激でTLR-4 KOマウスでは野生型マウスと同様にIL-12, IL-6, IFN- $\gamma$ の産生が認められたが、TLR-2 KO, RAGE KOでは著しく減少した。In vivoの効果はそれぞれのKOマウスをSTZ静注で糖尿病を作成、レシピエントとして使用し、野生型膵島200個を肝内に移植した。野生型、TLR-4 KO の糖尿病レシピエントでは移植後高血糖で推移したが、TLR-2 KO, RAGE KOでは移植後正常血糖となった。

(まとめ)

以上の研究成果より移植膵島に豊富に存在するHMGB1が移植後早期に膵島より肝内に放出され、肝内免疫系を活性化し、移植膵島を障害する移植膵島障害機序の全貌が明らかになった。

今後はマウス膵島移植で得られた知見がヒト膵島に適用できるか検討する必要があるが、本研究成果は臨床膵島移植の成績向上に寄与することが期待できる。

(2) NKT細胞以外の因子、特に好中球、炎症性サイトカインの役割解析

IFN- $\gamma$ が移植膵島障害に必須の役割を担っていることが明らかになった。また、アデノシンがNKT細胞に抑制的に働き、肝内移植膵島障害を防止することが判明した。

(3) サルを用いた移植膵島障害の解析

サルを用いて移植部位の膵島障害に及ぼす効果を検討した。現在は実験が進行中である。

(4) ヒト肝リンパ球の解析

外科的切除肝臓よりリンパ球を単離し、HMGB1刺激によるサイトカイン産生を検討した。ヒト肝単核球が単離可能であること、ならびにIFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ を産生することを見出した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. T Nitta, T Itoh, N Matsuoka, T Mera, D Kojima, M Nakano, Y Yamashita, Y Yasunami. Prevention of early loss of transplanted islets in the liver of mice by adenosine. Transplantation, in press. 査読有り
2. Iwai T, Tomita Y, Kajiwara T, Onzuka T, Okano S, Yasunami Y, Yoshikai Y, Nomoto K, Tominaga R. The immunoregulatory role of NKT cells in cyclophosphamide-induced tolerance. Transplantation 84(12): 1686-95, 2007 査読有り
3. M Satoh, Y Yasunami, N Matsuoka, M Nakano, T Itoh, T Nitta, K Anzai, J Ono, M Taniguchi, S Ikeda. Successful islet transplantation to two recipients from a single donor by targeting pro-inflammatory cytokines in mice. Transplantation 83(8):1085-1092, 2007 査読有り
4. T Kajiwara, Y Tomita, S Okano, T Iwai, Y Yasunami, Y Yoshikai, K Nomoto, R Tominaga, H Yasui. Effects of cyclosporin A on the activation of NKT cells induced by  $\alpha$ -galactosylceramide. Transplantation 83:184-192, 2007 査読有り
5. Regulatory roles of NKT cells in the induction and maintenance of cyclophosphamide-induced tolerance. T Iwai, Y Tomita, I Shimizu, Y Yasunami, T Kajiwara, S Okano, M Yoshikai, M Taniguchi, K Nomoto, H Yasui. J Immunol 177:8400-8409, 2006 査読有り
6. NKT cells participate in rejection of islet allografts in the liver of mice. A Toyofuku, Y Yasunami, K Nabeyama, M Nakano, M Satoh, N Matsuoka, J Ono, T Nakayama, M Taniguchi, M Tanaka, S Ikeda. Diabetes 55: 34-39, 2006 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1. Adenosine has an inhibitory effect on NKT cells facilitating to prevent early loss of transplanted islets in association with engraftments. T Nitta, N Matsuoka, T Itoh, T Mera, A Kinjo, M Nakano, Y Yamashita, Y Yasunami. 22th International Congress of the Transplantation Society. August 10-14, 2008, Sydney, Australia.
2. Successful islet transplantation from

one donor to one recipient by targeting IL-6 / IL-6 receptor signaling in mice. T Itoh, N Matsuoka, T Nitta, M Nakano, T Mera, Y Yamashita, J Ono, Y Yasunami. Joint Conference of Cell Transplantation Society, International Pancreas and Islet transplant Association and Xenotransplantation Association. September 15-20, 2007, Minneapolis, USA.

3. Timing of the Second Grafts is Crucial in Sequential Islet Transplantations to Prevent Early Loss of Islets in the Liver of Mice in Relation to Induction of Hypo-responsiveness of NKT Cells. N Matsuoka, T Itoh, T Nitta, M Nakano, K Anzai, J Ono, Y Yuichi Yamashita, M Taniguchi, Y Yasunami. 67th Scientific Sessions of American Diabetes Association. June 22-26, 2007, Chicago, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 26 件)

1. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤  
発明者：安波洋一  
権利者：福岡大学  
種類：特許権  
番号：9102182.5  
出願年月日：H21.3.6  
国内外の別：国外
2. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤  
発明者：安波洋一  
権利者：福岡大学  
種類：特許権  
番号：200680047109.4  
出願年月日：H20.6.13  
国内外の別：国外
3. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤  
発明者：安波洋一  
権利者：福岡大学  
種類：特許権  
番号：10-2008-7011381  
出願年月日：H20.5.13  
国内外の別：国外
4. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤  
発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：2008 2194

出願年月日：H20.5.13

国内外の別：国外

5. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：2008118906

出願年月日：H20.5.13

国内外の別：国外

6. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：2008/03973

出願年月日：H20.5.9

国内外の別：国外

7. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：20066300234

出願年月日：H20.4.28

国内外の別：国外

8. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：3111/DELNP/2008

出願年月日：H20.4.15

国内外の別：国外

9. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：PI0617378-0

出願年月日：H20.4.14

国内外の別：国外

10. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：MX/a/2008/004901

出願年月日：H20.4.14

国内外の別：国外

11. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：1-2008-500889

出願年月日：H20. 4. 14

国内外の別：国外

12. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：200802801-1

出願年月日：H20. 4. 11

国内外の別：国外

13. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：12/090,061

出願年月日：H20. 4. 11

国内外の別：国外

14. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：2,625,773

出願年月日：H20. 4. 9

国内外の別：国外

15. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：190693

出願年月日：H20. 4. 7

国内外の別：国外

16. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：06811729.0

出願年月日：H20. 3. 31

国内外の別：国外

17. 名称：移植膵島障害に対する抗High Mobility Group Box 1(HMGB1)抗体の効果

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2008/052520

出願年月日：H20. 2. 15

国内外の別：PCT

18. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：特願2007-539996

出願年月日：H19. 11. 6

国内外の別：国内

19. 名称：移植膵島障害に対する抗High Mobility Group Box 1(HMGB1)抗体の効果

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：2007-034280

出願年月日：H19. 2. 15

国内外の別：国内

20. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：7125

出願年月日：H18. 10. 28

国内外の別：国外

21. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2006/320441

出願年月日：H18. 10. 13

国内外の別：PCT

22. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：P 060104507

出願年月日：H18. 10. 13

国内外の別：国外

23. 名称：膵島移植における移植膵島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：2769-2006

出願年月日：H18. 10. 13

国内外の別：国外

24. 名称：臍島移植における移植臍島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：0601005048

出願年月日：H18. 10. 13

国内外の別：国外

25. 名称：臍島移植における移植臍島障害抑制剤

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：02342-2006

出願年月日：H18. 10. 13

国内外の別：国外

26. 名称：移植片喪失の予防剤、及びそのスクリーニング方法

発明者：安波洋一

権利者：福岡大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2006/316196

出願年月日：H18. 8. 11

国内外の別：PCT

○取得状況（計 0 件）

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安波 洋一 (YASUNAMI YOICHI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：00166521

(2) 研究分担者

中野 昌彦 (NAKANO MASAHIKO)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：90389354

松岡 信秀 (MATSUOKA NOBUHIDE)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：40461503

波部 重久 (HABE SHIGEHISA)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70037430

(3) 連携研究者

なし