

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08593

研究課題名（和文）最適な移植環境を構築する新規膵島移植免疫抑制法の開発：MEK阻害剤の応用可能性

研究課題名（英文）Development of novel immunosuppressive method using MEK inhibitor to construct optimal environment for pancreatic islet transplantation

研究代表者

穴澤 貴行（Anazawa, Takayuki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90566811

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：臨床膵島移植において使用されている免疫抑制剤は膵島毒性を有しており、移植後の長期成績の改善には膵島移植に適した免疫抑制療法の開発が必要である。インスリン抵抗性の改善効果やアロ反応性T細胞に対する抑制効果が報告されているMEK阻害剤に着目し検討を行った。糖尿病モデルマウスを用いた同種異系統の膵島移植において、MEK阻害剤投与群は非投与群に比べグラフト生着期間が有意に延長し、移植後のグラフト機能も良好であった。拒絶反応回避の機序として、レシピエントのCD4陽性T細胞を介した機能分化の抑制と、移植部位である肝臓内でのアロ抗原に対するTh1/Th2免疫応答の調整が関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞移植である膵島移植の更なる成績改善には、少ない膵島細胞でも血糖コントロールを可能とするような移植環境の構築が必要で、臓器移植と同様のプロトコールではなく、副作用のない薬剤によるAllo反応性免疫応答の制御が必要である。今回、MEK阻害剤によるAllo反応性T細胞の抑制が膵島移植にも応用可能であることが示され、新たな免疫抑制療法の選択肢となる可能性が示唆された。MEK/ERK経路の阻害はインスリン抵抗性改善効果も有するためこの薬剤は膵島移植において理想的な薬剤となりうる。同種膵島移植ならびに細胞移植におけるMEK阻害剤の免疫抑制作用については初の報告であり、他の分野にも波及しうる結果である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research to investigated the utility of the mitogen-activated protein kinase inhibitor trametinib in islet transplantation. Islets from fully major histocompatibility complex-mismatched BALB/c mice were transplanted into streptozotocin-induced diabetic C57BL/6 mice via the portal vein. Trametinib prolonged graft survival significantly when compared with vehicle. Histologic analyses revealed that cellular infiltration of the graft by lymphocytes was inhibited significantly. In addition, trametinib suppressed functional differentiation of naive CD4+ T cells in recipients. Expression of mRNA encoding inflammatory cytokines in recipients treated with trametinib was also inhibited. Trametinib delayed islet graft rejection by inhibiting functional differentiation of naive CD4+ T cells and regulating inflammatory cytokines. Trametinib might be a promising candidate for immunosuppressive therapy after allogeneic islet transplantation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵島移植 細胞移植 免疫抑制 再生医療 糖尿病 免疫抑制剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インスリン依存状態糖尿病に対する低侵襲な細胞移植である膵島移植は、臓器移植に比べ生着率で劣る点が課題である。膵島移植において最適な移植環境とは、移植膵島の機能に悪影響を与えず、移植後の血管新生が良好であることと考えられるが、現状の免疫抑制療法は膵島毒性和移植後血管新生阻害作用を有しており、膵島移植のブレイクスルーには新たな免疫抑制療法の開発が必要である。近年、「MEK(mitogen-activated protein kinase kinase)阻害剤」がAllo反応性T細胞を選択的に抑制しGVHDを抑制し、従来のCalcineurin阻害剤より効果が高いことが報告されている。また、MEK/ERK経路の阻害は耐糖能を改善しうる可能性があることも報告されている。これらの背景から、MEK阻害剤が、膵島移植において最適な移植環境を構築することに有用である可能性があると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、MEK阻害剤が膵島移植に有効であることを小動物モデルで検証し、免疫抑制療法および移植方法に新たな戦略を提示することである。具体的には、マウス経門脈膵島移植モデルにおいて、MEK阻害剤であるTrametinibが、Allo免疫応答を制御しうるか、移植膵島が機能しやすい環境を作り得るか、そして移植後の血管新生を阻害しないか、という点を検証する。MEK阻害剤は抗腫瘍剤として臨床使用され、基礎レベルではGVHD治療への有用性は示されているものの、臓器移植や細胞移植の免疫反応の制御に応用したとの報告はなく、新規の試みとなる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 経門脈膵島移植におけるMEK阻害剤: Trametinibの生着延長効果の検討

MEK阻害剤としてはGVHD治療での有用性が示唆されたTrametinibを用いた。BALB/c(H-2d haplotype)マウスから薬剤により糖尿病化したC57BL/6(H-2b haplotype)マウスへの同種異系(Allo)膵島移植を門脈内に行い、対照群とMEK阻害剤群におけるグラフト生着期間を検証した。

#### (2) MEK阻害剤投与が及ぼす耐糖能への影響の検討

非移植マウス、MEK阻害剤投与レシピエント、MEK阻害剤非投与レシピエントに対して、糖負荷試験を行い、耐糖能の評価を行った。

#### (3) 移植部位の組織学的評価

膵島移植グラフトへの拒絶反応に伴う免疫細胞の浸潤は、移植後7~10日頃にピークに達することから、拒絶反応の程度を評価するために、MEK阻害剤投与レシピエント、MEK阻害剤非投与レシピエントにおける肝内膵島移植グラフトを7日目に採取し、病理組織学的に評価した。

#### (4) 移植後のT細胞動態の検証

MEK阻害剤が膵島移植後のT細胞sub-populationに影響を検証するため、レシピエントマウスの肝臓および脾臓から分離したT細胞のsub-populationをフローサイトメトリーで解析した。

#### (5) 移植部位におけるmRNA発現解析

T細胞の活性化と分化に関連する炎症性免疫反応に対するMEK阻害剤の効果を調べるために移植後7日目にq-PCRを実施し、T細胞の活性化と分化に関わる炎症性サイトカインをコードするmRNAの発現を測定した。

#### (6) MEK阻害剤が膵島細胞Viabilityに及ぼす影響の検討

MEK阻害剤が膵島細胞のViabilityに与える影響(Calcein-AM/PI染色法)とインスリン分泌能に与える影響を、In vitroアッセイにて検証した。

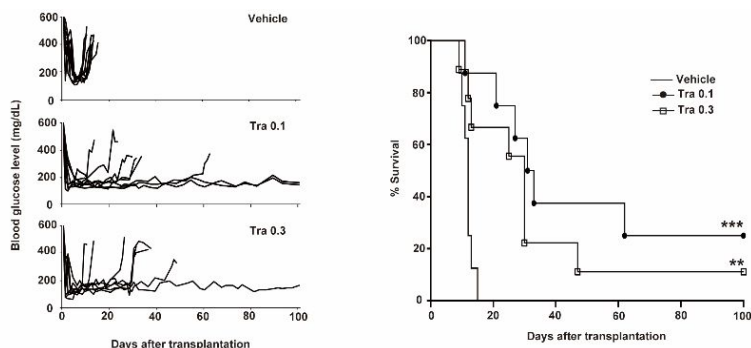
### 4. 研究成果

#### (1) TrametinibはMHC完全不一致の経門脈膵島移植モデルにおいて膵島グラフトの生着期間を延長する(図1)

600個のBALB/c(H-2dハプロタイプ)マウスから分離した膵島を、STZ誘発糖尿病のC57BL/6(H-2bハプロタイプ)マウスに経門脈的に移植した。溶媒のみを投与したマウスは全例移植膵島を拒絶し、移植膵島の生存期間の中央値は12日であった(n=8)。一方、Trametinibを1日

量 0.1 または 0.3mg/kg で 28 日間投与したところ、移植膵島の生着期間の中央値が、それぞれ 32 日 (n = 8、P = 0.0007) および 30 日 (n = 9、P = 0.005) に延長した。

図 1



(2) Trametinib は同種膵島移植後のグラフト機能とグルコース応答性を維持する  
 移植膵島の機能を評価するために、移植後 7 日目のレシピエントマウスに経腹腔的糖負荷試験 (IPGTT) を実施した。Trametinib 投与群は、IPGTT プロファイルがほぼ正常であった。さらに IPGTT の各時点 (0, 15, 30 分) での血漿中の C-ペプチド濃度を測定し、インスリン分泌を評価した。Trametinib 投与群は非投与群のレシピエントマウスと比べ、血漿 C ペプチド濃度が有意に良好であった。Trametinib は、同種膵島移植後の移植膵島機能とグルコース応答性を維持することが示された。

(3) Trametinib は移植膵島へのリンパ球の浸潤を抑制する  
 移植膵島への拒絶反応の程度を評価するために、膵島を移植された肝を 7 日目に採取し、病理組織学的に評価した。H&E 染色では、Trametinib 非投与群において移植膵島の内部および周囲への高度の細胞浸潤が認められた。免疫染色ではこれらの細胞は CD4+ および CD8+ 細胞で構成されていることが明らかになった。Trametinib 投与群では、CD4+ および CD8+ 細胞の浸潤が有意に抑制されていた。さらに、Trametinib 投与群では膵島の形態とインスリン染色陽性領域が良好に維持されていた。また移植膵島周囲の血管形成が良好であり、血管誘導に悪影響を与えていないことも示唆された。

(4) Trametinib は CD4+ T 細胞の機能分化を抑制する  
 対照群 (溶媒のみ投与) 0.1 または 0.3mg/kg のトラメチニブを投与した 7 日目のレシピエントマウスの肝臓および脾臓から分離した T 細胞亜集団をフローサイトメトリーで解析した。Trametinib は、CD4+ T 細胞のうち、肝臓におけるナイーブ T 細胞 (CD62L+CD44-) の割合を用量依存的に増加させた。また、エフェクターメモリー T 細胞 (CD62L-CD44+) の割合が減少した。対照的に、Trametinib は肝臓および脾臓における CD8+ T 細胞の亜集団には影響を与えなかった。これらの結果から、少なくとも in vivo では Trametinib は主に CD4+ ナイーブ T 細胞の機能分化を抑制することが示唆された。

(5) Trametinib は炎症性サイトカインをコードする mRNA の発現を抑制する  
 対照群 (溶媒のみ投与) 0.1 または 0.3mg/kg の Trametinib を投与した 7 日目のレシピエントの摘出した肝臓における炎症性サイトカインをコードする mRNA の発現を測定した。Trametinib 投与群 (0.1 mg/kg) の IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  をコードする mRNA の発現は、対照群に比べて有意に低下していた。炎症性サイトカインの抑制には用量依存性は確認されなかった (図 2)。抗炎症性サイトカインである IL-4 および IL-10 については、mRNA の発現がトラメチニブ投与群で高くなる傾向が見られた。これらの結果から Trametinib は、Th1 および Th2 免疫応答を調節し、炎症性サイトカインを制御することが示された。

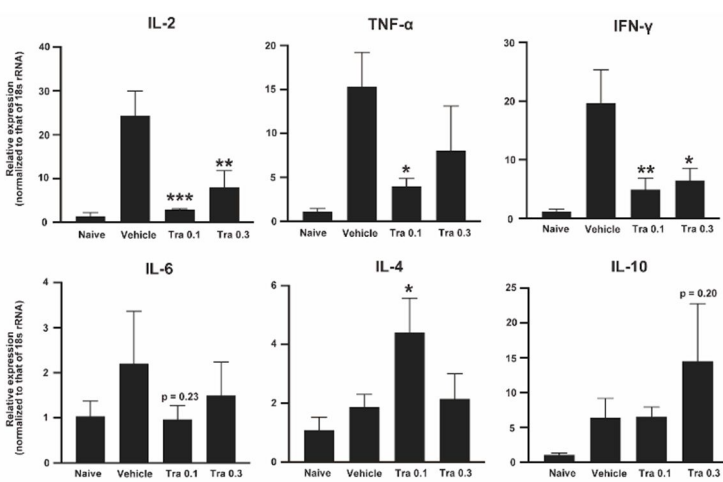


図 2

(6) Trametinib は膵島の Viability およびインスリン分泌能に悪影響を及ぼさない

0, 1, 10, 100 nmol/L, 1  $\mu$ M の Trametinib と共培養した膵島細胞の生存率には変化が見られなかった。各濃度の Trametinib の存在下で培養した膵臓の総インスリン量と分泌能を評価したが、グルコース低濃度 (3.3 mmol/L) または高濃度 (20 mmol/L) で培養した際の総インスリン量とインスリン分泌量は Trametinib の濃度を変えても変化はなく、Stimulation index にも変化は見られなかった。これらの結果から、Trametinib は膵島の Viability およびインスリン分泌能に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Anazawa Takayuki, Okajima Hideaki, Masui Toshihiko, Uemoto Shinji	4. 巻 3
2. 論文標題 Current state and future evolution of pancreatic islet transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 34 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tada Seiichiro, Anazawa Takayuki, Shindo Takero, Yamane Kei, Inoguchi Kenta, Fujimoto Nanae, Nagai Kazuyuki, Masui Toshihiko, Okajima Hideaki, Takaori Kyoichi, Sumi Shoichiro, Uemoto Shinji	4. 巻 6
2. 論文標題 The MEK Inhibitor Trametinib Suppresses Major Histocompatibility Antigen-mismatched Rejection Following Pancreatic Islet Transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Direct	6. 最初と最後の頁 e591 ~ e591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TXD.0000000000001045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 多田誠一郎、穴澤貴行、他
2. 発表標題 膵島移植における新たな作用機序による免疫抑制療法の開発と今後の展望
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiichiro Tada, Takayuki Anazawa
2. 発表標題 Establishment of islet allograft acceptance by mitogen-activated protein kinase kinase via suppression of alloreactive T cells
3. 学会等名 17th World Congress of the International Pancreas & Islet Transplant Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田誠一郎、穴澤貴行、他
2. 発表標題 MEK阻害剤トラメチニブはMHC不適合マウス膵島移植で膵島毒性を示すことなく拒絶反応を抑制する
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田誠一郎、穴澤貴行、他
2. 発表標題 膵島移植におけるMEK阻害剤の可能性
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田誠一郎、穴澤貴行、他
2. 発表標題 レシピエントの免疫応答が血管床誘導による皮下膵島移植に与える影響
3. 学会等名 第54回日本移植学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田誠一郎、穴澤貴行、他
2. 発表標題 血管床の誘導が皮下膵島移植に与える免疫学的な影響因子の検討
3. 学会等名 第45回日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田誠一郎、穴澤貴行、他
2. 発表標題 膵島移植における新たな作用機序による免疫抑制療法の開発：MEK阻害剤の応用可能性
3. 学会等名 第46回日本膵膵島移植研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Anazawa, et al.
2. 発表標題 A simple and promising strategy for pancreatic islet preconditioning to reduce immunogenicity and improve islet graft longevity
3. 学会等名 27th International Congress of the transplantation society (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
連携研究者	進藤 岳郎 (Shindo Takero)  (10646706)	京都大学・医学研究科・助教   (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------