

平成21年5月28日現在

研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2007 ～ 2008  
 課題番号： 19591192  
 研究課題名（和文）  
 膵島移植早期拒絶機序における白血球の解析—ワンドナーワンレシピエントを目指して—  
 研究課題名（英文） Analysis of leukocyte of rejection mechanism of early stage of islets transplantation.  
 研究代表者 安西慶三（ANZAI KEIZO）  
 福岡大学・医学部・講師  
 研究者番号：60258556

## 研究成果の概要：

- (1) 1型糖尿病のモデル動物である NOD マウスを用いて、Laser Microdissection(LMD)法による膵島浸潤リンパ球の解析を行い、膵島破壊につながる Th2 から Th1 への変化は局所の膵島炎の進行度によるものではなく全身的に Th1 優位に傾ける因子により変化すると考えられた。また顎下腺でも膵島と同様の Th1/Th2 バランス変化が認められたことから、膵島と同様な破壊機序が存在すると考えられた。LMD 法による凍結切片中の細胞の解析は確立している。
- (2) 同様の方法を用いて肝臓内移植膵島の移植後 6 時間以内の早期拒絶機序における白血球を経時的に採取し LMD 法で回収しどのような細胞がケモカインを産生しているか、その機序を解析中である。
- (3) 肝臓内移植膵島早期拒絶機序には移植膵島から放出される HMGB1 が引き金となり、HMGB1 により肝内単核球、NKT、白血球からの IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-6 産生が増強され膵島は破壊される。さらに TLR-2、RAGE が HMGB1 の受容体であることが解明した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：移植・再生医療、1型糖尿病、免疫学、膵島移植

## 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病患者は、生涯にわたってインスリンを注射し続けなければならない。このような患者がインスリン注射から離脱する究極の治療法は、インスリンを作る膵島細胞を糖尿病

患者の肝臓内に移植し、永久に生着させ、糖尿病を完治させる膵島移植である。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、我が国に於いても現在までに12例実施されている。臨床膵島移植の現在の最も

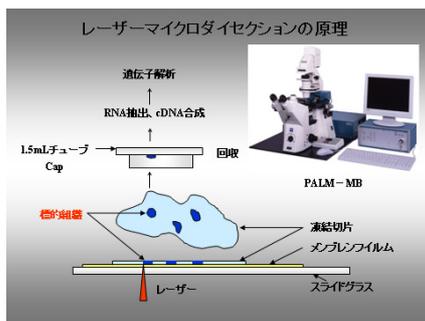
重要な課題は一人の糖尿病レシピエントの治療成功に2-3回の膵島移植、すなわち2-3人分のドナー膵臓を必要とすることが挙げられる。一人のドナー膵臓より得られた1回の膵島移植では生着する膵島数が少なく、移植膵島より分泌されるインスリンだけでは不十分で、減量できるもののインスリン注射を移植後に継続する必要がある。この問題が細胞移植である膵島移植が同じ目的で行われている膵臓器移植に比し、未だ実験的治療といわれる所以であり、その解決が臨床膵島移植の急務となっている。この問題を解決するために、移植後早期に肝内に移植された膵島の50%以上が移植後24時間以内に破壊され、移植部位である肝臓内に移植後6時間をピ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 $\gamma$ を産生放出、移植膵島を破壊することが判明した。またヒト膵島移植の拒絶には自己免疫反応による拒絶と移植免疫による拒絶の両方が関与しており自己免疫反応の拒絶も同時に解析した。移植早期膵島障害のメカニズムに基づき、好中球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は重要な研究課題と考えている。

## 2. 研究の目的

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。この課題を解決するためには膵島移植の早期拒絶を抑制する必要がある。さらに後期の拒絶には自己免疫反応による拒絶も関与しており、自己免疫反応による拒絶も解析した。本研究では、解析法としてLaser Microdissection(LMD)法を用いる。まず1型糖尿病のモデル動物であるNODマウスを用いてLMD法を確立させ、さらにC57BL/6マウスを用いて膵島膵島移植を行い移植後6時間以内で経時的にどのような機序が拒絶に関与しているか抗HMGB1抗体を用いて解析する。

## 3. 研究の方法

Laser Microdissection(LMD)法による膵島および膵島拒絶細胞の回収の原理



## 1) 実験方法

### I. Laser Microdissection(LMD)法の確立と1型糖尿病の発症機序の解析

- ① 1型糖尿病のモデル動物であるNOD Miceの5.8.12週齢雄性より臓器を採取した。脾臓・膵臓所属リンパ節、顎下リンパ節は全身の指標、膵臓および顎下腺は局所の指標とした。
- ② 各臓器の凍結切片を作製し、免疫染色によりリンパ球サブセットを解析した。また膵島浸潤リンパ球の程度によりGrade I~IV (I:膵島周囲、II:50%未満、III:50~90%、IV:90%以上)まで分類した。
- ③ レーザーマイクロダイセクション法を用いて脾臓、膵臓所属リンパ節、顎下リンパ節、膵島浸潤リンパ球、顎下腺浸潤リンパ球より組織を回収し、RNAを抽出した。
- ④ 抽出したRNAを用いてリアルタイムPCR法によりサイトカイン遺伝子の定量を行った。ターゲット遺伝子はTh1はIFN- $\gamma$ 、Th2はIL-10とした。

### II. 肝臓内移植膵島早期拒絶機序

- ① STZ糖尿病マウスへ単離膵島(ドナー1匹分200個、同種同系)肝内膵島移植時に、抗HMGB1抗体(0.5mg)投与してレシピエントの血糖を確認した。
- ② 抗HMGB1抗体投与後、経時的に肝内細胞をFACSおよび免疫染色で解析した。
- ③ HMGB1の血中および膵島内濃度を測定した。
- ④ 単離した膵島にサイトカイン(IFN- $\gamma$ 、YNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )を加え、培地中のHMGB1濃度を測定した。
- ⑤ HMGB1で培地中の単離肝単核球を刺激しサイトカイン濃度を測定した。

### III. 肝臓内移植膵島早期拒絶機序

C57BL/6マウスにストレプトゾシンを投与し、糖尿病マウスを作製。同系マウスの膵臓より膵島を分離し、作製した糖尿病発症マウスに経門脈的に肝臓に移植した。糖尿病発症マウスの肝臓を移植後に経時的に摘出し、免疫染色およびLMD法に用いるため連続した凍結切片を作製した。連続凍結切片を用いて免疫染色を行い、膵 $\beta$ 細胞および白血球およびケモカイン産生細胞を確認した。膵島の連続切片からLCM法にて選択的に膵島細胞、膵島周囲の細胞、浸潤細胞を切断、収集し、mRNAを抽出し、cDNAを作製した。確認されたケモカイン産生細胞についてReal-Time PCR法で経時的にケモカインの発現を解析中である。さらに抗HMGB1抗体投与後の拒絶細胞・移植膵島におけるサイトカインおよびHMGB1の発現についても解析している。

#### 4. 研究成果

##### I. Laser Microdissection(LMD)法の確立と1型糖尿病の発症機序の解析

- ①全身でのTh1/Th2バランスは、糖尿病未発症の5および8週齢ではTh2優位であったが、12週齢でTh1優位で移行した。
- ②膵島局所のTh1/Th2バランスは同じ膵島炎の程度にもかかわらず8週齢ではTh2優位に、12週齢ではTh1優位であり全身のTh1/Th2バランスと同等であった。
- ③12週齢では膵島および顎下腺はいずれにおいても全身から局所へのTh1優位なバランス変化の移行が見られた。LMD法による解析は確立した。

##### II. 肝臓内移植膵島早期拒絶機序

- ①STZ糖尿病マウスへ単離膵島肝内移植時に、抗HMGB1抗体投与でレシピエントは正常血糖になった。対照抗体では高血糖に推移した。
- ②FACS解析では抗HMGB1抗体投与により肝内NKT、好中球のIFN- $\gamma$ 産生が抑制された。免疫染色で無処置膵臓膵島、単離膵島核に、移植後3時間後ではHMGB1が移植膵島核のみならず、細胞質に染色された。
- ③移植後6時間をピークにレシピエント血中にHMGB1値が上昇した。単離膵島は他臓器組織(胸腺、肝臓、肺、脾臓、膵臓)、肝単核球に比し、50倍以上のHMGB1を含有することが判明した。
- ④単離培養膵島にサイトカインを加えると膵島は破壊され、培地中HMGB1は上昇した。HMGB1静注後、肝単核球、NKT、好中球からのIFN- $\gamma$ 産生が増強した。HMGB1刺激で単離肝単核球がIL-12, IL-6, IFN- $\gamma$ をFACS分離クッパー、好中球がNKT依存性にIL-12, IL-6を産生し、さらにIL-12, IL-6の存在下に好中球IFN- $\gamma$ 産生が増強した。
- ⑤ノックアウトマウスを用いTLR-2, RAGEがHMGB1の受容体であることが判明した。

##### III. 肝臓内移植膵島早期拒絶機序

現在、移植後6時間以内で経時的にどのような細胞がケモカインを産生しているか、それがどのように早期拒絶機序と関連しているか解析中である。

#### 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9件)

1. Anzai K, Fukagawa K, Iwakiri R, Fujimoto K, Akashi K, Tso P. Increased lipid

absorption and transport in the small intestine of Zucker obese rats. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. in press.

2. Nitta T, Itoh T, Matsuoka N, Mera T, Kojima D, Nakano M, Yamashita Y, Yasunami Y. Prevention of early loss of transplanted islets in the liver of mice by adenosine. Transplantation, in press.
3. Akehi Y, Anzai K, Katsua H, Yoshida R, Ohkubo K, Yamashita T, Kawashima H, Ono J. Adverse effects of obesity on  $\beta$ -cell function in Japanese subjects with normal glucose tolerance. Obesity Research & Clinical Practice. 2(3): 195-202, 2008
4. Iwai T, Tomita Y, Kajiura 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
5. Kajiura T, Tomita Y, Okano S, Iwai T, Yasunami Y, Yoshikai Y, Nomoto K, Tominaga R, Yasui H. Effects of cyclosporin A on the activation of NKT cells induced by  $\alpha$ -galactosylceramide. Transplantation 83:184-192, 2007
6. Asano T, Yoshida R, Ogata H, Kogawa K, Ogimoto M, Akehi Y, Anzai K, Ono J, Tamura K, Hidehira K, Kikuchi M. Beta-cell function is a major contributor to oral glucose disposition in obese Japanese students. Endocr J. 54(6):903-910, 2007.
7. Akehi Y, Oketa A, Mitsuyoshi Y, Yoshida R, Ohkubo K, Yamashita T, kawashima H, Anzai K, Ono J. The effects of age on insulin sensitivity and insulin secretion in Japanese subjects with normal glucose tolerance. Rinsho Byori. 55(10):901-905, 2007
8. Asano T, Yoshida R, Ogata H, Kogawa K, Akehi Y, Anzai K, Ono J, Tamura K, Kikuchi M. Characteristic Features of Metabolic Syndrome in Obese Japanese Students. Med. Bull. Fukuoka Univ. 34(3), 189-194, 2007
9. Satoh M, Yasunami Y, Matsuoka N, Nakano M, Itoh T, Nitta T, Anzai K, Ono J, Taniguchi M, Ikeda S. Successful Islet Transplantation to Two Recipients From a Single Donor by Targeting Proinflammatory Cytokines in Mice. Transplantation. 83(8):1085-1092, 2007

[学会発表] (計 10 件)

1. Matono S, Yoshimura E, Kumahara K, Tobina T, Koshimizu T, Kiyonaga A, Anzai K, Tanaka T. Changes in high molecular weight adiponectin and insulin resistance. 20th World Diabetes Congress. October 18-22, 2009, Canada.
2. Yoshimura E, Kumahara H, Tobina T, Matono S, Kiyonaga A, Kimura M, Tsukikawa H, Kawano S, Etou T, Irie S, Anzai K, Tanaka H. The influence of adipocytokines, muscle and hepatic lipid content on insulin resistance in Japanese. 20th World Diabetes Congress. October 18-22, 2009, Canada.
3. Itoh T, Nakagawa R, Matsuoka N, Nagata N, Nitta T, Mera T, Yamashita Y, Okamoto K, Yamamoto H, Yamada S, Maruyama I, Taniguchi M, Yasunami Y. A novel mechanism involved in early loss of transplanted islets in the liver mediated by HMGB1. 69th Scientific Sessions of American Diabetes Association. June 5-9, 2009, New Orleans, USA.
4. Matsuo T, Noguchi Y, Nagao Y, Shindo M, Kogawa K, Iwakiri R, Akashi T, Kondo S, Hara T, Kudoh J, Shimizu H, Kurisaki H, Katsuta H, Anzai K, Nagafuchi S. The Significance of b Cells in the Pathogenesis of type 1 Diabetes and a Possible Role of AIRE Gene. 69th Scientific Sessions of American Diabetes Association. June 5-9, 2009, New Orleans, USA.
5. Yoshimura E, Kumahara H, Tobina T, Koshimizu T, Shindo M, Kiyonaga A, Anzai K, Tanaka H. Effect of exercise and diet intervention on the anthropometric measures and metabolic risk factors in Japanese. European Congress on Obesity. May 14-17, 2009, Switzerland.
6. 安西慶三、明比祐子、中野真樹子、中野昌彦、松岡信秀、伊藤威、新田智之、米良利之、金城亜哉、小野順子、安波洋一腎移植後膵島移植を施行した1型糖尿病の経過報告。第52回日本糖尿病学会。2009. 5. 21-24, 大阪
7. 安西慶三、中野昌彦、明比祐子、吉満研吾、松永彰、川島博信、金城亜哉、小野順子、安波洋一、膵島移植の現状と展望。第46回日本糖尿病学会九州地方会。2008. 10. 10-11, 久留米
8. T Nitta, N Matsuoka, T Itoh, T Mera, A Kinjo, M Nakano, Y Yamashita, Y Yasunami.

- Adenosine has an inhibitory effect on NKT cells facilitating to prevent early loss of transplanted islets in association with engraftments. 22th International Congress of the Transplantation Society. August 10-14, 2008, Sydney, Australia.
9. Itoh T, Matsuoka N, Nitta T, Nakano M, Mera T, Yamashita Y, Ono J, Yasunami Y. Successful islet transplantation from one donor to one recipient by targeting IL-6 / IL-6 receptor signaling in mice. Joint Conference of Cell Transplantation Society International Pancreas and Islet Transplant Association and Xenotransplantation Association. September 15-20, 2007, Minneapolis, USA.
  10. Matsuoka N, Itoh T, Nitta T, Nakano M, Anzai K, Ono J, Yuichi Y, Yamashita Y, Taniguchi M, Yasunami Y. 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. 67th Scientific Sessions of American Diabetes Association. June 22-26, 2007, Chicago, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安西 慶三 (ANZAI KEIZO)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号: 60258556

### (2) 研究分担者

安波 洋一 (YASUNAMI YOUICHI)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号: 00166521

小河 一彦 (KOGAWA KAZUHIKO)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号: 60360301  
(平成 19 年 4 月 1 日～平成 20 年 10 月 27 日)

松岡 信秀 (MATSUOKA NOBUHIDE)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号: 40461503

### (3) 連携研究者

なし