

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08999

研究課題名(和文)ES/iPS細胞移植を見据えた複数回膵島移植後の免疫応答の解明と制御法の開発

研究課題名(英文)Development of control method of immune response after multiple islet transplantation in anticipation of ES/iPS cell transplantation

研究代表者

石山 宏平 (Ishiyama, Kohei)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50437589

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)：膵島移植成績向上のために、間葉系幹細胞(MSC)のなかでも、より高い機能特性を有するヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)を用いた免疫制御プロトコルの開発に着手している。細胞培養環境に左右されやすいMSCと違い、SHEDは安定した細胞集団であることを確認した。また、抑制性因子産生能も、SHEDにおいて有意な産生増強効果を認めた。更に、ヒトPBMC活性化と膵島への細胞傷害活性をSHEDが強力に抑制することが確認できた。この効果にPD1-PDL1経路が関与していることを確認し、MSC/SHEDの免疫抑制効果は液性因子だけでなく、細胞接触によるメカニズムが関与していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病に対する根治的治療法として死体ドナーからの同種膵島移植だけでなく、異種膵島やES/iPS細胞を用いた膵島移植にも期待がかかっている。しかしながら、移植医療普及のためには細胞移植治療効率を上げるための工夫が必要不可欠となる。免疫抑制効果を有するMSC/SHEDを用いることで膵島グラフト傷害が回避できる可能性について研究した。本研究の結果、限られたグラフト提供を有効に活用するための治療戦略を開発することで、移植成績の向上、患者のQuality of lifeの改善、2型糖尿病への応用など臨床面だけでなく、医療費削減など経済面においても貢献ができると考える。

研究成果の概要(英文)：To improve islet transplantation outcomes, we have begun developing immunoregulatory protocols using Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), which have higher functional characteristics among Mesenchymal stem cells (MSC). Unlike MSCs, which are easily affected by the cell culture environment, we have confirmed that SHEDs are a stable cell population. The ability to produce inhibitory factors was also significantly enhanced in SHED. Furthermore, we confirmed that SHED strongly suppressed human PBMC activation and cytotoxic activity to pancreatic islets. We confirmed that the PD1-PDL1 pathway is involved in this effect and that the immunosuppressive effect of MSC/SHD is not only mediated by humoral factors but also by cell-cell contact mechanisms.

研究分野：移植免疫

キーワード：膵島移植 免疫制御 間葉系幹細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、膵島移植成績向上のために移植免疫学的アプローチによる問題解決に取り組んできた。これまで、マウス経門脈的同系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た。次に、移植後急性期の膵島傷害に関わる instant blood mediated inflammatory reaction (IBMIR)との関連を検討し、IBMIR の主要サイトカイン(TNF-、IFN-、IL-1)が膵島移植後急性期に産生され、膵島グラフト廃絶に関わる TRAIL 分子を表出した liver resident (DX5-)NK 細胞活性が増強することを確認した。次に、膵島移植後に生じる肝臓内免疫応答活性を制御するために prostaglandin E2 (PGE2)や Transforming Growth Factor (TGF)- などの生理活性物質による細胞傷害活性抑制効果を有する間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSCs)の同時移植(研究簡便化のため骨髓由来 MSC 細胞株を使用)を行い、PGE2 経路下に DX5- NK 細胞活性が抑制され、膵島グラフト生着率が向上することを確認した。

近年では免疫制御を目的として MSCs を用いた臨床試験が進んでいるが、MSCs の免疫細胞抑制効果における作用メカニズムの詳細は明らかではない。申請者の報告に於いても MSCs 細胞株を同時移植することで移植成績は向上したが、臨床応用に即した骨髓もしくは脂肪組織から分離培養した MSCs 使用の効果は不明である。また、国内におけるドナー不足の観点ならびに、膵島分離の技術的問題・費用からも ES/iPS 細胞由来膵島移植の臨床応用が期待されるが、誘導された細胞の抗原性や移植後免疫応答については未知数である。近い将来、有効な ES/iPS 細胞由来膵島が作成された際に起こり得る移植後生体免疫反応を中心に、現時点で問題解決しておく必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

低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。欧米に於ける移植成績向上を背景に、本邦に於いても先進医療 B として多施設共同臨床試験が開始され、良好な途中経過が報告されている。しかしながら、克服すべき課題として、満足できる治療成績を得るためには複数回の膵島移植が必要となることが挙げられており、ドナー不足を解消するための代替療法として ES/iPS 細胞由来膵島移植の研究も積極的に行なわれている。ES/iPS 細胞由来膵島を含めた移植グラフト機能改善や、膵島分離法の工夫は研究されているが、移植後の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については明らかにされていない。

そこで、本研究では膵島移植後の免疫細胞活性を制御する治療戦略の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

当初の研究計画(2020年度~2022年度)に対応した実際の研究内容について報告する。

○骨髓由来 MSCs、脂肪組織由来 MSCs を作成し、それぞれの 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。

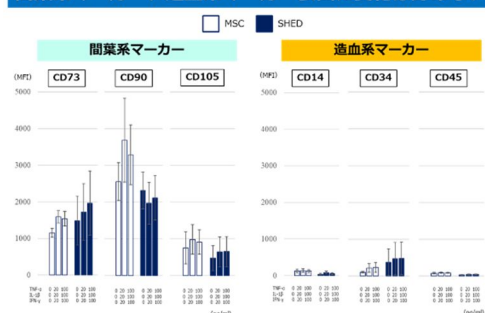
申請者の施設変更に伴い、新しい researcher が安定した移植成績を得るためのマウス実験手技を習得するまでの期間、ヒト免疫系での in vitro 実験を行うこととした。

比較する間葉系幹細胞について、骨髓由来ヒト MSC とヒト脱落乳歯歯髓幹細胞(Stem cells from human exfoliated deciduous teeth : SHED)を用いることとした。

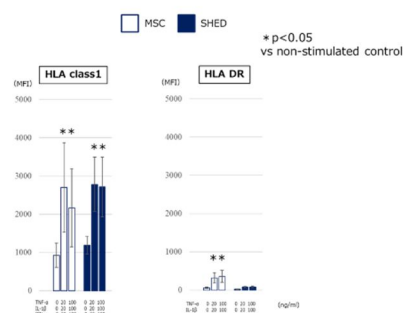
MSC の特性は培養環境に左右されやすく、その原因を SHED と比較することで検証した。

MSC と SHED に対するサイトカイン刺激を high dose (TNF-、INF-、IL1- 100ng/ml)、low dose (TNF-、INF-、IL1- 20ng/ml)として表面抗原の変化をフローサイトメトリーで確認した。間葉系幹細胞のマーカに対する変化は認めなかったが、抗原性に影響する MHC class の発現に関して、MSC で表出を認めたが SHED では表出を認めなかった。この違いが免疫抑制に関する安定性の違いと考え、SHED の有利性が認められた。

サイトカイン刺激による  
間葉系マーカー、造血系マーカー表出に変化は認めない



サイトカイン刺激によるSHEDの安定性を確認した

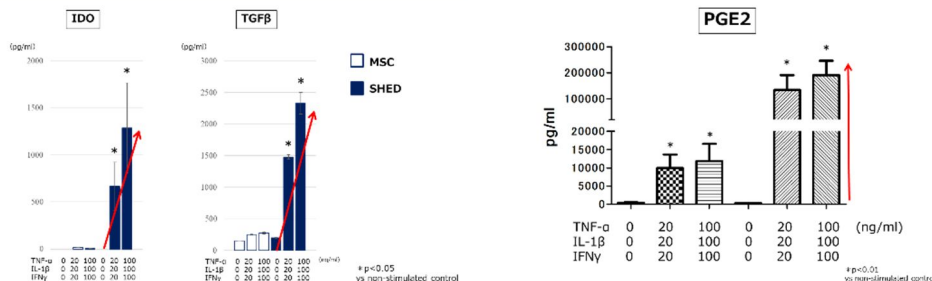


○サイトカイン環境がそれぞれの MSCs 上の抑制性分子表出や液性因子産生能に与える影響について免疫抑制メカニズムの検討を行う。

サイトカイン刺激により、抑制因子である IDO、TGF $\beta$  の産生を MSC/SHED に認めたが、PGE2 の産生能に関しては SHED での有意な産生増加が認められた。

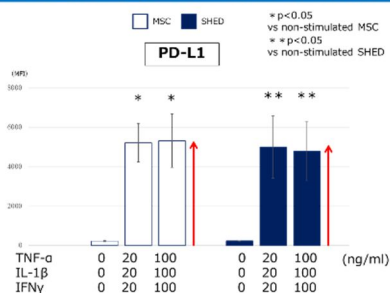
**サイトカイン刺激により抑制因子分泌能が増強する**

**SHEDにおけるPGE2産生能の優位性が認められた**



サイトカイン刺激により、細胞死を誘導する PDL1 の発現が認められた。

**サイトカイン刺激による細胞増殖抑制効果が期待できる**

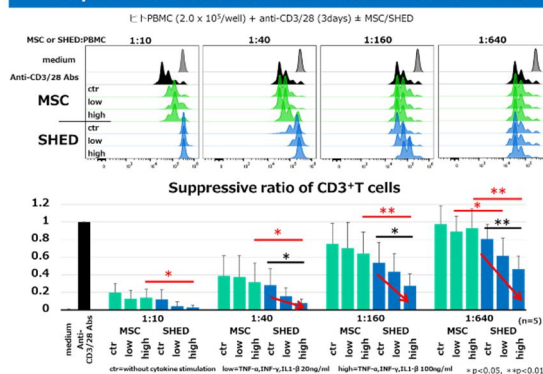


○マウス脾臓移植生着効果を、MSCs 同時移植もしくは前投与の有無などで比較検討する。MSCs が肝臓内免疫応答ならびに引き続き応答する獲得免疫系に与える効果をマウス脾臓移植で検討する。

動物実験での検証は出来なかったが、免疫細胞活性化抑制実験と細胞傷害活性試験を行うことで代用した。

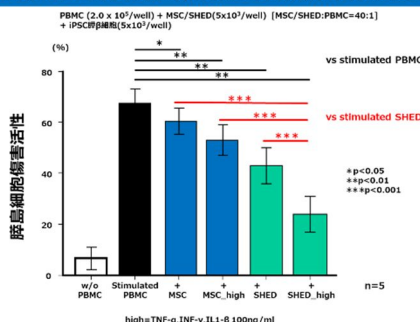
CFSE 色素染色したヒト PBMC を CD3/28 ビーズ刺激して活性化させ、MSC/SHED に抑制効果があるか検証した。High dose で刺激することで細胞活性化抑制効果が容量依存性に認められ、MSC と比較して強力な抑制効果が SHED に認められた。

**MSC/SHEDには活性化T細胞の増殖抑制効果がある**



iPS 由来ヒト 細胞に対する細胞傷害活性を検討した。活性化 PBMC による細胞傷害効果は SHED との混合培養化に有意に抑制された。この際に、N-SPC 非 RI 細胞傷害性アッセイキットを用いることで、被爆を避け安全に検証することができた。

**活性化SHEDによる脾臓細胞傷害抑制効果が認められた**



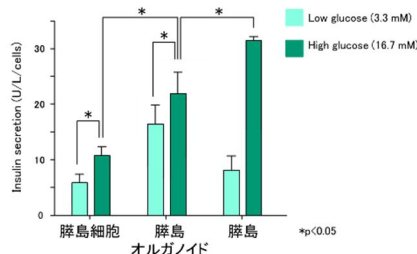


## 2. MSCs の免疫抑制機能が膵島グラフトに与える影響の証明：

○長期的な MSCs の膵島グラフト保護効果を検討する。

MSC を用いることでグラフト保護効果が得られるかを評価する前に、SHED を用いた膵島オルガノイドを作成してグラフト機能評価をグルコース応答性インスリン分泌能で確認した。

少量の膵島細胞からグルコース応答性インスリン分泌能を有するヒト膵島オルガノイドが作成できた



○膵島移植後の免疫環境の変化が 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、恒常性と機能性の面から検討を行う。

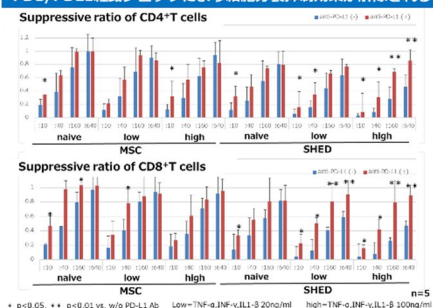
膵島移植実験を行うことができなかったため、検証不能。

## 3. ヒト間葉系幹細胞がヒト膵島グラフト生着率向上に与える影響の証明：

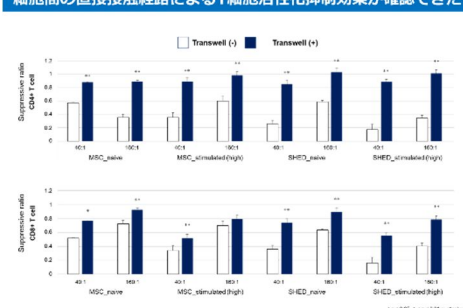
○ヒト MSCs がヒト膵島に与える免疫抑制効果について in vitro、in vivo ヒト膵島移植モデルで検討する。

抑制メカニズムについて液性因子と細胞接触の両方の免疫制御系が作用している可能性が示唆された。研究結果として、PD1/PDL1 経路をブロックすることで細胞傷害活性抑制効果が解除されること、トランスウェルシステムを用いることで細胞接触を遮断すると細胞傷害活性抑制効果が解除されることを確認した。

PD1/PDL1経路ブロックにより細胞分裂抑制効果が解除される



細胞間の直接接経路によるT細胞活性化抑制効果が確認できた



## 4. 研究成果

本研究では膵島移植後の免疫細胞活性を効率的に制御する治療戦略の確立を目指している。研究概略として、MSC をサイトカイン刺激して膵島と同時移植することにより免疫応答が抑制される現象がヒト免疫系においても確認できるか、骨髄由来 MSC だけでなく、MSC のなかでも歯髄由来である SHED を用いて in vitro の検討を行った。

本研究期間中に、SHED は MSC と比較して細胞培養環境による影響を受けにくく細胞機能的に安定した細胞集団であること、MSC/SHED をサイトカイン刺激することで細胞表面に PDL1 が有意に表出することを新しく確認した。また、PD1-PDL1 経路を遮断することで活性化 PBMC の膵島細胞への細胞傷害活性が有意に抑制されることも確認できた。このことは MSC/SHED が液性因子だけではなく、細胞接触による免疫制御能を有している可能性を示唆した。免疫制御に細胞接触の必要性があるか否かによって、治療戦略が異なってくることから、トランスウェルシステムを用いて、細胞接触を阻害した状態で膵島細胞への細胞傷害活性を確認した。結果として、トランスウェルありの環境では有意に傷害活性が低下した。すなわち、MSC/SHED の免疫抑制効果に液性因子だけでなく、細胞接触による抑制メカニズムが存在することが証明できた。

細胞接触に伴う細胞傷害メカニズムには、PD1-PDL1 経路以外にも存在する可能性はあるが、MSC/SHED と膵島グラフトが混在することが膵島移植後の免疫制御に重要であることが示唆された。

当初は、マウス実験による免疫応答評価を計画していたが、ヒト免疫系での評価を優先し、より具体性のある免疫抑制プロトコルの作成を目指した。研究期間内にマウス実験による評価を行うことができなかったため、この成果をもとに今後の研究を進展させる予定である。

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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石山宏平
2. 発表標題 拒絶反応制御を目的とした ヒト乳歯歯髄幹細胞同時移植による 膵島移植後の新しい免疫抑制法の開発
3. 学会等名 日本移植学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石山宏平
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髄幹細胞を用いた膵島オルガノイドによる画期的膵島移植プロトコルの開発
3. 学会等名 日本膵膵島移植学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石山宏平
2. 発表標題 膵島移植における活性型歯髄幹細胞を用いた免疫抑制療法の開発
3. 学会等名 第49回日本膵・膵島移植学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石山宏平
2. 発表標題 膵島移植における活性化ヒト間葉系幹細胞を用いた免疫抑制療法の開発
3. 学会等名 第47回日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------