

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591636

研究課題名（和文）ポリフェノールを用いた移植膵島に対する免疫反応の抑制

研究課題名（英文）Attenuation of Immunological Responses Against Islet Transplants by Using Polyphenols

研究代表者

岩永 康裕（IWANAGA YASUHIRO）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80378661

研究成果の概要（和文）：ポリフェノール（エピガロカテキンガレート=EGCG）の移植免疫反応抑制効果を、マウスリンパ球共培養法と膵島移植実験系を用いて評価した結果、EGCG は免疫拒絶反応に対して移植片の CD28 や CD3 ϵ の副刺激抗原を阻害し、TCR $\alpha\beta$ 刺激下で応答側細胞に対して不完全刺激によるポトーシスを惹起して免疫応答を抑制した。GVHD に対しても副刺激阻害による免疫抑制効果を示し、移植免疫抑制剤としてのモデル化合物の可能性を持つことが示された。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the immunological attenuation effects of a polyphenol (epigallocatechin gallate=EGCG) by mixed lymphocyte reaction assays and murine islet transplantation models. EGCG attenuated immunological reactions in allograft transplantations for both immunological rejection and graft-versus-host disease. In the rejection model, EGCG blocked CD28 and CD3 ϵ , rendering incomplete stimulation and subsequent apoptosis in the responder cells. EGCG by blocking similar co-stimulatory signals also attenuated the severity of GVHD. Taken together, EGCG was found to exhibit immunological attenuating effects and be a potential model compound for developing immune-suppression drugs in transplantation medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：膵島移植、免疫抑制、拒絶反応、ポリフェノール、糖尿病、抗原提示・認識、免疫カムフラージュ、アナジー

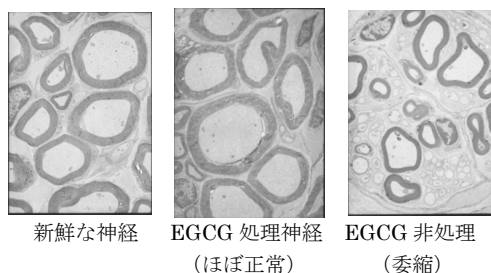
1. 研究開始当初の背景

（1）糖尿病は現在国内で1千万人以上が苦しむ難病である。インスリン分泌能

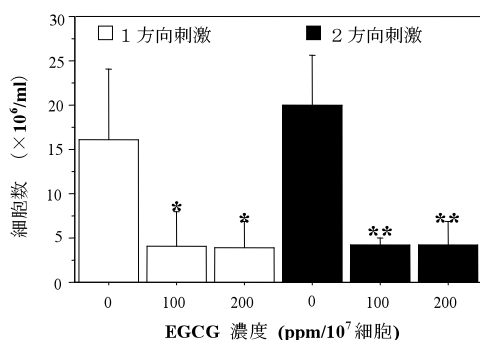
が枯渇し、末期では他の臓器に重篤な疾患を併発する。根治療法は現在、膵臓移植と膵島移植のみである。膵島移植は、

レシピエント（移植を受ける患者）にとって低侵襲だが、十分な効果を得るには通常2、3回の移植が必要となる。研究代表者らは、日本初の膵島移植を行なって以来、10人の重症糖尿病患者に計20回施行し、全ての患者で血糖値の安定化を実現した。しかし、現在移植に伴う問題として移植膵島に対する急性及び慢性の拒絶反応があるため、複数回の移植が必要であること、及び移植膵島の長期生着率が低いことが世界的に大きな課題である。解決法として大量の免疫抑制剤を使用すると、移植後患者は副作用の危険にさらされる為、副作用の無い新たな免疫抑制法の開発が求められている。

(2) 緑茶ポリフェノールは抗炎症作用などの生理活性で注目されているが、連携研究者の玄らは、ポリフェノール（主成分：エピガロカテキンガレート[EGCG]）が、移植組織に対する免疫反応を抑制することを動物実験で明らかにした（右上図）（Ikeguchi et al. *Transplantation* 2005）。ポリフェノールは膵島細胞の生理活性を維持することも分っており（松本[研究協力者]、Zhang 2004）、総じて膵島移植に関する課題解決の切り札となる。



(3) 私達は、拒絶反応が起こる異系統のマウスのリンパ球を用いた実験で、実際にポリフェノールが組織を攻撃するリンパ球の抗原認識力を低下させ、その活性を抑制し（下図）、リンパ球の増殖を誘導するサイトカインの量をも減らすことを見出した（Kim et al. 2007; 出願特許）。



リンパ球共培養実験. 片方 (1 方向)又は両方 (2 方向) のリンパ球刺激で、EGCG は攻撃性リンパ球の増殖を抑制した(n=3, ANOVA, F-PLSD: *p<0.0001; **p<0.018) (*Cell Transpl.* 2007)。

2. 研究の目的

- (1) 小動物（マウス）の膵島移植実験系を用いたポリフェノールによる免疫抑制技術を確立する。
- (2) ポリフェノールによる初期免疫反応抑制効果を確認する。
- (3) 大動物（イヌ）移植実験系でポリフェノール免疫抑制効果を確認する。
- (4) ヒト膵島-ヒト血液間初期免疫反応抑制効果と安全性を確認する。
- (5) 臨床膵島移植への応用を開始する。

3. 研究の方法

- (1) マウスの膵島移植実験系を用いたポリフェノール (EGCG) 免疫抑制技術の確立-膵島を浸漬処理する液中 EGCG 最適濃度と処理条件を決定するため、マウスを用いた実験系を用いる。
 - ① 異系統マウス間の膵島とリンパ球の共培養モデルで、膵島の EGCG 処理濃度・時間とリンパ球活性抑制効果の関係を把握し、最適処理条件を決定する。
 - ② EGCG 最適処理条件下で異系統マウス間の膵島移植実験を行ない、免疫抑制効果を解析する。
 - ③ 血中グルコース濃度の計測による移植膵島の生存度曲線解析を行う。
- (2) ポリフェノール (EGCG) の初期免疫反応抑制効果の評価-膵島移植直後に血液凝固を伴う初期免疫反応が起こることが知られている。そこで、ブタ膵島とヒト血液の共培養法 (Johansson et al 1996) を用いて、EGCG の初期免疫抑制効果を評価する。
 - ① ブタ膵島とヒト血液との共培養をモデルとして用い、血液凝固反応、マクロファージ及び好中球数、補体産生動態、サイトカイン (TNF- α) 産生動態を計測し、初期免疫反応及び炎症反応をどの程度 EGCG が抑制するかを評価する。
 - ② 次にブタ膵島をマウス肝臓内に移植する異種移植実験により、移植後の血液凝固動態、移植膵島に対する炎症反応、マクロファージ等の組織内浸潤を評価する。
- (3) 大動物（イヌ）移植実験系を用いたポリフェノール (EGCG) 移植免疫抑制効果の評価-免疫抑制効果をより臨床に近い

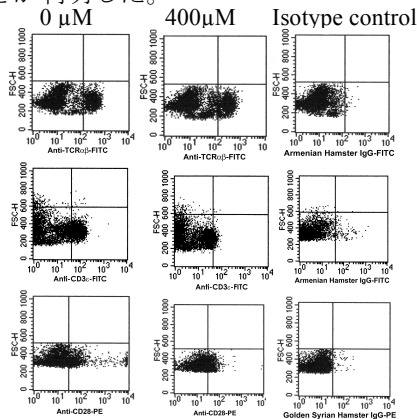
形で評価するため、大動物での移植実験を行う。

- ① ブリーダーの異なるビーグル犬の膵島移植実験により、EGCG処理による免疫抑制効果を解析。
 - ② 移植後の血中グルコース濃度とCペプチドを計測し、移植膵島の生存度曲線解析を行なう。
 - ③ 大動物ではEGCGによる免疫抑制効が十分でない可能性がある。その場合は、免疫抑制剤 (FK506) を投与した宿主 (ビーグル犬) にEGCG処理した膵島を移植し、その後免疫抑制剤を減量していき、その投与量と移植膵島に対する拒絶反応の惹起の関係を解析する (Wang et al. 2005)。
- (4) ヒト膵島組織を用いたポリフェノールの初期免疫反応抑制効果と安全性の評価—実験用ヒト膵島と自施設内で採取されたヒト血液の共培養実験を行い、臨床移植直後に起こり得る初期免疫反応に対するポリフェノールの抑制効果と安全性を確認する。

4. 研究成果

(1) リンパ球共培養法とサイトメトリーによる免疫阻害効果の評価

EGCGの移植免疫反応抑制効果を、マウスのリンパ球共培養法と膵島移植実験系で解析した。その結果、EGCGはアロ移植系の免疫拒絶と移植片対宿主の両方の免疫反応への抑制効果を示した。免疫拒絶反応に対しては、EGCGが移植片の表面抗原に結合し、免疫カンプラージュ様の作用を示すことを、サイトメトリーを用いた処理細胞の表面抗原解析で明らかになった (下図)。その裏付けとして、処理細胞の表面抗原提示が阻害されるが、抗原蛋白の産生と mRNA 発現が EGCG によって抑制されない。興味深いことに、EGCG は提示阻害作用の抗原特異性を示し、特に CD28 や CD3 ϵ 等の抗原決定基による副刺激が EGCG 処理により阻害され、細胞間における TCR 刺激下で、応答する側の細胞に対して不完全刺激を与え、末梢リンパ球がアポトーシスを起こすことが判明した。

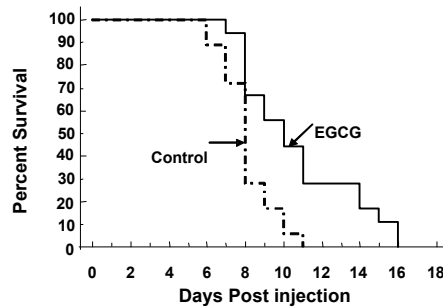


サイトメトリーによる表面抗原解析。上から TCR $\alpha\beta$, CD3 ϵ , CD28。其々、0 μ M、400 μ M の EGCG で処理後に解析。

(2) 生体マウスの GVHD 誘導実験

膵島移植モデル実験では、EGCG 処理膵島をレシピエントの腎被膜下に移植後、約 7-10 日で減衰した。そこで移植後 7 日以降の免疫抑制効果を持続させるべく、EGCG をレシピエント腹腔内に追加投与したが、安定した抑制効果を見なかった。

そこで当初計画していた中・大動物を用いた実験に替えて、さらに詳細な免疫抑制効果のメカニズムを明らかにするため、アロ免疫の両面の反対側にあたる移植片対宿主反応 (GVHD) に対する EGCG の効果の詳細な解析を行った。 γ 線を照射したレシピエントマウスに EGCG 処理と未処理 (Control) の異系統マウスのリンパ球を移植した。この GVHD モデルの実験結果から、EGCG の免疫抑制効果は移植後、1 週後に有意差を示し (図)、未処理との差はマージナルではあるが、GVHD 抑制作用を確認できた。



B6 マウスリンパ球を EGCG 処理し、 γ 線照射した BALB/c マウスの腹腔内に移植した GVHD モデル実験

これらのデータは、EGCG がアロ拒絶反応に対して反応側の細胞に直接免疫活性を低下させずに、細胞間シグナル伝達を介した二次的な免疫応答を抑制することを示す。総じて、EGCG は抗原決定基特異的な不完全刺激による免疫抑制効果を示し、ドナーリンパ球への EGCG 投与が刺激を発信する側の細胞に対しても副刺激の阻害による免疫抑制作用を持つことが判明した。これらのことから、EGCG は、免疫表面抗原決定基に対する特異性を持つという点で、移植免疫抑制剤の開発におけるモデル化合物の可能性があると解った。

(3) EGCG パルミチル基誘導体を用いた免疫抑制の評価

EGCG による細胞表面抗原決定基に対する阻害特異性は、その分子構造に由来し、主にガラクトースの吸着特異性にあると考えられる。そこでパイロット試験として、抗原決定基に

対する阻害作用を増強できる細胞吸着性の高い EGCG パルミチル基誘導体を用いた同様の免疫抑制実験を試みた。結果として、細胞毒性の増強により適切な評価には至らなかったが、特異的な吸着性を維持しつつ、同時に細胞毒性の低い EGCG 誘導体の分子デザインの研究に可能性が開かれていると考えている。

(4) 今後の展望

近年、免疫抑制現象における重要性が指摘されつつある調節性 T 細胞 (T reg) に対する、EGCG や EGCG 誘導体の影響を解析していくことが今後の重要なテーマであると考えられる。また、移植免疫抑制をレシピエント側ではなく移植組織・細胞に対して最適化していくという本研究の提示する移植免疫制御の戦略には、今後さらなる発展が期待できると考える。

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 2 件)

- ① Kanamune, J., Iwanaga, Y., Kina, T., Noguchi, H., Matsumura, K., Uemoto, S., Hyon, S-H. Attenuation of murine GVHD by a tea polyphenol. *Cell Transplantation*. 2012. In press. 査読有. (DOI=10.3727/096368911X623934).
- ② 岩永康裕、金宗潤、高折恭一、上本伸二、 脾臓移植における免疫抑制法、脾臓、26 巻、2011、pp197-203. 査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩永 康裕 (IWANAGA YASUHIRO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：80378661

(2) 研究分担者

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：40252449

(3) 連携研究者

玄丞然 (Hyon S-H)
京都大学再生医科学研究所・准教授
研究者番号：90283655