

## 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25年 5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390248

研究課題名（和文） 細胞死回避による免疫寛容誘導の機構解明とその展開

研究課題名（英文） Immunological tolerance induced by surviving but not dying cells following sublethal stress

研究代表者

後藤 満一（GOTOH MITSUKAZU）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50162160

研究成果の概要（和文）：細胞死回避による免疫寛容誘導の機構解明を、ラット膵島分離後、亜致死刺激の濃度の Mitomycin C(MMC)処置をおこない、その後培養する系において実施した。MMC 処置により damage-associated molecular pattern 分子である HMGB1 や eat-me signal を誘導する calreticulin を濃染する中心壊死部が有意に抑制された。Western blot では、apoptosis の経路には変化はなく、細胞周期停止が直接的に誘導されていることが明らかとなり、これまでの in vivo の結果を含め、寛容誘導につながる機構が想定された。

研究成果の概要（英文）：Islets treated with sublethal concentration of MMC at 10  $\mu$  g/ml for 30 min induced immunological unresponsiveness when these islets were cultured for more than 20 hrs and transplanted into renal subcapsular space of STZ-induced diabetic mice. MMC treatment effectively reduced central necrotic area which pooled calreticulin and HMGB1 both inducing cross priming together. Western blot analysis suggested that MMC treatment and subsequent culture for 8 or 20 h upregulated the active form of p53 as well as the downstream gene p21waf1. Meanwhile, the active form of caspase-3 was not significantly changed. This indicates that the activation of p53 was directed at cell cycle arrest, but not at apoptosis processes through the activation of caspase-3. These findings together with previous in vivo results would support that a concept of surviving but not dying cells through sublethal stress induce unresponsiveness to the treated cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
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：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：膵島、亜致死刺激、免疫寛容、細胞周期停止、Mitomycin C、HMGB1、calreticulin

## 1. 研究開始当初の背景

膵島移植はホストに免疫抑制剤を投与することなく、グラフトの **immuno-modulation** のみで、長期生着が得られる可能性がある。1984 年には膵島を UV 照射することにより長期生着することが示された (*Science* 223: 607, 1984)。我々は膵島を  $\gamma$  線照射する方法 (*Diabetes* 38 Suppl 1:154, 1989)、**Mitomycin-C (MMC)** 処置し短期間培養することによりラットからマウスの異種移植の系で有意な生着延長効果が得られることを明らかにした (*Transplantation* 67: 1474, 1999)。また、MMC 処置膵島ではマウスの **full-allogeneic** な系においても約半数の動物で永久生着すること (*Transplantation* 76: 65, 2003)、さらに、ラットからマウスの異種移植の系においても、培養時間を 20 時間から 3 日に延長することによって約半数の動物で永久生着が得られることを明らかにした (*Cell Transplantation* 17: 619, 2008)。

これらの事実は **sublethal** な細胞死を誘導する処置を施された膵島は細胞死から逃れ、免疫不応答を獲得することを示すものと考えられた。

## 2. 研究の目的

これまで我々がマウス、ラットで明らかにしてきた MMC により細胞死を回避した膵島が免疫不応答を誘導する機構解析をおこなうことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞死を回避した膵島が免疫不応答を誘導する機構解析をおこなうため、①細胞死を回避した細胞はストレスに抵抗性を獲得することが出来るかどうか、②細胞死を回避した細胞ではどのようなシグナル伝達が誘導されているかの 2 点について検討した。

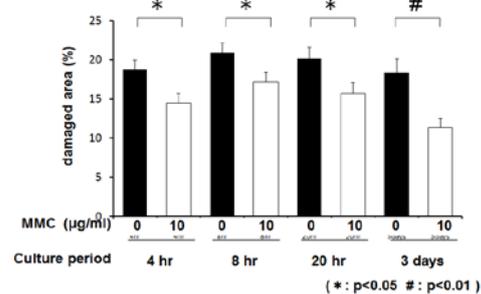
方法としては、①は MMC 処置後、培養ストレス下の膵島の **viability** の測定と **damage-associated molecular pattern** 分子である **HMGB1** や **eat-me signal** を誘導する **calreticulin** の免疫染色をおこない、免疫応答制御因子の評価をおこなった。②に関しては、MMC 処置後の細胞内シグナル伝達について **Western blot** にて検討した。

## 4. 研究成果

膵島分離後、培養の系において膵島の中心部に壊死部がみられるが、MMC 処置による影響を検討するため、ヘマトキシリン・エオジン染色標本において、膵島全体面積と **damage** 部分の面積を、ソフトウェア **Microanalyzer** で測定し、膵島全体に対する **damage** 部分の面積比を計算したところ、有意な差がみられた。

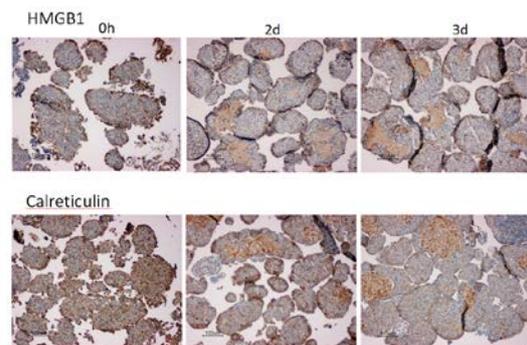
図 1

MMC 処置による膵島全体に対する damage 部分の面積比の変化



中心壊死部には **damage-associated molecular pattern** 分子である **HMGB1** や **eat-me signal** を誘導する **calreticulin** が貯留し、培養とともに染色部の減少が見られることが明らかとなった。

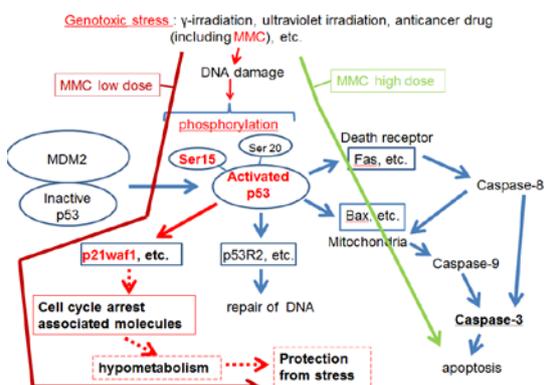
図 2



細胞内シグナル伝達を調べたところ、8,20 時間培養において、MMC 処置により、活性型 **p53** とその下流の **p21waf1** のタンパクレベルは上昇していた。一方、活性型 **Akt** と活性型 **caspase-3** は、MMC 処置による増減は認められた。MMC は、**p53** の **serine 15** のリン酸化により、細胞周期停止、DNA 修復、**apoptosis** を誘導するが、MMC 低濃度処置とそれに続く 8,20 時間培養は、活性型 **p53** と

その下流遺伝子である p21waf1 の upregulation を誘導したが、一方で、活性型 caspase-3 は有意には変化がみられなかったことより、p53 の活性化から、apoptosis は誘導されずに、細胞周期停止が直接的に誘導されていることが示唆された。

図 3



これらの結果から、sublethal なストレスを受け細胞死を回避した細胞はその後のストレスにも抵抗性を示すこと、また、その際、damage-associated molecular pattern 分子である HMGB1 や eat-me signal を誘導する calreticulin の表出を押さえるとともに、自分自身は apoptosis に向かうのではなく細胞周期を停止し、ストレスに対する抵抗性を保持していることが示唆された。本研究で得られた結果は今後、移植免疫のみならず、がん免疫を考えるうえで、重要な知見となると考えられた。

## 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 10 件)

- ① Saito T, Saito T, Sato Y, Ise K, Anazawa T, Oshibe I, Haga J, Yamamoto M, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin-C treatment significantly reduces central damage of islets in culture. *Pancreas*. 査読有 41(2), 2012, 245-252.  
DOI: 10.1097/MPA.0b013e31822461c7
- ② Ishii S, Saito T, Ise K, Yamashita M, Sato Y, Saito T, Tsukada M, Oshibe I, Kenjo A, Kimura T, Anazawa T, Suzuki S, Gotoh M. Preservation of pancreatic islets in cold UW solution

before transplantation. *Islets*. 査読有 4(1), 2012, 32-39.

DOI: 10.4161/isl.18607

- ③ Oshibe I, Saito T, Sato Y, Saito T, Tsukada M, Ise K, Kenjo A, Kimura T, Anazawa T, Suzuki S, Hashimoto Y, Gotoh M. Adenine nucleotide levels in a closed enzymatic digestion system for porcine islet isolation. *Cell Transplantation*. 査読有 21(2-3), 2012, 483-491.  
DOI: 10.3727/096368911X605394
- ④ Saito T, Saito T, Sato Y, Ise K, Anazawa T, Oshibe I, Haga J, Yamamoto M, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin- C treatment significantly reduces central damage of islets in culture. *Pancreas*. 査読有 41(2), 2012, 245-252.  
DOI: 10.1097/MPA.0b013e31822461c7
- ⑤ Tsukada M, Saito T, Ise K, Kenjo A, Kimura T, Sato Y, Saito T, Anazawa T, Oshibe I, Suzuki S, Hashimoto Y, Gotoh M. A model to evaluate toxic factors influencing islets during collagenase digestion: the role of serine protease inhibitor in the protection of islets. *Cell Transplantation*. 査読有 21(2-3), 2012, 473-482.  
DOI: 10.3727/096368911X605385
- ⑥ Yamashita M, Saito T, Ise K, Ishii S, Sato Y, Saito T, Oshibe I, Shimizu H, Kenjo A, Kimura T, Gotoh M. Mizoribine as Sole Immunosuppressive Agent in Islet Xenotransplantation Models: A Candidate Immunosuppressant Causing no Adverse Effects on Islets. *Cell Transplantation*. 査読有 21(2-3), 2012, 535-545.  
DOI: 10.3727/096368911X605457
- ⑦ Anazawa T, Sato Y, Saito T, Tsuchiya T, Kenjo A, Kimura T, Haga J, Miyake M, Waguri S, Hazama A, Gotoh M. Improved islet yield and function by use of a chloride channel blocker during collagenase digestion. *Transplantation*. 査読有 92(8), 2011, 871-877.  
DOI: 10.1097/TP.0b013e31822e6eb4

⑧ Saito T, Ohashi K, Utoh R, Shimizu H, Ise K, Suzuki H, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation*. 査読有 92(11), 2011, 1231-1236.  
DOI: 10.1097/TP.0b013e3182375835

⑨ Saito T, Anazawa T, Gotoh M, Uemoto S, Kenmochi T, Kuroda Y, Satomi S, Itoh T, Yasunami Y, Kitamoto T, Mohri S, Teraoka S. Actions of the Japanese Pancreas and Islet Transplantation Association Regarding Transplanted Human Islets Isolated Using Liberase HI. *Transplantation Proceedings*. 査読有 42(10), 2010, 4213-4216.  
DOI: 10.1016/j.transproceed.2010.09.142.

⑩ Saito T, Gotoh M, Satomi S, Uemoto S, Kenmochi T, Itoh T, Kuroda Y, Yasunami Y, Matsumoto S, Teraoka S. Islet transplantation using donors after cardiac death: report of the Japan Islet Transplantation Registry. *Transplantation*. 査読有 90(7), 2010, 740-747.  
DOI: 10.1097/TP.0b013e3181ecb044.

[学会発表] (計4件)

① 穴澤貴行, 土屋貴男, 見城明, 芳賀淳一郎, 佐藤哲, 三宅将生, 狭間章博, 後藤満一. 重症低血糖発作を伴うインスリン依存性糖尿病に対する心停止ドナーからの膵島移植: 日本膵・膵島移植研究会事務局報告. 第47回日本移植学会総会. 2011.10.4-6, 仙台.

② Anazawa T, Tsuchiya T, Kenjo A, Haga J, Sato T, Sato N, Saito T, Sato Y, Miyake M, Hazama A, Gotoh M. Inhibition of chloride ion influx into islet cells protects islets during pancreatic islet isolation. The 13th World congress of International pancreas and islet transplantation association. 2011.6.1-4, Prague, Czech Republic.

③ Shimizu H, Ohashi K, Saito T, Utoh R, Ise K, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Functional Islet Tissue Engineering in Subcutaneous Site Using Fabricated Islet Cell Sheets. The 13th World

congress of International pancreas and islet transplantation association. 2011.6.1-4, Prague, Czech Republic.

④ Saito T, Saito T, Sato Y, Ise K, Oshibe I, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin-C treatment significantly reduces central necrotic damage of islets in culture. The 23th International Congress of the Transplantation Society. 2010.8.16, Vancouver, Canada.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤満一 (GOTOH MITSUKAZU)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50162160

### (2) 研究分担者

斎藤拓朗 (SAITO TAKURO)  
福島県立医科大学・医学部・医監兼教授  
研究者番号: 20305361  
穴澤貴行 (ANAZAWA TAKAYUKI)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90566811

### (3) 連携研究者

見城明 (KENJO AKIRA)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40305355  
伊勢一哉 (ISE KAZUYA)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90566811  
木村隆 (KIMURA TAKASHI)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00381369  
鈴木弘行 (SUZUKI HIROYUKI)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30322340