

## 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23日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591417

研究課題名（和文）

大動物モデルによる膵島移植の免疫学的特異性に基づいた非侵襲的免疫寛容誘導法の確立

研究課題名（英文） Role of prevascularization of islets in the induction of tolerance of allogeneic islets in miniature swine

研究代表者

平方 敦史 (HIRAKATA ATSUSHI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40468765

研究成果の概要（和文）：我々は膵島移植における免疫寛容誘導法の確立を目指し、独自の免疫寛容誘導戦略として、移植前にドナー腎臓皮膜下で膵島血管を再構築（vascularization）した膵島腎グラフト（Islet Kidney: IK）を考案し、前臨床大動物モデルでの免疫寛容誘導を示した。本実験では、主要組織適合性抗原（MHC）確立クラウンミニブタを用いた前臨床大動物実験により、ドナー腎移植を伴わずに膵島を vascularized islets として移植するのみで IK 移植と同様に免疫寛容が誘導可能かを評価した。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported successful induction of tolerance of allogeneic islets by transplantation of islets as a form of composite islet-kidney in preclinical MHC inbred miniature swine while all islets were rejected when islets were injected as islet cell transplantation. This study aimed to determine whether vascularized islets have the ability to induce tolerance without renal graft.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：移植外科学、膵島移植、移植後免疫寛容、ミニブタ、腎移植、膵島・腎移植、血管再構築

## 1. 研究開始当初の背景

膵島移植は重症糖尿病に対する非侵襲的な根治治療であるが、免疫療法の改善によっても移植5年後に半数はインスリン依存性に戻り、またインスリン離脱後も免疫抑制療法が必要である。更に膵島移植によりインスリン治療から解放された場合も、現在の臨床膵島移植法では移植膵島の生着持続には免疫

抑制剤の永続的内服が必須であり、インシュリン治療の免疫抑制治療へのトレードとなるにすぎない。これらの点は、患者、医療費に及ぼす影響は非常に大きく、問題解決のためには膵島移植における免疫寛容誘導法の確立が急務である。

## 2. 研究の目的

臨床移植において、この5年間で免疫寛容の誘導例が報告され、免疫寛容誘導が実験レベルから臨床応用可能なレベルとなってきた。しかし、実質臓器の免疫寛容は可能であるが、細胞移植である膵島移植は、その免疫反応から免疫寛容誘導が困難であり、膵島移植独自の免疫寛容戦略が必要である。

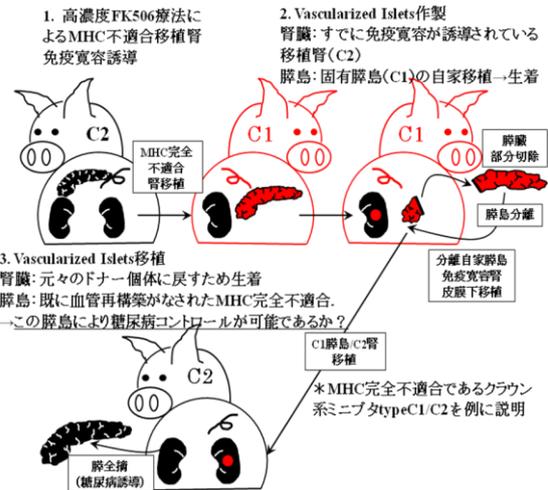
我々は膵島移植における免疫寛容誘導法の確立を目指し、独自の免疫寛容誘導戦略の開発を推進してきた。移植前にドナー腎臓皮膜下で膵島血管を再構築 (vascularization) した膵島腎グラフト (Islet Kidney: IK) を作製し、膵島を IK グラフトとして移植する独自の IK 移植法を考案し、前臨床大動物モデルでの免疫寛容誘導を示した (Kumagai N and Yamada K et al. Diabetes 2002)。しかし、IK 移植による免疫寛容誘導機序は明らかでなく、また膵島・腎同時移植である IK 法は適応が糖尿病性腎不全に限られる。

本実験では、主要組織適合性抗原 (MHC) 確立クラウンミニブタを用いた前臨床大動物実験により、(1) IK 移植による免疫寛容機序の解明を通じ、膵島移植の免疫学的特異性を明らかにする (目的 1)、(2) 腎移植を伴わない膵島移植独自の免疫寛容誘導法の確立 (目的 2) の 2 点を目指す。

## 3. 研究の方法

IK 法による免疫寛容誘導が、ドナー腎依存的なものか、あるいは Vascularized Islets のみで可能であるかを評価する。

(1) Vascularized Islets 作製・移植 (下図) : MHC 確立クラウンミニブタを用い、MHC 不適合間腎移植で免疫寛容となる高濃度カルシウム阻害剤療法下に同種腎移植を行い、免疫寛容腎を作製する。3 ヶ月後にこの免疫寛容腎 (黒) を有するレシピエントの膵臓 (赤) を部分切除し、分離膵島を腎 (黒) 皮膜下に移植し Vascularized Islets (膵島 (赤) /腎 (黒)) を作製する。このグラフトを、膵島移植 5 日前に自己膵臓を全摘出し、IDDM を誘導した腎ドナー個体 (赤) に移植する。免疫寛容 C2 腎移植は自己腎移植となるので、ドナー腎移植を伴わない Vascularized Islets のみの膵島移植が可能となる。



(2) 分離膵島の評価: ジチゾン染色による膵島量、膵島形態から Score を測定し、AO/PI (acridine orange/propidium iodide) 染色により膵島細胞の viability を判定する。分離膵島を高/低グルコース濃度の溶液で培養し、放出されるインスリン比から Stimulation Index を算出し機能を評価する。

(3) 移植膵島評価: IDDM 高血糖が正常血糖に回復するか、免疫寛容誘導が可能かについて、移植後膵島機能は空腹時血糖を検討する。

(4) 免疫反応評価: 混合細胞培養 MLR、細胞障害性試験 CML および抗ドナー抗体産生により評価する。

## 4. 研究成果

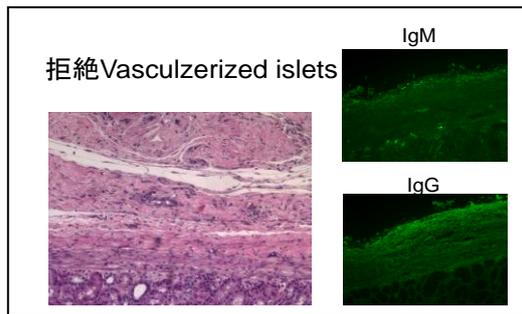
【成果 1: IK による免疫寛容機序の解明 (目的 1)】

ドナー腎移植を伴わずに vascularized islets 移植のみで IK 移植と同様に免疫寛容となるかについて評価した。

第 1 段階として、12 日間高濃度カルシウム阻害剤療法下で同種間腎移植免疫寛容を導いた移植腎 (A) に、レシピエント (B) 自身の膵島を移植し、移植腎内 (A) での移植膵島 (B) の生着および移植膵島 (B) が免疫寛容腎 (A) からの血管で vascularize されていることを組織学的に確認した。

第 2 段階として、作成した膵島腎 (IK: 腎臓 A、膵島 B) を腎臓と同じ MHC のブタ (A') に対し、自己膵臓完全摘出後に 12 日間高濃度 CyA 下に IK 移植を 3 例に行った (膵島は vascularized-同種膵島)。移植後の経過として一過性の血糖制御を認め、free islets 移植に比較し生着延長は認められた。しかし、移植後 1-2 ヶ月に血糖の上昇を認め、移植後 2-3 か月後には血糖制御は困難となった。同時に

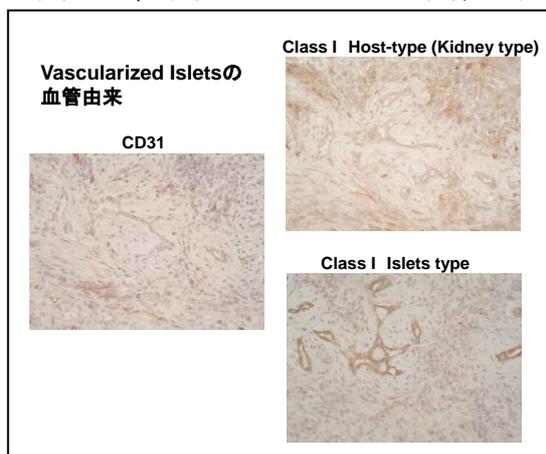
抗ドナー反応を認め、免疫学的ならびに組織学的にも拒絶に至ったことを確認した。



この結果は、腎移植では免疫寛容が得られる 12 日間高濃度カルシウム阻害剤療法では、vascularized islets は免疫寛容が誘導されないことを示している。しかし、これまでの我々の研究結果から、同種腎とそのドナーからの膵島を、prevascularization せずに、臨床と同様の free islets として移植した場合、その prevascularization していない同種膵島 (islets) は拒絶されることを確認している。これらを総合すると、IK 移植による膵島免疫寛容は、移植腎依存性であり、且つ膵島の prevascularization が必要なことを示している。

【成果 2 : Vascularized islets の組織学的検証 (目的 2)】

Vascularized islets は、そのみでは免疫寛容を誘導し得ないが、ドナー内で IK として prevascularization し、同種 IK として移植することで免疫寛容を誘導し得る。このメカニズムの更なる検討として、vascularized islets の免疫組織学的検討を行った。ドナー MHC Class I またはレシピエント MHC Class I 抗原に特異的に反応する抗体、更にブタ T 細胞 (CD3) 並びにマクロファージ等抗原提示細胞に反応する抗体を用いて、その Vascularization がドナー Islets グraft 由来か、あるいはレシピエント由来であるか、更に、その浸潤細胞がドナー由来であるのか、あるいはレシピエント由来である



るかについて確認を行った。

本法で用いる Vascularized islet グraft は、レシピエント MHC 適合腎皮膜下でまず Vascularized して、本来のレシピエントに Vascularized Islet 腎 (Islets のみドナー MHC) として移植したものである。免疫病理学的検討から、その Islets への vascularization はレシピエントタイプ Class I を発現していた。

更に、持込み細胞 (Passenger cells) も Islets を除き、レシピエントタイプ MHC を発現していた。これらのことから、Vascularized Islets においても、移植免疫寛容誘導には、直接経路で抗原認識を行うドナー血管内皮細胞やドナー抗原提示細胞 (DC、マクロファージ) が重要な役割を示していることが示唆された。

【成果 3 : IK の腎依存性免疫寛容メカニズムにおける抑制 T 細胞 (Treg) の役割】

IK の腎依存性免疫寛容メカニズムを利用した IK 移植誘導を応用した膵島免疫寛容戦略を確立するため、腎移植寛容レシピエントから得た抑制性 T 細胞 Treg と免疫寛容腎の寛容細胞に着目し、それを用いた免疫寛容誘導性を検討した。

ナイーブレシピエントに 10mg/kg DST と 150rad WBI を行い、2 例で免疫寛容が誘導された腎レシピエントの移植腎 (Treg が含まれる tolerated kidney) を移植した。Treg PBMC を静注したレシピエントは抗ドナー反応の低下は得られず、その後移植した challenged graft を 9 日以内に拒絶した。一方、Tolerated kidney を移植されたレシピエントは in vitro ドナー特異的低反応を認め、それに続く challenged graft は免疫抑制無しで 3 か月以上生着した。

これらの結果から、Vascularized islets の腎依存性免疫寛容に対する腎内 Treg または腎内実質細胞 (尿細管細胞 RTEC) の同時移植の有用性が示唆され、今後これらの腎内免疫寛容誘導性細胞評価を進める重要性を確認した。

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 3 件)

- ① Okumi M, Hirakata A (9 人中 4 番目), Yamada K (9 人中 9 番目). The induction of tolerance of renal allografts by adoptive transfer in miniature Swine.

Am J Transplant. 2013. 13(5): 1193-202

- ② Yamada K (9人中1番目) and Hirakata A (9人中2番目). Composite islet-kidneys from single baboon donors cure diabetes across fully allogenic barriers. Am J Transplant. 2011 Dec; 11(12): 2603-12.
- ③ Hirakata A (10人中1番目) and Yamada K (10人中10番目). Reversal of age-related thymic involution by an LHRH agonist in miniature swine. Transpl Immunol. 2010 Oct;24(1):76-81.

[学会発表] (計2件)

- ① Yamada K. SOTA 6- Barriers to vascularized xenotransplantation solid organ Xenotransplantation: Overcome cellular immune responses. CTS (Cell Transplant Society) -IXA (International Xenotransplantation Association) 2011 Joint Congress. 2011. 10. 23-26 (24). Miami beach, FL, US.
- ② 山田和彦. 「ワークショップ3. 膝・膝島移植の現状と今後の課題」血管再構築と免疫寛容誘導戦略に基づく重症糖尿病性腎症根治療法の確立. 第46回日本移植学会総会. 2010. 10. 20-22 (22). 京都市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平方 敦史 (HIRAKATA ATSUSHI)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 40468765

### (2) 研究分担者

山田 和彦 (YAMADA KAZUHIKO)  
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発  
研究センター・教授  
研究者番号: 40241103

佐原 寿史 (SASHARA HISASHI)  
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発  
研究センター・特任准教授  
研究者番号: 90452333

### (3) 連携研究者

清水 章 (SHIMIZU AKIRA)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00256942