

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390309

研究課題名(和文) 分子標的薬による新たな膵島移植法の開発：重症糖尿病の克服に向けた新戦略

研究課題名(英文) Development of a new strategy for pancreatic islet transplantation by molecular targeting agents

研究代表者

山下 健一郎 (Yamashita, Kenichiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：00399940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：膵島移植は 1 型糖尿病の理想的な細胞治療法であるが、移植した膵島は早期より傷害され進行性に失われてしまう。本研究では、安全かつ有効な膵島移植法を確立するため、NF- κ B や CD40 を標的とした新しい治療戦略を探索した。マウスやイヌ膵島移植モデルで NF- κ B 活性化抑制作用を有する DHMEQ、PPAR- γ アゴニストやプロテアソーム阻害剤投与により、移植後早期の炎症反応による膵島消失を有効に抑制し得た。また、マウスやサル膵島移植モデルにおいて、CD40-CD40L 副刺激遮断により拒絶反応は強力に抑制されアロ移植膵島の生着期間は著明に延長した。これら分子標的治療は有効であり、臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic islet transplantation (PIT) is an ideal cell-based therapy for type 1 diabetes. However, transplanted islets are injured immediately after grafting, and islet graft function deteriorates progressively. In order to overcome these hurdles, we focused on NF- κ B and CD40, and tried to establish a safe and effective strategy for PIT in the current studies. In murine and canine PIT models, we found that agents which inhibits NF- κ B activation such as DHMEQ, PPAR- γ agonist and proteasome inhibitor, efficiently blocks inflammatory responses and prevents islet graft loss shortly after PIT. Also, CD40-CD40L costimulatory blockade potently suppressed rejection and markedly prolonged islet allograft survival in both mouse and monkey PIT models. Our results demonstrated that treatments targeting NF- κ B and CD40 are very effective for preventing graft loss following PIT, and that these strategies would be applicable for clinical PIT.

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：膵ラ氏島移植 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

型糖尿病は自己T細胞が膵β細胞を破壊する自己免疫疾患で、終生のインスリン治療、慢性透析、若年死亡が不可避である。膵臓移植は極めて有効な治療法であるが、脳死下の臓器提供が極めて少ない本邦では、新たな治療法の確立が切望されている。膵β細胞ラ氏島(膵島)移植は最先端かつ理想的な細胞治療法であり欧米では臨床応用されているが、移植直後の炎症・免疫反応による早期グラフトロスが起こるため、ひとりの患者治療に2~3人のドナーが必要である。また、膵島移植1年後のインスリン非依存率は漸く80%まで向上したものの、5年後には遅発性グラフトロスにより15%まで減少し予後不良であるため、本細胞治療法は現在、縮小傾向にあり新たな治療戦略が必要である。

膵島細胞移植後の早期グラフトロスは、血液に惹起される即時的な炎症反応: instant blood-mediated inflammatory response (IBMIR) や自然免疫: innate immunity 反応が主な原因であることが近年の研究から解ってきた。CD40-CD40L 副刺激およびその下流に存在する転写因子 NF-κB は、T細胞、B細胞、樹状細胞、M 等の活性化に重要な役割を果たし、自然免疫や獲得免疫(細胞性免疫、液性免疫)炎症反応に大きく関わっている。最近の研究では、膵管細胞や膵β細胞にはCD40が発現し、このレセプターを介したシグナルに引き続きNF-κBが活性化されることで膵細胞自身からも炎症性サイトカインが放出され、細胞傷害を増悪させることが見いだされた。従って、これらは早期グラフトロスを防止する上で非常に重要な標的分子である。また、膵ラ氏島の遅発性グラフトロスには、移植細胞に対するアロ免疫反応および型糖尿病の場合には膵細胞自身に対する自己抗体・T細胞による免疫反応が関与している。前述の通り、広く免疫反応に関わる転写因子NF-κBやCD40-CD40L副刺激を阻害することは、早期のみならず遅発性グラフトロスの制御にも有効性が期待される。なお、CD40-CD40Lシグナルは型糖尿病の発病に重要な役割を果たしていることもNODマウスを用いた研究から示唆されている。

2. 研究の目的

安全かつ有効な膵島移植法を確立する上でハードルとなっている膵島後の早期および遅発性グラフトロスに対し、NF-κBやCD40を標的とした新しい治療戦略を見いだすことが目的である。

3. 研究の方法

(1) NF-κB 阻害による膵島保護効果の検討:

C57BL/6 マウスより膵ラ氏島を単離し、HMGB1で刺激したRAW264.7細胞と共培養した。膵ラ氏島培養開始時にNF-κB阻害剤DHMEQを添加し、24時間後に培養膵島数および上清中のTNF-α、IL-6濃度を検討した。

(2) 単離膵島におけるNF-κB阻害剤によるIBMIR抑制作用の検討:

カニクイサルを全身麻酔下に開腹し、摘出膵臓より膵島を単離した。Loop system (Bennet W, et al. Diabetes 1999) 内に同一ドナーより採取した血液3mlを入れ、37、50 ml/minの条件下に緩徐に振盪した。震盪開始時にNF-κB阻害剤Liposome-DHMEQ (10 μg/ml)を添加し、チューブ内に膵島を入れて0、60、180、360分後にチューブ内血液を回収し、血液中のInsulin、C-peptide、HMGB1濃度を測定しIBMIR抑制作用を検討した。

(3) NF-κB 阻害剤DHMEQによる早期グラフト障害抑制効果の検討:

C57BL/6 (B6)マウス膵島175個をSTZ糖尿病誘導同系マウスの肝臓内に経門脈的に移植した。移植1時間前にLiposome-DHMEQ (20 mg/kg)もしくはLiposomeのみを投与し、移植後血糖値を測定した。また、移植12時間後の血清HMGB1をELISA法で測定し、移植後14日目に腹腔内ブドウ糖負荷試験(IPGTT)を施行した。

(4) マウス同系膵島移植におけるBortezomibの早期グラフト障害抑制効果の検討:

STZ糖尿病誘導B6マウスにB6マウス膵島200 IEQを経門脈的に肝臓内へ移植した。Bortezomib (0.5-1.0 mg/kg)を移植1時間前にiv投与し、移植14日目の血糖正常化率およびIPGTTによる移植膵島機能を検討した。

(5) イヌ膵島自家 marginal model 移植における PPAR- γ アゴニストの早期グラフトロス抑制効果の検討：

ビーグル犬を用い膵島自家移植モデルを作成した。ビーグル犬において膵全摘を行い、膵島を Ricoldi chamber を用いて単離し、得られた膵島を経門脈性に肝内へ自家移植した。移植膵島数は 0、500、1000 または 2000 IEQ/kg を移植しマージナルモデルを確立する。この至適なマージナル膵島数を移植するモデルにおいて、レシピエント犬に PPAR- γ アゴニスト pioglitazone 5 mg/kg \sim 10 mg/kg を移植直前・直後及び 1 日後の計 3 回投与し、空腹時血糖値を測定して血糖正常化率を評価した。

(6) CD40-CD154 副刺激経路遮断による、膵島移植後の早期グラフトロス抑制効果の検討：

B6 マウス膵島を単離し、CD40 発現をフローサイトメトリーで解析した。膵島 175 個を STZ で糖尿病化した B6 の肝内に移植した。 β ガラクトシダーゼまたは CD40Ig 遺伝子をコードするアデノウイルスベクター (AdLacZ、AdCD40Ig) を、移植 2 日前にレシピエントに単回 IV 投与 (1×10^8 pfu/body) し、移植後の空腹時血糖値を測定した。膵島移植 3 時間後の肝臓を採取し、炎症性サイトカインの mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。

(7) アロ膵島移植における NF- κ B 阻害薬、DHMEQ と Tacrolimus 併用療法の有効性の検討：

BALB/c マウス膵島を STZ 誘導糖尿病 B6 マウス肝内へ経門脈的に移植した。DHMEQ (20 mg/kg) を移植後 3 日間もしくは 14 日間 IP 投与した。tacrolimus (FK: 1.5 mg/kg) は移植後 14 日間 IP 投与した。IP 投与した。併用療法群では、術後 3 日間は DHMEQ のみを投与し、その後 FK を 14 日間投与した。空腹時血糖を測定し、アログラフトの生着期間を検討した。

(8) アロ膵島移植における NF- κ B 活性阻害と CD40-CD154 副刺激経路遮断併用療法の有効性についての検討：

BALB/c マウスアロ膵島を STZ で糖尿病化した B6 マウス肝内へ経門脈的に移植し

た。移植 2 日前に AdCD40Ig または AdLacZ (1×10^8 pfu/body) をレシピエントへ単回 IV 投与した。NF- κ B 阻害薬 DHMEQ (20 mg/kg) を移植後 3 日間 IP 投与した。空腹時血糖を測定し、アロ膵島グラフトの生着期間を検討した。

(9) サルアロ膵島移植モデルにおける抗 CD40 抗体のグラフトロス抑制効果の検討：

カニクイザル(年齢: 5.2 \pm 0.9 年, 体重: 5.3 \pm 0.8 kg) に膵臓全摘出術を施行し、糖尿病を誘導した。膵臓全摘出術の 2 週間後に ABO 血液型一致ドナー(年齢: 4.9 \pm 0.7 年, 体重: 5.2 \pm 1.1 kg, MLR: SI $>$ 4.6) の膵島を経門脈的に肝臓内に移植した。導入療法群 (n=5) には、抗 CD40 抗体 (10 mg/kg) を移植当日、4、7、11、14 日目に静脈内投与した。維持療法群 (n=4) には、さらに抗 CD40 抗体 (5 mg/kg) を週 1 回、6 か月目まで投与した。移植後に血糖を測定し、膵島グラフト生着期間を評価した。さらに、血中 C-peptide 値、インスリン値、静脈内耐糖能試験 (IVGTT) により移植膵島グラフト機能を評価した。末梢血中の白血球の phenotype や血中抗 CD40 抗体濃度を測定し、ドナー抗原に対する細胞性免疫反応を IFN- γ ELISpot で、液性免疫応答を抗ドナー IgG 抗体測定によりそれぞれ評価した。また、肝臓内に移植された膵島を免疫組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) NF- κ B 阻害による膵島保護効果：

Control 群では約 40% の膵島が死滅したが、NF- κ B 阻害剤 DHMEQ 添加群では傷害は軽減され約 95% が生存した。培養上清中の TNF- α 、IL-6、HMGB1 は DHMEQ 添加群で抑制された。

(2) 単離膵島における NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の IBMIR 抑制作用：

Insulin、C-peptide、HMGB1 の 3 項目いずれについても、360 分までの検討で、Control の Liposome 群と比較して Liposome- DHMEQ 血液添加による膵島破壊の抑制は認められなかった。膵島移植における早期グラフト傷害は、移植後 24 時間以内に多くの膵島が喪失することから、観察期間を移植後 24 時間

まで延長して再度検討したが、Insulin、C-peptide のいずれについても DHMEQ による膵島破壊の抑制は認められなかった。

(3) NF- κ B 阻害剤 DHMEQ による早期グラフト障害抑制効果：

Liposome-DHMEQ 20 mg/kg 投与群の血糖正常化率は 86% (n=7)であり、対照群の血糖正常化率 11% (n=9)と比較して有意に改善した。治療群の IPGTT は正常のパターンを示したが、対照群では糖尿病パターンを呈した。血清 HMGB1 濃度は DHMEQ 投与群 14.2 \pm 9.4、対照群 87.1 \pm 25.3 (ng/ml)で、治療群で有意に低値であった。

(4) マウス膵島移植におけるプロテアソーム阻害薬 Bortezomib の早期グラフト障害抑制効果：

マウスマージナル膵島移植モデルにおいて、移植後血糖正常化率は、無治療群 10.0% (n=10)に対し、Bortezomib 0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg 投与群では各々 60.0% (n=10)、45.4% (n=11)、50.0% (n=4)に改善した。移植 14 日目の IPGTT 後血糖値 AUC 値は無治療群、Bortezomib 0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg 各投与群でそれぞれ 1411 \pm 260、1028 \pm 395、1195 \pm 260、1201 \pm 255 mg/d*hr と減少し、Bortezomib 投与群では膵島機能が保たれた。

(5) イヌ膵島自家 marginal model 移植における PPAR- γ アゴニスト pioglitazone の早期グラフトロス抑制効果：

膵全摘ビーグル犬で膵島を移植しない糖尿病発症コントロール群および 500 IEQ/kg 移植群では、術後早期より血糖値が上昇し、全例で高血糖による代謝障害を来した。膵島 1000 IEQ/kg 移植群では 7 例中 3 例 (44.4%) が、2000 IEQ/kg 移植群では 5 例中 4 例 (80%) で血糖正常化し、膵島 1000 IEQ/kg 移植群がマージナルモデルと判断した。本モデルにおける PPAR- γ agonist の早期グラフト傷害抑制効果の検討では、無治療の血糖正常化率 42.9% (3/7)に対し、pioglitazone 移植後 3 日間経口投与により 100% (7/7)で血糖が正常化し、移植後 14 日目の IVGTT 血糖値 AUC₀₋₁₂₀ も改善した。

(6) CD40-CD154 副刺激経路遮断による膵

島移植後の早期グラフトロス抑制効果：

単離膵島をサイトカインカクテル TNF- α + IL-1 β + IFN- γ で刺激すると膵島表面の CD40 発現レベルは 9.1 \pm 2.2% から 28.2 \pm 6.8%へ上昇した。マージナル膵島移植モデルにおいて、無治療群 (n=11)と AdLacZ 群 (n=7) では 1 例も血糖正常化しなかったが、AdCD40Ig 投与群では 6 例中 5 例 (83%) の血糖が正常化した。また、AdCD40Ig 投与群では AdLacZ 群と比較して移植後の肝内 TNF α 、IL-1 β 、MCP-1 の mRNA 発現が抑制された。

(7) アロ膵島移植における NF- κ B 阻害薬、DHMEQ と Tacrolimus の併用効果：

マウス骨髄由来 DC を *in vitro* において HMGB1 で刺激すると CD40、CD86、MHC class II の発現は増強するが、DHMEQ 添加によりこれら活性化マーカーの発現は抑制された。また、HMGB1 で DC を刺激するとアロ T 細胞のプライミングは増強され T 細胞増殖反応 (MLR) は亢進したが、DHMEQ 添加した DC では MLR は抑制された。BALB/c マウス由来のアロ膵島 600 個を STZ で糖尿病化した B6 マウス肝内へ経門脈的に移植すると、無治療では全例で膵島グラフトが 17 日以内に拒絶された。DHMEQ を移植後 3 日間投与またはタクロリムスを 14 日間投与すると、アロ膵島の生着率は各々 25% (2/8 例)および 38% (3/8 例)であったが、DHMEQ を移植 3 日間投与後にタクロリムスを 14 日間併用すると全例 (100%)が長期生着した。アロ膵島レシピエントでは、移植 6 時間後に上昇した血中 HMGB1 濃度は DHMEQ 投与により抑制され、移植後 9 日のアロ反応性 IFN- γ 産生細胞数も DHMEQ 併用群で低下した。アロ膵島を 300 個へ減らして同様に糖尿病マウスへ移植すると、無治療では一度も血糖は正常化しなかった。DHMEQ 3 日間投与またはタクロリムス 14 日間投与では膵島グラフトの生着期間は延長したものの全例で拒絶されたが、DHMEQ とタクロリムスの併用群では膵島グラフト生着期間は著明に延長し 50% (4/8 例)が長期生着した。

(8) アロ膵島移植における NF- κ B 活性阻害と CD40-CD154 副刺激経路遮断併用療法の有効性：

アロ膵島 200 個を移植するモデルにおいて、無治療コントロール群 (n = 4) および AdLacZ 群 (n = 6) では全くグラフト生着が得られず、DHMEQ 投与群 (n = 7) でも移植後 24 日目までにすべてのグラフトが拒絶された。一方、AdCD40Ig 投与群 (n = 11) では 7 例 (64%) のグラフトが生着し、5 例 (45%) は 200 日以上生着した。DHMEQ 併用 (n = 8) によりグラフト生着率は更に改善した。

(9) サルアロ膵島移植モデルにおける抗 CD40 抗体による遅発性グラフトロス抑制効果 :

膵臓全摘出後、糖尿病誘導を IVGTT における高血糖の維持、血中 C-peptide 及びインスリン値の応答及び不検出により確認した。同種間膵島移植(移植膵島 : 8201-12438 IEQ/kg)後、全例で血糖が正常化した。無治療のコントロール群 (n=3) では、9 日以内に拒絶され、血中の C-peptide 値は拒絶翌日には検出感度以下となった。一方、抗 CD40 抗体導入療法群では、2 頭が 15、23 日目に血糖正常のまま犠牲死 (内ヘルニア、腹膜炎) となった。2 頭が 210、250 日目にそれぞれ拒絶されたが、1 頭は血糖正常のまま観察期間を終えた (>608 日)。抗 CD40 抗体維持療法群では、2 頭が 96、115 日目に消化管蠕動不良のため血糖正常の状態に犠牲死となった。1 頭は 523 日目に拒絶されたが、1 頭は血糖正常のまま観察期間を終えた (>607 日)。抗 CD40 抗体治療群では、移植後 IVGTT において、血糖値、C-peptide 値、インスリン値は正常パターンを示した。血中抗 CD40 抗体濃度は、導入療法群では移植後 60 日目に検出感度以下となったが、維持療法群では移植後 200 日目まで保たれた。抗 CD40 抗体投与群では、ドナー抗原に対する細胞性免疫反応及び抗ドナー抗体産生が抗体投与期間中、強く抑制された。しかし、拒絶を呈した 3 頭 (導入療法群 2 頭と維持療法群 1 頭) では、ドナー抗原に対する細胞性免疫反応は徐々に増加し、さらに抗ドナー抗体が陽転化した後に高血糖となりグラフトは拒絶された。一方、拒絶を示さなかった 2 頭 (導入療法群 1 頭、維持療法群 1 頭) では、全観察期間に渡って、これら免疫反応は完全に抑制され、さらに

組織学的解析においても移植膵島への CD3、CD4 及び CD8 陽性細胞の浸潤が認められなかった。観察期間終了時 (移植後 607、608 日目) の IVGTT において、血糖値、C-peptide 値、インスリン値は全て正常パターンを示した。末梢血中の白血球の phenotype 解析では、特に拒絶を示さなかった 2 頭において CD4⁺ T 細胞の増加及び CD20⁺ B 細胞の抗 CD40 抗体投与終了後に増加が認められた。

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 4 件)

Kuraya D, Watanabe M, Koshizuka Y, Ogura M, Yoshida T, Asahi Y, Kamachi H, Nakamura T, Harashima H, Ozaki M, Umezawa K, Matsushita M, Yamashita K, Todo S. The efficacy of DHMEQ, a NF- κ B inhibitor, in islet transplantation: I. HMGB1 suppression by DHMEQ prevents early islet graft damage. *Transplantation* 96(5) 445-53, 2013. DOI: 10.1097/TP.0b013e31829b0744 査読有

Watanabe M, Yamashita K, Kamachi H, Kuraya D, Koshizuka Y, Shibasaki S, Asahi Y, Ono H, Emoto S, Ogura M, Yoshida T, Ozaki M, Umezawa K, Matsushita M, Todo S. The efficacy of DHMEQ, a NF- κ B inhibitor, in islet transplantation: II. Induction DHMEQ treatment ameliorates subsequent allo-immune responses, and permits a long-term islet allograft acceptance. *Transplantation* 96(5) 454-62, 2013. DOI: 10.1097/TP.0b013e31829b077f 査読有

Watanabe M, Yamashita K, Suzuki T, Kamachi H, Kuraya D, Koshizuka Y, Ogura M, Yoshida T, Aoyagi T, Fukumori D, Shimamura T, Okimura K, Maeta K, Miura T, Sakai F, Todo S. ASKP1240, a fully human anti-CD40 monoclonal antibody, prolongs pancreatic islet allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant* 13(8) 1976-88, 2013. DOI: 10.1111/ajt.12330 査読有

Yoshida T, Suzuki T, Watanabe M, Yamashita

K, Koshizuka Y, Kuraya D, Ogura H, Kamachi H, Matsushita M, Todo S. Induction of insulin-dependent diabetes mellitus by total pancreatectomy for pancreatic islet transplantation in cynomolgus monkeys. J Hepatobiliary Pancreat Sci 19(6):661-6, 2012. DOI: 10.1007/s00534-011-0485-3 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Asahi Y, Yamashita K, Watanabe M, Ogura M, Ono H, Handly DE, Emoto S, Nagatsu A, Yoshida T, Koshizuka Y, Kamachi H, Taketomi A, Todo S. Prevention of early graft loss by Proliferator-activated receptor-gamma agonist, pioglitazone, in canine islet autotransplantation. American Transplant Congress 2013.5.20 Seattle, U.S.A.

Asahi Y, Yamashita K, Watanabe M, Ogura M, Ono H, Emoto S, Nagatsu A, Yoshida T, Koshizuka Y, Taketomi A, Todo S. Improvement of normoglycemic rate by Proliferator-activated receptor-gamma agonist, pioglitazone, in canine islet autotransplantation. 16th Congress of the European Society for Organ Transplantation 2013.9.9 Vienna, Austria

Koshizuka Y, Watanabe M, Suzuki T, Kamachi H, Ogura M, Yoshida T, Kuraya D, Fukumori D, Shimamura T, Okimura K, Maeta K, Miura T, Sakai F, Todo S, Yamashita K. Roles of CD40-CD40L costimulatory pathway in pancreatic islet transplantation. 3rd ESOT Basic Science Meeting & 13th TTS Basic Science Symposium Paris, France (2013.11.8)

山下健一郎：膵島移植における分子標的治療薬を用いた免疫療法 –膵島移植成績の向上に向けて-(教育講演) 第39回日本膵・膵島移植研究会、旭川、2012年3月9-10日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 健一郎 (YAMASHITA, Kenichiro)
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：00399940

(2) 研究分担者

藤堂 省 (TODO, Satoru)
聖マリア学院大学・看護学研究科・教授
研究者番号：60136463

蒲池 浩文 (KAMACHI, Hirofumi)
北海道大学・大学院医学研究科・特任講師
研究者番号：60374237

松下 通明 (MATSUSHITA, Michiaki)
天使病院
研究者番号：20250425

古川 博之 (FURUKAWA, Hiroyuki)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：70292026

尾崎 倫孝 (OZAKI, Michitaka)
北海道大学・保健科学研究所・教授
研究者番号：80256510

(3) 連携研究者

梅澤 一夫 (UMEZAWA, Kazuo)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：70114402