

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592027

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を利用した膵島移植による I 型糖尿病治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of a therapy for type 1 diabetes by islet cell transplantation with mesenchymal stem cells

研究代表者

浅利 貞毅 (ASARI, SADAKI)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20580682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：(1) C57BL/6由来骨髄細胞(BMCs)からPI(-)CD45(-)Ter119(-)Sca-1(+)PDGFR- (+)細胞群を sortingし、これらを培養することにより比較的均一な間葉系幹細胞が分離されることを明らかにした。  
(2) 糖尿病未発症NODマウスにtemsilorimusを-d7, -d1に、cyclophosphamideを-d4から-d1まで連日投与し、d0に2Gy放射線照射とC57BL/6由来BMCsを  $2 \times 10^6$  投与することにより、移植後1カ月の末梢血で血液キメラが誘導され糖尿病発症が抑制されることを証明した。

研究成果の概要(英文)：(1) We demonstrated that mesenchymal stem cells (MSCs) were purified by culturing the sorted C57BL/6-derived bone marrow cells (BMCs) with the PI(-)CD45(-)Ter119(-)Sca-1(+)PDGFR- (+) markers.

(2) We showed that transplantation of C57BL/6-derived BMCs ( $2 \times 10^6$ ) induced stable mixed hematopoietic chimerism without GVHD in prediabetic NOD mice preconditioned with temsilorimus (5mg/kg on -day 7 and -day 1), cyclophosphamide (100mg/kg on -day 4 to -day 1) and 2Gy total body irradiation (on day 0). This immunosuppression is a novel regimen based on the clinical transplantation. We also revealed that the induced hematopoietic chimerism completely prevented insulinitis and onset of autoimmune diabetes.

研究分野：消化器外科学

キーワード：骨髄細胞 間葉系幹細胞 膵島 1型糖尿病 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

我が国では、1型糖尿病治療として膵島移植の再開が予定されているが、依然として(1)ドナー膵島(Islets)の絶対的不足、(2)移植後5年時のインスリン離脱は20%未満、(3)免疫抑制剤の危険性、という大きな問題に直面している。

2. 研究の目的

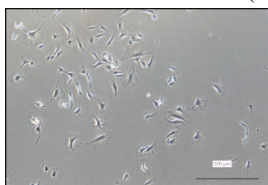
研究の全体構想は、アロ抗原である骨髄細胞(BMCs)、間葉系幹細胞(MSCs)、Isletsを1型糖尿病レシピエントに移植し、生体内でGraft vs. Host Disease (GVHD)を惹起することなく安定したドナー抗原ならびに自己抗原特異的免疫寛容を誘導し、免疫抑制剤を使用することなく1型糖尿病を治癒に導くことである。本研究では、1型糖尿病レシピエントのモデルであるNODマウスを用い、アロ由来のBMCs, MSCs, Isletsを経門脈的に移植することにより、MSCsがグラフト生着の向上に果たす役割とそのメカニズムについて明らかにすることである。

3. 研究の方法

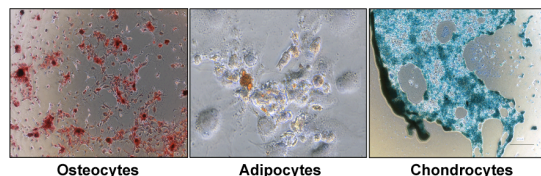
糖尿病発症後のNODマウスをレシピエントとして前処置を行ったのち、アロ由来のMSCs, BMCs, Isletsを経門脈的に移植し、(1)血液キメラの誘導、(2)Isletsグラフト生着、(3)同グラフト拒絶、(4)GVHD制御、(5)糖尿病治癒、の過程をリアルタイムに検討し、それらの過程にMSCsが及ぼす機能を明らかにする。予備実験として、糖尿病未発症NODマウスに前処置を行ったのち、アロ由来のMSCs, BMCsを経尾静脈的に移植し、血液キメラの誘導と糖尿病発症の抑制が可能であるかを評価する。

4. 研究成果

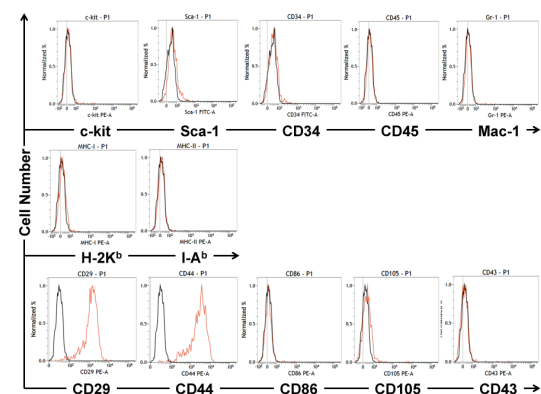
(1) C57BL/6 骨髄細胞由来間葉系幹細胞の新たな分離培養方法の確立  
BMCsから接着細胞のみを培養継代しMSCsを分離する手法では、安定したMSCsを採取することは困難であった。我々はBMCsからPI<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Ter119<sup>-</sup> gated Sca-1<sup>+</sup> PDGFR- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞をsortingし、この細胞群だけを培養継代することにより比較的均一なMSCsが分離されることを明らかにした(下図)。



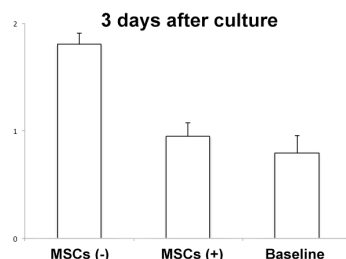
分化誘導実験では、この細胞群が骨細胞(Osteocytes)、脂肪細胞(Adipocytes)、軟骨細胞(Chondrocytes)いずれにも分化することを証明した(下図)。



抗体を用いた表面マーカーの探索では c-kit, Sca-1, CD34, CD45, CD11b, H-2K<sup>b</sup>, I-A<sup>b</sup>, CD86がいずれも陰性、CD29, CD44が陽性で文献報告と一致していた(下図)。

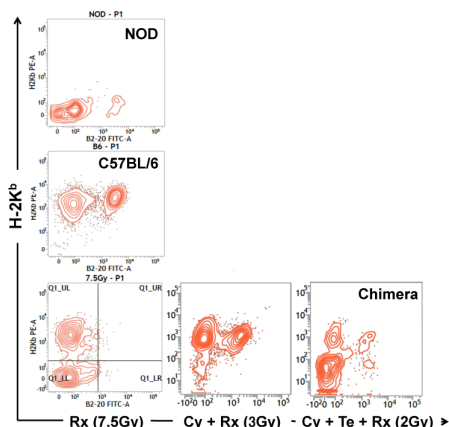


Concanavarin AによるTリンパ球刺激試験では、刺激Tリンパ球単独培養群と比較し、MSCs混合培養群では有意にリンパ球の増殖が抑制されることを証明した(下図)。

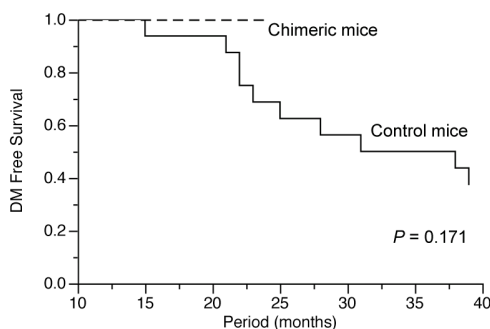


(2) 糖尿病未発症 NOD マウスにおける新たな血液キメラ誘導方法の確立

我々は糖尿病未発症 NOD マウス(6週齢)に anti-CD3 mAb 投与と低用量(3Gy)放射線照射を行ったのち、C57BL/6 由来 MSCs, BMCs を移植することにより GVHD を発症することなく血液キメラを誘導し、糖尿病の発症を抑制する方法を報告した(Asari et al. *Exp Hematol* 2009)。本研究では、より臨床に即した免疫抑制剤を使用することにより GVHD を発症しない血液キメラの誘導方法を確立した。NOD マウス(6週齢)に temsilorimus (5mg/kg)を -d7, -d1 に、cyclophosphamide (100mg/kg)を -d4 から -d1 まで連日投与したのち、d0 に 2Gy の放射線照射と C57BL/6 由来 BMCs を  $2 \times 10^7$  個投与することにより、移植後1カ月の末梢血で安定した血液キメラが誘導されることを証明した(下図では末梢血中のBリンパ球キメラを呈示)。



さらに血液キメラが誘導された NOD マウスでは、糖尿病発症が抑制されることを明らかにした(下図)。

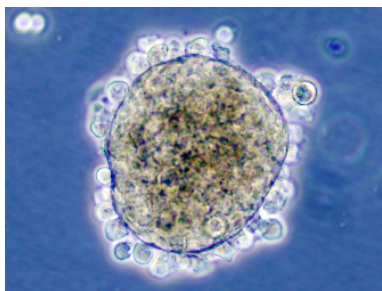


現在、血液キメラの誘導に必要な最小限の放射線照射量を明らかにするため、cyclophosphamide ならびに temsilorimus 投与量の最適化を行っている(下表)。

Group	Donor	Recipient	BMCs, x10 <sup>7</sup>	TBI, Gy	Cy, mg/kg	Temsilorimus, mg/kg	Chimera	GVHD
A	C57BL/6	NOD	2	0-6	0	0	0/5	0/5
B	C57BL/6	NOD	2	7.5	0	0	10/10	4/10
C	C57BL/6	NOD	2	0-5	100, x4	0	0/5	0/5
D	C57BL/6	NOD	2	6	100, x4	0	3/3	0/3
E	C57BL/6	NOD	2	0-2	100, x4	5, x2		
F	C57BL/6	NOD	2	3	100, x4	5, x2		

### (3) C57BL/6 マウス膵臓からの膵島分離方法の確立

C57BL/6 マウスにおいて、総胆管経由で主膵管に collagenase type I を注入し Islets を分離する方法を見いだした(下図)。現在、Islets の採取量が増加するよう分離方法の最適化を行っている。



### (4) 今後の展望

3 年間で予定していた研究目標に到達する

ことができなかったが、引き続き以下の実験を計画している。

① NOD 糖尿病未発症モデル(6 週齢)に上記前処置を行い、C57BL/6 由来 BMCs, MSCs を同時移植することにより MSCs の新たな上乘せ効果(急性・慢性拒絶反応の抑制、グラフト生着率の向上、糖尿病発症の抑制など)を評価する。また、その効果に対する MSCs の細胞学的特徴を分子レベルで明らかにする。

② NOD 糖尿病発症モデル(10 週齢を予定)に対し上記免疫抑制処置を行ったのち、C57BL/6 由来 MSCs, BMCs, Islets を移植することにより血液キメラを誘導し糖尿病が治癒するかを評価する。また、MSCs を移植しない群と比較し MSCs が果たす細胞学的特徴を明らかにする。

レシピエントの免疫抑制方法を大動物実験に移行しやすい cyclophosphamide ならびに temsilorimus に変更したことにより臨床応用への可能性が広がり、さらには MSCs によるグラフト生着率の向上が期待されるであろう。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/hbps/index.html>

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅利 贞毅 (ASARI, Sadaki)  
神戸大学・医学部附属病院・特定助教  
研究者番号：20580682

(2) 研究分担者

松本 逸平 (MATSUMOTO, Ippei)  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号：30379408

後藤 直大 (GOTO, Tadahiro)  
神戸大学・医学部附属病院・特命助教  
研究者番号：40580684

福本 巧 (FUKUMOTO, Takumi)  
神戸大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：70379402

具 英成 (KU, Yonoson)  
神戸大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：40195615

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：