

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890149

研究課題名(和文) ヒストンアセチル化制御による免疫寛容誘導と移植後膵島保護作用の研究

研究課題名(英文) The induction of immune tolerance and the improvement islet transplantation with histone deacetylase inhibitors.

研究代表者

岩橋 衆一 (IWAHASHI, Shuichi)

徳島大学・大学病院・特任助教

研究者番号：30531751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：(目的)膵島移植における問題点として免疫抑制剤自体の副作用が挙げられる。ドナー特異的輸血(DST)は免疫抑制剤以外でドナー特異的な免疫寛容を誘導する方法であるが、単独での効果には限界があると考えられる。調節性T細胞(Treg)を増加させる作用を有するHDAC阻害剤(HDACi)に着目し検討した。(成果)DSTとHDACiの併用により、対照群と比較して胸腺・脾臓内のリンパ球のTreg比率は有意に上昇した。一方CD4+IL17+T cellはDST群と比較して有意に低下した。DST+HDACi併用群ではDST単独群と比較して移植片生着期間は延長した。

研究成果の概要(英文)：We focused on histone deacetylase inhibitors (HDACi) because it was reported that inhibition of HDAC activity prevented Treg differentiation into IL17-producing cells. We therefore sought to enhance Treg while suppressing Th17 cells using DST with HDACi to prolong graft survival. To stimulate Treg by DST, we used donor splenocytes. In DST with HDACi group, Foxp3 mRNA expression and Treg population increased in the thymus and spleen, whereas Th17 population decreased. qPCR analysis of lymphocyte mRNA indicated that Foxp3, IL-10, and TGF- β expression increased. However, interleukin 17a, Stat3 (Th17), and IFN- γ expression decreased in DST + HDACi group, relative to DST alone. Moreover, DST treated with HDACi prolonged graft survival relative to controls in mice islet transplantation. DST with HDACi may therefore have utility in islet transplantation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：免疫寛容誘導 ドナー特異的輸血 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

膵島移植における問題点として、免疫抑制剤の非特異的免疫抑制作用や免疫抑制剤自体の副作用が挙げられる。ドナー特異的輸血(DST)は免疫抑制剤以外でドナー特異的な免疫寛容を誘導する方法としてこれまでに検討されているが、単独での効果には限界があると考えられる。近年、調節性T細胞(Treg)を増加させる作用や炎症性サイトカインの産生を抑制するという報告、ヒストンの脱アセチル化によって膵島の生存率やインスリン分泌能を上昇させるという報告が認められ、HDAC阻害剤(HDACi)に着目し、本研究ではDSTと併用することによる免疫寛容誘導効果について検討する。

2. 研究の目的

膵島移植におけるHDACiによる免疫寛容誘導効果、移植後膵島保護作用を明らかにする。

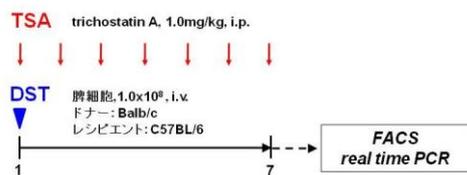
3. 研究の方法

(1)HDACiによる膵島保護作用の検討

単離膵島の培養液中にIFN- γ (5mg/ml)を加え、サイトカインによる膵島傷害モデルを作成する。HDACiとしてTrichostatin A (TSA) (Sigma, T8852) (0.5nM, 5nM, 50nM)を用い、HDACiによる膵島保護作用を検討する。

(2) DSTにHDACiを併用することによるTreg・Th17発現変化の検討

ドナーマウスとしてBalb/c、レシピエントマウスとしてC57BL/6を使用し、対照群、DST単独群、HDACi (TSA)単独群、DST+TSA群を作成する(下図)。DSTとしてドナー脾細胞(1.0x10⁸ cells)をday1に尾静脈より注入し、TSA (1.0mg/kg)をday1-7に腹腔内投与した後、day8に胸腺、脾臓中のTreg、Th17発現やTh1、Th2発現の変化をFACS (CD4+CD25+Foxp3+ T cell, CD4+CD17+ T cell), real time PCRで解析する。



(3) DSTにHDACiを併用することによるマウス異系膵島移植モデルでのグラフト生着期間の検討

検討2で作成した4群を用いてマウス膵島移植(400個、門脈内移植)を行い、グラフト生着期間の延長効果を検討する。移植後、2日に1回マウスの血糖測定を行い、血糖が200mg/dl以下になった場合を血糖正常化、250mg/dlを2回超えた時点を拒絶と判定し、

血糖正常化率とグラフト生着期間をそれぞれ比較検討する。

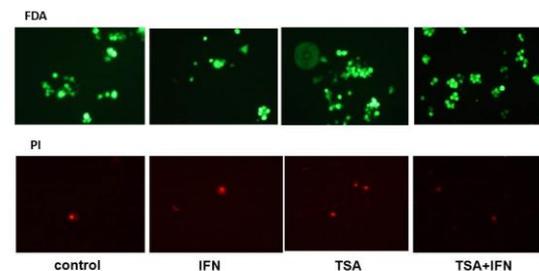
(4) DSTのドナー特異性、安全性の検討

DSTによって発現上昇したTregの機能的解析、ドナー特異性を検討するため、Mixed lymphoid reaction test、Treg function testを行う。また、DSTの安全性についても検討するため、DST後のドナー抗体の産生を測定する。検討2で作成したDST単独群、DST+TSA群をday8に犠死させ、脾細胞を単離し、FACSにてドナー(Balb/c)抗体である抗H-2^d抗体量を測定する。また、レシピエント(C57BL/6)血清中のIgG濃度をELISAにて測定し、液性免疫の評価も行う。

4. 研究成果

(1)HDACiによる膵島保護作用の検討

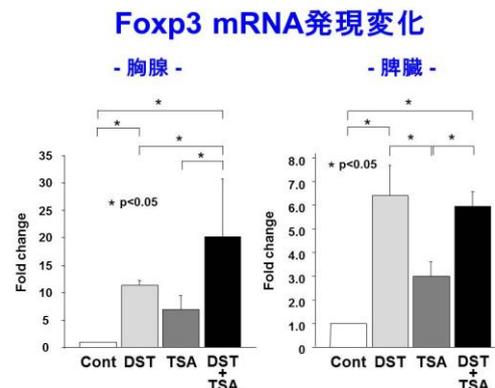
ブタ膵島を単離しサイトカインIFN- γ による傷害モデルを作成。TSAでの膵島保護作用を検討した。



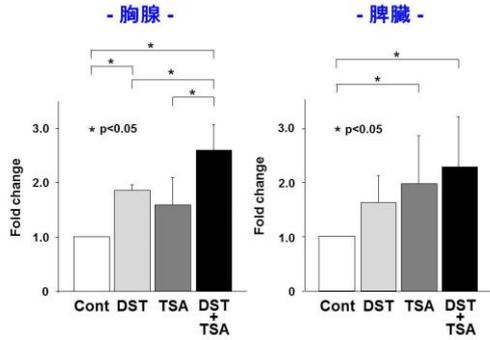
サイトカインによる膵島への傷害作用がやや弱く、TSAの保護作用は明らかと言える結果には至らなかった。今後サイトカインの濃度、膵島へ暴露する時間を変更して検討を行う予定である。

(2) DSTにHDACiを併用することによるTreg・Th17発現変化の検討

(胸腺・脾臓中のFoxp3発現とTreg細胞数)



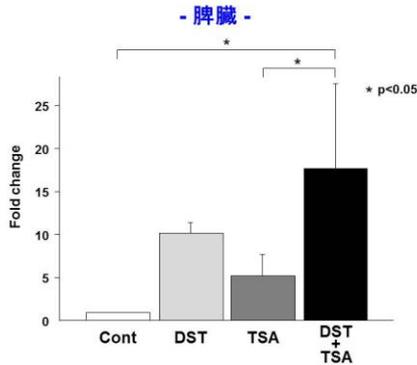
Treg細胞増加率



Foxp3 は胸腺にて併用群で単剤群よりも有意な上昇あり。脾臓ではコントロールと比べてDST 単独と併用群で有意な上昇を認めたものの、単剤群と併用群では有意差なし。Treg 比率に関しては、胸腺においてはDST 単独と比較して、DST とHDAC 阻害剤の併用では、有意に増加していた。脾臓においてもDST 単独、併用で上昇を認めた。

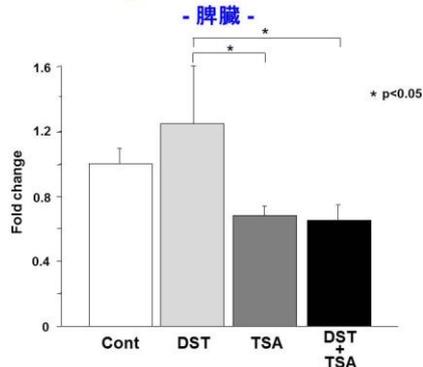
〈サイトカインの変化〉

IL-10 mRNA発現変化



IL-10 mRNA においてはDST、TSA 単剤、また併用群で上昇し、また併用群では有意な上昇を認めた。

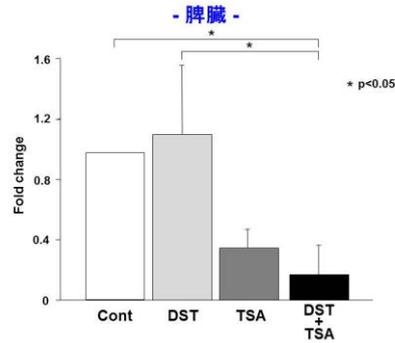
IFN-γ mRNA発現変化



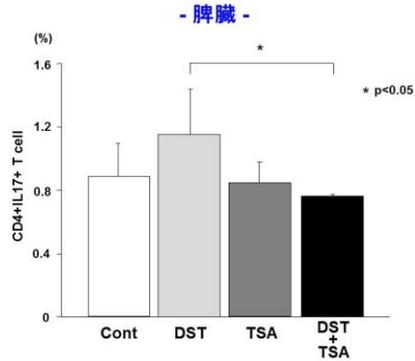
IFN γ に関しては、TSA による抑制が認められ、今後の検討としては、IFN γ を産生するTh1 やNKT 細胞などについても行う方針である。

〈胸腺・脾臓中の IL-17 発現と Th17 細胞数〉

IL-17 mRNA発現変化



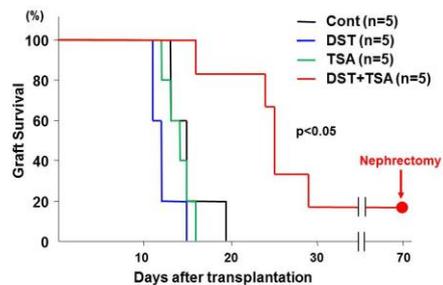
Th17細胞比率



Th17 の代表的なサイトカインである IL17 についてはDST 群と比べて、TSA との併用によって有意な低下を認め、Th17 細胞の発現は、DST 単独と比較して、DST とHDAC 阻害剤の併用により有意に低下した。

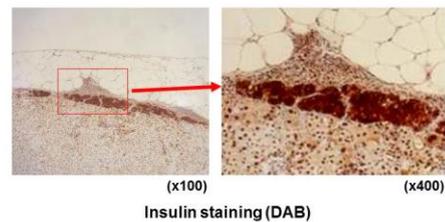
(3) DST にHDACi を併用することによるマウス異系膵島移植モデルでのグラフト生着期間の検討

マウス膵島移植グラフト生着率



インスリン発現

長期生着例 (移植後 60日後)



マウス膵島移植モデルを作成したところ、DSTとHDAC阻害剤の併用により、グラフト生着期間は有意な延長を認めた。その中で長期生存例も認められ、グラフト内のインスリン発現を免疫染色にて検討したところ、60日後においても移植後膵島の腎被膜下への生着が認められた。

(4) DSTのドナー特異性、安全性の検討

検討2と同様のDST単独群とDST+HDAC阻害剤の群で抗体産生(IgG)を検討中である。

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 13 件)

1) Naziruddin B, Iwahashi S, Kanak MA, Takita M, Itoh T, Levy MF. Evidence for instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical autologous islet transplantation. *Am J Transplant*. 2014;14:428-437. 査読有. doi: 10.1111/ajt.12558.

2) Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Laparoscopic hepatic resection for metastatic liver tumor of colorectal cancer: comparative analysis of short- and long-term results. *Surg Endosc*. 2014;28:80-84. 査読有. doi: 10.1007/s00464-013-3165-3.

3) Asanoma M, Ikemoto T, Mori H, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S, Shimada M. Cytokine expression in spleen affects progression of liver cirrhosis through liver-spleen cross-talk. *Hepatol Res*. 2014 査読有, in press

4) Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y. CXCR4 receptor and stromal cell-derived factor 1 in primary tumors and liver metastases of colorectal cancer. *J Surg Res*. 2014;187:107-112. 査読有. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.030.

5) Utsunomiya T, Ishikawa D, Asanoma M, Yamada S, Iwahashi S, Kanamoto M, Arakawa Y, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Ishibashi H, Takasu C, Shimada M. Specific miRNA expression profiles of non-tumor liver tissue predict a risk for recurrence of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2014 [Epub ahead of print] 査読有. doi: 10.1111/hepr.12164.

6) Ikemoto T, Shimada M, Iwahashi S, Saito Y, Kanamoto M, Mori H, Morine Y, Imura S, Utsunomiya T. Changes of immunological parameters with administration of Japanese Kampo medicine (Juzen-Taihoto/TJ-48) in patients with advanced pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol*. 2014;19:81-86. 査読有. doi: 10.1007/s10147-013-0529-6.

7) Itoh T, Iwahashi S, Kanak MA, Shimoda M, Takita M, Chujo D, Tamura Y, Rahman AM, Chung WY, Onaca N, Coates PT, Dennison AR, Naziruddin B, Levy MF, Matsumoto S. Elevation of high-mobility group box 1 after clinical autologous islet transplantation and its inverse correlation with outcomes. *Cell Transplant*. 2014;23:153-165. 査読有. doi: 10.3727/096368912X658980.

8) Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J, Iwahashi S, Yamada S, Asanoma M. Regulatory T cells in the blood: a new marker of surgical stress. *Surg Today*. 2013;43:608-612. 査読有. doi: 10.1007/s00595-013-0517-5.

9) Takita M, Itoh T, Matsumoto S, Shimoda M, Chujo D, Iwahashi S, Tamura Y, Onaca N, Naziruddin B, Bartlett BL, Levy MF. Autoimmune chronic pancreatitis with IgG4-related pancreatic pseudocyst in a patient undergoing total pancreatectomy followed by autologous islet transplantation: a case report. *Pancreas*. 2013;42:175-177. 査読有. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182546e37.

10) Iwahashi S, Utsunomiya T, Shimada M, et al. High expression of cancer stem cell markers in cholangiolocellular carcinoma. *Surg Today*. 2013;43(6):654-660. 査読有. doi: 10.1007/s00595-012-0437-9.

11) Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Sugimoto K, Iwahashi S, Asanoma M. The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules. *J Surg Res*. 2013;180:162-168. 査読有. doi: 10.1016/j.jss.2012.10.009.

12) Yamada S, Shimada M, Miyake H, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J, Iwahashi S, Saito Y. Outcome of hepatectomy in super-elderly patients with hepatocellular carcinoma.

Hepatol Res. 2012;42:454-458. 査読有. doi:
10.1111/j.1872-034X.2011.00952.x.

[学会発表] (計 1 件)

1) 岩橋衆一, 島田光生, 宇都宮徹, 森根裕
二, 居村暁, 池本哲也, 松本慎一,
Naziruddin B, Levy M.F. 自家臍島移植に
おける Instant blood-mediated
inflammatory reaction 発現の検討
第48回日本移植学会総会 2012年9月20日
-22日 愛知県 (愛知県労働産業センター)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩橋 衆一 (IWAHASHI Shuichi)
徳島大学・病院・特任助教
研究者番号: 30531751

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし