

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461948

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞による肝臓内免疫細胞の膵島グラフト傷害抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) The suppressive mechanism of liver immune reactivity after islet transplantation by mesenchymal stem cells

研究代表者

石山 宏平 (Ishiyama, Kohei)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：50437589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵島移植は1型糖尿病に対する標準治療として注目されている。しかしながら、限られたドナーからの膵島供給や、特殊な免疫抑制管理、複数回移植の必要性など、依然として数多くのハードルが膵島移植の発展を妨げている。

膵島移植の成績向上のために肝臓内免疫細胞の膵島グラフトに対する細胞傷害活性を抑制するための新しい免疫抑制療法の開発を本研究の目的とした。経門脈的膵島移植後に肝臓内ナチュラルキラー(NK)細胞の細胞傷害活性が増強し、移植膵島の生着を妨げていることを確認し、免疫抑制作用を有する間葉系幹細胞を同時投与することでNK細胞活性の抑制効果、ならびに移植膵島の生着延長が得られることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Islet transplantation is considered as one of the standard therapy against type 1 diabetes mellitus. The purpose of this study is to develop a new immunosuppressant treatment for improvement of islet graft engraftment by regulation of liver immune response after islet transplantation.

We confirmed that cytotoxic activity of natural killer (NK) cells in the liver were increased after intraportal islet transplantation and activation of NK cells prevent islet graft better engraftment in the murine model. In this study, we focused on the mesenchymal stem cells (MSCs) which possess the immune suppressive function for suppression of the NK cells activation after islet transplantation. The simultaneous administration of MSCs with islet into the portal vein showed prolonged islet graft survival and the suppressive effect of activated liver NK cells after islet transplantation when compared with islet transplantation alone.

研究分野：移植

キーワード：糖尿病 移植 免疫

1. 研究開始当初の背景

国内外における膵島移植に対する認識は、過去 10 年間の臨床実績により、実験的医療としての観点から信頼のける臨床的医療へと大きく変貌を遂げてきた。それ故、欧米では腎不全発症前の 1 型糖尿病患者に対して膵臓単独移植よりも膵島単独移植が優先治療として選択される割合が次第に多くなってきている。本邦でも膵島移植が高度医療に承認され、平成 24 年 6 月から臨床試験が再開となったことで臨床面、研究面において大きな関心が集まっている。

現状では 1 型糖尿病治療の選択枝として既に膵臓移植が臨床応用され、長期にわたる血糖値の正常化、慢性合併症の発症・進展の阻止ならびに改善効果が確認されているが、膵臓の 95% 以上を占める外分泌腺組織を除去した後に膵ランゲルハンス島(膵島)のみを抽出分離して局所麻酔下に経門脈的に肝臓内に投与する膵島移植のほうが、レシピエントへの負担がはるかに少なく、安全性の観点からもより合理的であると考えられる。しかしながら、膵島移植後の良好な成績を得るためには依然として複数回の膵島移植が必要であり、数多くのハードル(膵島分離操作に伴う膵島の機能低下、肝臓内投与後の膵島グラフトの血流障害、免疫抑制剤による細胞毒性など)が臨床膵島移植の成績向上と発展を妨げていることも明らかとなっている。そのため、移植後にインスリン完全離脱を実現するためには通常 2~3 人のドナーが必要となることから、一つの臓器によって一人の患者を治療する One-to-One を確立することが、本邦で膵島移植が広く普及していくための必要条件と考えられている。

前述の問題点を解決するために、多くの施設が分離膵島回収率の向上と膵島グラフト機能維持を目的とした膵島分離法の改良や、免疫抑制剤による細胞毒性を回避するための免疫抑制プロトコルの開発を行ってきた。しかしながら、細胞免疫学的観点からの検討が不十分なため、未だにコンセンサスの得られた免疫抑制プロトコルは確立されていない。申請者は、臨床膵島移植の移植部位として選択される肝臓内免疫細胞の細胞傷害活性が末梢免疫環境と比べて強力であり、その中心的役割を Natural Killer(NK)細胞が担っていることを証明した背景から、「膵島移植の成績が不良である理由は、肝臓内 NK 細胞の強力な細胞傷害能によって肝臓内に移植された膵島グラフトが傷害を受けるためである」と仮説を立て、研究を開始した。

経門脈的膵島移植を NK 細胞除去した糖尿病マウスに行う事で、移植直後から良好な膵島グラフト機能を認め、メカニズムとして膵島移植後に肝臓内 NK 細胞の細胞傷害活性が増強するために膵島グラフトが傷害されることを証明した。その後も、「経門脈的膵

島移植の際に肝臓内 NK 細胞の細胞傷害活性を抑制することが移植成績向上に寄与する」と考え、平成 23 年度科学研究費助成事業「研究活動スタート支援」を獲得してきた。臨床的に NK 細胞を除去することは不可能であり、従来のカルシニューリンインヒビター等の免疫抑制剤は獲得免疫細胞が標的であり NK 細胞に対する抑制効果が期待できないことから、PGE2(prostaglandin E2)や TGF などの生理活性物質による細胞傷害活性抑制効果に着目したところ、サイトカイン刺激活性化 NK 細胞上の細胞傷害分子 TRAIL(TNF related apoptosis inducing ligand)や、活性化分子(CD69)の発現減弱効果があることが確認できた。更に、invitro での膵島に対する肝臓内 NK 細胞の細胞傷害活性抑制効果を PGE2 共培養下において確認することが出来たが、in vivo での免疫抑制効果を持続させるためには工夫が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

20 世紀末から飛躍的に発展してきた臓器移植に続く次世代医療として、低侵襲かつ簡便な細胞移植の可能性に大きな期待が寄せられている。その中でも、膵島移植は比較的早い時期から 1 型糖尿病に対する標準治療として確立されると注目されてきた。近年、欧米における臨床膵島移植の成績は向上してきたが、限られたドナーからの膵島供給や、特殊な免疫抑制管理、複数回移植の必要性など、依然として数多くのハードルが膵島移植の発展を妨げているのが現状である。申請者は、膵島の移植部位となる肝臓免疫に着目した研究に従事し、同種同系・異系膵島を肝臓内移植することで肝臓内 Natural Killer(NK)細胞の膵島に対する細胞傷害活性が増強し、膵島グラフトが廃絶されることをマウスモデルで証明した。

本研究では、臨床膵島移植の成績向上のために肝臓内免疫細胞の膵島グラフトに対する細胞傷害活性を抑制するための新しい免疫抑制療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

前述の学術的背景から、膵島移植成績向上には肝臓内免疫細胞を制御することが有効手段となることが推測された。そこで、初期免疫細胞である NK 細胞の細胞傷害活性を PGE2 などの生理活性物質により抑制しつつ、効果を持続させるために間葉系幹細胞(MSC:Mesenchymal stem cell)の免疫抑制作用に着目した。間葉系幹細胞は、骨、心筋などへの多分化能や抗炎症効果などの多機能効果を有する体性幹細胞である。近年、間葉系幹細胞による GVHD の予防効果や自己免疫性疾患における T 細胞性免疫応答抑制効果などが報告されており、新たな治療ツールとし

ても期待されている。間葉系幹細胞が産生する PGE2、IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase) などによる免疫細胞抑制効果が in vitro で報告されていることから、本研究では、「間葉系幹細胞による抑制刺激が経門脈的膵島移植において肝臓内 NK 細胞の膵島グラフトに対する細胞傷害活性を抑制する可能性」についてマウスモデルによる移植膵島生着延長効果の確認(in vivo)ならびに、細胞傷害活性抑制を誘導する機能解析(in vitro)を行う。

4. 研究成果

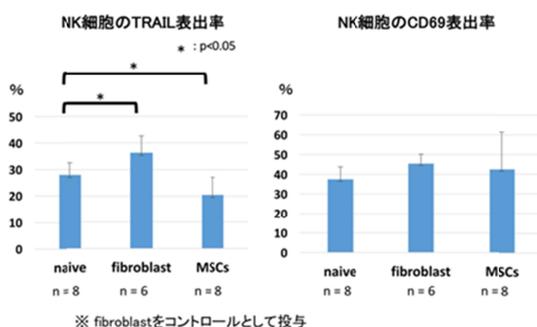
間葉系幹細胞の樹立：

間葉系幹細胞(MSC)は骨髄細胞、末梢血単核球や脂肪組織などの間葉系組織から樹立が可能である。申請者は、マウス骨髄由来間葉系幹細胞を樹立することに成功した。樹立細胞のフェノタイプは CD34(-)、CD45(-)、CD11b(-)、MHC class II(-)、CD80(-)、CD86(-)、Sca-1(+), CD44(+), CD90(+)であり、共培養下でのコンカナバリン A 刺激リンパ球増殖反応の抑制効果や、脂肪細胞や骨細胞への分化能を有することから、間葉系幹細胞の特徴を有した細胞であることを確認した。しかしながら、常に同機能を有する MSC を維持することが研究費の負担とマウスの使用を制限する目的で、細胞株としての MSC を購入し、研究を継続することとした。

肝臓内単核球および肝臓内 NK 細胞のマウス膵島に対する細胞傷害活性抑制効果：

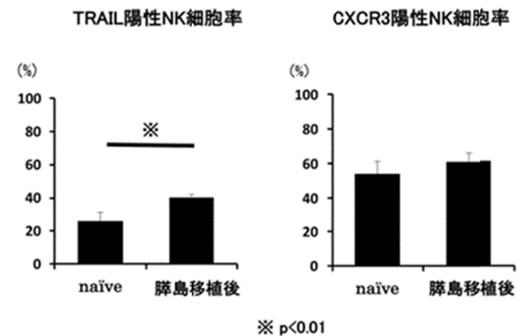
間葉系幹細胞との共培養下に、肝臓内単核球および肝臓内 NK 細胞のマウス膵島に対する細胞傷害活性抑制効果を評価した。これまでに、in vitro において炎症性サイトカイン (IL-2、IL-12) 存在下で活性化した NK 細胞と間葉系幹細胞を共培養することで、活性化マーカー CD69 や細胞傷害分子 TRAIL の表出を抑制することを確認していた。今回、in vivo において間葉系幹細胞が肝臓内 NK 細胞の活性を抑制しうるか経門脈的投与モデルを用いて検討した。間葉系幹細胞を肝臓内へ投与することで、肝臓内 NK 細胞の TRAIL 分子表出割合が抑制されることが確認できた (図 1)。

図 1 MSC門脈内投与3日後肝臓内NK細胞フェノタイプ



更に、膵島移植を行った後に、肝臓内 NK 細胞が活性化し、膵島 細胞の細胞表面表出する TRAIL 受容体や CXCL10 などのケモカインに対応する表面抗原 (TRAIL、CXCR3) の表出が増強することも確認できた (図 2)。

図2. 膵島移植後の肝臓内NK細胞フェノタイプの変化



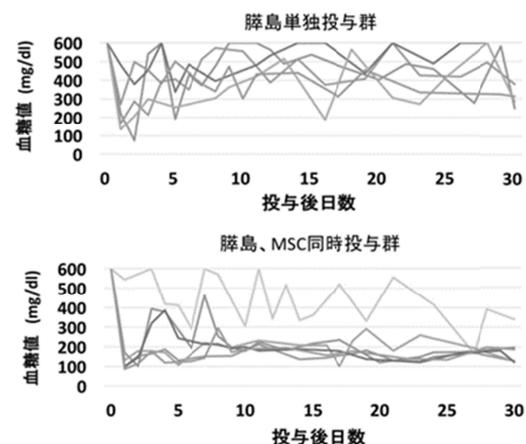
現在、膵島移植を行った後の摘出肝を保存しており、サイトカイン、ケモカインの mRNA 濃度を測定する予定である。

膵島移植における間葉系幹細胞投与による生着率延長効果の確認：

膵島移植の大きな課題は、膵島移植直後に生じる肝臓内での膵島グラフト消失である。消失率は移植後数週間で約 70%前後に達すると報告されている。本研究計画では、間葉系幹細胞の同時移植、もしくは移植前投与が膵島グラフト機能に与える影響を検討するために、ストレプトゾトシン投与糖尿病 C57BL/6 マウスに対して糖尿病治療境界領域となる 300 個の膵島を経門脈的に肝臓内投与し、移植後の血糖を測定した。

間葉系幹細胞を同時投与することで移植膵島の良好な機能が得られ、有意な血糖改善効果が得られた (図 3)。

図3. 膵島とMSC同時投与による血糖の改善効果



膵島移植における間葉系幹細胞による肝臓内免疫細胞抑制効果の確認：

膵島移植後のレシピエントから肝臓内単核球および肝臓内 NK 細胞を灌流法により採取し、間葉系幹細胞併用移植による肝臓内免疫抑制効果の機能解析を行った。移植膵島グ

ラフトから刺激を受けた肝臓内 NK 細胞のフェノタイプ解析を行った。移植膵島グラフトから刺激を受けた肝臓内 NK 細胞のフェノタイプ解析を行ったところ、CD69 や TRAIL の表出が抑制されていることと、同時に、膵島移植後に肝臓内に局在する DX5-NK 細胞の割合が減弱していることが確認できた (図 4)。

図 4a. 膵島とMSC同時門脈内投与3日後の肝臓内NK細胞フェノタイプ

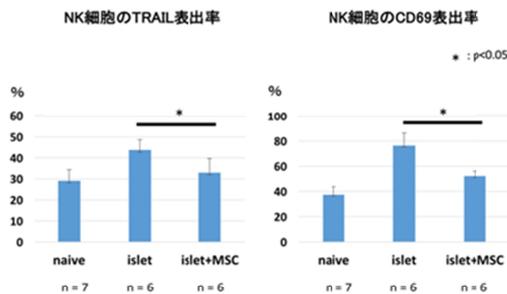
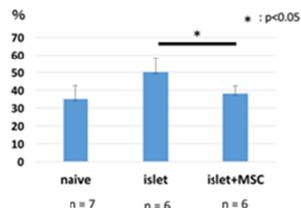


図 4b. 膵島とMSC同時門脈内投与3日後の肝臓内NK細胞に占めるDX5-NK細胞の比率



以上の結果から、本研究期間において膵島移植の成績向上のために免疫抑制効果を有する間葉系幹細胞 (MSC) を同時投与することが、膵島移植後に生じる肝臓内免疫活性を抑制し、膵島移植の生着率向上に寄与していることが証明できた。

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 1 件)

1. 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 膵島保護へむけた膵島移植における肝臓内 Natural Killer 細胞活性化機構の解明. *Organ Biology*. 2015 ;22(2): 123-127 査読無

[学会発表](計 18 件)

1. 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 膵島移植後における肝臓内 NK 細胞免疫応答の経時的変化. 第 43 回日本膵膵島移植研究会 2016.3.4-5 ホテルグランヴィア広島(広島)

2. 石田伸樹、石山宏平、平田文宏、佐伯吉弘、田中友加、大段秀樹 骨髄由来間葉系幹細胞による膵島移植後、肝臓内 NK 細胞傷害活性抑制効果 第 43 回膵・膵島移植研究会 2016.3.4-5 ホテルグランヴィア広島(広島)

3. 石田伸樹、石山宏平、平田文宏、佐伯吉弘、

田中友加、大段秀樹 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた膵島に対する肝臓内 NK 細胞傷害活性抑制の試み 第 42 回日本臓器保存生物医学学会学術集会 2015.11.13-14 いわて県民情報交流センター(アイーナ)(岩手)

4. Y. Saeki, K. Ishiyama, Ishida N., Y. Tanaka, H. Ohdan Liver-resident natural killer cells exposed to instant blood-mediated inflammatory reaction after intraportal islet transplantation persistently sustain memory phenotype with cytotoxicity against islets. TSS2015 14th Transplantation Science Symposium 2015.11.11-13. ローン(オーストラリア)

5. 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 肝臓内 NK 細胞の移植膵島に対する継時的な免疫応答変化と機能解析. 第 51 回日本移植学会総会 2015.10.1-3 ホテル日航熊本(熊本)

6. 石田伸樹、石山宏平、平田文宏、佐伯吉弘、田中友加、大段秀樹 骨髄由来間葉系幹細胞移植による膵島グラフト傷害に対する肝臓内 NK 細胞活性抑制機構の解明 第 51 回日本移植学会 2015.10.1-3 ホテル日航熊本(熊本)

7. 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 肝臓内 memory NK 細胞による移植後膵島グラフトに対する免疫応答機構の解明. 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17. アクトシティ浜松(静岡)

8. 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 膵島移植における肝臓内 memory NK 細胞の免疫応答機構の解明. 第 46 回日本膵臓学会大会 2015.6.19-20. 名古屋国際会議場(愛知)

9. Y. Saeki, K. Ishiyama, N. Ishida, Y. Tanaka, H. Ohdan Persistent expansion of DX5- memory natural killer cells in the liver after intraportal islet transplantation. American Transplant Congress 2015 2015.5.2-6 フィラデルフィア(アメリカ)

10. N. Ishida, K. Ishiyama, F. Hirata, Y. Saeki, Y. Tanaka, H. Ohdan Mesenchymal stem cells suppress cytotoxicity of activated natural killer cells in liver via the TRAIL-TRAIL receptor pathway in islet transplantation American Transplant Congress 2015 2015.5.2-6 フィラデルフィア(アメリカ)

11. 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 膵島移植後早期から長期にか

けて肝臓内 memory NK 細胞がグラフトに与える免疫応答機構の解析 第 42 回日本膵・膵島移植研究会 2015.3.6-7 京王プラザホテル(東京)

12. 佐伯吉弘、石山宏平、石田伸樹、田中友加、大段秀樹 膵島保護へむけた膵島移植における肝臓内 Natural Killer 細胞活性化機構の解明 第 41 回日本臓器保存生物医学学会学術集会 2014.11.28-29 千里ライフサイエンスセンター(大阪)

13. 佐伯吉弘、石山宏平、田中友加、大段秀樹 膵島移植における肝臓内 NK 細胞による膵島傷害のメカニズム解析 第 50 回日本移植学会総会 2014.9.10-12 京王プラザホテル(東京)

14. Tanaka, H. Ohdan Liver DX5- natural killer cells play a crucial role on the instant blood-mediated inflammatory reaction after islet transplantation American Transplant Congress/WTC 2014 2014.7.26-31 サンフランシスコ(アメリカ)

15. 佐伯吉弘、石山宏平、平田文宏、田中友加、大段秀樹 膵島移植後グラフト傷害に対する肝臓内 Memory Natural killer 細胞の機能解析 第 69 回日本消化器外科学会 2014.7.16-18 郡山市民文化センター(福島)

16. 佐伯吉弘、石山宏平、平田文宏、田中友加、大段秀樹 膵島移植の Instant blood mediated inflammatory reaction (IBMIR) 環境下における Natural Killer (NK) 細胞の活性化機構の解明 第 114 回日本外科学会 2014.4.3-5 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都)

17. 佐伯吉弘、石山宏平、平田文宏、田中友加、大段秀樹 間葉系幹細胞を介した肝臓内免疫制御による膵島グラフト機能傷害克服の試み 第68回日本消化器外科学会総会 2013.7.17-19 シーガイアコンベンションセンター(宮崎)

18. Y. Saeki, K. Ishiyama, F. Hirata, Y. Tanaka, H. Ohdan Mesenchymal Stem Cells Suppress Cytotoxic Activity of Natural Killer Cells in Islet Cell Transplantation American Transplant Congress 2013 2013.5.18-23 シアトル(アメリカ)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

広島大学 消化器・移植外科のホームページに研究概要を掲載した。

アドレス：
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/home2ge/research/trans/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
石山 宏平 (Ishiyama Kohei)
広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：50437589

(2) 研究分担者
なし()

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし()

研究者番号：