

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462114

研究課題名(和文) 膵島移植における脂肪由来幹細胞を用いたIBMIR制御に関する研究

研究課題名(英文) The basic research for establishment of a new strategy for IBMIR control in islet transplantation by ADSC

研究代表者

池本 哲也 (IKEMOTO, Tetsuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：20398019

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)：当研究において、ADSCと膵島共培養によってVEGFを介する細胞保護効果が実証された。全身投与されたADSCは傷害膵に集積せず、網内系にトラップされた。IBMIR制御の検討のためにADSC投与によるマウスの凝固系変化およびブタを用いた膵島と全血の混合培養を行い、サイトカイン分析を行った。結果としては凝固系およびサイトカイン変化に与えるADSCの影響は極めて小さくかつ極めて多量の細胞数を必要とした。

研究成果の概要(英文)：This project revealed that ADSC had the trophic effect for injured islet though VEGF signaling. As in vivo study, ADSC were trapped in reticuloendothelial system, not in injured pancreas when they were administered intravenously. Mouse coagulation system analysis and porcine islet-whole blood co-culture system revealed that the effects on these systems by ADSC were very small and required large amount of ADSC even though these effects were ADSC dose-dependent manner.

研究分野：消化器外科

キーワード：IBMIR ADSC trophic effect blood coagulation system

1. 研究開始当初の背景

膵島移植の臨床的意義と問題点

膵島移植は極めて低侵襲の細胞移植治療であり、1型糖尿病根治的治療として、欧米ではすでに保険適応を受け、実際の1型糖尿病の治療オプションとして機能している。2000年に発表された Edmonton protocol (Shapiro AM, N Engl J Med. 2000) は Steroid free での膵島移植をなし得た偉業ではあるが、5年のフォローアップ後に同施設から発表された成績では、膵島移植の5年後のインスリン完全離脱率は10%以下と満足できるものではなかった (Ryan EA, Diabetes 2005)。しかしながら、豊富な donor source の存在する欧米であれば multi donor-one recipient の移植が可能であるが、絶対的ドナー不足である本邦においては、one donor - one recipient とすべき効果的膵島移植法の開発が急務である。その解決策としては、1. 移植膵島の保護、2. 効果的免疫抑制法の開発、3. ドナー特異的免疫寛容誘導法の開発が挙げられる。

2. 研究の目的

IBMIRの制御

上記1.に着目し、膵島保護につき検討を行うこととした。経門脈的に移植された移植膵島は肝内で補体/凝固系・マクロファージを中心とした自然免疫反応によって補足/破壊され、極めて短時間で40-50%内外の膵島が loss される Instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR) が生じ、排除されることが報告 (Ups J Med Sci 2000, Lancet 2002) されており、膵島移植においては同時にこの IBMIR の制御が必須である。そこで、当研究は研究代表者らがこれまで行ってきた、脂肪由来幹細胞 (Adipose tissue derived stem cell: ADSC) を用いた移植膵島直接保護作用とマクロファージ制御を主体とした IBMIL 抑制により、膵島移植の飛躍的成績向上を目指すものである。

IBMIR のメカニズムとしては、まず分離膵島に起こる虚血再還流傷害として膵島組織表面において Tissue Factor (TF) が発現し、さらにその膵島が経門脈的に移植されることで、膵島から活性化した補体が分泌され、TF 依存的な凝固系の活性化が生じ、Thrombin-antithrombin (TAT) 複合体の形成、炎症性サイトカインの形成が起こり、さらに活性化した補体からはマクロファージが誘導され、炎症性サイトカイン、マクロファージにより膵島細胞が傷害される。これまでに我々はこれが allogenic な反応のみならず、自家膵島移植でも生じている可能性を示してきた (池本ら、第48回日本移植学会 2012)。これは IBMIR が主として移植膵島の allo 抗原を契機としての作用ではなく、傷害細胞を排除しようとする一連の生体防御反応と考えることができる。全身的な補体系の活性を低下させたり、血小板活性を制御することな

どが実験的に考えられている (Diabetes. 2002) が、DIC や出血、生体防御能の低下など膵島移植のベネフィットを IBMIL 制御によるリスクが上回ってしまうと低侵襲医療である膵島移植の特色の1つが失われてしまう。しかしながら、研究代表者らは、移植された ADSC が樹状細胞を regulate し各種サイトカインを分泌すること (池本ら、第47回日本移植学会 2011)、マクロファージは移植片に対する免疫担当細胞 (T 細胞) へ抗炎症性サイトカインを分泌することを示してきた (Ikemoto T, et al. ATC 2009)。これらのことから、ADSC の抗炎症性サイトカインおよびマクロファージ制御能によって、EBMIR が抑制可能ではないかと考えられる。そこで、傷害細胞に対して抗炎症サイトカイン分泌を中心とした強力な保護作用を持ち、マクロファージ調節能を持つ ADSC 移植による IBMIL の制御を通して移植膵島の効果的保護が可能ではないかと着想し実証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1-1) ADSC と膵島共培養による細胞保護効果の実証 (in vitro)

(1-2) ADSC の凝固系・免疫担当細胞に対する反応に関する検討 (in vitro)

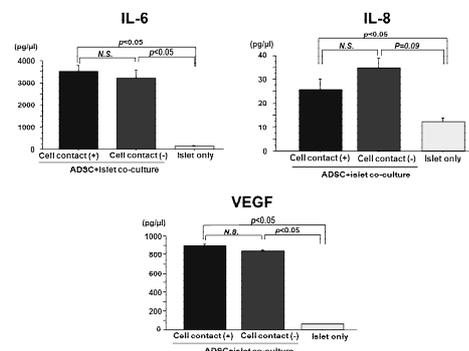
(2-1) 同系膵島移植モデルを用いた ADSC 投与経路による IBMIR 制御に関する検討

(2-2) 異系膵島移植モデルを用いた ADSC による IBMIR 制御に関する検討

4. 研究成果

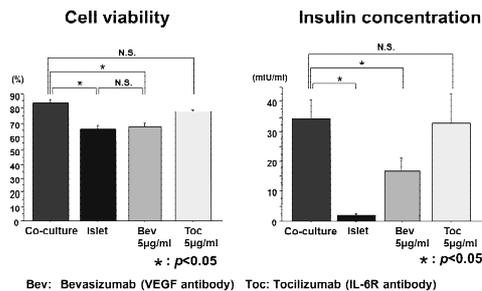
予備的検討として ADSC と膵島共培養による細胞保護効果の実証を行った。分離膵島 (1x10⁵ 個) 単培養群、細胞隔絶膜あり (細胞接触なし) 共培養 (膵島 1x10⁵ 個、ADSC 1x10⁵ 個)、細胞隔絶膜なし (細胞接触あり) 共培養群 (膵島 1x10⁵ 個、ADSC 1x10⁵ 個) に分け検討を行った。膵島 recovery 率、viability は ADSC 共培養群 (細胞接触あり、なし双方) で有意に良好であり (P<0.05)、上清中のサイトカインプロファイルを ELISA 法によって測定すると、インスリン、IL-6、IL-8、VEGF が ADSC 共培養群 (細胞接触あり、なし双方) で高値 (P<0.01) であった。

Cytokine profile



VEGF を抗 VEG 薬添加によって阻害すると、viability・インスリン濃度は低下した。

VEGF-IL-6 antibody



BEV: Bevasizumab (VEGF antibody) Toc: Tocilizumab (IL-6R antibody)

VEGF antibody decreased cell viability and insulin concentration.

また、in vivo の実験を進めるにあたり、ADSC の至適投与経路につき検証を行った。ADSC を Xenolight Dir® でラベルし、実際に尾静脈より静注し、蛍光色素の追跡を行った。その結果は尾静脈から注入された ADSC は脾にほとんど集積(Homing)せず、網内系(脾臓、肝)にトラップされることが判明した。

(研究 2-2) 異系膵島移植モデルを用いた ADSC による IBMIR 制御に関する検討(in vivo)のために膵島および ADSC の経門脈的移植の系を確立するとともに、ADSC 投与によるレシピエントマウスの凝固系の変化(TF, C3a)および High-mobility group box 1 (HMGB1) につき検討を行った。

また同時に 27 年度施行予定の大動物(ブタ)を用いた予備実験としてブタ膵島とブタ全血の混合培養を行い、サイトカイン分析(IL-6, IL-8, IP-10, IL-4, TGF-, MCP-1)を行った。

この実験によれば、TF, C3a へ影響を及ぼすには極めて多量(10^{10} のオーダー)の ADSC を要すること、また、コントロールに比べて ADSC 共培養群はデータのばらつきが非常に大きいという結果が得られた。上記サイトカインプロファイルにおいても同様の結果であった。

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 5 件)

- Ikemoto T, Sugimoto K, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S.
Clinical Role of Notch Signaling Pathway in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. *J*

Gastroenterol Hepatol.

2015;30(1):217-222.

doi: 10.1111/jgh.12660. 査読有

- 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

doi: 10.1007/s10147-013-0529-6. 査読有

- Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Takasu C.

Homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver: the shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014 Dec;21(12):873-380.

doi: 10.1002/jhbp.147. 査読有

- Ikemoto T, Takita M, Levy MF, Shimada M, Naziruddin B.

CD11b+cells in donor-specific transfusion prolonged allogeneic skin graft survival through indoleamine 2,3-dioxygenase.

Cellular Immunology 2013

May-Jun;283(1-2):81-90.

doi: 10.1016/j.cellimm.2013.06.004. 査読有

- Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Saito Y, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S.

Trophic effect of adipose tissue-derived stem cells on porcine islet cells.

J Surg Res. 2013 Oct 21. pii:

S0022-4804(13)00976-1.

doi: 10.1016/j.jss.2013.10.031. 査読有

【学会発表】(計 4 件)

- 第 43 回日本膵・膵島移植研究会
2016 年 3 月 4-5 日 ホテルグランヴィア広島(広島県広島市)
池本哲也, 島田光生, 居村暁, 森根裕二, 齋藤裕, 山田眞一郎, 吉川雅登, 寺奥大貴, 良元俊昭
脂肪由来幹細胞による膵島移植・膵島再生に関する新たな戦略
- 第 51 回日本移植学会総会
2015 年 10 月 1-3 日 ホテル日航熊本(熊本県熊本市)
池本哲也, 島田光生, 居村暁, 森根裕二, 齋藤裕, 山田眞一郎, 寺奥大貴, 吉川雅登

脂肪由来幹細胞が拓く膵島細胞移植成績向上に関する展望と課題

3. 第50回日本移植学会総会
2014年9月10-12日 京王プラザホテル
(東京都新宿区)
池本哲也, 島田光生, 居村暁, 森根裕二,
荒川悠佑, 森大樹, 岩橋衆一, 齋藤裕, 山田眞一郎, 石川大地
紫令湯による膵島破壊抑制機序の解明
に関する免疫学的検討
4. 第114回日本外科学会定期学術集会
2014年4月3-5日 国立京都国際会議場
ホテルグランドプリンス京都(京都府
京都市)
池本哲也, 島田光生, 宇都宮徹, 居村
暁, 森根裕二, 森大樹, 荒川悠佑, 金
本真美, 岩橋衆一, 石川大地
柴令湯による膵島破壊抑制機序の解明
に関する研究

〔図書〕(計1件)

1. 池本哲也, 島田光生
A 膵島再生のサイエンス(基礎系)第4章
3 膵島細胞の傷害機序と液性因子による
膵島防護作用 **膵島の再生医療** 2015年
200頁(pp96-101)
6. 研究組織
(1)研究代表者
池本 哲也 (IKEMOTO, Tetsuya)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 20398019
(2)研究分担者
島田 光生 (SHIMADA, Mitsuo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 10216070

居村 暁 (IMURA, Satoru)
徳島大学・病院・特任教授
研究者番号: 90380021

森根 裕二 (MORINE, Yuji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号: 60398021

齋藤 裕 (SAITO, Yu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 50548675

山田 眞一郎 (YAMADA, Shinichiro)
徳島大学・病院・特任助教
研究者番号: 30579884

岩橋 衆一 (IWAHASHI, Shuichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任

助教

研究者番号: 30531751

宇都宮 徹 (UTSUNOMIYA, Toru)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号: 30304801

金本 真実 (KANAMOTO, Mami)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 10448326

荒川 悠佑 (ARAKAWA, Yusuke)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 00448325