

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871001

研究課題名(和文) バイオ人工膵島移植の課題：最適な移植部位の検討および移植早期炎症反応の制御

研究課題名(英文) Analysis of inflammatory reactions after intraperitoneal transplantation of microencapsulated porcine islets in mice

研究代表者

伊東 威 (ITO, Takeshi)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：70634400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：カプセル化ブタ膵島は主に糖尿病レシピエントの腹腔内に移植されているが、移植後、炎症反応により繊維化が起こり機能不全に陥る。今回、我々はブタ膵島をカプセル化し移植後の炎症反応を解析した。カプセル化ブタ膵島を障害するとHMGB1が放出された。カプセル化ブタ膵島をマウス腹腔内に移植すると、移植後3日をピークに腹腔内にTNF- α 、IL-6、IFN- γ 陽性マクロファージ、好中球、樹状細胞が集積した。また、マウス同種同系膵島移植でNF- κ B阻害剤や、抗IL-6レセプター抗体を投与により移植後の炎症反応を制御する方法を開発した。今後、炎症反応を制御しカプセル化膵島移植の血糖改善効果を検討する。

研究成果の概要(英文)：Currently, the efficacy of microencapsulated porcine islet transplantation into the peritoneal cavity is limited because of fibrosis of microencapsulated islets resulting from inflammation, and this is one of the most serious issues to promote this procedure as a standard therapy. In the present study, we revealed that TNF- α , IFN- γ and/or IL-6 positive macrophages, neutrophils and dendritic cells were infiltrated into the peritoneal cavity after receiving microencapsulated porcine islets, with a peak at 3 days after transplantation. In vitro studies revealed that damaged microencapsulated islets released HMGB1. Furthermore, we realized that Withaferin A, a kind of NF- κ B inhibitor, and anti-IL-6 receptor antibody could prevent early inflammatory reactions after intrahepatic syngeneic islet transplantation in mice. These results demonstrated that the efficacy of microencapsulated islet transplantation might be improved by the treatment targeting HMGB1-mediated inflammatory reactions.

研究分野：移植外科学

キーワード：膵島移植 バイオ人工膵島 異種移植

1. 研究開始当初の背景

2000年のエドモントン・プロトコールの発表以降、欧米を中心としてインスリン依存性糖尿病患者に対して同種膵島移植が行われているが、ドナー不足が深刻な問題となっている。そのため、“ヒトドナーに依存しない膵島移植”の確立は、この問題の一つの解決策として期待され、その一つとして、ブタ膵島を用いた膵島移植の確立が目指されている。ブタ膵島を免疫隔離膜で被覆し、レシピエントには免疫抑制剤を投与せずに移植を行う方法(バイオ人工膵島移植)は、インスリン依存性糖尿病患者に対して臨床試験がニュージーランド等ですでに開始されている(Living Cell Technology社、ニュージーランド)。

バイオ人工膵島は、理論上、同種免疫拒絶反応、異種免疫拒絶反応、自己免疫拒絶反応から回避できる方法である。しかし、これらの拒絶反応とは別に移植後早期に惹起される炎症反応に対する免疫隔離膜の効果はまだ明らかになっていない。本研究では、糖尿病レシピエントマウスを用いた移植実験系で、バイオ人工膵島後の炎症反応のメカニズムを解析し、さらに制御方法を開発しバイオ人工膵島移植のさらなる成績向上を目指すものである。

先の研究で、申請者らは膵島移植早期に惹起される自然免疫による炎症反応が関与する移植早期の膵島障害のメカニズムをマウスモデルで明らかにした(J Clin Invest. 2010/ J Exp Med. 2005)。マウス膵島にHMGB1が多く存在しており、肝内移植後6時間~24時間後に移植された膵島からHMGB1が放出され、HMGB1が樹状細胞に作用し、インターロイキン-12を産生し、ナチュラルキラーT(NKT)細胞を活性化する。活性化NKT細胞がインターフェロン- γ (IFN- γ)を産生し、肝内に集積した好中球からIFN- γ 産生を促進することによって惹起される移植後早期の炎症反応のメカニズムを明らかにした。さらにこのHMGB1が惹起する炎症反応を制御することにより移植後成績が改善することを明らかにした(Transplantation 2007 / Transplantation 2009 / Transplantation 2012)。また、臨床膵島移植後にレシピエント血中HMGB1が上昇する事を明らかにした(Cell Transplantation 2014)。以上のようにマウス及びヒト同種膵島移植において、移植後レシピエント血清HMGB1が上昇する事を明らかにした。さらにマウスモデルにおいて、HMGB1が惹起する炎症反応を制御することにより移植後成績が改善することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、HMGB1とバイオ人工膵島移植後の移植早期炎症反応の関連に着目し、移植早期の炎症反応のメカニズムを解析し、さらに炎症を制御する事により、バイオ人工膵島移

植の成績が向上するか移植実験系で検討する。

3. 研究の方法

単離ブタ膵島にマイクロエンカプレーションを施し、ストレプトゾトシン誘導糖尿病マウス(野生型 C57BL/6)をレシピエントとした異種移植の系で、移植早期におこる炎症反応のメカニズムを組織学的、免疫学的に解析する。In vivo 実験系では、レシピエントマウス腹腔内にカプセル化ブタ膵島を移植し、移植成績、炎症反応、拒絶反応等を組織学的、免疫学的に解析する。In vitro 実験系では、カプセル化ブタ膵島を低酸素状態や炎症性サイトカイン等で障害し、障害の程度、放出されるHMGB1の解析を行う。これらの結果よりバイオ人工膵島移植後の炎症反応を解析し、移植後炎症反応の制御方法を開発し、移植膵島の障害を抑制し、バイオ人工膵島移植成績の向上を目指す。

4. 研究成果

ブタ膵島およびカプセル化ブタ膵島からのHMGB1放出

ブタ膵島がHMGB1を放出するかに関して、adult pigから膵島を分離した。分離膵島を培養し、培養液中に放出されたHMGB1を測定すると、培養前(n=4)が $0.83 \pm 0.17 \text{ ng/mL}$ であるのに対して、3日間培養後(n=4)が $22.33 \pm 4.48 \text{ ng/mL}$ で培養液中HMGB1値は有意($p < 0.001$)に上昇していた。アルギン酸でカプセル化したブタ膵島も障害によりカプセル外にHMGB1を放出することが明らかとなった。

移植部位の検討

同種同系移植で移植効率の比較実験を行った。カプセル化していないマウス膵島をSTZ糖尿病マウスの肝臓、腎皮膜下、皮下、腹腔内に移植し、正常血糖になる必要個数を検討した。腎皮膜下(100~200個)、腹腔内(200~400個)、肝臓(200~400個)、皮下(400個以上)で正常血糖になった。カプセル化していない膵島移植は腎皮膜下が最適であったが、腎皮膜下の容量は限られており、カプセル化膵島移植の場合、移植するvolumeが増加するため、腎皮膜下よりも腹腔内が適していると考えられた。

条件の良い膵島カプセル化法の確立

まず純粋にカプセルの素材を検討するためにドナーおよびレシピエントにC57BL/6マウスを用いた同種同系モデルでアガロースカプセル化膵島移植を行った。アガロースでカプセル化したマウス膵島1000個の腹腔内移植で1例、正常血糖化した。しかし、400~1200個の膵島を計8例移植したが、正常血糖化したのは1例のみであった。正常血糖にならなかったマウスをautopsyし、腹腔内を検索したが、カプセルのみ存在し、カプセル内

の膵島は消失していたため、アガロースによるカプセル化は最適ではないと考えられた。次にアルギン酸を免疫隔離膜として用いる方法を導入した。アルギン酸でマイクロカプセル化したブタ膵島を STZ 糖尿病マウス (C57BL/6J) の腹腔内に移植し、正常血糖になる必要個数を検討した。カプセル化ブタ膵島を 15,000IEQ (n=2)、10,000IEQ (n=5) もしくは 5,000IEQ (n=15) 腹腔内に移植すると全例で血糖は正常化した。以上より、カプセル化の素材としては、アガロースよりアルギン酸の方が適していると考えられた。

カプセル化膵島移植後の炎症反応の解析

アルギン酸を用いたカプセル化ブタ膵島移植 3~4 週間後に糖尿病レシピエントマウスは再度高血糖となった。この移植結果により、移植されたカプセル化膵島が異種免疫による拒絶反応、炎症反応による膵島障害、もしくはカプセル内での低酸素・低栄養に伴う膵島障害により高血糖になったのではないかと考え、まず移植カプセル化膵島を組織学的に解析した。組織学的には、カプセル周囲には少量のリンパ球を認めるもののカプセル内部まで浸潤はしておらず、異種免疫反応が膵島喪失の主な原因とは考えにくかった。次に、カプセル化膵島移植後の炎症反応を解析した。

マウス腹腔内にカプセル化ブタ膵島を移植し、移植後経時的に腹腔内に浸潤した単核球を回収し、フローサイトメトリーで細胞の種類および細胞内サイトカインの解析を行った。移植後腹腔内に浸潤する細胞の総数は移植後 3~7 日をピークに上昇し、徐々に減って移植後 28 日に移植前と同レベルまで減少した。浸潤する細胞は主にマクロファージ、好中球、樹状細胞であった。T リンパ球の浸潤は認めなかった。移植早期より腹腔内に浸潤する細胞は TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 を発現していた(un-published data)。以上のことから、カプセル化ブタ膵島をマウス腹腔内に移植すると、移植後一週間でピークにマクロファージ、好中球、樹状細胞が集積し、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 を産生していることが明らかとなった。

移植膵島の生着率改善を目指した治療法の開発

カプセル化膵島および膵島(カプセル化していない膵島)を移植し、移植成績向上につながる方法を開発した。今回の解析で、アルギン酸でカプセル化したブタ膵島も障害によりカプセル外に HMGB1 を放出することが明らかとなり、ヒトおよびマウス膵島移植と同様にカプセル化膵島移植後も HMGB1 による炎症反応が惹起される可能性が考えられ、マウス膵島移植モデルにおいて HMGB1 が惹起する炎症反応を抑制し、移植成績が向上する方法を検討した。マウス肝内膵島移植モデルにおいてコントロール群はレシピエントマウスの

血糖正常化に 400 個の膵島が必要であったが、抗 IL-6 レセプター抗体投与群ではより少数の 200 個の膵島でレシピエントマウスの血糖が正常化した (Pancreas 2015;44(1):166-71.)。肝内膵島移植後 6 時間をピークに肝内に NKT 細胞、好中球が集積し IFN- γ を産生し移植膵島を障害するが、移植時に抗 IL-6 レセプター抗体を投与することにより、この移植早期の炎症反応が制御され、より少数の膵島でレシピエントマウスの血糖が正常化することを明らかとした (Pancreas 2015;44(1):166-71.)。また、肝内膵島移植では、膵島を門脈内に移植するため膵島が血液内に移植される。この状況が Instant Blood-mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) という現象を引き起こし、移植膵島の NF- κ B を活性化し、炎症反応や移植膵島の細胞死を引き起こすことが先の研究で明らかにされている。我々は NF- κ B 阻害剤 (Withaferin) によって IBMIR を制御出来るか検討した。ヒト膵島とヒト血液(同一個体)をサンプルとして用いた実験 (isograft) で、invitro で膵島と血液を混合し 37 $^{\circ}$ C で培養すると膵島は障害され viability は低下、また血液中の炎症性サイトカインは増加した。一方、上記サンプル中に Withaferin を加えると膵島の viability は改善し、血液内(血清中)炎症性サイトカインは有意に低下した (Transplantation. 2014;98(5):578-84.)。このように、炎症性サイトカインや NF- κ B を標的とした治療で炎症反応および膵島の障害を制御出来ることを明らかにした。また、膵島は通常、脳死下または心停止下臓器提供者から摘出され、膵島を分離する。この過程で、膵臓および膵島は血流が途絶え低酸素・低栄養状態に晒される。それにより膵島障害が惹起され、移植成績が悪くなる、もしくは障害を受けた膵島を移植することにより膵島から HMGB1 をはじめとする DAMPs が放出され炎症を惹起し膵島が障害される。これらの一連の流れを制御するには、摘出膵臓の低酸素・低栄養による障害を抑制する、もしくは細胞を低酸素や低栄養に対して強くするといった方法が考えられる。ドナー膵臓摘出後の臓器保存時に、膵管から逆行性に膵実質内に臓器保存液 (ET-Kyoto 液) を注入する膵臓保存法により分離膵島量および膵島の質が改善することを明らかにした (Pancreas. 2014;43(8):1249-55.)。また、低酸素や低栄養に耐性の細胞を誘導するために細胞に微弱な電荷を加え細胞内に細胞死を抑制する方法を開発した (Current Tissue Engineering. 2014;3(2):102-11.)。

以上より、カプセル化ブタ膵島移植後早期にマクロファージ、好中球、樹状細胞が活性化され、TNF- α 、IL-6、IFN- γ といった炎症性サイトカインを産生し移植部位である腹腔内に炎症を惹起していることが明らかとな

った。移植したカプセル化膵島の機能喪失の原因としてはT細胞を中心とした異種免疫反応より、移植早期に惹起される炎症反応が重要な役割を果たしていると示唆された。また、空カプセル移植よりカプセル化膵島移植後の方が、惹起される炎症反応が強く、またカプセル化膵島からHMGB1がカプセル外に放出されることが明らかとなり、HMGB1を含むDAMPsがカプセル化膵島から放出され、カプセルに対する炎症反応に加えて、DAMPs由来の炎症反応が惹起され移植膵島を障害していることが示唆された。

今回の知見により、移植後の炎症反応を標的とした治療を移植と併用することにより、より良い移植成績が得られると考えられる。

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7件)

Itoh T, Nitta T, Nishinakamura H, Kojima D, Mera T, Ono J, Kodama S, Yasunami Y. HMGB1-mediated early loss of transplanted islets is prevented by anti-IL-6R antibody in mice. *Pancreas* 44(1):166-171, 2015 査読有
DOI: 10.1097/MPA.0000000000000188

Takita M, Itoh T, Shimoda M, Kanak MA, Shahbazov R, Kunnathodi F, Lawrence MC, Naziruddin B, Levy MF. Pancreatic ductal perfusion at organ procurement enhances islet yield in human islet isolation. *Pancreas*. 43(8):1249-55, 2014 査読有
DOI: 10.1097/MPA.0000000000000196

Kojima D, Nishinakamura H, Itoh T, Kodama S.* (*Corresponding author) An extremely weak electric current system induces anti-apoptotic effects and anti-ecrotic effects in living cells. *Current Tissue Engineering*. 3(2): 102-111, 2014 査読有
DOI:10.2174/2211542003666141010215906

Kanak MA, Takita M, Itoh T, Sorelle JA, Murali S, Kunnathodi F, Shahbazov R, Lawrence MC, Levy MF, Naziruddin B. Alleviation of Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction in Autologous Conditions Through Treatment of Human Islets with NF- κ B Inhibitors. *Transplantation*. 98(5): 578-84, 2014 査読有
DOI: 10.1097/TP.0000000000000107

Itoh T, Iwahashi S, Kanak MA, Shimoda M, Takita M, Chujo D, Tamura Y, Rahman AM,

Chung WY, Onaca N, Coates PTH, 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*. 23(2): 153-65, 2014 査読有
DOI: 10.3727/096368912X658980

Mera T, Itoh T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M, Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y. Pretreatment of donor islets with the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. *Am J Transplant*. 13(8): 2154-60, 2013 査読有
DOI: 10.1111/ajt.12306

Sorelle JA, Itoh T, Peng H, Kanak MA, Sugimoto K, Matsumoto S, Levy MF, Lawrence MC, Naziruddin B. Withaferin A inhibits pro-inflammatory cytokine-induced damage to islets in culture and following transplantation. *Diabetologia*. 56(4): 814-24, 2013 査読有
DOI: 10.1007/s00125-012-2813-9

[学会発表](計8件)

西中村瞳, 桑原豪, 小島大望, 伊東威, 田代忠, 小玉正太 M-CSF あるいは GM-CSF 培養 F4/80 陽性細胞投与によるマウス虚血肢モデルを用いた血流改善効果の比較検討 第14回日本再生医療学会総会 2015年3月19日 パシフィコ横浜(横浜)

Itoh T, Mera T, Nishinakamura H, Kodama S, Yasunami Y. Addition of a specific Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor into collagenase solution prevents hypoxic damage of islets during isolation, facilitating to improve the efficiency of islet transplantation in mice. The 2014 World Transplant Congress. July 29, 2014 San Francisco, USA

Tanaka T, Itoh T, Matsumoto M, Kojima D, Mera T, Nishinakamura H, Kodama S, Ono J, Yanase T, Yasunami Y. Expansion of Transplanted Islets by Co-transplantation of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells in Mice. 74th Scientific Sessions of American Diabetes Association. June 16, 2014 San Francisco, USA

田中智子, 伊東威, 松本征仁, 小島大望, 米良利之, 西中村瞳, 小玉正太, 小野順子, 柳瀬敏彦, 安波洋一 脂肪組織由来間葉系幹細胞による移植膵島生着率改善と膵島量増加効果 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会 2014 年 5 月 24 日 ホテル N C B (大阪)

田中智子, 伊東威, 松本征仁, 小島大望, 米良利之, 西中村瞳, 小玉正太, 小野順子, 柳瀬敏彦, 安波洋一 脂肪組織由来間葉系幹細胞による移植膵島生着率改善と膵島量増加効果 第 41 回日本膵・膵島移植研究会 2014 年 3 月 8 日 ミッドランドホール (名古屋)

Itoh T, Mera T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Iwamoto T, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y. The early loss of transplanted islets is prevented by targeting Na⁺/Ca²⁺ exchanger of donor islets prior to transplantation. IPITA 14th World Congress. September 25, 2013 Monterey, USA

伊東威 単離ドナー膵島の Na⁺/Ca²⁺交換体を標的とした移植前治療による肝内移植早期膵島障害の制御 第 49 回日本移植学会総会 2013 年 9 月 6 日 国立京都国際会館 (京都)

Itoh T, Mera T, Kita S, Kojima D, Nishinakamura H, Ono J, Iwamoto T, Kodama S, Yasunami Y. Pretreatment of Donor Islets with a Specific Inhibitor of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Prior to Transplantation Improves the Efficiency of Islet Transplantation. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. September 5, 2013 国立京都国際会館 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 威 (ITO, Takeshi)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号: 70634400