

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670577

研究課題名(和文)免疫抑制剤非投与下での皮下膵島移植の実現とその免疫寛容機構の解析

研究課題名(英文)Transplantation of islets in immune tolerance site under skin induced by bFGF or SEK-1005

研究代表者

岩田 博夫 (IWATA, Hiroo)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：30160120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病ラットの皮下に膵島を移植し、免疫抑制剤非投与下で膵島が長期に生着した。移植部位を作製するためにSEK-1005あるいはbFGF含有アガロースロッドを埋め込んだ。アガロースロッド埋め込み部位近傍の免疫抑制的に働く制御性T細胞(Treg)の比率が高くなり、また、膵島移植後もTreg細胞の比率は高い値を維持していた。アガロースロッド周囲の肉芽組織を埋め込み7日後に回収し、遺伝子網羅的に解析したところTregの遊走・誘導に関する遺伝子の発現が優位に高くなっていた。また、肉芽組織の近傍の浸出液中のTGF- β 1の濃度も高くなっていた。これらのことから原因で免疫寛容する環境が構築されたと考えている。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that blood glucose levels of diabetic rats were kept stable normal by transplanting islet at subcutaneous sites without immunosuppressive drug. Transplantation sites were prepared by implanting agarose rods with SEK-1005 or bFGF. The population of regulatory T (Treg) cells infiltrated into granulomatous tissue formed around the agarose rods were significantly increased in comparison with normal subcutaneous tissue. The population of Treg cells were kept constant higher levels after islet transplantation. Gene expression of the granulomatous tissue around agarose rods 7 days after implantation were analyzed. The expression levels of Treg cells associated chemokines and cytokines were increased in granulomatous tissue. Concentration of activated TGF- β 1 in exudate reached maximum 10 days after implantation of agarose-SEK. The immune tolerance site was formed around the agarose rods.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ランゲルハンス氏島 膵島 制御性T細胞 糖尿病 血糖値 移植 皮下移植

1. 研究開始当初の背景

インスリン依存型糖尿病の治療として、ドナーから提供された膵ランゲルハンス氏島(膵島)の移植が試験的治療として世界で年間200-300例程度行われている。かなり成績が向上しているものの、深部の重要臓器である肝臓を移植部位としており移植時の侵襲が比較的大きいこと、また、膵島を移植した後、免疫抑制剤を一生涯投与する必要があるなど、解決すべき問題がある。我々は世界で初めて、免疫抑制剤非投与で皮下へ移植した膵島が長期間拒絶反応を受けることなく生着し、血糖値を制御できることを示した。本手法をヒトへと適用するには移植膵島の長期生着が可能になった機構を明らかにし、基礎データを取得する必要がある。

2. 研究の目的

(1) 現在までの研究で、ラット間の同種膵島移植で、安全かつ低侵襲な部位である皮下に膵島を移植し、免疫抑制剤非投与下での長期生着を実現した。本膵島移植方法はインスリン依存型糖尿病の治療法として極めて有効であると考えられる。ヒト患者に適用するためには、移植前後において移植部位で起きている免疫反応などを解析し、理解する必要がある。(2) 本研究では、皮下に血管が豊富な免疫寛容部位を作製するために、線維芽細胞増殖因子(bFGF)あるいは環状ペプチドである SEK-1005(SEK, C₄₅H₇₀N₉O₁₃、図1)を担持したアガロースロッドを糖尿病ラットの皮下に埋め込み、埋め込み部位やそこに移植した膵島近傍に集まるリンパ球、サイトカインなどを解析する。更に考察を加えて、ヒト患者に適用する時の最適な膵島移植法立案のための基礎とする。

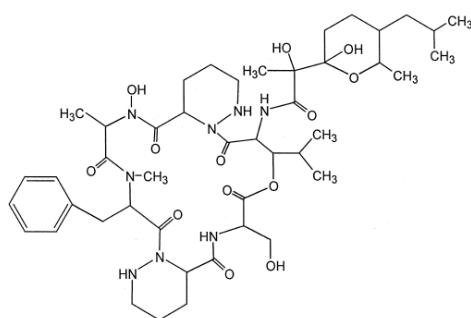


図1. SEKの構造式

3. 研究の方法

(1) 4.5%のアガロースゲルをロッド状(直径4mm、長さ25mm)に固化し、1晩凍結した後、1晩減圧下で乾燥することで、乾燥アガロースロッドを得た。(2) F334ラットから膵島を分離し、ストレプトゾトシン(STZ)で糖尿病を誘発したACIラットへ移植する系を用いた。(3) アガロースロッド埋め込み日にACIラッ

STZ(60 mg/kg body weight)を投与することで糖尿病を誘発した。ACIラットの背部の背骨の左右の皮下部位にSEK(100 μg)あるいはbFGF(50 μg)含むアガロースロッドをそれぞれ1本ずつ埋め込んだ。埋め込み2、7、10、14日後にアガロースロッド周囲に形成された組織を回収した。得られた組織をホモゲナイズすることにより細胞を回収し、パーコール密度勾配遠心によりリンパ球を純化した後、フローサイトメーターで解析した。

(4) 遺伝子解析のためにbFGF含有アガロースロッド、SEK含有アガロースロッドあるいはコントロールとして薬剤不含アガロースロッドを糖尿病ACIラットに埋め込んだ7日目に、ロッドが埋め込まれていた場所の周囲の組織を回収した。回収した組織はRNA分解を阻害するRNA later液を速やかに浸透させ、RNA分解を阻害した。組織中のRNAはカラム法により抽出した。抽出したRNAはExpress kit法により増幅、cRNA化しピオチンによる標識を行った。ピオチン標識cRNAはRat Genome 230 2.0アレイにハイブリダイズし、各wellの蛍光強度をHewlett-Packard GeneArray Scanner G2500Aで読み取った。このようにbFGF含有アガロースロッド、SEK含有アガロースロッド及び、薬剤不含アガロースロッドの周辺組織各3個について遺伝子発現解析を行った。

(5) bFGF含有アガロースロッド、SEK含有アガロースロッドを埋め込んだ後に周囲の浸出液を回収しTGF-β1濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病ACIラットの背部皮下部位にbFGF含有アガロースロッドを7日間埋め込むことで血管が豊富な部位を作製することができた。その部位にF344ラットの膵島3000個を移植したところ、7匹中全てのレシピエントにおいて移植膵島が拒絶を受けることなく、血糖値が長期間正常化した。アガロースロッド埋め込み部位の免疫状態を解析するためにbFGF含有アガロースロッド周囲に形成された組織からリンパ球を回収しフローサイトメーターを用いて解析を行った。免疫抑制的に作用する制御性T細胞(Treg細胞)の比率(Foxp3/CD4 x 100)が20-30%であった。bFGF不含アガロースロッド周囲の組織では、この比率が10-15%であり、bFGF含有アガロースロッドを埋め込むことで、アガロースロッド周囲に浸潤するTreg細胞の割合は約2-3倍増加していることが分かった(図2)。更に、膵島移植後もTreg細胞の比率は持続的に20-30%の高値を維持していた。また、所属リンパ節や脾臓内のTreg細胞の比率は10%以下であった。一方、細胞障害性T細胞(CD8陽性細胞)について解析を行ったところbFGF含有アガロースロッドの周囲の組織ではCD8陽性細胞とCD4陽性細胞の割合(CD8/CD4 x 100)が30-80%であり、bFGF不含アガロースロッドの周囲の組織では50-70%であった。この比

率については両者に有意な違いはなかった。膵島が長期間生着しているレシピエント ACI ラットにドナーである F344 ラットの脾細胞を腹腔内注入することで、ドナー抗原特異的な免疫反応を惹起した。脾細胞注入 10 日以内に、生着していた移植膵島が拒絶されてレシピエント ACI ラットの血糖値が上昇した。このことから、bFGF 含有アガロースロッドを

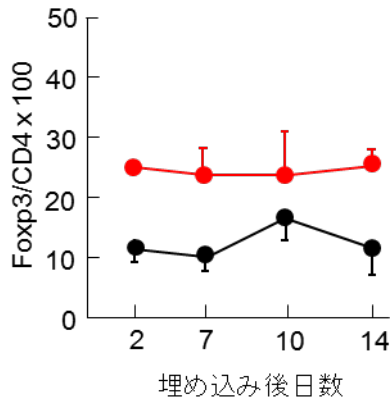


図 2. Treg 細胞の比率。(赤);bFGF 含有、(黒);bFGF 非含有アガロースロッド。

埋め込むことによって形成された寛容環境は免疫学的な寛容であることが分かった。

網羅的遺伝子発現解析の結果、bFGF 含有アガロースロッド群で chemokine・cytokine 関連遺伝子のうち、Treg 細胞の遊走・誘導に関する遺伝子の発現が有意に上昇し、それ以外の遺伝子発現が有意に低下していることが明らかとなった。その中でも特に TGF- 1 は非常に強力な Treg 細胞誘導作用を持つ。埋め込み部位から採取した浸出液中の TGF- 1 の濃度を測定した。bFGF 含有アガロースロッド埋め込み 7 日後で、TGF- 1 の濃度は 0.5 ± 0.1 ng/ml であった。その後徐々に TGF- 1 の濃度は増加し、埋め込み 10 日後には 0.7 ± 0.3 ng/ml になった。一方、未処置群では埋め込み 3 日後で 0.1 ± 0.9 ng/ml となり、その後検出できない濃度となった。皮下に bFGF を作用させることで Treg 細胞に関連する chemokine・cytokine の遺伝子発現や TGF- 1 のタンパクレベルでの発現が上昇し、bFGF 含有アガロースロッド周辺での Treg 細胞が増加した。その結果、細胞障害性 T 細胞 (CD8 細胞) の増殖・活性化が抑制され、移植細胞を免疫寛容する環境が整えられたと考えている。

(2) 糖尿病 ACI ラットの背部皮下部位に SEK 含有アガロースロッドを 10 日間埋め込むことで血管が豊富な部位を作製することができた。その部位に F344 ラットの膵島 3000 個を移植したところ、10 匹中 8 匹のレシピエントにおいて移植膵島が拒絶を受けることなく、血糖値が長期間正常化した。SEK 含有アガロースロッド周囲に形成された組織からリンパ球を回収しフローサイトメーターで解析を行ったところ Treg 細胞の比率、

Foxp3/CD4 x 100 が 20 -30%であった。SEK 不含アガロースロッド周囲の組織ではこの比率が 10 -15%であり、SEK 含有アガロースロッドを埋め込むことで、アガロースロッド周囲の組織に浸潤する Treg の割合は約 2-3 倍増加していることが分かった(図 3)。更に、膵島移植後においても移植膵島近傍の Treg 細胞の比率は持続的に 20 -30%の高値を維持していた。また、所属リンパ節や脾臓内の Treg 細胞の比率は 10%以下であった。一方、CD8 陽性細胞について解析を行ったところ、SEK 含有アガロースロッドを埋め込んだ周囲の組織では CD8/CD4 x 100 が 30-40%であった。それと比較して、SEK 不含アガロースロッドの周囲の組織ではこの比率は 50 -70%であった。通常、異物を埋め込むことでこの比率は 50%以上に増加することが多いが、SEK 含有アガロースロッドを埋め込むことによって周囲の組織に浸潤する CD8 細胞の増殖が有意に抑えられていた。膵島が長期間生着しているレシピエント ACI ラットにドナーである F344 ラットの脾細胞を腹腔内注入することで、ドナー抗原特異的な免疫反応を惹起した。脾細胞注入 10 日以内に、生着していた移植膵島が拒絶されてレシピエント ACI ラットの血糖値が上昇した。このことから、SEK 含有アガロースロッドを埋め込むことによって形成された寛容環境は免疫学的な寛容であることが分かった。

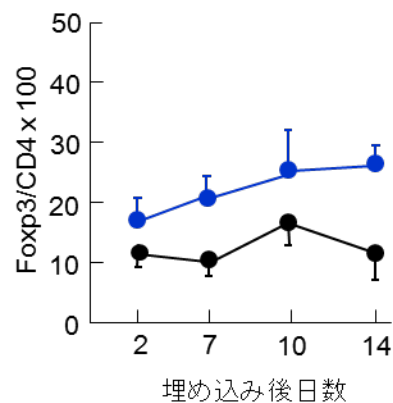


図 3. Treg 細胞の比率。(青);SEK 含有、(黒);SEK 非含有アガロースロッド。

網羅的遺伝子発現解析の結果、SEK-1005 含有アガロースロッド群で chemokine・cytokine 関連遺伝子のうち、Treg 細胞の遊走・誘導に関する遺伝子の発現が有意に上昇し、それ以外の遺伝子発現が有意に低下していることが明らかとなった。埋め込み部位から採取した浸出液中の TGF- 1 の濃度を測定した。SEK 含有アガロースロッドを埋め込み 7 日後までは 0.8 ± 0.3 ng/ml であった。その後、徐々に TGF- 1 の濃度は増加し、埋め込み 10 日後には 2.0 ± 1.0 ng/ml になった。一方、未処置群では埋め込み 3 日後で TGF- 1 の濃度は 0.1 ± 0.9 ng/ml となり、その後検出できなかった。制御性 T 細胞関連にする

chemokine・cytokine の遺伝子発現や TGF-1 のタンパクレベルでの発現を上昇させることで、SEK 含有アガロースロッド周辺での制御性 T 細胞が増加し、細胞障害性 T 細胞 (CD8) 増殖・活性化が抑制され、移植細胞を免疫寛容する環境が整えられていると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

栗原 令, 岩田 博夫: 塩基性線維芽細胞増殖因子担持デバイスを用いて皮下に誘導した免疫寛容部位への脾臓移植. 第 14 回会総会, 2015 年 3 月 19-21 日, パシフィコ横浜 (横浜市西区)

栗原 令, 岩田 博夫: bFGF 担持ハイドロゲルにより皮下に作製した免疫特典部位への脾臓移植. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17-18 日, タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 免疫寛容部位形成剤及び免疫抑制性細胞の誘引剤

発明者: 岩田博夫, 栗原令, 濱口真英, 平野邦夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-82847

出願年月日: 2015 年 4 月 14 日

国内外の別: 国内

名称: 移植部位形成剤、移植部位形成デバイス、血管新生誘導剤及び血管新生誘導デバイス

発明者: 岩田博夫, 栗原令, 平野邦夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-223174

出願年月日: 2014 年 10 月 31 日

国内外の別: 国内

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 博夫 (IWATA Hiroo)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号: 30160120

(2) 研究分担者

濱口 真英 (HAMAGUCHI Masahide)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻

医

研究者番号: 80350883

(3) 連携研究者

坂口 志文 (SAKAGUCHI Shimon)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センタ

ー・教授

研究者番号: 30280770