

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10033

研究課題名(和文) 細胞置換療法における細胞処置法確立へのバイオインフォマティクスのアプローチ

研究課題名(英文) Bioinformatics approach to establish preconditioning method for beta cell replacement

研究代表者

穴澤 貴行 (Anazawa, Takayuki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90566811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵島移植は重症低血糖発作を伴うインスリン依存糖尿病患者の低侵襲治療であるが、移植グラフトの生着率改善が最大の課題である。我々は、膵島移植前にMitomycin C処置を行った膵島が免疫抑制剤非使用下で生着延長をもたらす知見をもとに、処置後の遺伝子発現変化をバイオインフォマティクスの方法で解析した。膵島分離過程を経た膵島グラフトは、免疫細胞遊走因子を分泌し宿主免疫応答を惹起するが、移植前培養期間にMitomycin C処置を付加することにより、免疫細胞遊走因子の分泌が抑制され、局所免疫反応の応答が誘導されることで、免疫抑制剤非使用下においてもグラフトの生着延長がもたらされることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Strategies to reduce the immunogenicity of pancreatic islets is essential for successful islet engraftment. We previously demonstrated that mitomycin C (MMC) pretreatment significantly prolonged graft survival. Fully understanding the biological process could result in the development of a protocol. The gene expression analysis identified downregulation of annotated functions associated with cellular movement and revealed significant downregulation of multiple genes encoding proinflammatory mediators with chemotactic activity. Validation studies revealed significantly decreased levels of IL-6, MCP-3, and MMP-2 in culture supernatants of MMC-treated islets. We also showed that MMC-treated islets secreted lower levels of chemoattractants that synergistically reduced the immunogenic potential of islets. The pretreatment of islets with MMC can reduce the immunogenic potential and prolong the survival of islet grafts by inducing the suppression of multiple leukocyte chemotactic factors.

研究分野：外科学

キーワード：膵島移植 細胞移植 糖尿病 再生医療 免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

膵島移植はインスリン依存状態糖尿病に対する低侵襲移植治療である。現在長期成績の改善を目指し、欧米を中心に新たな免疫抑制プロトコールが探索され一定の成果を挙げており (Diabetes Care 35:1436-1445, 2012)、本邦でも長期成績の改善を目指し新規免疫抑制プロトコールによる臨床試験が実施されている (UMIN 試験 ID: UMIN000003977)。しかし、一人のレシピエントに対し複数の膵島移植を必要とするという現状は依然解決されておらず、移植効率の改善において膵島分離ストレスや移植後早期障害に引き続き惹起される炎症反応・自然免疫反応、および同種移植片に対する拒絶反応の制御が大きな課題とされている。

臨床膵島移植は膵島分離後に約2日間の培養を経て移植される。培養期間にレシピエントの免疫抑制が開始できる利点があるものの、培養中に失われる膵島があることが欠点とされる。我々は培養期間中にグラフトである膵島に対して生着率改善を目指した処置を施すことが可能であることに着目した。これまで Genotoxic stress に作用するとされる Mitomycin-C(MMC)を処置することでラットからマウスの異種移植の系 (Transplantation 67:1474,1999) 及びマウスの同種移植の系において移植成績が改善しうることを明らかにし (Transplantation 76:65,2003) さらにその効果は適切な培養期間を設けることで増強されることを明らかにしてきた (Cell Transplantation 17; 2008)。これらは、膵島移植前の移植前処置により免疫寛容を誘導しうることを示したものであるが、その分子生物学的機序については解明できておらず、更に効果的な移植前グラフト処理法の確立や臨床展開への課題となっていた。

## 2. 研究の目的

膵島分離ストレスや移植後早期障害に引き続き惹起される炎症反応・自然免疫反応、および同種移植片に対する拒絶反応、といった膵島グラフト生着を阻む反応を回避するため、移植細胞の培養・加工法を開発することは重要なアプローチである。これまで、細胞死を回避しうる処置を施したグラフトを移植すると、移植後のグラフト障害が回避され、グラフトの生着率が著しく改善しうることを示してきたが、その詳細な分子生物学的機序は不明であったため、バイオインフォマティクス的手法の導入によりグラフト生着率改善の機序を明らかにして、臨床に応用可能なグラフト処置法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験 ; 分離したラット膵島を Mitomycin C(MMC)処置群 (10 µg/ml, 30分) と単純培養群に分け、Streptozotocin 誘導糖尿病マウスの腎被膜下に移植した。また、移植部位に浸潤した免疫細胞を免疫組織学的染色にて評価した。実験 ; 両群において新鮮膵島と3日間培養膵島を採取し、マイクロアレイにて網羅的遺伝子解析を行った。バイオインフォマティクス解析ソフトを用いて、データマイニング解析、および生物学的機能解析を行った。実験 ; 遺伝子解析の妥当性を invitro 実験系において検証した。膵島培養液中のタンパク発現を ELISA 法により評価し、さらに膵島培養液へのマウス単球の遊走能を評価した。

## 4. 研究成果

結果 ; ラット膵島のマウスへの免疫抑制剤非使用移植実験の結果、MMC 処置膵島の平均生着期間は非処置膵島と比較して有意に延長した。移植部位の免疫細胞数は MMC 処置膵島で有意に減少し局所免疫不応答の誘導が

示唆された。結果 ; 両群の膵島において発現遺伝子の生物学的機能変化を比較した結果、非処置群では多くの遺伝子群 (cellular movement, immune cell trafficking, inflammatory response など) で発現増強を認めたと、MMC 処置膵島ではいずれも発現が抑制されていた。これらの遺伝子群より膵島より分泌される免疫細胞遊走因子 (サイトカイン・ペプチダーゼ) が MMC 処置により複数で同時に抑制されていることが注目され、発現差の大きい IL-6、MCP-3、MMP2 を検証実験の候補として選定した。結果 ; 膵島培養液中の IL-6、MCP-3 および MMP-2 値はいずれも、MMC 処置膵島において有意に抑制され、遺伝子解析の妥当性が確認された。また、膵島培養液に対するマウス単球の遊走能は、MMC 処置群において有意に抑制された。さらに非処置膵島培養液に抗 MCP-3 モノクローナル抗体もしくは MMP 阻害剤を用いると単球の遊走能は有意に抑制された。

膵島分離過程を経た膵島グラフトは、免疫細胞遊走因子を分泌し、宿主免疫応答を惹起するが、移植前培養期間に MMC 処置を付加することにより、免疫細胞遊走因子の分泌が抑制され、局所免疫反応の応答が誘導されると結論づけた。炎症を緩和し細胞死を抑制して、免疫担当細胞の惹起を抑えるアプローチが生着延長に有効であることが本手法により示された。

## 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 4 件 )

Schuetz C, Anazawa T, Cross SE, Labriola L, Meier RPH, Redfield RR 3rd, Scholz H, Stock PG, Zammit NW; IPITA YIC Young Investigator Committee. Cell Replacement Therapy: The Next 10 Years. *Transplantation*. 査読有 2018

Feb;102(2):215-229. doi:

10.1097/TP.0000000000001937.

Sato N, Haga J, Anazawa T, Kenjo A, Kimura T, Wada I, Mori T, Marubashi S, Gotoh M. Ex vivo Pretreatment of Islets with Mitomycin C: Reduction in Immunogenic Potential of Islets by Suppressing Secretion of Multiple Chemotactic Factors. *Cell Transplant*. 査読有 2017 Aug;26(8):1392-1404. doi:10.1177/0963689717721233.

穴澤貴行、岡島英明、上本伸二、膵島移植の現状と今後の展開 *日本輸血細胞治療学会誌* 査読有 第 62 巻 6 号: 635-640、2016

Anazawa T, Okajima H, Uemoto S. [Pancreatic islet transplantation]. *Nihon Rinsho*. 2015 Dec;73(12):2117-22. Japanese.

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

Takayuki Anazawa, Hideaki Okajima, Yasuhiro Iwanaga, Toshihiko Masui, Seiichiro Tada, Kei Yamane, Kenta Inoguchi, Kyoichi Takaori, Yoshiya Kawaguchi, Shinji Uemoto. A comparative analysis of the clinical outcome of islet transplantation using donors after cardiac death vs intensive insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia unawareness: a 10-year follow-up at a single centre. 16th International Congress of International Pancreas and Islet Transplant Association. June 20-23, 2017 Oxford, UK

Takayuki Anazawa, Hideaki Okajima, Yasuhiro Iwanaga, Toshihiko Masui, Tatsuo Itoh, Michiya Kawaguchi,

Seiichiro Tada, Kei Yamane, Kyoichi Takaori, Yoshiya Kawaguchi, Shinji Uemoto. A 10-year outcome of pancreatic islet transplantation. The 20th meeting of the International Association of Pancreatology August 4-7, 2016. Sendai, Japan

穴澤貴行、岡島英明、岩永康裕、川口道也、増井俊彦、伊藤達雄、細川慎一、波多野悦朗、海道利実、上本伸二、次世代の細胞移植療法開発における探索的医療研究の役割 膵島移植からの成果報告 第 116 回日本外科学会定期学術集会 4 月 14-16 日、2016 大阪

穴澤貴行、岡島英明、上本伸二、再生医療基盤技術としての膵島移植 同種細胞移植から多能性幹細胞由来細胞移植実現への展望 JDDW2016 (第 58 回日本消化器病学会大会) 11 月 3-6 日、2016 神戸

Takayuki Anazawa, Junichiro Haga, Naoya Sato, Akira Kenjo, Shigeru Marubashi, Takashi Kimura, Tsutomu Mori, Hideaki Okajima, Shinji Uemoto, and Mitsukazu Gotoh. Pancreatic islet culture induces tolerogenic effects as well as stimulates immune cell trafficking by regulating inflammatory cytokines. IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress Nov 15-19, 2015 Melbourne, Australia

〔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〕

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

穴澤 貴行 (TAKAYUKI ANAZAWA)

京都大学大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 90566811