

令和元年6月18日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05403

研究課題名(和文) 前臨床サル移植モデルによる革新的膵島・腎移植法を用いた糖尿病性腎症根治療法の確立

研究課題名(英文) Establish a treatment strategy to diabetic nephropathy using combined kidney and islets transplantation

研究代表者

山田 和彦 (YAMADA, Kazuhiko)

鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授

研究者番号：40241103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題はサルを用いた骨髄移植を併用した同種膵島腎移植免疫寛容移植実験であり、その最終目的は自己免疫疾患1型糖尿病性腎症に対する根治療法の確立、即ち自己免疫の制御を含めた戦略の確立である。助成3年間で、最終目的への道筋として、免疫寛容誘導免疫抑制療法において3段階の発展的改良を加えた。第1世代で、すでに200日を越える移植膵島腎生着を得たが、免疫抑制剤の膵島毒性と一過性末梢血キメラにとどまり、第2世代で膵島毒性の軽減、更に平成30年度は第3世代として、Leukapheresisの確立によって、30%を超える末梢血キメラが6週間以上継続し、更に骨髄キメラも確認するという成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

独自の血管再構築による膵島腎(Islet-Kidney: IK)移植を軸とした、臨床応用可能な糖尿病性腎症患者に対する根治的戦略の確立をはかる本申請研究は、国際的学術誌に認められた自らの成果に基づく計画のもとに遂行され、糖尿病性腎症の根治的治療としての革新的免疫寛容誘導戦略の確立と臨床応用性が、大きく前進するものと確信する。本戦略の臨床応用によって、終末期糖尿病性腎症患者のQOL向上のみならず、医療費削減という社会的観点からも大きな貢献を果たす。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to cure diabetic nephropathy by utilizing a composite islet-kidney combined with hematopoietic cell transplantation. Over a three-year period, the goal of a three-step progressive improvement in the immune tolerance-inducing immunosuppressive therapy was achieved. Although we have exceeded 200 days survival of composite islet-kidney grafts with first-generation immunosuppression, further efforts are required to reduce drug-induced islet toxicity and improve donor chimerism. The second step demonstrated evidence of BM engraftment at day 37 and rejection free islet-kidney grafts, and the third step further improved % and duration of donor chimerism. With the establishment of the leukapheresis procedure, we have achieved peripheral chimerism for more than 30% over 6 weeks following transplantation, as well as further bone marrow chimerism.

研究分野：外科学一般

キーワード：移植・再生医療 免疫寛容 膵島移植 大動物 腎臓移植 骨髄移植 サル キメラ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

増加の一途をたどる重症糖尿病・糖尿病性腎症に対する根治的治療戦略の確立は急務であり、腎臓+膵臓移植あるいは腎臓+膵島移植に期待が寄せられる。しかし膵臓移植には高率の術後合併症という問題が挙げられ、また一方の膵島移植は低侵襲であるものの、移植後成績が膵臓移植に及ばないという問題がある。更にインスリン離脱の後も永続的な免疫抑制剤が不可避であることに加え、現状の膵島移植では、血糖制御に複数ドナー膵臓が必要であるため、脳死ドナー数が限られ、生体ドナーに依存するわが国では、膵島移植が糖尿病性腎症の根治療法になることは革新的戦略なくしては困難である。糖尿病性腎症の根治的治療としての革新的免疫寛容誘導戦略の確立により、終末期糖尿病性腎症患者の QOL 向上のみならず、医療費削減という社会的観点からも大きな貢献を果たすことが期待される。

### 2. 研究の目的

本申請研究は、重症糖尿病性腎症の根治療法として、我々が医用ミニブタを用いて開発し成果を挙げている“生体ドナー移植を対象とした革新的膵島・腎移植戦略 (Islet-Kidney: IK)”を、臨床応用の段階へ引き上げることを目的とし、霊長類を用いた同種 IK 移植による免疫寛容誘導とドナー侵襲の軽減をはかる。ドナー造血幹細胞移植 (Hematopoietic Stem Cell Transplantation: HSCTx) による免疫寛容誘導療法併用下の IK 移植によって、Streptozotocin (STZ) および両側自己腎摘出により IDDM と腎不全を誘導したサルレシピエントの膵島・腎機能の根治的維持と免疫寛容を誘導する。

### 3. 研究の方法

ドナー造血幹細胞を回収し、ドナー幹細胞注入療法併用下に膵島腎移植を行い、免疫寛容誘導戦略の確立を目的とした実験を実施する。

(1) 動物: サル。

(2) 造血幹細胞移植: 骨髄穿刺または Leukapheresis によりドナー幹細胞を回収し、レシピエントに経静脈的に移植する。

(3) IDDM 誘導: STZ を 80 mg/kg 静注する。効果不十分の際は膵臓全摘出を行う。

(4) 免疫寛容誘導療法:

第 1 世代免疫抑制療法: 45 日間シクロスポリン (CyA) を基礎免疫療法とし、移植前 T 細胞除去を目的とした CD3 除去抗体を投与する。

第 2 世代: 薬剤性膵毒性を軽減する目的で、CyA の投与量を高濃度から早期に減少させ、co-stimulatory blockade 抗体とラパマイシンを主とした導入療法を行う。更に NKT 細胞寛容も目指し、anti-GalCer を移植前および移植後に投与する。

第 3 世代: ドナー骨髄移植をより多くの骨髄前駆細胞の移植が期待できる Leukapheresis 法を確立する。免疫抑制療法は co-stimulatory blockade 抗体と少量のタクロリムスを用いる。ラパマイシン、胸腺放射線照射は除外する。

(5) レシピエントへの膵腎臓移植: 小児臨床腎移植に準じた移植法を用いる。造血肝細胞移植後 20-42 日に膵島腎移植を行う。

(6) 移植膵島・腎機能評価および骨髄/末梢キメラの追跡: 血糖・腎機能を主体とした生化学試験ならびに血液細胞数検査を行う。細胞解析 FCM によりマクロキメラを追跡し、また病理組織学的検討を行う。

### 4. 研究成果

本課題はサル同種間で、骨髄移植を同種膵島腎移植に対して併用した免疫寛容移植実験であり、その最終目的は、自己免疫疾患 1 型糖尿病性腎症に対する根治療法の確立である。本戦略を確立するためには自己免疫を制御する必要がある。助成 3 年間において、本戦略の最終目的への道筋として、免疫寛容誘導免疫抑制療法において 3 段階の発展的改良を加えた。

本戦略で用いる免疫寛容誘導免疫抑制療法として、まず第 1 世代免疫抑制療法では、45 日間 CyA を基礎免疫療法とし、移植前 T 細胞除去を目的とした CD3 除去抗体を用いた。3 例中 2 例は 200 日を越える移植腎の生着結果を得たものの、CyA による膵島毒性、および移植後のキメラの継続が、移植後 3 週間以内に消失する一過性キメラであるという二つの問題を呈した。

次に第 2 世代として、薬剤性膵毒性を軽減する目的で、CyA の投与量を高濃度から早期に減少させ、co-stimulatory blockade 抗体とラパマイシンを主とした導入療法を用い、更に NKT 細胞寛容も目指し、anti-GalCer を移植前および移植後に投与した免疫抑制療法を開発した。予期せぬグラフト損傷と感染などのため長期の移植膵島腎生着は得られなかったが、これまでに確認し得なかった移植後 1 か月以降のキメラを認めた。末梢血 T 細胞キメラは 6%、myeloid キメラ 5%、更に骨髄キメラを 1.4% (Day 37) を確認した (図 1)。更に、移植腎に拒絶はなく、移植膵島も拒絶像を認めなかった (図 2)。また、anti-GalCer を本実験の in vivo 導入療法に用いるにあたり、サルとヒトの血中に含まれる iNKT cell の解析を行った。iNKT cell は CD3 分子を発現し、anti-GalCer と CD1d 複合体を認識する細胞の総称である。iNKT cell の同定には anti-CD3 抗体と anti-GalCer-loaded CD1dtetramer 抗体を用いて、フローサイトメトリーにより解析を行った。サル PBMC とヒト PBMC 中に含まれる iNKT cell は非常に少数であり、ヒト PBMC 中には 1.5-1.8%、一方サル PBMC 中には 0.3-0.6% の iNKT cell が同定された。次い

で、これら iNKT cell のサブセット解析を行った。ヒト iNKT cell の 70-80%が CD8 陽性であるが、サル iNKT cell では 50-60%が CD4 陽性、25-30%が CD8 陽性であった(図3)。

しかし、本課題の最終目的は糖尿病性腎症、特に自己免疫疾患 1 型糖尿病患者を対象としている。このことは本戦略では自己免疫を制御する必要があることを意味する。最近の小動物実験において、キメラの継続により自己免疫をも制御しうる成果が報告されている。このことは本モデルにおいても、最終目的の達成には高い割合のキメラが長期維持されることが必要であることを示唆している。そこで平成 30 年度は、第 3 世代として、ドナー骨髄移植をより多くの骨髄前駆細胞の移植が期待できる Leukapheresis 法を確立し、免疫抑制は co-stimulatory blockade 抗体と少量のタクロリムスを用い、これまで用いたラパマイシン、胸腺放射線照射を除いた療法を開発した。この療法で、5 例の Leukapheresis を行い、CD34+細胞を臨床骨髄移植で骨髄移植生着に必要な  $2-6 \times 10^6/\text{kg}$  の 4 倍以上の回収を行うことができた。うち 2 例に対し同種移植を行い、2 例とも 30%を超える末梢血キメラが 6 週間以上継続し、更に骨髄キメラも Lymphoid で 15%、Myeloid で 42%確認した。

図 1 . 移植後 6 週における末梢血 T 細胞キメラ (6%。左パネル) 骨髄キメラ (1.4% 右パネル)

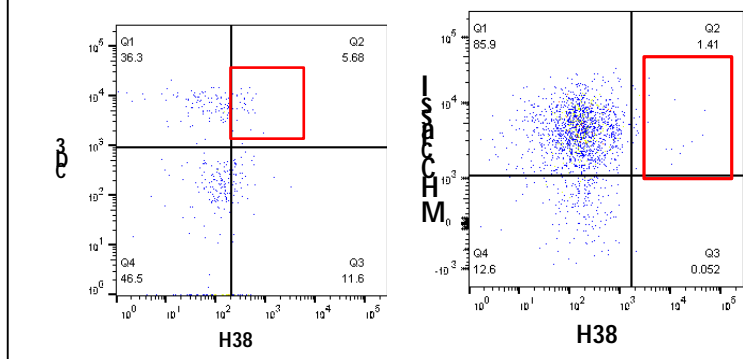


図 2 . 移植後 37 日における移植腎臓と膵島。拒絶を示唆する細胞浸潤を認めない。

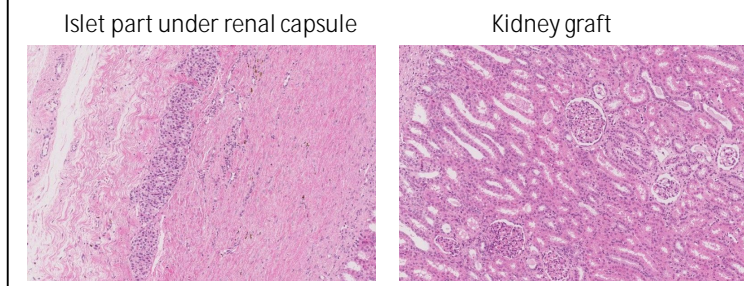
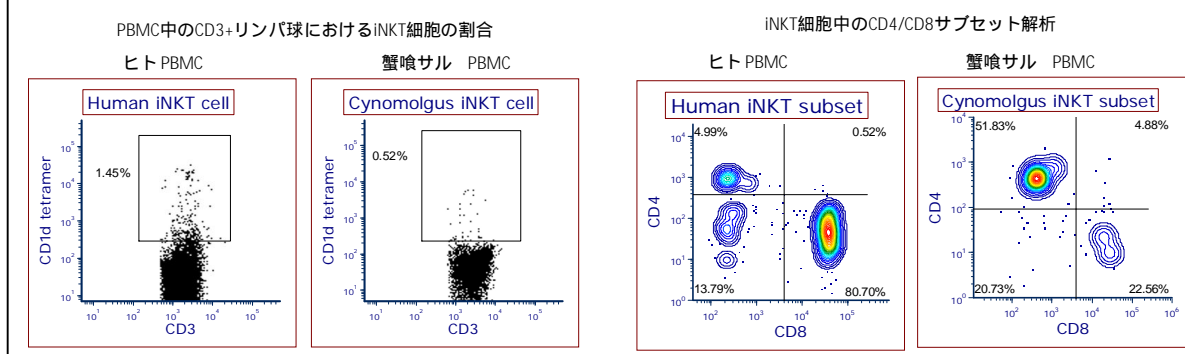


図 3 . 抗-CD3 抗体と抗-GalCer-loaded CD1d tetramer 抗体を用いたフローサイトメトリーによる、サル PBMC とヒト PBMC 中の iNKT cell の割合(左)と iNKT cell のサブセット解析(右)



5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 0 件)

[ 学会発表 ] (計 0 件)

[ 図書 ] (計 0 件)

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xenotx/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：佐原 寿史

ローマ字氏名：(SAHARA, hisashi)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：総合科学域総合研究学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90452333

研究分担者氏名：清水 章

ローマ字氏名：(SHIMIZU, akira)

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：大学院医学研究科

職名：大学院教授

研究者番号（8桁）：00256942

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。