

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390251

研究課題名（和文）新たに見出された Na⁺/Ca²⁺交換体を介した移植膵島細胞死の制御に関する研究研究課題名（英文）Prevention of early loss of transplanted islets by targeting Na⁺/Ca²⁺ exchanger of donor islets prior to transplantation

研究代表者

安波 洋一（YASUNAMI YOHICHI）

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：00166521

研究成果の概要（和文）：臨床膵島移植が直面する最も重要な課題は膵島移植特有の自然免疫拒絶反応の新規制御法開発である。本研究では膵島移植の自然免疫拒絶反応がドナー膵島細胞の細胞膜に存在する Na⁺/Ca²⁺交換体を介した細胞内への Ca²⁺の流入に端を発した、膵島細胞障害により惹起されること、またドナー膵島を移植前に Na⁺/Ca²⁺交換体阻害剤で処置することにより自然免疫拒絶反応が制御できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A major obstacle facing clinical islet transplantation is the low efficiency of this procedure due to innate immune rejection of transplanted islets. In the present study, we demonstrate that the innate immune rejection of transplanted islets is triggered by injury of islet cells caused by Ca²⁺ influx into β cells via Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) and that innate immune rejection can be prevented by the treatment of donor islets with NCX inhibitor prior to transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |
| 2011年度 | 4,900,000 | 1,470,000 | 6,370,000 |
| 2012年度 | 5,600,000 | 1,680,000 | 7,280,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,300,000 | 4,290,000 | 18,590,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学、トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

臨床膵島移植の現在の最も重要な課題は一人の糖尿病レシピエントの治療成功に2-3回の膵島移植、すなわち2-3人分のドナー膵臓を必要とする事が挙げられる。一人のドナー膵臓より得られた1回の膵島移植では生着する膵島数が少なく、移植膵島から分泌される

インスリンだけでは不十分で、減量できるもののインスリン注射を移植後に継続する必要がある。この問題が細胞移植である膵島移植が同じ目的で行われている膵臓器移植に比し、未だ実験的治療といわれる所以であり、その解決が臨床膵島移植の急務となっている。この問題を解決する従来の研究動向としては、

より多くのドナー膵島を得る為の方法論すなわち、ドナー膵臓摘出法、保存法ならびに膵島単離法の確立、さらには臓器移植とは異なる膵島移植拒絶反応の制御法を見出すことが主体であった。申請者は膵島移植拒絶反応に関し、近年見出された免疫担当細胞であるNKT細胞が必須の役割を担っていることを世界に先駆けて明らかにしている (JCI 105: 1761-1767, 2000, Diabetes 55: 34-39, 2006)。今後の方向性として申請者は独自の視点、すなわち移植早期(24時間以内)に発現する膵島障害、自然免疫拒絶反応による移植膵島破壊(喪失)に着目し、研究を進めている。膵島移植では種々の理由より移植部位として肝臓(経門脈的肝内)が選択される。しかしながら、肝臓は生体の第一線の防御機能を有しており、膵島移植後には肝臓内で種々の生体防御反応、特に炎症反応を含む“自然免疫拒絶反応”が惹起され、翻って移植膵島自身が障害される機序が考えられる。この膵島障害の制御により一人から一人への膵島移植を達成できる可能性がある。先の研究(平成15-17年度文部科学省基盤研究B)で肝内に移植された膵島の50%以上が移植後24時間以内に破壊され、その過程に、近年新に見出された免疫担当細胞であるナチュラルキラー T (NKT)細胞が必須の役割を担っていることを見出した。また、移植部位である肝臓内に移植後6時間をピークに好中球が集積、移植膵島内に浸潤し、インターフェロン γ を産生放出、移植膵島を破壊することが判明した。更に、集積した好中球の活性化(インターフェロン γ 産生)にはNKT細胞の存在が必須で、NKT細胞を介して好中球がエフェクターとして機能していることが明らかになった。平成18年度からの研究(平成18-20年度文部科学省基盤研究B)では上記知見で明らかになったNKT細胞を介した移植早期膵島障害のメカニズムに関し

て、その全貌を明らかにすべく、より上流のNKT細胞活性化機序について解析した。その結果、膵島の肝内移植直後より移植膵島自身より炎症惹起因子(HMGB1)が放出され、NKT細胞依存性にクッパー細胞、好中球よりそれぞれIL-12、IL-6産生を刺激し、両者により好中球がIFN- γ を産生、そのIFN- γ が移植膵島を障害する新しい経路を見出した(Transplantation 83:1085-1092, 2007, Diabetes)。これらの知見は移植膵島に存在する炎症惹起因子(HMGB1)が移植膵島障害の規定因子であり、その放出機序解析が新規治療法開発に直結することを示している。HMGB1は当初全ての有核細胞の核に存在するDNA結合蛋白として見出されたが、最近の研究により細胞に種々のストレスがかかった時に細胞質、細胞外に放出され、炎症を惹起することが報告されている。我々は膵島細胞が他の組織、細胞に比し、多量のHMGB1を含有することを見出した(submitted)。一方、移植膵島は経門脈的に移植され、肝内で生着するが新たな動脈血管新生までには1-2週間を要し、それまでは門脈(静脈)血でのみ栄養されることになる。従って移植直後より、移植膵島は虚血(低酸素)状態となる。我々はこの点に着目、すなわち移植直後の虚血、低酸素状態が移植膵島へのストレスとなりHMGB1放出へのトリガーになると想定した。予備実験の結果、単離膵島の低酸素下培養による細胞死の過程で、膵島よりHMGB1が放出されることが確認できた。更には低酸素下膵島細胞死に新たに見出された $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX)を介した Ca^{2+} イオンの細胞内流入が関与している知見を得た。NCXは細胞膜に存在し、細胞内Naの細胞外流出によって細胞外Caを細胞内に取り込むイオントランスポーターで、共同研究者の岩本隆宏教授が世界に先駆けて遺伝子改変マウスを作成し、高血圧症の成因として報告している(Nat Med)。膵島細胞におけるNCXの存在、生理機能については全く未解明

で、本研究により世界で最初の成果が得られる。

2. 研究の目的

本研究では肝内移植後早期(24時間以内)に発現する自然免疫拒絶反応による移植膵島細胞死の機序を解析、その制御法を見出し、膵島移植の成績向上に寄与することを目的にしている。

3. 研究の方法

平成22年度にはマウス単離膵島を用いて膵島低酸素下培養に於ける膵島障害の *in vitro* モデルを確立し、同モデルを用いて $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX)インヒビターの低酸素下培養膵島障害に対する抑制効果を検証した。更には膵島細胞に於けるNCXの存在、機能の解析、*in vivo* 膵島移植モデルでドナー膵島の移植前 NCX インヒビター存在下培養の移植早期膵島障害に対する効果を検証した。

平成23-24年度は膵島細胞死に係わる NCX isoform を明らかにするとともに NCX1+/- マウス膵島β細胞を用いて膵島細胞のNCX機能の詳細を検討した。また、単離ヒト膵島を免疫不全マウスに移植する実験系で NCX インヒビターの移植ヒト膵島障害に対する効果を検討した。

4. 研究成果

平成22年度

(1) マウス(C57BL/6)単離膵島を低酸素ガス(1%O₂+5%CO₂+94%N₂)で満たしたチャンバー(37C)内で培養する低酸素下培養単離膵島細胞死の *in vitro* モデルを確立した。

(2) NCX 阻害剤を用いて低酸素下培養膵島細胞死に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体が関与していることを明らかにした。

(3) 膵島細胞に於ける NCX の存在を RT-PCR, western blotting, 免疫組織染色で明らかにし

た。

(4) 膵島移植の実験系でNCXインヒビターでのドナー膵島移植前処理により移植膵島障害が制御できることを明らかにした。

平成23年度

(1) NCX isoform の解析により、膵島β細胞には主に NCX1 が発現していることを分子生物学的、免疫組織学的に明らかにした。

(2) NCX1KO マウスは胎生致死であり、実験には NCX1+/-, マウスインスリンプロモーターに NCX1 gene を組み込んだトランスジェニックマウスを使用した。NCX1+/- ならびに NCX1Tgマウスの単離膵島を用いて *in vitro* ならびに *in vivo* 膵島移植実験のドナーとして用い、移植膵島障害に於ける NCX1 の役割を明らかにできた。

(3) サル膵島にNCXが発現していることを免疫組織学的に明らかにできた。

平成24年度

倫理委員会の承認を受け、ヒト膵島を用いた実験を行い、以下の知見を得た。ヒト単離膵島は米国共同研究者より供給を受け、フェデックスで搬送し、実験に使用した。

(1) ヒト膵島にはマウス膵島と同様にNCX1が優位に発現することをqPCR、免疫染色で明らかにした。

(2) ストレプトゾトシンで糖尿病を作成した免疫不全マウス(NOD/scid)への移植実験で、NCXインヒビターによる前処置で移植後のヒト膵島細胞死が制御でき、生着率が向上することが判明した。

(3) ヒト膵島グラフトの免疫染色でインスリン陽性細胞を豊富に含有するβ細胞を認めた。

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2件)

- 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.** In press. 査読有

2. Kojima D, Mera T, Nishinakamura H, Itoh T, Ogata T, Matsuoka N, Kodama S, Yasunami Y. Prevention of High-Mobility Group Box 1-Mediated Early Loss of Transplanted Mouse Islets in the Liver by Antithrombin III. **Transplantation.** 93(10): 983-8, 2012. 査読有

[学会発表] (計5件)

1. 米良利之, 伊東威, 喜多紗斗美, 小島大望, 西中村瞳, 永石美晴, 小方貴子, 金城亜哉, 岩本隆宏, 小玉正太, 安波洋一 単離ドナー膵島の Na⁺/Ca²⁺ 交換体を標的にした移植前治療による肝内移植早期膵島障害の新規制御法 第40回日本膵・膵島移植研究会 2013年3月2日 高松
2. Kojima D, Nishinakamura H, Ogata T, Nagaishi M, Mera T, Itoh T, Matsuoka N, Kodama S, Yasunami Y. Inhibitory effect of thrombomodulin on HMGB1-stimulated IFN- γ production of hepatic NKT and Gr-1⁺ Cells, facilitating to prevent early loss of transplanted islets in the liver of mice. 24th International Congress of the Transplantation society. 2012年7月19日 ドイツ、ベルリン
3. 小島大望, 米良利之, 西中村瞳, 伊東威, 松岡信秀, 小玉正太, 安波洋一 トロンボモデュリンによる移植膵島早期膵島障害の制御 第39回日本膵・膵島移植研究会 2012年3月10日 旭川
4. 安波洋一 肝内移植早期膵島障害の機序と制御法 第39回日本膵・膵島移植研究会 2012年3月9日 旭川

5. 米良利之, 小島大望, 西中村瞳, 伊東威, 松岡信秀, 小玉正太, 安波洋一 移植後24時間以内に発現する肝内移植膵島障害、喪失の機序解明と新規制御法開発 第38回日本膵・膵島移植研究会 2011年3月5日 奈良

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安波 洋一 (YASUNAMI YOHICHI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号: 00166521

(2) 研究分担者

岩本 隆宏 (IWAMOTO TAKAHIRO)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号: 20300973

(3) 連携研究者

谷口 克 (TANIGUCHI MASARU)
独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究
グループ・グループディレクター
研究者番号: 80110310