

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19864

研究課題名(和文) 糖尿病の根治を目指した免疫制御治療の新戦略

研究課題名(英文) Lifelong cure of diabetes by novel approach utilizing immune regulatory system

研究代表者

平井 敏仁 (Hirai, Toshihito)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70722693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Invariant natural killer T (iNKT)細胞は免疫制御を担当する自然免疫細胞である。我々はマウス骨髄移植実験モデルで、リポソーム化  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド(RGI-2001)と抗CD40L抗体でiNKT細胞を刺激することで、低侵襲な前処置でもドナー骨髄細胞を生着させることに成功している。本研究では糖尿病マウスに対する膵島移植モデルに本治療法を応用した。本治療下に同一ドナーからの骨髄と膵島を移植したところ、免疫抑制剤を使わずに長期間血糖値を正常範囲に維持できた。この治療を臨床応用することで、糖尿病が根治可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Invariant natural killer T (iNKT) cells are innate immune cells that have strong potential of immune regulation. We developed a novel approach that can enhance iNKT cell immune regulatory function by stimulating them with liposomal formulation of  $\alpha$ -galactosylceramide (RGI-2001) plus anti-CD40L antibody. Using this strategy for murine bone marrow transplant model, engraftment of donor hematopoietic cells was achieved even after mild preconditioning (establishment of transplant tolerance). These animals permanently accepted organ graft from the same donor without any other immune suppressants. In current research project, we attempted the same strategy in an islet transplant model of diabetic mice. RGI-2001 plus anti-CD40L antibody therapy treated mice showed long term maintenance of normal blood glucose level, suggests that this remedy can achieve lifelong cure of diabetes.

研究分野：Transplant immunology

キーワード：膵島移植 免疫寛容 iNKT細胞  $\alpha$ -galactosylceramide 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵島移植は糖尿病を根治可能な数少ない手段の一つであり、その普及が期待されている。しかしながら、最新の免疫抑制療法を用いた報告でも、3年生着率は44%から70%と芳しくなく、移植後5年まで正常血糖値を維持できる例は極めて少ない。また、移植後糖尿病をはじめとする免疫抑制療法そのものによる合併症も無視することはできない。

(2) 移植免疫寛容誘導とは、レシピエントの免疫機能に働きかけ、移植ドナー抗原に反応しない状態を作り出す手法である。一度免疫寛容が誘導されれば、移植後に免疫抑制剤を用いなくても、生涯に渡る臓器生着が得られる。この免疫寛容を誘導するための手段も種々考案されているが、確固たる方法は未だ確立していない。

(3) Invariant natural killer T (iNKT) 細胞は、その ligand である  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) で刺激されると、免疫応答を促進する Th1 サイトカインと、免疫を制御する Th2 サイトカインの両者を爆発的に産生する。我々はこれまでの研究で、リポソーム化  $\alpha$ -GalCer (RGI-2001) と抗 CD40Ligand (CD40L) 抗体を併用することで、iNKT 細胞からのサイトカイン産生を Th2 優位にシフトさせることができることを発見した。さらに、マウス骨髄移植モデルで RGI-2001 と抗 CD40L 抗体により免疫制御機能を増強すると、低侵襲な前処置でも骨髄生着が可能となることがわかった。この方法により作成されたマウスには、骨髄ドナー抗原に対する免疫寛容が成立するため、同一ドナーからの臓器を免疫抑制剤なしで生着させることができる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、膵島移植片に対する免疫寛容誘導プロトコルを樹立することである。まず、RGI-2001 + 抗 CD40L 抗体療法により誘導した骨髄ドナー免疫寛容マウスが、同一系統マウスからの膵島移植片を生着しうるか否かを検証する。さらに、骨髄移植を行わず、膵島移植のみを行った際における同治療プロトコルの効果も検証した。

## 3. 研究の方法

(1) BALB/c マウス (H2<sup>d</sup>) の腹腔内にストレプトゾシンを投与 (190mg/kg) することで糖尿病マウスを作成する。これらのマウスに 3 Gy の全身放射線照射 (Total body

irradiation; TBI) 後、主要組織適合性 (MHC) 抗原の異なるドナーマウス (C57BL/6; H2<sup>b</sup>) から採取された骨髄細胞  $2 \times 10^6$  を移入する。細胞移入後、RGI-2001 と抗 CD40L 抗体を投与する。2週間後に末梢血中のドナー MHC (H2<sup>b</sup>) 陽性血液細胞の有無を flow cytometry にて同定することで、ドナー骨髄細胞の生着を確認した (骨髄キメラの成立)。

(2) 作成された糖尿病骨髄キメラマウスの腎被膜下に、骨髄ドナーと同一の MHC 抗原を持つドナーマウスから採取した膵島を移植する。移植後は血糖値を定期的に観察。移植後 100 日経過後、ブドウ糖負荷試験で耐糖能を評価する。

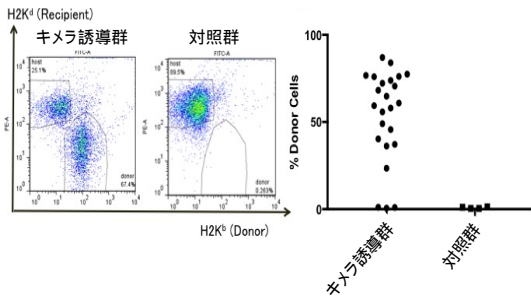
(3) 長期糖尿病改善マウスの膵島移植片を除去し、病理組織学的評価を行う。また、移植片除去後の血糖値の推移を記録した。

(4) レシピエントマウスを安楽殺して、脾臓細胞を抽出、Carboxyfluorescein succinimidyle ester (CFSE) にて標識した後、レシピエント (BALB/c; H2<sup>d</sup>)、ドナー (C57BL/6; H2<sup>b</sup>) および 3rd party (C3H; H2<sup>k</sup>) 由来の脾臓細胞で刺激し 4 日間共培養した。CFSE の減衰を flow cytometry で測定することで、各々の抗原に対する反応性を評価した。また、長期生着マウスの血清を採取、ドナー T 細胞と反応させた後、FITC-conjugated IgG で 2 次染色。Flow cytometry にてドナー特異的抗体形成の有無を評価した。

(5) 骨髄移植を用いずに RGI-2001+抗 CD40L 抗体療法の膵島移植片への直接の効果を検証した。Luciferine 遺伝子導入マウスより膵島グラフトを抽出し、糖尿病モデルマウスと同様に腎被膜下に移植した。移植後にレシピエントマウスに luciferase を投与し、膵島移植片の viability を可視化することで、拒絶反応を定量化した。

## 4. 研究成果

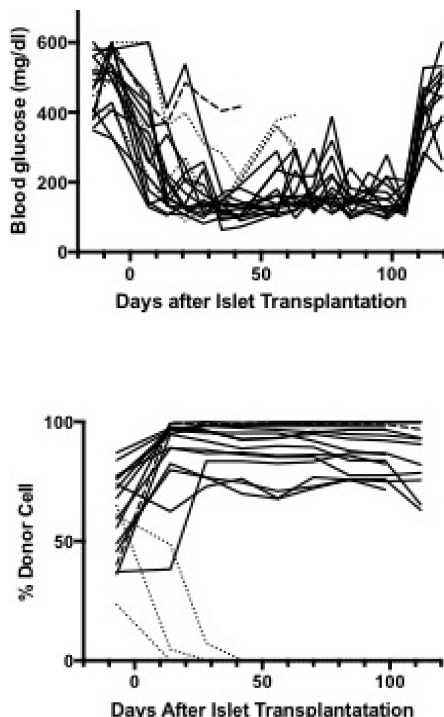
(1) 28 匹の BALB/c マウスにストレプトゾシンを投与、すべてのマウスで 1 週間後に血糖値の上昇を認めた。この糖尿病誘導マウスに 3 Gy TBI 後、C57BL/6 マウス骨髄細胞を移入した。これらのうち 24 匹には RGI-2001+ 抗 CD40L 抗体を投与 (キメラ誘導群)、4 匹は無治療とした (対照群)。24 匹中 21 匹で骨髄キメラの確立に成功した (図 1)。死亡したマウスは認めなかった。このことより、糖尿病状態であっても安全に、従来と同様の効率で骨髄キメラが誘導可能であることが示された。



**図1 末梢血単球細胞中のドナーMHC 抗原陽性細胞の flow cytometry 解析**

左; X 軸に donor MHC, Y 軸に recipient MHC を展開した dot plot の 1 例。右; ドナーMHC 陽性細胞の比率を示す。

(2) 21匹のキメラマウスのうち、18匹に同一系統ドナー (C57BL/6) からの膵島移植を行った。図2上段に移植後の血糖値の推移を示す。膵島移植後に一度も血糖値の低下を認めなかったのは1匹のみで (primary non functioning; 破線) これを除く全てのマウスで速やかな血糖値改善を認め、14匹 (74%) は100日までの観察期間中、正常血糖値を維持した (寛容成立群; 実線)。一方、3匹のマウスでは一旦改善していた血糖値が徐々に上昇した (寛容非成立群; 点線)。各群での末梢血中のドナーMHC 陽性細胞の推移を図2下段に示す。寛容成立群では血中ドナー細胞が維持されているのに対し、寛容非成立群では血糖値の上昇と平行してドナー細胞陽性率が徐々に減少していることから、血中ドナー細胞と膵島移植片機能に重要な相関があることが類推される。対照群マウスでは一度も血糖値が正常範囲に改善することはない (データ非提示)。



**図2 膵島移植後血糖値 (上段) と末梢血単**

**球中ドナーMHC 陽性細胞の割合 (下段) の推移**

実線; 寛容成立群、点線; 寛容非成立群、破線; primary non functioning。移植後100日目に移植片を摘出。

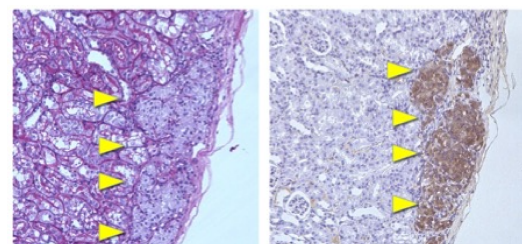
移植100日経過後、寛容群マウスの耐糖能を確認するため、ブドウ糖負荷テストを行った (図3)。血糖値の低下は正常未処置マウスと比べやや遅れるものの、2時間以内に正常範囲に改善しており、移植膵島は正常に機能しているものと考えられる。



**図3 血糖負荷試験**

2時間絶食の後、0.04mgのグルコース溶液を腹腔内投与後の血糖値推移。実線; 寛容成立群 (N=11)。点線; 正常マウス。\*P値 < 0.05 (Mann-Whitney test)

(3) 寛容群マウスから全身麻酔下に膵島グラフトを除去したところ、速やかに血糖値が再上昇したことから、移植膵島が正常に機能していたことが裏付けられる (図2)。摘出膵島の病理組織検査では細胞浸潤など拒絶を示唆する所見は認められず、インスリン染色によりインスリン産性能が確認された (図4)。

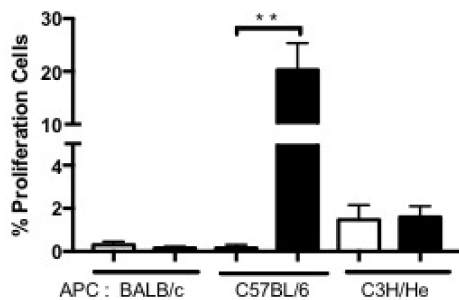


**図4 摘出膵島移植片病理組織所見**

左: HE 染色 移植膵島を腎被膜下に認める。炎症細胞の浸潤を認めない。右: インスリン染色 膵島移植片に一致してインスリン陽性細胞を認める。

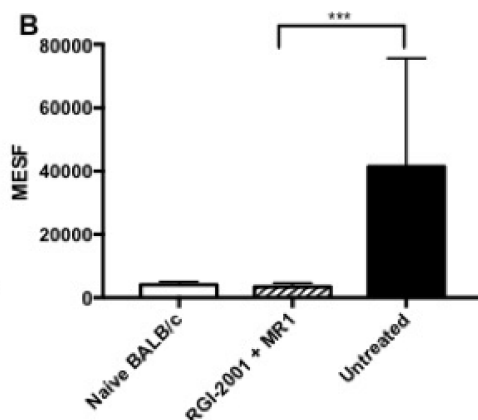
(4) 最終的に骨髄、膵島移植片のどちらも拒絶した対照群マウスの脾臓細胞は、in vitro 試験においてもドナー抗原に対する強い増殖反応を示した。それに対し、寛容成立群のマウス脾臓細胞は3rd party 抗原に対し

では対照群と同様に反応するものの、ドナー抗原に対してはほぼ無反応であった(図5)。同様に、対照群の血清中にはドナー抗原に反応するIgG抗体が同定されたのに対し、寛容成立群の血清中には陰性であった(図6)。以上より、寛容成立群は細胞性免疫、液性免疫のどちらもドナーに対する低反応性を獲得していることが示唆される。



**図5 リンパ球混合試験**

BALB/c, C57BL/6, C3H/He のそれぞれから脾臓細胞を抽出後、30 Gy の放射線を照射し、CFSE 標識したレシピエント脾臓細胞と共培養した。白棒；免疫寛容マウス (N= 5)、黒棒；対照群マウス (N= 4)、\*\* P<0.05; Mann-Whitney test。



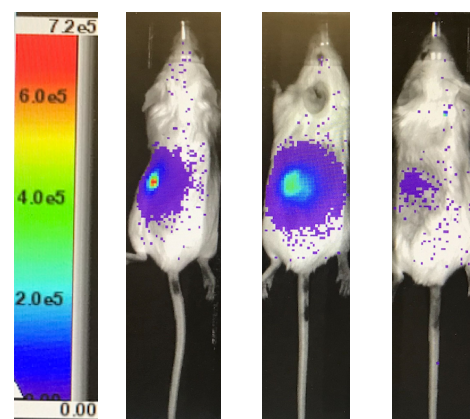
**図6 抗ドナー特異的抗体測定**

無治療正常マウス(白棒; N= 6)、免疫寛容マウス(斜線; N= 16)、対照群マウス(黒棒; N= 4)における抗ドナー抗体の力価をMESF値にて示す

(5)ここまでの結果から、骨髄細胞に対する免疫寛容が成立すれば、その後の脾臓移植片への拒絶反応は制御可能であることが示された。続いて、RGI-2001+抗CD40L抗体治療が脾臓移植片に直接及ぼす効果を検証するため、骨髄移植を介さずに直接、脾臓移植を行うプロトコルの検証を行った。本実験では脾臓移植片のviabilityをin vivoで可視化して追跡可能とするため、luciferase 遺

伝子導入マウスをドナーとして利用した。3 Gy TBI後に脾臓移植を行い、直後にRGI-2001と抗CD40L抗体を投与した。無治療群と抗CD40L抗体単剤治療群を対照群とし、移植後20日後にin vivo imaging解析を行った結果を図7に示す。驚くべきことに、RGI-2001投与群は無治療群や抗CD40L抗体療法単剤群よりも移植片からのシグナルが減衰していた。RGI-2001により、むしろ拒絶反応が惹起されたと推察される。

RGI-2001	(-)	(-)	(+)
anti-CD40L	(-)	(+)	(+)



**図7 In vivo luciferase 発光解析**

これまでの我々の研究で、骨髄移植片への免疫寛容成立において、iNKT細胞の活性化に続く調節性T(regulatory T;Treg)細胞の増殖が重要な働きを示すことがわかっている。Treg細胞は脾臓移植片の生着にも関与するはずであるが、今回の結果からはRGI-2001の単回投与では移植片生着に十分なTreg細胞の増殖が得られなかったことが示唆される。骨髄移植を回避した、より低侵襲な免疫寛容誘導プロトコルの確立のためには、さらなる解析が必要である。

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)

[学会発表](計 2 件)

神澤 太一、平井 敏仁、福田 洋典、勝俣 陽貴、石井 瑠美、宮入 聡嗣、池宮城 雅子、奥見 雅由、石井 保之、田邊 一成、Islet Allografts Survive Permanently by Inducing Hematopoietic Chimerism with Activating Invariant Natural Killer T Cells and CD40-CD154 Signal Blockade、アメリカ移植学会 2017年

神澤 太一、平井 敏仁、福田 洋典、勝俣 陽貴、石井 瑠美、宮入 聡嗣、池宮城

雅子、奥見 雅由、石井 保之、田邊 一成、  
Islet Allografts Survive Permanently by  
Inducing Hematopoietic Chimerism with  
Activating Invariant Natural Killer T  
Cells and CD40-CD154 Signal Blockade、第  
45回日本免疫学会学術集会、2016年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平井 敏仁 (HIRAI, Toshihito)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70722693

### (2) 研究協力者

石井 保之 (ISHII, Yasuyuki)

Robert S Negrin

Evertt Meyer

Magdiel Perez Cruz