

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19902

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子発現解析に基づいた膵島移植片前処置による長期生着効果の誘導

研究課題名(英文) Ex-vivo Mitomycin-C pretreatment induced lower immunogenic potential of islets via suppressing secretion of multiple chemotaxis factors.

研究代表者

佐藤 直哉 (SATO, Naoya)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90622332

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)：本研究では移植前Mitomycin-C(MMC)処置による移植膵島片の生着延長メカニズムを網羅的遺伝子発現解析の手法で解明した。MMC処置膵島では免疫細胞遊走因子(複数のサイトカインを含む)の遺伝子発現が有意に抑制され、その妥当性は膵島培養の上清蛋白測定や免疫細胞遊走実験により示された。また膵島培養液に対する単球の遊走はMMC処置群において有意に抑制され、MMC処置によるサイトカイン分泌抑制による免疫原性低下が生着延長に関わることが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study to investigate a mechanism of islet graft engraftment by ex vivo mitomycin C (MMC) pretreatment, using comprehensive gene expression analysis of MMC-treated islets. The gene expression analysis identified significant downregulation of multiple genes encoding proinflammatory mediators with chemotactic activity, including multiple chemokines and peptidases. The result was validated by quantification of their proteins in islets culture supernatants. Moreover, we showed suppression of leukocyte-chemotactic activity of MMC-treated islets in vitro. The ex vivo 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：消化器外科学

キーワード：膵島移植 Mitomycin-C 生着延長 免疫抑制 マイクロアレイ サイトカイン 免疫原性低下

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は、細胞機能が廃絶した1型糖尿病において血糖コントロールが困難な重症患者を対象とし、血糖応答性インスリン分泌の回復を目的とした細胞置換療法である。ドナーより提供された膵臓から膵島分離用酵素を用いて膵島組織のみを分離し、移植膵島を局所麻酔下で経皮経肝的にレシピエント門脈内に輸注する方法で、膵臓移植と比較して極めて低侵襲であるという優位性を有している。膵島移植により重症1型糖尿病患者は血糖応答性インスリン分泌能を長期的に獲得し、重症低血糖発作から開放されることが明らかにされたが、複数回の移植を施しても長期的なインスリン離脱は困難であることが課題とされている。膵島移植の効果を阻害する要因は、膵島分離過程(膵臓膨化消化・純化)で生じる細胞ストレスによる膵島の喪失やviabilityの低下、移植後の補体系/凝固系の活性化と自然免疫応答による炎症反応、不十分な免疫抑制または免疫抑制剤自身による膵島障害、自己免疫反応の再活性化などがあげられる。したがって、膵島毒性を有する免疫抑制剤を用いることなく、移植細胞・組織への宿主免疫応答を抑制しうるプロトコルが実現すれば、膵島移植の成績を改善すると期待される。

これまで、我々は、分離膵島に移植前 Mitomycin-C (MMC) 処置を付加することで免疫抑制剤を投与せずに移植膵島の長期生着が得られることを報告してきた。しかし、MMC 処置による膵島グラフト生着効果のメカニズムは明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、MMC 処置がもたらす膵島の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、免疫抑制剤の非使用下での膵島グラフト生着延長メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

実験 ; 分離したラット膵島を 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。

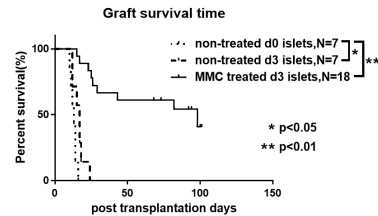
実験 ; 両群において新鮮膵島と3日間培養膵島を採取(各 n=3)し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現差解析を行い、そのデータに基づき生物学的機能解析を行った。

実験 ; 遺伝子解析の妥当性を invitro、in vivo 実験で検証した。膵島培養液中のタンパク発現を ELISA 法により評価し、さらにラット膵島培養液へのマウス単球の遊走能を評価した。また、膵島移植片に浸潤した免疫細胞を免疫組織学的染色にて評価した。

4. 研究成果

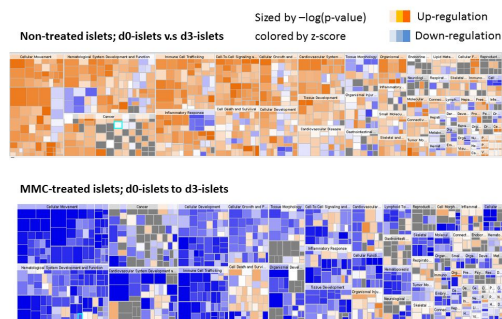
結果 ; ラット膵島のマウスへの免疫抑制剤非使用移植実験の結果、MMC 処置膵島の平均生着期間は非処置膵島と比較して有意に延長した(下図)。

Graft survival time of MMC- and non-treated islet xenograft (Wistar rat islets to B6 mice)



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) で発現増強を認めしたが、MMC 処置膵島ではいずれも発現が抑制されていた(下図)。

Bio-function analysis of gene alteration in non-treated and MMC-treated islets

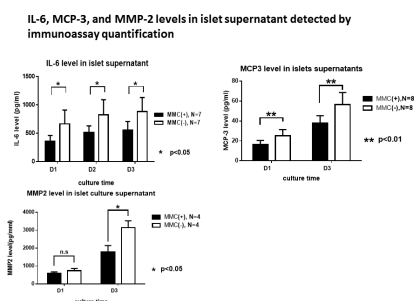


これらの遺伝子群の詳細を検討し、膵島より分泌される免疫細胞遊走因子(サイトカイン・ペプチダーゼ)が MMC 処置により複数で同時に抑制されていることが注目され、発現差の大きい IL-6、MCP-3、MMP2 を検証実験の候補として選定した(下表)。

Synchronous suppression of cytokine and peptidase genes by ex-vivo MMC treatment

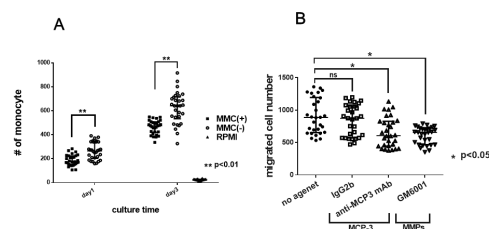
	30min cultured islets		1-Day cultured islets		3-Day culture islets	
	Symbol	Gene Name	FC	Symbol	Gene Name	FC
cytokines	IL6	interleukin6	9.041	CXCL10	chemokine ligand10	4.508
	CCL13	chemokine ligand13	7.102	WNT5A	integrin alpha family, member 5A	-2.005
	CXCL10	chemokine ligand10	5.857	IL11	interleukin11	-3.896
	CXCL2	chemokine ligand2	4.928			
	CXCL3	chemokine ligand3	4.390			
peptidase				ADAM6	ADAM metallopeptidase domain6	3.812
				C3	complement component 3	-3.454
				ADAM8	ADAM metallopeptidase domain8	11.024
				LOC299690	LOC299690	3.782
				CASP1	caspase 1, apoptosis-related cytosolic peptidase	-2.200
				MMP9	matrix metallopeptidase 9	-2.406
				PLAU	plasminogen activator, urokinase	-2.507
				MMP7	matrix metallopeptidase 7	-3.203
				MMP14	matrix metallopeptidase 14	-3.052
				C3	complement component 3	-4.526
			MMP2	matrix metallopeptidase 2	-4.721	
			CTSC	cathepsin C	-4.063	
			GZMB	GZMB	-4.807	

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。



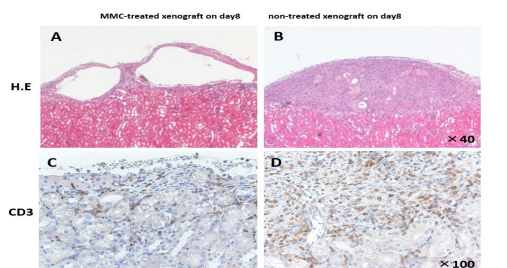
また、ラット膵島培養液に対するマウス単球の遊走能は、MMC 処置群において有意に抑制された。さらに非処置膵島培養液に抗 MCP-3 モノクローナル抗体もしくは MMP 阻害剤を用いると単球の遊走能は有意に抑制された(下図)。これらの所見から、MMC 処置膵島ではサイトカイン分泌が抑制され、宿主自然免疫応答が軽減されることが示された。

Mouse monocyte chemotaxis activity to MMC-treated or non-treated islets culture supernatant



つぎに、糖尿病マウスの腎被膜下に移植された膵島への免疫細胞数(CD3)浸潤は、MMC 処置膵島で有意に減少することが示され(下図)局所免疫不応答の誘導が示唆された。

Histology of representative Ws rat islets taken from C57BL/6 recipient on day 8



本研究結果をまとめると、膵島グラフトは分離過程による細胞ストレスを受け、複数の免疫細胞遊走因子を分泌する。これらは宿主免疫応答を惹起し、長期的な生着を妨げる。その一方で、移植前培養期間に MMC 処置を付加することにより、膵島からの免疫細胞遊走因子の分泌が抑制され、移植グラフトの免疫原

性が低下することが明らかになった。その結果として、局所免疫反応の不応答が誘導され、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ものと考えられた。

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3件)

佐藤直哉, 穴澤貴行, 後藤満一.
膵島移植前 Mitomycin-C 処置によるグラフト生着延長効果. Organ Biology, 2016, 22(2): 117-122.

Sato T, Marubashi S, Kenjo A, Tsuchiya T, Kimura T, Sato N, Watanabe J, Tasaki K, Hashimoto Y, Wada I, Gotoh M.
M1 macrophage infiltrations and histological changes in the liver after portal vein embolization using fibrinogen and OK432 in the rat. Cell Immunol. 2016 May; 303: 66-71

Kenjo A, Sato T, Marubashi S, Saito T, Tsuchiya T, Kimura T, Sato N, Takahashi A, Ohira H, Gotoh M.
Role of intratumoral infiltrating macrophages after transarterial immunoembolization for hepatocellular carcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2016 May; 23(5):298-304

(学会発表)(計7件)

Sato N, Anazawa T, Haga J, Kenjo A, Marubashi S, Kimura T, Wada I, Mori T, Gotoh M. Comprehensive gene analysis on ex-vivo Mitomycin-C treatment as a potential protocol for inducing unresponsiveness to islet engraftment-harmonised suppression of multiple chemotaxis factors-. IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress. 2015.11.15-19 Melbourne, Australia

佐藤直哉, 穴澤貴行, 芳賀淳一郎, 見城明, 木村 隆, 佐藤 哲, 渡邊淳一郎, 菊池智宏. 移植前処置による膵島の免疫細胞遊走因子の抑制効果 グラフト生着延長のメカニズム -. 第 42 回日本膵・膵島移植研究会 シンポジウム 2015.3.6 東京

佐藤直哉, 芳賀淳一郎, 穴澤貴行, 見城明, 丸橋 繁, 木村 隆, 佐藤 哲, 渡邊淳一郎, 菊池智宏, 後藤満一. Inhibition of cytokine secretion from islets by ex-vivo Mitomycin-c treatment. 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-18 浜

松

佐藤直哉, 見城 明, 丸橋 繁, 木村 隆, 渡邊淳一郎, 後藤満一. 分離膵島への移植前 Mitomycin-C 処置が実現する複数の免疫細胞遊走因子の分泌抑制. 第 43 回日本膵・膵島移植研究会 2016.3.4-5 広島

佐藤直哉, 芳賀淳一郎, 穴澤貴行, 見城明, 丸橋 繁, 木村 隆, 渡邊淳一郎, 後藤満一. 分離膵島の Mitomycin-C 前処置による生着延長メカニズム-複数の免疫細胞遊走因子の分泌抑制をもたらす局所免疫不応答-. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016.4.14-16 大阪

佐藤直哉, 芳賀淳一郎, 穴澤貴行, 見城明, 丸橋 繁, 木村 隆, 渡邊淳一郎, 後藤満一. Gene expression profile in Mitomycin-C treated islets- enhancing graft survival-. 第 71 回日本消化器外科学会 2016.7.14-16 徳島

佐藤直哉, 見城 明, 丸橋 繁, 木村 隆, 渡邊淳一郎, 武藤 亮, 西間木淳. Mitomycin-C 処置による膵島サイトカイン分泌抑制に關与する上流制御因子の解明. 第 52 回日本移植学会 2016.9.7-9 東京

〔図書〕(計1件)

佐藤直哉, 穴澤貴行, 後藤満一. 臨床膵島移植の現状. 川口義弥編. 月刊糖尿病. 医学出版. 2015. 63-68.

〔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

佐藤 直哉 (SATO, Naoya)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 9 0 6 2 2 3 3 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし