

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04270

研究課題名(和文) 膵島細胞症様変化に着目した糖尿病に対する次世代細胞療法の創成

研究課題名(英文) Creation of next-generation cell therapy for diabetes with focus on nesidioblastic change

研究代表者

小林 隆 (Kobayashi, Takashi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：40464010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性膵炎組織でみられる膵島細胞症様変化ではストレス蛋白発現が認められ、薬剤障害モデルにおいても同様の蛋白が誘導されることが確認された。ストレス蛋白は移植組織片の生着を促進することが報告されているが、ストレス関連蛋白が膵島細胞症様変化を呈した移植片の生着にも関与している可能性は高いことが裏付けられた。また、膵島生着後の移植膵島の再生促進、血糖改善効果の可能性のある薬剤としてGLP-1の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は、小児から高齢者まで幅広い年齢層に発生する難治性の疾患です。脳死ドナーの膵臓から分離された膵島細胞移植治療は、糖尿病の根治的な治療として注目されており、膵島移植治療によって、これまでのインスリン注射や食事療法から解放され、死の危険性もある低血糖発作も予防することができます。本研究の成果によって、脳死ドナー不足が深刻な本邦において、少ない膵島細胞からでも十分な効果を発揮する膵島細胞移植治療の開発が可能となります。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that stress protein expression was nesidioblastic changes observed in chronic pancreatitis tissue, and that similar proteins were also induced in drug induced pancreatitis models. Although stress proteins have been reported to promote graft engraftment, it is likely that stress-related proteins are also involved in graft engraftment with nesidioblastic changes. In addition, the usefulness of GLP-1 was suggested as a drug that may promote the regeneration of transplanted islets after engraftment of islets and improve blood glucose.

研究分野：移植外科学

キーワード：膵島移植 細胞移植 糖尿病 再生医療 移植外科学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は、若年発症を特徴とする難治性自己免疫疾患である。近年、エドモントン・プロトコールと呼ばれる技術革新により、「膵島細胞移植」が同疾患に有望な根治療法として注目されている(Shapiro N et al. N Eng J Med 2000)。膵島移植は死体膵移植に比べ圧倒的に低侵襲で合併症も少ないメリットがあるが、患者がインスリン離脱するには、複数名のドナーを用いた移植を施行しなければならず、ドナー不足が深刻な本邦では非現実的である。最近では膵ドナー不足を解消する方法として、異種ドナー(ブタ)、iPS細胞/間葉系幹細胞、カプセル化膵島等による次世代型の膵島移植法が報告されているが、ウイルス感染や癌化・生着期間の不足により臨床応用はまだまだ困難である。1型糖尿病は、長年にわたる苦痛と膨大な医療費を要する疾患である。最小限のドナー数で確実に患者を救うことができる、新たなアプローチによる膵島移植の開発が切に望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵島細胞移植の生着機序の解明を行い、効率的な糖尿病移植治療法開発の基盤を構築することである。最近、申請者は“障害膵を用いた膵島細胞移植において、極めて少量の膵島でもインスリン離脱が可能になる症例が存在する(図1)、それらは組織学的に nesidioblastic change と呼ばれる膵島細胞症様変化を示す、nesidioblastic change とインスリン分泌は正の相関を示す”、という新規知見を得た。これらの研究成果をもとに、nesidioblastic change がインスリン分泌細胞の生着を促進するストレス蛋白制御機構および免疫学的機序を明らかにし、肝内生着率の促進のための膵島移植療法を探ることを目的とした。

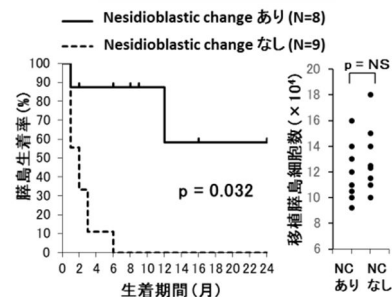


図1 200,000個以下での自家膵島移植後生着率

3. 研究の方法

(1) ヒト移植膵組織におけるストレス蛋白の観察

ストレス蛋白は移植組織片の生着を促進することが報告されており(Masuda Y et al. PLoS One 2015)、同関連蛋白が Nesidioblastic change を呈した移植片の生着にも関与している可能性は高い。本研究では、ヒト移植膵や慢性膵炎のストレス蛋白を免疫染色で観察し、移植後の nesidioblastic change に最も強く関与する因子を検討する。

(2) ヒト膵島組織における細胞分化度の検証

最近、外分泌性の膵導管細胞は、培養レベルでは膵島細胞に移行することが可能であると報告された(Assouline-Thomas et al. Differentiation 2015)。しかしながら生体内で膵導管細胞や腺房細胞が膵島に移行する過程を詳細に検討した報告はない。そこで本研究では、nesidioblastic change の膵島細胞への分化誘導過程を明らかにする目的で、膵細胞誘導転写因子を RT-PCR、ウエスタン・ブロット、免疫染色で検討する。

(3) 膵島移植モデル作成とその生着メカニズムの検証

動物モデルの解析を行う。ストレプトゾトシン(STZ)誘発膵島障害ラットは、回復過程で nesidioblastic change を生じることが知られている。同モデルを応用し、STZ 誘発膵島傷害ラットから膵島組織をコラーゲン灌流・遠心分離法で回収して、経門脈的に同種移植する。移植膵島の生着率を動物実験で検証する。

(4) 膵島移植モデルの肝内リンパ球動態の解析

nesidioblastic change が豊富な膵島細胞を分離して膵島移植を行い、レシピエント動物の肝灌流液中の制御 T 細胞をフローサイトメトリー解析する。nesidioblastic change が免疫細胞に与える影響を比較検討する。具体的には、膵島移植前と後で経時的にリンパ球を回収し、Th17+CD4+T 細胞、INF 産生 naive T 細胞、TNF 産生 helper T 細胞、制御性 T 細胞を解析する。

(5) 膵島移植モデルの膵島細胞培養実験

培養レベルで膵島細胞の nesidioblastic change を誘導することによって、これまで述べたヒト・動物実験の解析結果との比較検討を行う。具体的には、STZ モデルから分離した nesidioblastic change が豊富な膵島を 24-48 時間培養後、ストレス蛋白を解析する。

(6) ヒト膵島移植後組織の解析

ミネソタ大学 Sutherland 教授との共同研究で、プロトコール針生検時の残余検体を用いて、肝内リンパ球と脂質動態、移植膵島新生血管、ストレス蛋白と調節因子を解析する。申請者らの施設での自家膵島移植の膵島分離については院内生命科学医療センター細胞プロセッシング室(GMP 規格・Grade B 基準)を使用する。

4. 研究成果

(1) ヒト移植膵組織におけるストレス蛋白の観察

慢性膵炎組織で生じた nesidioblastic change では、ストレス蛋白が強く発現していることを確認した(図2)。ストレス蛋白は移植組織片の生着を促進することが報告されているが、ストレス関連蛋白が nesidioblastic change を呈した移植片の生着にも関与している可能性は高いことが裏付けられた。

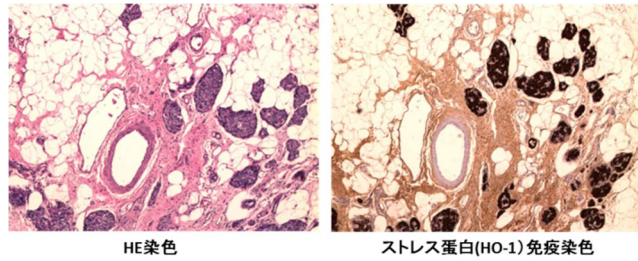


図2 ヒト移植膵組織におけるストレス蛋白の観察

(2) ヒト膵島組織における 細胞分化度の検証

生体内で膵導管細胞や腺房細胞が膵島に移行する過程を検討した。nesidioblastic change の膵島細胞への分化誘導過程を明らかにする目的で、膵 細胞誘導転写因子を RT-PCR, ウェスタン・ブロット、免疫染色で検討したが、nesidioblastic change と 細胞分化度との明らかな相関は認められない。

(3) 膵島移植モデル作成とその生着メカニズムの検証

ヒトを対象にした初年度実験の普遍性を確かめる目的で、動物モデルの解析を行った。研究当初はラットを用いて実験を進める予定であったが、ヒトとの違いが大きく、大動物(ブタ)に変更して実施した。ストレプトゾトシン(STZ)誘発膵島障害モデルでの nesidioblastic change を確認した。動物をラットからブタに変更し、STZ 誘発膵島傷害モデルから膵臓を摘出し(図3)、膵島組織をコラーゲン灌流・遠心分離法で回収して経門脈的に同種移植した。移植膵島の生着を確認し、さらに耐糖能の改善についても確認した。nesidioblastic change を示す膵島細胞でより生着改善効果が確認された。また、生着膵島細胞の膵 細胞マーカーの再現性については一定の傾向は認められなかった。

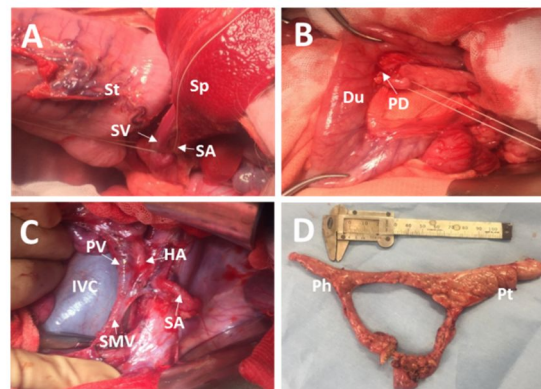


図3 ブタ膵全摘の手術手技 A:膵臓処理 B:膵管処理 C:膵全摘後 D:摘出膵

(4) 膵島移植モデルの肝内リンパ球動態の解析

STZ 誘発膵障害ブタから nesidioblastic change が豊富な膵島細胞を分離して膵島移植を行い、レシピエント動物の肝灌流液中 の制御T細胞をフローサイトメトリー解析を実施した。膵島移植前と後で経時的にリンパ 球を回収し解析した結果、制御性T細胞の分画が極めて微量であり、症例によっては解析不能であった。採取する灌流量を再検討するなどの対策にてリンパ球の回収率は改善したものの十分な解析には至らなかった。

(5) 膵島移植モデルの膵島細胞培養実験

動物実験モデルから分離した nesidioblastic change が豊富な膵島を 24-48 時間培養後、ストレス関連蛋白についてウェスタン・ブロット解析を実施し、各種増殖シグナルの阻害剤各シグナル阻害剤 (IL-1/IL-6/COX2 阻害剤、抗酸化剤、TNF- /カスパーゼ阻害剤、ATM/ATR 阻害剤) による検討を実施した。抗酸化剤によるストレス蛋白発現の増加は抑制されたが、その他の阻害剤による発現抑制効果は認められなかった。

(6) ヒト膵島移植後組織の解析

海外の共同研究機関からの検体入手が困難な状況となったため、大動物実験に変更し大動物で同様の検討を行った。移植後膵島の再生を期待して追加実験として実施した GLP-1 投与モデルにおいて移植後膵島の増大傾向を認めた。また、膵島移植後の血糖値の推移についても検討を行い膵島移植後の血糖値の改善効果を認めた(図4)。

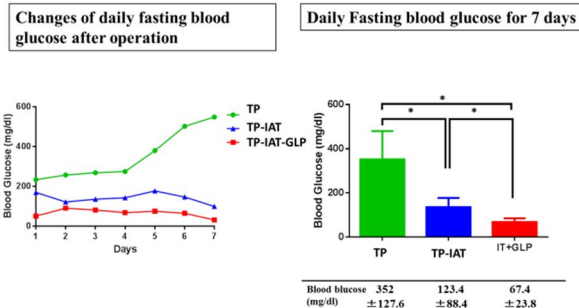


図4 ブタ自家膵島移植後の血糖値 GLP-1 投与モデル (TP-IAT-GLP)で最も血糖値の改善効果を認めた

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 張 セイクン	4. 巻 132
2. 論文標題 ブタ自家臍島移植モデルの作製	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 新潟医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 139-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Takashi, Miura Kohei, Saito Keita, Tasaki Masayuki, Saito Kazuhide, Sakata Jun, Takizawa Kazuyasu, Katada Tomohiro, Hirose Yuki, Yuza Kizuki, Ando Takuya, Nagahashi Masayuki, Kameyama Hitoshi, Wakai Toshifumi	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Inguinal Herniation After Living Donor Kidney Transplantation: A Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1345(19)31864-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2020.02.131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miura Kohei, Kobayashi Takashi, Prason Pankaj, Miura Yohei, Hirose Yuki, Katada Tomohiro, Takizawa Kazuyasu, Nagahashi Masayuki, Sakata Jun, Wakai Toshifumi	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Successful Surgical Intervention for Recurring Severe Hepatic Encephalopathy Caused by Portosystemic Collaterals After Living-Donor Liver Transplantation: A Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1345(19)31806-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2020.01.156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi T., Miura K., Ishikawa H., Soma D., Ando T., Yuza K., Hirose Y., Katada T., Takizawa K., Nagahashi M., Sakata J., Kameyama H., Wakai T.	4. 巻 50
2. 論文標題 Long-term Follow-up of Laparoscope-Assisted Living Donor Hepatectomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 2597 ~ 2600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2018.03.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Takashi, Kubota Masayuki, Kinoshita Yoshiaki, Arai Yuki, Oyama Toshiyuki, Yokota Naoki, Saito Koichi, Matsuda Yasunobu, Osawa Mami	4. 巻 35
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor/heme oxygenase-1 axis is involved in chemoresistance to cisplatin and pirarubicin in HepG2 cell lines and hepatoblastoma specimens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1369 ~ 1378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04563-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 三浦宏平、小林 隆
2. 発表標題 同種膵島移植実験を見据えたブタ1型糖尿病モデルおよび自家膵島移植モデルの確立
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Kobayashi, Kohei Miura, Takuya Ando, Kizuki Yuza, Yohei Miura, Koji Toge, Tomohiro Katada, Yuki Hirose, Kazuyasu Takizawa, Jun Sakata, Masayuki Nagahashi, Hitoshi Kameyama, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Exenatide administration enlarges transplanted islets and improves endocrine function in a swine islet autotransplant model
3. 学会等名 16th Congress of the Cell Transplant and Regenerative Medicine Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松田 康伸 (Matsuda Yasunobu) (40334669)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三浦 宏平 (Miura Kohei) (70733658)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	窪田 正幸 (Kubota Masayuki) (50205150)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究協力者	石川 博補 (Ishikawa Hirosuke)		