

令和元年5月15日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16512

研究課題名(和文) 移植前Mitomycin-C処置ドナー樹状細胞を介した免疫寛容誘導の解明

研究課題名(英文) Ex-vivo pretreatment of islets with Mitomycin-C have a potential to induce specific immune response for peripheral tolerance

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：【研究目的】移植前Mitomycin-C(MMC)処置による膵島グラフトの長期生着は、免疫抑制剤なしに達成され、ドナー特異的免疫寛容が関与する可能性が示される。本研究では、MMCを用いた移植前処置によるドナー特異的免疫寛容誘導について評価した。【結果】長期間生着したMMC処置膵島グラフトに対する宿主リンパ球は限局性に集簇し、中心にCD3陽性T細胞、辺縁部にCD45R陽性B細胞が極性をもって局在していることが明らかとなった。【結論】MMC処置移植グラフトに対する宿主免疫応答は、拒絶される非処置移植グラフトとは異なり、特徴的な免疫細胞の集簇として観察され、末梢性免疫寛容に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植後免疫抑制剤を加えずに、移植前処置のみでグラフトの長期生着をもたらすプロトコルの確立は、膵島移植のみならず移植医療の究極的な目標である。我々の既報ではMMC処置によるSublethal cell stressは細胞死を回避し、免疫応答の抑制により膵島移植片の生着率の改善をもたらしている。これは移植前処置における理想的な免疫抑制モデルとなる可能性を秘めており、この細胞死の回避と免疫寛容メカニズムを解明する事により、最適な移植前処置の確立と膵島移植成績の向上へつながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Introduction: Our previous study demonstrated that ex-vivo Mitomycin-C(MMC) pretreatment of islets reduced immunogenicity, enhancing graft survival without immunosuppression. The aim of this study is to investigate an immunological mechanism to enhance graft survival of MMC-treated islets. Method: Isolated islets with MMC pretreatment were implanted to renal subcapsular space of diabetic mice. Immune response to xenograft in over-100-days after grafting was evaluated by histological analysis. Result: Histological and immunohistochemical analyses of the implant site revealed that infiltration of CD3-positive T cell was decreased in MMC-treated islets in early phase after transplantation. In all mice survived over-100-days, CD3-positive T cell aggregation surround by CD45R-positive B cell was found near xenograft. Conclusion: Ex-vivo MMC pretreatment of islets reduced early phase immune response to xenograft and induced characteristic immune response in peripheral transplantation site.

研究分野：膵島移植

キーワード：膵島移植 免疫寛容 preconditioning Mitomycin-C

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

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型糖尿病患者において、無自覚性低血糖発作を伴う血糖コントロールが困難な重症症例に対し、血糖応答性インスリン分泌の回復をもたらすβ細胞置換療法である。膵島移植は膵臓移植と比較して低侵襲であり、理想的な移植治療としての確立が期待されるが、臨床膵島移植の課題は長期生着の改善にある。膵島移植後のインスリン離脱率は1年目では80%であるが、移植後5年では10%以下に低下する(NEJM 343:230-238,2000)。それは、①膵島分離過程で生じる細胞ストレスによる cell viability 低下、②移植後早期障害とそれに引き続き惹起される宿主免疫応答、③免疫抑制剤による細胞障害、など複合的な要因により移植片の大半が喪失されるためであると理解される。したがって免疫抑制剤を用いることなく、移植後早期障害グラフトが惹起する宿主免疫応答を抑制できれば、膵島移植の成績を向上させる極めて有効なアプローチとなりうる。

我々はこれまでに、移植前 Mitomycin-C (MMC) 処置によりラットからマウスの異種移植実験系において、免疫抑制剤を要せずに約半数で永久生着が得られることを示した(Transplantation 76:65-71, 2003)。さらに、MMC 処置による生着延長のメカニズムとして膵島から分泌されるサイトカインが複数抑制されることを明らかにし、MMC 処置による膵島の免疫原性低下が機序の一端をなしていると考えられた。しかし、MMC 処置によるグラフト生着が、免疫抑制剤を用いずに達成される機序の解明には、獲得免疫応答に至る過程での **ドナー特異的免疫寛容の誘導の関与が予想される**。そこで我々は膵島樹状細胞に着目し、移植前 MMC 処置により膵島樹状細胞が免疫寛容性の形質変化を獲得することが生着に関与すると仮説をたて、その検証を行った。

2. 研究の目的

本研究は、MMC を用いた移植前膵島処置による膵島内樹状細胞の形質変化 (**tolerogenic dendritic cells、以後 tol-DC と略**) を介する **ドナー特異的免疫寛容の誘導** について解明する。

3. 研究の方法

MMC 処置によるドナー樹状細胞の phenotype と機能を明らかにするために、研究期間内に研究項目を計画した。

MMC 膵島内樹状細胞の抽出と表現型および機能解析

磁気細胞分離装置 (auto-MACS) を用いて分離膵島内の組織樹状細胞を抽出する。

MMC 処置膵島由来の樹状細胞の phenotype 解析を行う。

Flow cytometry をもちいて、MMC derived DC (MMC-DC) の phenotype を明らかにする。特に、tol-DC を特徴づける Fcr、TLRs, PD-L1, CCR7 などの発現亢進、もしくは MCH-、CD86 の発現低下の有無に着目する。

MMC-DC の細胞内サイトカインの測定

MMC-DC 内のサイトカインを測定し、Treg 誘導に関連のある IL-10、TGF-、IDO といったサイトカイン発現の有無を評価する。

MMC 処置膵島グラフトに対する宿主免疫応答の解析

糖尿病マウスの腎被膜下に MMC 処置ラット膵島を移植する動物実験モデルにおいて、長期間生着した個体でのグラフトへの免疫応答を免疫組織学的染色にて評価した。

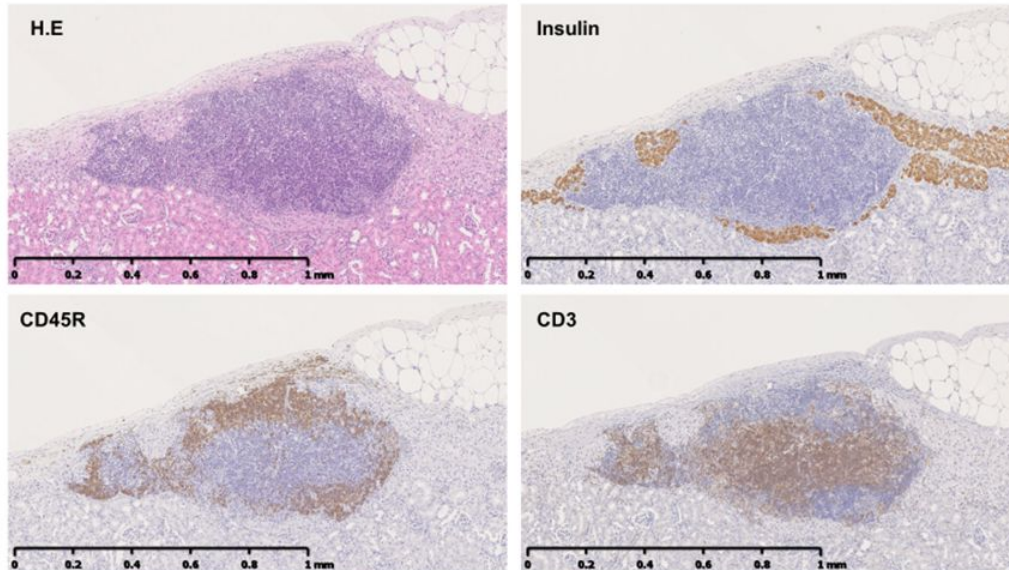
4. 研究成果

MMC 膵島内樹状細胞の抽出

膵島内の樹状細胞を Magnetic cell sorting system で分離することを試みたが、評価可能な樹状細胞を分離することはできなかった。

MMC 処置膵島グラフトに対する宿主免疫応答の解析

膵島移植後 100 日間の血糖正常化を達成した個体 (n=4) において生着した膵島を確認した (インスリン染色)。また、移植グラフト周囲にはリンパ球が限局性に集簇し、CD3 および CD45R 染



色では中心に CD3 陽性 T 細胞、辺縁部に CD45R 陽性 B 細胞が局在していた (図 1)。
 図 1 : 長期生着膵島グラフトにおける宿主免疫応答の特徴

5 . 主な発表論文等

Sato N, Haga J, Anazawa T, Kenjo A, Kimura T, Wada I, Mori T, Marubashi S, Gotoh M.:
 Ex vivo Pretreatment of Islets with Mitomycin C: Reduction in Immunogenic Potential of
 Islets by Suppressing Secretion of Multiple Chemotactic Factors. Cell Transplant. 2017
 Aug;26(8):1392-1404

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Naoya Sato, Akira Kenjyo, Takashi Kimura, Ryo Okada, Terushige Ishigame, Yasuhide Kofunato, Junichiro Watanabe, Makoto Muto, Atsushi Nishimagi, Mitsukazu Gotoh, Shigeru Marubashi. Ex-vivo pretreatment of islets with Mitomycin-C have a potential to induce specific immune response for peripheral tolerance. American Transplant Congress 2018 02.-06 .June 2018 Seattle, USA
2. 佐藤直哉 岡田良 石亀輝英 小船戸康英 渡邊淳一郎 武藤亮 鈴志野聖子 月田茂之 木村隆 見城明 志村龍男 丸橋繁移植前 Mitomycin-C 処置に対する末梢性免疫寛容性免疫応答の検討 第 54 回 日本移植学会 10 月 3 日-5 日 2018 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

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。