

平成22年 5月22日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19209045

研究課題名（和文） 肝幹細胞を利用した糖尿病治療戦略

研究課題名（英文） Therapeutic Strategy for Diabrtes mellitus by Hepatic Stem cell

研究代表者

高山 忠利（TAKAYAMA TADATOSHI）

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30280944

研究成果の概要（和文）：I型糖尿病は、膵β細胞の減少が本態の疾患であり、この減少に基づきインスリン投与を生涯必要とする。自己や近縁者の細胞をインスリン産生細胞へ分化させ、長期間レシピエントに拒絶されなければ、インスリン治療から開放される夢の治療といえる。骨髄キメラモデルを作成し、個体の全般的な免疫機能を保ちつつ該当移植抗原に対する免疫応答のみを抑制した状態の誘導を効率化するドナー特異的免疫寛容のモデルを作成した。これは、免疫抑制剤を用いずに移植片を生着させる新たな方法として注目され長期に移植細胞や臓器が生着することを目的としている。レシピエント内にドナー由来細胞が存在するキメリズムの状態は、ドナー特異的免疫寛容の誘導の一手段であり、キメリズムの形成と維持により、移植片を長期に生着させることが可能となる。もうひとつの目的としてキメリズムおよび移植片の生着の維持には免疫担当細胞としての脾臓細胞が有用であり、MHC が一部合致する細胞の存在により、特異的免疫寛容が維持されることを証明した。

研究成果の概要（英文）：The development of effective immunosuppressants has dramatically improved both graft and patient survival rates in organ transplantation, and has contributed to advances in medical transplantation during the past few years. Inducing donor-specific tolerance (DST) is widely believed to be the most effective solution to these problems. Chimerism is viewed as an attractive approach to inducing DST, and many studies of this phenomenon have been published. A mixed chimera can be created by transplanting bone marrow (BM) from histoincompatible donor mice to lethally-irradiated recipient mice, together with BM that is histocompatible with the recipient mice, so that the recipient haematopoietic cells can be partially replaced by donor-compatible cells. Compared to an allochimera, a mixed chimera is more stable and less susceptible to the lethal BM aplasia associated with BM graft rejection. We have focused on using splenocytes as a source of cells for establishing tolerance, in view of their availability for use in clinical practice. Splenocytes are an attractive source of cells with which to develop chimerism because they are a rich source of lymphocytes. In the current study, we verified the hypothesis that splenocytes containing abundant immunocytes are effective for maintaining chimerism and improving long-term graft survival in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,100,000	5,430,000	23,530,000
2008年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000

年度			
年度			
総計	37,200,000	11,160,000	48,360,000

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵島移植、膵β細胞、PDX-1、インスリン

1. 研究開始当初の背景

肝細胞の可塑性に着目し、In vivoにおいて、肝細胞からインスリン産生細胞へ分化させる方法を開発することが目的である。肝細胞に対するPdx-1遺伝子導入によるインスリン産生能の獲得についてはすでに報告されているが、本研究では臨床応用に向けたインスリン産生能の長期維持を目的としたものであり、肝細胞の門脈血流遮断、外分泌機能の廃絶を行うことによって、肝細胞の恒久的なラ氏島β細胞への形質転換を狙ったものである。

2. 研究の目的

(1) 糖尿病治療遺伝子の作成、発現の検討

膵ラ氏島移植は臨床応用され、一定の成績が報告されるようになってきたが、ドナー不足の問題より、日本ではラ氏島移植の恩恵にあずかれる患者はほとんどいないのが現状である。自己の細胞を採取してインスリン産生細胞へ分化させて体内に戻す治療、あるいは、自己の組織をインスリン産生細胞へ分化させる治療が実現できればこの問題は解決する。

最初に、肝細胞の可塑性に着目し、In vivoにおいて、肝細胞からインスリン産生細胞へ分化させる方法を開発することが目的とする。次に他家よりの細胞移植によりインスリン発現細胞を免疫抑制剤なしに長期間生着させることに2面より外科的な糖尿病に対する戦略を確立することを目的とする。

(2) 脾臓細胞によるキメラ細胞の置換とドナー特異的免疫寛容の維持の検討

研究の目的

免疫抑制剤を用いずに、一度生着した移植片を長期に維持することは非常に重要である。そこで、ドナー特異的免疫寛容の指標となるキメリズムの導入時に有効と考えられている脾臓細胞の、キメリズムの維持における有用性について検討した。

3. 研究の方法

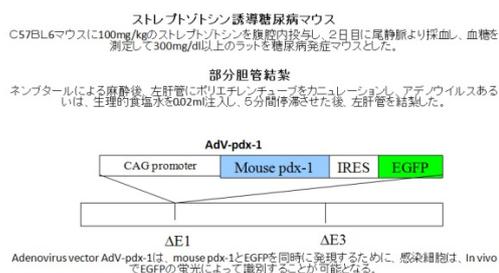
(1) 糖尿病治療遺伝子の作成と発現の検討 Adenovirus の作成

本研究では adenovirus vector を用いて骨髄細胞、肝細胞、脾臓細胞などの各種細胞への遺伝子導入を行う予定とした。マウス PDX-1 遺伝子発現 adenovirus については、群馬大学生体調節研究所 小島 至教授より供与を受け、当研究室の負担で外注（タカラ・バイオ株式会社：ドラゴンジェノミクスセンター）で増幅精製した。

胆管結紮 + ストレプトゾシン誘導糖尿病発現マウスの作成

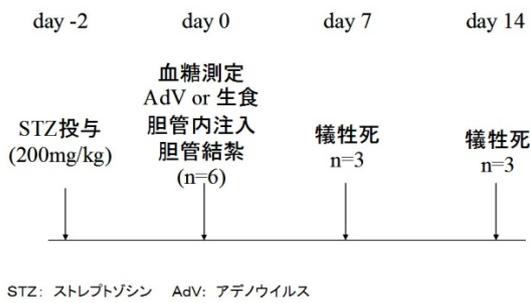
ストレプトゾシンは膵内分泌細胞をターゲットとして傷害させる薬物として知られている。ストレプトゾシンによる糖尿病誘発モデルは確立されたモデルとしてよく知られており、また臨床的には内分泌細胞癌などに応用されている。これに部分胆管結紮を行い肝門脈周囲に特異的に肝障害を起こすモデルに対して pdx-1 遺伝子導入アデノウイルス (AdV-pdx-1) を経胆管的に注入 (図1) する。

図1 糖尿病マウスモデルの作成



ストレプトゾシン投与後のプロトコール
糖尿病モデルマウスは7日目、14日目に犠死させ免疫染色によりインスリンの発現を確認する。血糖を経時的に測定して、インスリンの発現に対する血糖降下作用を確認する。

図2 糖尿病マウスモデルの作成



(2) 脾臓細胞によるキメラ細胞の置換とドナー特異的免疫寛容の維持の検討

1-1 マウス

MHC class I が H-2Kb である C57BL/6J (B6)、MHC class I が H-2Kk である C3H/He (C3H)、MHC class I が H-2K b/d である B6 と DBA/2 の F1 {第一世代の子供 (B6D2F1)}、MHC class I が H-2K b/k である B6 と C3H の F1 (B6D2F1) の Specific Pathogen Free (SPF) マウスを使用した。

1-2 皮膚移植

皮膚ドナーマウスの腹部の毛を除毛後、全層の皮膚を採取。採取した皮膚は 15×15mm ずつに切り分け、皮下組織をすべて除去したものを移植片として使用した。

1-3 骨髄移植

レシピエントマウスに 1,000 rad の放射線を照射。骨髄細胞は、ドナーマウスの上腕骨、大腿骨および脛骨から採取した。採取した骨髄細胞は、70 μm のセルストレーナー (Becton Dickinson Japan) で濾した後、計 3 回遠心 (4°C、1500rpm、5 分) して抗 Thy1.2 抗体 (Miltenyi Biotec Tokyo) の付いた magnetic beads (Miltenyi Biotec Tokyo) を使用して T 細胞を除去しドナー由来骨髄細胞を放射線照射マウスの尾静脈より注入した。

脾臓細胞の採取と投与

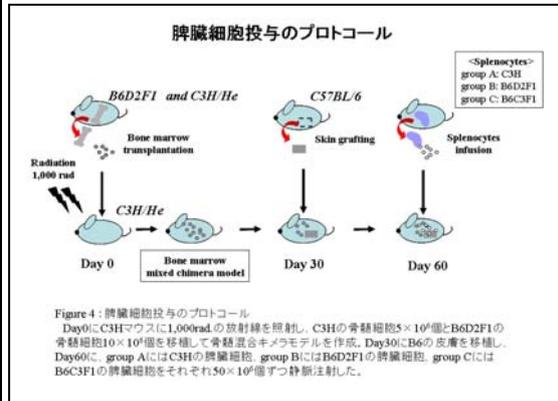
脾臓細胞は丁寧につぶし、赤血球は BD Pharm Lyse 溶液 (Becton Dickinson) で溶血させた。次に、細胞を 1% のウシ胎仔血清入りの HBSS で合計 3 回洗浄し破砕された赤血球細胞を除去し使用した。

動物モデルの作成

骨髄混合キメラに脾臓細胞を追加投与するモデル

骨髄混合キメラモデルは、C3H (H-2Kk) をレシピエントとして、Day 0 に C3H (H-2Kk) の骨髄細胞 5×10⁶ 個と B6D2F1 (H-2Kb/d) の骨髄細胞 10×10⁶ 個を移植して作成。Day 30 に

B6 (H-2Kb) の皮膚を移植し、Day 60 に種々の脾臓細胞を 50×10⁶ 個投与して 3 種類のグループに分けた。レシピエントと同種である C3H の脾臓細胞を投与する群をグループ A、骨髄ドナーと同種である B6D2F1 の脾臓細胞を投与する群をグループ B、レシピエントと皮膚ドナーの F1 である B6C3F1 の脾臓細胞を投与する群をグループ C とした。



フローサイトメトリー

末梢血中の赤血球を溶解液 (FACS Lysing Solution ; Becton Dickinson) で溶血させ、非特異的結合物質を抗 CD16/32 抗体 (PharMingen) で排除した。その後、1×10⁶ 個の細胞を FITC または PE に結合した抗 H-2Kb、H-2Kd、H-2Kk、Thy1.2、CD19、Gr-1 抗体 (PharMingen) で染色し、FACS Calibur (Becton Dickinson) で細胞表面抗原を測定。解析には CELL Quest (BD Biosciences) を使用した。

4. 研究成果

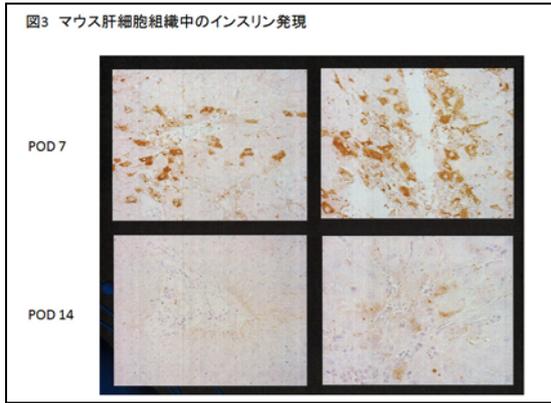
(1) 糖尿病治療遺伝子の作成と発現の検討

2-3 結果

インスリンによる肝組織の免疫染色

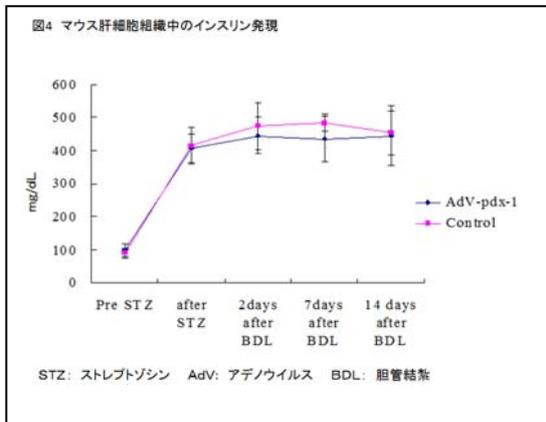
pdx-1 遺伝子導入後 7 日目および 14 日目の肝組織中のインスリンの発現を免疫染色で検討した。7 日目においては門脈周囲の肝細胞にインスリン強陽性の肝細胞が出現した。しかし、14 日目の免疫染色検体においては、門脈周囲の肝細胞に高率に発現し強陽性であった細胞は、数、発現強度において減弱していた。

このことより、pdx-1 遺伝子によるインスリンの誘導は門脈周囲の肝細胞に起こる事が確認された。



糖尿病マウスのインスリン発現と血糖降下作用の検討

また、胆管結紮による肝障害により門脈周囲の細胞はpdx-1 遺伝子投与によるインスリンの発現は免疫染色では確認されたものの一過性のものであり、持続発現および更なる効率の追求が必要と考えられた。糖尿病発症マウスにおいて、すべての個体で糖尿病の発病をみとめ、持続的な高血糖状態が維持された。胆管結紮後、pdx-1 遺伝子導入アデノウイルス注入群ではマウスの随時血糖はControlと比較して低いものの統計学的な有意差は検出できなかった。



(2) 脾臓細胞によるキメラ細胞の置換とドナー特異的免疫寛容の維持の検討

骨髄混合キメラモデル

経時的なキメラレベルの変化を調べ、Day30 に移植した皮膚の生着を観察した。混合キメラの形成
骨髄ドナーに B6(H-2Kb)を用いて作成した混合キメラモデルでは、C3H(H-2Kk)の骨髄細胞と B6(H-2Kb)の骨髄細胞を移植した群と、B6(H-2Kb)の骨髄細胞を投与した群を作成。

投与した骨髄量 C3H:B6=1:2 の群では、末梢血のキメラレベルは day28 に平均 11.78 ± 9.00% (range 0.58-26.24%)、day60 には平均 28.58 ± 12.09% (range 19.96-46.22%) となり、投与した骨髄量 C3H:B6=1:3 の群では、末梢血のキメラレベルは day28 に平均 36.38 ± 17.20% (range 8.03-63.38%)、day60 には平均 50.46 ± 21.01% (range 15.29-70.74%) となった。

B6D2F1(H-2Kb/d)を用いて作成した混合キメラモデルでは、C3H(H-2Kk)の骨髄細胞 5 × 10⁶個と B6D2F1(H-2Kb/d)の骨髄細胞 10 × 10⁶個(C3H:B6D2F1=1:2)を移植し day28 に末梢血のキメラレベルは平均 78.89 ± 7.88% (range 62.21-91.63%)、day60 には平均 84.50 ± 6.31% (range 72.09-95.22%) になり高率なキメラ細胞が得られた。

皮膚移植片の生着

C3HとB6の組み合わせの混合キメラモデルで移植した骨髄細胞の数が C3H:B6=1:2 の群では、Day30 に移植した B6(H-2Kb)の皮膚移植片のうち Day60 まで生着していたのは 40% であった。一方、C3H:B6=1:3 の群、および C3HとB6D2F1の組み合わせの混合キメラモデルでは、Day30 に移植した B6(H-2Kb)の皮膚移植片は、全て Day60 まで生着していた。

ドナー特異的免疫寛容の維持における脾臓細胞の役割

前述の皮膚移植モデルのなかで、最もキメラ率が高く、皮膚移植片の生着率がよかったのは、レシピエントに C3H(H-2Kk)、骨髄ドナーに B6D2F1(H-2Kb/d)を使用した骨髄混合キメラモデルであった。このモデルを使用して、移植片の維持期に 3 種の脾臓細胞を投与することによって、その後のキメラ細胞の変化、皮膚移植片の生着を観察した。

キメラ細胞の除去

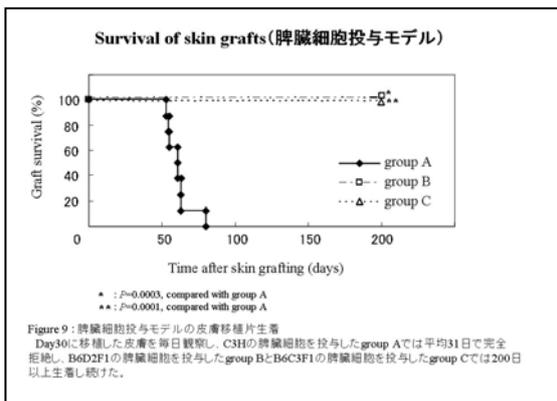
C3H(H-2Kk)の脾臓細胞 50 × 10⁶個を day60 に静注したグループ A のマウス末梢血を 7 日毎にフローサイトメトリーで解析した結果、C3H 由来の MHC class I である H-2Kk 陽性細胞は徐々に増えて、平均 7.39 ± 3.07% から、静注 21 日後には平均 97.47 ± 2.91% になった。一方、B6D2F1 由来の H-2Kb および H-2Kd は徐々に減少し、H-2Kb は平均 86.18 ± 5.88% から、静注 21 日後には平均 0.04 ± 0.03% になった。骨髄ドナーと同じ B6D2F1(H-2Kb/d)の脾臓細胞 50 × 10⁶個を静注したグループ B (n=7) の末梢血では、B6D2F1 由来の H-2Kb および H-2Kd は徐々に増え、H-2Kb は平均 83.74 ± 7.21% から、静注 21 日後には平均 99.60 ± 0.21% になった。C3H 由来の H-2Kk は徐々に減少し、平均 8.88 ± 4.24% から静注 21 日後には平均 0.21 ± 0.14% になった。

キメラ細胞の置換

レシピエントでもなくドナーでもない、レシピエントと皮膚ドナーの F1 である B6C3F1 (H-2Kb/k) の脾臓細胞 50×10^6 個を静注したグループ C (n=8) の末梢血では、H-2Kk が徐々に増え、平均 $9.02 \pm 3.79\%$ から静注 21 日後には平均 $98.42 \pm 0.90\%$ になった。H-2Kd は徐々に減少し、平均 $85.79 \pm 3.33\%$ から静注 35 日後には平均 $0.29 \pm 0.69\%$ になった。この B6C3F1 脾臓由来細胞は徐々にレシピエント末梢血内で占める割合が増加し、脾臓細胞の静注から 180 日後には H-2Kb/k の細胞は平均 $77.77 \pm 19.11\%$ となった。

皮膚移植片の生着

各種の脾臓細胞投与後、既に生着している皮膚移植片を連日観察した結果、グループ A では、Day30 に移植した B6 (H-2K b) の皮膚は、脾臓細胞静注から平均 31 日後 (23-50 日後) に完全に拒絶された。一方、グループ B 及びグループ C では B6 の皮膚移植片は 200 日以上生着し続けた。



再置換したキメラ細胞の解析

グループ C で MHC class I が H-2Kb/k であった細胞をさらに解析すると、脾臓細胞の静注から 180 日目の骨髄系細胞が平均 $5.24 \pm 1.84\%$ 、T リンパ球系細胞が平均 $11.37 \pm 3.04\%$ 、B リンパ球系細胞が平均 $78.49 \pm 4.87\%$ であった (Figure 13)。移植した皮膚は生着したまま維持され、末梢血中には特定の細胞群のみではなく、投与した脾臓由来の細胞が多系に渡って維持・増加し、180 日以上、レシピエントマウス内を循環し続けた。これは、脾臓細胞によりキメラ細胞が再置換を受けたということの意味している。

考察

レシピエントと血縁関係にある F1 マウスの脾臓細胞を投与することにより、骨髄混合キメラマウスの末梢血中キメラ細胞を置換す

ることが可能であり、その状態は長期間維持されることがわかった。また、移植片と MHC が一部合致する新たなキメリズム下では、特異的免疫寛容が維持され移植片の生着も維持されることが示唆された。

また、レシピエントと移植皮膚ドナーとの F1 マウスの脾臓細胞投与でキメリズムが維持され、移植片の生着を継続させることができたことから、臨床においても、臓器移植後にドナーと全く同一の細胞がなくても、レシピエントやドナーの血縁者、脳死患者、臍帯血、ES 細胞から臓器ドナーと近似の MHC を有する細胞を利用することで移植片を生着・維持が可能であることが示唆された。特に、血縁者の細胞が利用可能であるということは、細胞提供者が患者の身近に居り、倫理的にも臨床応用しやすいと思われる。

この実験は、免疫抑制剤の長期投与からレシピエントを開放する重要な鍵となる結果であり、臨床治療でキメリズムを維持し、移植の長期予後を改善させる上で、この結果の細胞移植の成立、維持に対して持つ意味は大きいと考える。

総括

平成 19 年度から 21 年度の 3 年間にわたり、科学研究費補助金 A(2)により、『肝幹細胞を利用した糖尿病治療戦略』研究を行った。この最終目標を達成するには、作成した pdx-1 遺伝子のホストへの効率の良い移入方法、およびホストでの恒久的発現が最重要課題であり、本研究でその機序の一端を解明し、これからの臨床応用への扉を開いたと考えている。

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)

〔雑誌論文〕(計 21 件)

1. The technical advance and impact of caudate lobe venous reconstruction in left liver: additional safety for living-related donor liver transplantation.

Yamazaki S, Takayama T, Makuuchi M.

Transpl Int. 2010;23:345-9. (査読有)

2. Use of a bridging autologous hepatic vein graft for extended right-liver transplantation.

Watanabe Y, Takayama T, Yamazaki S,

Aramaki O, Moriguchi M, Higaki T, Inoue K, Makuuchi M.

Transpl Int. 2009;22:1193-4. (査読有)

3. Simplified technique for one-orifice vein reconstruction in left-lobe liver transplantation.

Yamazaki S, Takayama T, Inoue K, Higaki

- T, Makuuchi M.
Liver Transpl. 2009 Jan;15:115-6. (査読有)
4. Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. Midorikawa Y, Yamamoto S, Tsuji S, Kamimura N, Ishikawa S, Igarashi H, Makuuchi M., Kokudo N, Sugimura H, Aburatani H. Hepatology. 2009;49:513-22. (査読有)
5. Transplantation-related thrombotic microangiopathy triggered by preemptive therapy for hepatitis C virus infection. Yamazaki S, Takayama T, Inoue K, Higaki T, Makuuchi M. Transplantation. 2008;86:1010-1. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

1. Surgical resection. T Takayama, M Makuuchi., 6th International Meeting Hepatocellular Carcinoma: Eastern & Western Experiences. Dec 8, 2008 Seoul, Korea.
2. Perioperative steroids administration in hepatectomy: a prospective randomized study. Y Hayashi, T Takayama, S Yamazaki, H Nakayama., The 7th Sino-Japanese Symposium on Hepato-Pancreato-Biliary Diseases & China International Forum on Hepatobiliary Surgery 2008 (第7回日中肝胆膵シンポジウム) Apr 20, 2008 Beijing, China.
3. Asynchronous sclerosing pancreato-cholangitis, H Nakayama, T Takayama, Y Hayashi. The 7th Sino-Japanese Symposium on Hepato-Pancreato-Biliary Diseases & China International Forum on Hepatobiliary Surgery 2008 (第7回日中肝胆膵シンポジウム) Apr 19, 2008 Beijing, China.
4. High dorsal resection of the caudate lobe. T Takayama., The 7th Sino-Japanese Symposium on Hepato-Pancreato-Biliary Diseases & China International Forum on Hepatobiliary Surgery 2008 (第7回日中肝胆膵シンポジウム) Apr 19, 2008 Beijing, China.

[図書] (計 9 件)

1. 高山忠利 他, 医学書院, 今日の治療指針 2008年版 [ポケット版], 415-416, 2008.
2. 高山忠利 他, 医学書院, 今日の治療指針 2008年版 (Volume 50), 415-416, 2008.
3. 高山忠利 他, 照林社, ナースのための術前・術後マニュアル, 106-108, 2008.

4. 高山忠利 他, 中外医学社, 消化器癌の外科治療 2. 肝・胆・膵, 39-41, 2008.
5. 高山忠利 他, メジカルビュー社, D S NOW 肝・脾外科, 標準手術, 31-45, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 忠利 (TAKAYAMA TADATOSHI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 30280944

(2) 研究分担者

幕内 雅敏 (MAKUUCHI MASATOSHI)
東京大学・医学部・名誉教授
研究者番号: 60114641 (H19~H20)

井上 和人 (INOUE KAZUTO)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 00372996 (H19~H20)

中山 壽之 (NAKAYAMA HISASHI)
日本大学・医学部・講師
研究者番号: 00287632 (H21)

三木 健司 (MIKI KENJI)
日本大学・医学部・兼任講師
研究者番号: 20386014 (H19~H21)

山崎 慎太郎 (YAMAZAKI SHINTARO)
日本大学・医学部・助手
研究者番号: 20409014 (H19)