

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591524

研究課題名(和文)

膵島移植長期成績改善のためのオートファジー阻害剤による免疫抑制副作用制御法の開発

研究課題名(英文)

A novel strategy to minimize mTOR-induced autophagy to pancreatic islet beta cells

研究代表者 伊藤 壽記 (ITO TOSHINORI)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：20231152

研究成果の概要(和文)：Mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤は、膵島移植に用いられる免疫抑制剤の中で中心的役割を果たす薬剤であるが、各種細胞株に対しオートファジーを誘導することが知られている。しかしながら、mTOR 阻害剤投与にて膵島にもオートファジーが誘導されるかは報告されていない。今回の研究で、LC-3-GFP マウスを用いて、ラパマイシン投与により実際に膵島にオートファジーが誘導されることが in vitro および in vivo で証明された。また、オートファジー阻害作用を有する 3-methyladenine (3-MA) を添加することで、分離膵島のオートファジーを抑制し、膵島グラフトに対しても保護的に働くことが確認された。これらの結果より、mTOR 阻害剤を含む免疫抑制プロトコールにオートファジー抑制剤を組み合わせるストラテジーが膵島移植の長期成績を改善しうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor has extensively used in clinical islet transplantation to prevent the graft rejection. Recently, mTOR inhibitor has also reported to induce autophagy to various kinds of cell lines. Autophagy is an essential, homeostatic process by which cells break down their own components. However, its role on pancreatic islets has not been thoroughly understood. In this study we demonstrated that both in vitro and in vivo, rapamycin treatment induced autophagy to islets. Furthermore, addition of autophagy inhibitor resulted in better graft outcome. These results suggest that rapamycin with autophagy inhibitor would be an ideal combination to prevent graft rejection without autophagy induction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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, 1型糖尿病, オートファジー, 長期成績, mTOR 阻害剤, 3-MA

1. 研究開始当初の背景

ラパマイシンは mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤として知られており免疫抑制作用を有し、臨床膵島移植で頻用されている薬剤である。一方、ラパマイシン

は各種細胞株に対しオートファジーを誘導することが知られている。オートファジーは細胞内のたんぱく質を分解するシステムであるが、この作用は生体において異常たんぱく質の蓄積を抑制することで生命維持に働

く可能性と、細胞自身に危害を加え（自食）生命維持に負の作用をもたらす可能性が指摘されている。しかしながら、mTOR 阻害剤投与にて膵島にもオートファジーが誘導されるかは報告されていない。

2. 研究の目的

今回の研究では、LC-3-GFP マウスを用いて、ラパマイシン投与により実際に膵島にオートファジーが誘導されるか、また誘導される場合、それが移植膵島を傷害するかを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

オートファジーのマーカーである LC-3 に GFP タグを導入した LC-3-GFP マウスを用いた。また、オートファジー阻害作用を有する 3-methyladenine (3-MA) を投与した。膵島の viability はグルコース刺激インスリン分泌試験にて解析した。

4. 研究成果

B6 マウスと LC-3-GFP マウスから膵島を分離した。膵島を *in vitro* で培養し、そこにラパマイシンを投与すると、緑色蛍光が増強し、分離膵島でも確かにオートファジーが誘導された。また、マウスにラパマイシンを投与することで、*in vivo* でもオートファジーが誘導された。さらに、ラパマイシンに 3-MA を添加することで、分離膵島のオートファジーを抑制し、膵島グラフトに対しても保護的に働くことが確認した。

これらの結果より、mTOR 阻害剤を含む免疫抑制プロトコールにオートファジー抑制剤を組み合わせるストラテジーが膵島移植の長期成績を改善しうることが示唆された。

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 12 件)

1. Koyama S, Tomimatsu T, Kanagawa T, Daimon E, Kimura T, Kuroda A, Tanemura M, Doki Y, Ito T. Successful pregnancy after simultaneous pancreas-kidney transplantation from a brain-dead donor: the first case report in Japan. *J Obstetrics Gynaecol Res.* 2011 in press.

2. Ohmura Y, Tanemura M, Kawaguchi N, Machida T, Tanida T, Deguchi T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Matsuura N, Ito T, Nagano H, Doki Y and Mori M. Combined Transplantation of Pancreatic Islets and Adipose Tissue-Derived Stem Cells Enhances the Survival and Insulin Function of Islet Grafts in Diabetic Mice. *Transplantation.* 90 (12): 1366-73, 2010

3. Deguchi T, Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Machida T, Ohmura Y, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Ito T, Mori M, Doki Y and Sawa Y. Increased immunogenicity of tumor-associated antigen, MUC1, engineered to express α -gal epitopes: A novel approach to immunotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Research.* 70 (13):5259-69, 2010

4. Kobayashi S, Marubashi S, Hama N, Asaoka T, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Doki Y, Mori M. GBP2 mRNA in peripheral blood leukocytes of liver transplant recipients as a marker for acute cellular rejection. *Transplant int.* 23 (4): 390-6, 2009

5. Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Intra- and extracellular remodeling effectively prevent human CD8⁺ CTL-mediated xenocytotoxicity by coexpression of membrane-bound human FasL and pig c-FLIP_L in pig endothelial cells. *Transplant Proc.* 41 (1) 391-394, 2009

6. Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Adenovirus-mediated gene expression of human c-FLIP_L protects pig islets against human CD8⁺ CTL-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc.* 41 (1) 319-322, 2009

7. Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Rapamycin induces autophagy in islets: Relevance for islet transplantation. *Transplant Proc.* 41 (1) 334-38, 2009

8. Kawamoto K, Tanemura M, Ito T, Deguchi T, Machida T, Nishida T, Doki Y, Mori M, Sawa Y. Prolonged survival of pig islets xenograft by adenovirus-mediated expression of either membrane-bound human

FasL or human decoy Fas antigen gene. *Xenotransplantation*. 15 (5) 333-43, 2008

9. **Tanemura M**, Saga A, Kawamoto K, Deguchi T, Machida T, Nishida T, Sawa Y, **Ito T**. In vitro and in vivo prevention of human CD8⁺ CTL-mediated xenocytotoxicity by pig c-FLIP expression in porcine endothelial cells. *Am J Transplant*. 8 (2): 288-297, 2008

10. **Tanemura M**, Saga A, Kawamoto K, Manabe N, Machida T, Deguchi T, Sawa Y, Nishida T, **Ito T**. Pig cellular FLICE-like Inhibitory Protein (c-FLIP) overexpression in pig xenograft cells induces resistance to human CD8⁺ CTL-mediated xenocytotoxicity. *Transplant Proc*. 40(2):559-63, 2008

11. Kawamoto K, **Tanemura M**, Saga A, Komoda H, Fumimoto Y, Deguchi T, Machida T, Sawa Y, Nishida T, **Ito T**. Adenoviral-mediated overexpression of either membrane-bound human FasL or human decoy Fas can prolong pig islet xenograft survival in rat transplant model. *Transplant Proc*. 40(2):477-9, 2008

12. Shimada K, **Ito T**, **Tanemura M**, Komoda H, Fumimoto Y, Kawamoto K, Nishida T, Kaneto H, Sawa Y. Development of beta-Cells in the Native Pancreas After Pancreas Allo-Transplantation in the Spontaneously Diabetic Torii Rat. *J Surg Res*. 145 (2): 229-37, 2008

[学会発表] (計9件)

1. Y. Ohmura, **M. Tanemura**, T. Machida, T. Deguchi, H. Wada, S. Kobayashi, S. Marubashi, H. Eguchi, Y. Takeda, N. Kawaguchi, N. Matsuura, **T. Ito**, H. Nagano, Y. Doki, M. Mori
Hybrid islet transplantation with marginal islet mass and adipose tissue-derived stem cells can elicit long-term islet graft survival and support normoglycemia in diabetic mice. XXIII International Congress of The Transplantation Society, 2010/8/16, Vancouver, CANADA

2. **Tanemura M**, Deguchi T, Miyoshi E, Nagano H, Ohmura Y, Machida T, Wada H, Kobayashi

S, Marubash S, Eguchi H, Takeda Y, **Ito T**, Mori M and Doki Y.

MUC1, remodeled to express α -gal epitopes immune-based therapy can elicit both significant prolonged survival and effective antibody production against multiple tumor-associated antigens. AACR 101nd Annual Meeting, 2010/4/17~20, Washington, USA

3. **種村 匡弘**, 出口 貴司, 町田 智彦, 永野 浩昭, 小林 省吾, 丸橋 繁, 江口 英利, 武田 裕, 塚本里加子, **伊藤 壽記**, 森 正樹, 土岐祐一郎
ラパマイシン毒性としての移植膵島におけるオートファジー誘導の意義
第45回日本移植学会総会(東京; 2009, 9/16-18)

4. **種村 匡弘**, **伊藤 壽記**, 永野 浩昭, 出口 貴司, 町田 智彦, 小林 省吾, 丸橋 繁, 武田 裕, 北川 透, 堂野 恵三, 門田 守人, 森 正樹, 土岐 祐一郎 異種膵島移植療法の臨床応用に向けた先端研究
第21回日本肝胆膵外科学会・学術集会(名古屋; 2009, 6/10-12)

5. **Tanemura M**, **Ito T**, Machida T., Deguchi T., Kobayashi S., Marubashi S., Takeda Y., Nagano H., Sawa Y., Mori M., Doki Y.
Rapamycin Induces Autophagy in Islets and Impairs Islet Function.
American Transplantation Congress. 5/30-6/2 Boston; 2009

6. **種村 匡弘**, 嵯峨 礼美, 川本 弘一, 出口 貴司, 町田 智彦, 西田 俊朗, 澤 芳樹, 森 正樹, 土岐 祐一郎, **伊藤 壽記**
移植膵島でのオートファジー誘導の臨床的意義 - 膵島移植後免疫抑制療法としてラパマイシンは妥当か?
第44回日本移植学会総会(大阪; 2008, 9/19-21)

7. **Tanemura M**, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, **Ito T**. : Intra- and extracellular remodeling effectively prevent human CD8⁺ CTL-mediated xenocytotoxicity by coexpression of human membrane-bound FasL and pig c-FLIPL in pig endothelial cells. 22th International congress of the transplantation society. (Sydney; 2008, 8. 9-14)

8. Tanemura M., Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. : Adenovirus-mediated gene expression of human c-FLIPL protects pig islets against human CD8+ CTL-mediated cytotoxicity.

22th International congress of the transplantation society. (Sydney; 2008, 8. 9-14)

9. Tanemura M., Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. : Rapamycin induces autophagy in islets : Relevance for islets transplantation.

22th International congress of the transplantation society. (Sydney; 2008, 8. 9-14)

[図書] (計1件)

寺岡 慧、伊藤 壽記 編集 「膵臓移植－糖尿病根治を目指して－」 シュブリンガージャパン出版、2009年、474ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1. 名称：膵島移植時の膵島生着率を高める膵島移植の生着改善剤、膵島移植用生物製剤、及び膵島移植用キット

発明者：種村 匡弘

権利者：大阪大学

種類：特願

番号：2010-177993

出願年月日：平成22年8月6日

国内外の別：国内

2. 名称：膵島の分離方法および膵島組織を保護するための保護液

発明者：種村 匡弘

権利者：大阪大学

種類：特願

番号：2010-159053

出願年月日：平成22年7月13日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 壽記 (ITO TOSHINORI)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：20231152

(2)研究分担者

種村 匡弘 (TANEMURA MASAHIRO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30379250

(3)連携研究者
()

研究者番号：