

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21628

研究課題名（和文）セラミドによる免疫制御機構を応用した膵島移植における膵島生着延長の試み

研究課題名（英文）Extend islet graft survival in pancreatic islet transplantation by applying the immunoregulatory mechanism of ceramide

研究代表者

小林 隆（Kobayashi, Takashi）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40464010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：セラミドなどの脂質メディエーターは情報伝達物質として生体内で作用する分子であり、セラミド自体は、制御性T細胞の活性化、機能維持に働いて局所免疫を制御している。本研究の目的は脂質メディエーターの一種であるセラミドがTリンパ球の一種である制御性T細胞の機能維持に重要であるとの知見（Apostolidis et al. Nat Immunol 2016）を踏まえ、膵島移植において、セラミドが制御性T細胞を介して生着改善効果を示すかどうかを明らかにすることである。本研究の結果、膵島移植ではセラミド投与により制御性T細胞が誘導され、移植膵島の生着が促進することで内分泌機能の改善した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病治療としての膵島細胞移植は、膵島自体を移植するため根本的な治療であること、点滴で移植が可能なため低侵襲であることが大きな利点であるが、移植直後に免疫学的な膵島破壊により80%の膵島が喪失するため、最低でも2～3人分の膵島量が必要であることがドナー不足の日本では問題であった。これまで新規免疫抑制剤の導入、免疫隔離膜を用いた皮下埋め込み型デバイスの開発、異種ドナー（ブタ）や、iPS細胞由来膵島の使用などが試みられているが、生着不足やウイルス感染、癌化のリスクなどの問題を抱えている。セラミドは生体内に元々存在する脂質であるため臨床応用を考えると安全性に問題なく臨床研究へ発展させやすい。

研究成果の概要（英文）：Insulin independence after pancreatic islet transplant for diabetes mellitus is mainly limited by early immunological reaction, such as instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR). It induces a high rate of post-procedure beta cell apoptosis and leads to islet graft loss. Ceramide is a lipid mediator and acts as a signal transmitter. Ceramide is also reported to activate regulatory T cell and modulate local immunity to prevent excessive immune reactions. The purpose of this study is to clarify whether ceramide may improve the function of pancreatic islet grafts. The results of this study suggest that administration of ceramide induced regulatory T cells and contributed to functional improvement of pancreatic islet grafts.

研究分野：移植治療

キーワード：細胞移植 臓器移植 移植免疫 糖尿病 脂質メディエーター

## 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。1 型糖尿病の根治治療として膵臓移植が行われているが、侵襲性が高く小児や合併症を有する高齢者では適応とならない。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)。膵島細胞移植は点滴で治療が可能であるため、膵臓移植に比べ圧倒的に低侵襲で合併症も少なく、小児や高齢者でも治療が可能というメリットがある。しかしながら長期成績が著しく不良で、移植直後の膵島破壊による膵島喪失が 80%にもものぼるため、1 人分の膵臓ではインスリン離脱は不可能で、2~3 人分の健康な膵臓から分離された膵島細胞を必要とする。この膵島破壊の根本原因は膵島細胞が免疫反応に脆弱な点にある。移植直後から免疫学的な攻撃にさらされ、経時的に破壊され減少してしまう。近年の取り組みとして、新規免疫抑制プロトコールの導入、免疫隔離膜を用いたカプセル化膵島や皮下埋め込み型デバイスの開発、異種ドナー(ブタ)や、iPS 細胞由来膵島の使用などが報告されているが、生着期間不足やウイルス感染、癌化の問題などから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。低侵襲で確実に患者を救える新たなアプローチによる膵島移植の開発が望まれる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は脂質メディエーターの一種であるセラミドが T リンパ球の一種である制御性 T 細胞の機能維持に重要であるとの知見(Apostolidis et al. Nat Immunol 2016)を踏まえ、1 型糖尿病に対する細胞治療である膵島移植にセラミドによる制御性 T 細胞の活性化、機能維持により生着延長効果を明らかにすることである。

セラミドなどの脂質メディエーターは脂質でありながら、タンパク質と同じように情報伝達物質として作用する分子である。セラミドはスフィンゴ脂質代謝経路の中心分子であり、様々な物質へと代謝され、多様な作用を発揮する。セラミド自体は、制御性 T 細胞の活性化、機能維持に働いており、過剰な免疫反応が起きないように局所免疫を制御している。膵島移植では、移植直後に局所の免疫反応によって、移植膵島の約 80%が破壊され、喪失すると言われている。そこで、セラミド投与による膵島移植後の生体内における微小環境での免疫動態を解析し、セラミドの膵島移植への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ラットを用いた自家膵島移植の系を用いて解析を行う。

(1)セラミドの違いによる効果を検証する目的で、自家膵島移植のプラセボ群、セラミド投与群、グリコシルセラミド投与群の 3 群に分けて、免疫動態を解析する。膵島を移植した肝臓を摘出し、免疫組織学的に検討する。

(2)プラセボ群、セラミド投与群、グリコシルセラミド投与群の 3 群について、内分泌学的な側面から血糖を経時的に測定し、グルコース負荷試験についても実施し、負荷試験後 1 時間、2 時間の血糖値を解析する。

## 4. 研究成果

(1)ラットの膵島移植モデル作成: 8

12 週齢の雄の Wister ラットを用いた。体重は 250-300g とした。イソフルレンで導入し 3 種混合麻酔下に開腹し膵体尾部を摘出しおおよそ 70%の膵切除を行った。脾臓も摘出した。コラゲナーゼを膵に注入して膵を膨化させ、膵島分離は Riccordi 法に準じて行い、膵島を回収した。純化は行わず、新鮮な 1000 個の膵島を経門脈的に肝臓に移植した。自家膵島移植後 1 週間後に肝生検を行い、組織学的に HE 染色で肝内門脈域に膵島細胞を認めた。

また、インスリン染色を行うと、膵島

内に陽性細胞を認め、膵島のインスリン分泌を確認した(図 1)。セラミド投与群とグリコシルセラミド投与群においても同様に肝内への膵島の生着を確認した。

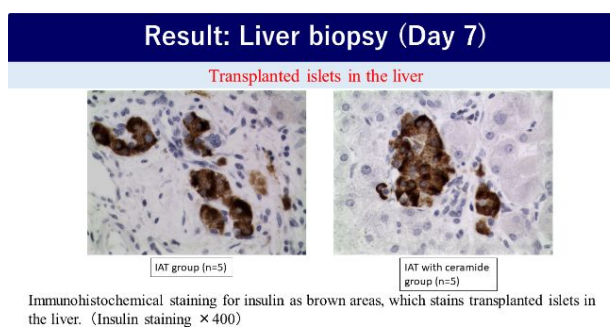


図 1 肝内に生着した膵島

(2)自家膵島移植後の血糖値の推移:ラットの自家膵島移植後 1 週間の血糖値の推移を測定した。プラセボ群とグリコシルセラミド投与群において、血糖値はそれぞれ移植前 98, 103mg/dl, 1 日目 129, 130mg/dl, 2 日目 131, 124mg/dl, 3 日目 118, 120mg/dl, 4 日目 112, 116mg/dl, 5 日

目 105, 106mg/dl, 6 日目 107, 110mg/dl, 7 日目 101, 103mg/dl であり、差を認めなかった ( 図 2 )

(3)移植後 1 週間目のグルコース負荷試験の結果：プラセボ群とグリコシルセラミド投与群において負荷試験 ( 2g グルコース/kg 体重投与 ) を行い、投与後 1 時間、2 時間後の血糖を測定した。プラセボ群、グリコシルセラミド投与群それぞれ、投与前の血糖が 108, 104mg/dl, 投与後 1 時間の血糖が 278, 190mg/dl ( p = 0.008 ), 投与後 2 時間の血糖が 219, 145mg/dl ( p = 0.01 ) であり、投与後 1 時間、2 時間の血糖に差を認めた ( 図 3 )。このことから、70% 膵切除の自家膵島移植モデルは一見正常な血糖を示しているが、負荷試験を行うと血糖の上昇を認めており、内分泌機能が低下した境界型の糖尿病の状態に近いモデルであることが示された。また、その内分泌機能の低下は、グリコシルセラミド投与群において改善する傾向が見られ、グリコシルセラミドが移植膵島に何らかの影響を与え、生着を改善させた可能性が示唆された。

(4)末梢血のフローサイトメトリー解析：グリコシルセラミドの移植膵島に与える影響を免疫学的な側面から解析する目的で、自家膵島移植モデルにおける末梢血の CD4+CD25+細胞をプラセボ群と比較した ( 図 4 )。プラセボ群では CD4+CD25+細胞は  $6.25 \pm 1.02\%$  であるのに対してグリコシルセラミド投与群では  $11.56 \pm 4.06\%$  ( p = 0.040 ) とグリコシルセラミド投与群で CD4+CD25+細胞分画の増加を認めた ( 図 5 )。CD4+CD25+細胞分画には制御性 T 細胞を含むため、グリコシルセラミド投与によって制御性 T 細胞が誘導された可能性がある。これらの結果から、ラット自家膵島移植モデルにおいて、グリコシルセラミド投与が何らかの機序により制御性 T 細胞の誘導を促し、膵島移植生着に関与した可能性が示唆された。膵島移植における移植直後の Instant blood-mediated inflammatory reaction ( IBMIR ) と呼ばれる過剰な原始免疫反応を制御することは移植後の膵島喪失の防止につながる可能性がある。そのため、現在の膵島生着率の向上を目指すためには IBMIR の制御は極めて重要なテーマである。今回の検討結果から、脂質メディエーターの一つであるグリコシルセラミドは制御性 T 細胞の活性化を介して IBMIR を抑制し、膵島移植生着に関与している可能性があるとの知見が得られた。

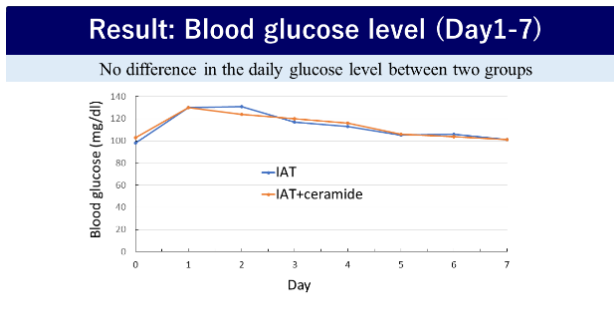


図 2 血糖値の 1 週間の推移

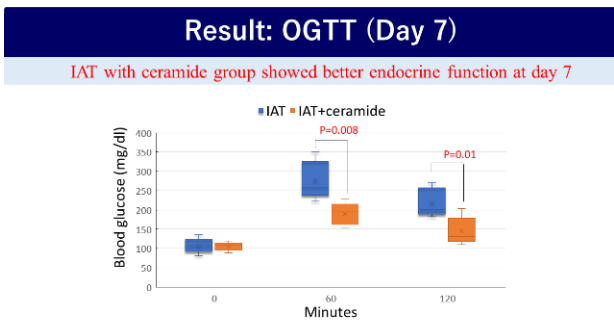


図 3 グルコース負荷試験結果

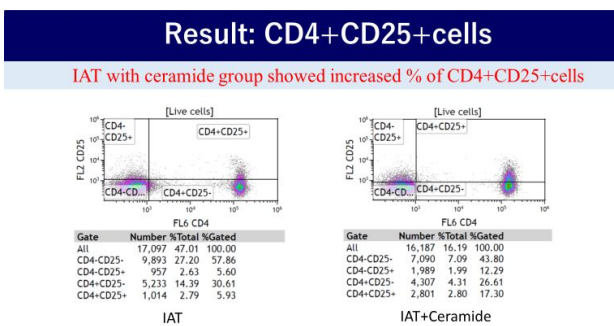


図 4 フローサイトメトリー結果

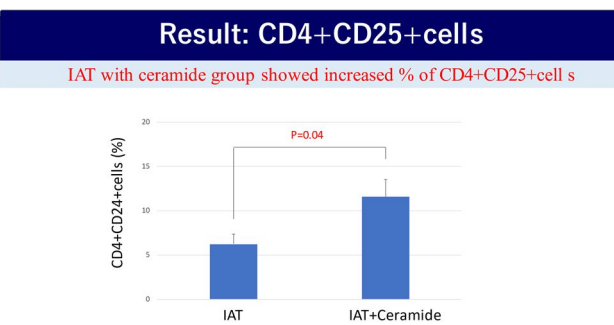


図 5 フローサイトメトリー結果の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kobayashi T, Miura K, Saito K, Tasaki M, Saito K, Sakata J, Takizawa K, Katada T, Hirose Y, Yuza K, Ando T, Nagahashi M, Kameyama H, Wakai T.	4. 巻 52
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 Transplant Proc	6. 最初と最後の頁 1940-1943
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 Kobayashi T, Miura K, Kubota M, Kinoshita Y, Sakata J, Takizawa K, Katada T, Hirose Y, Yuza K, Ando T, Miura Y, Nagahashi M, Kameyama H, Wakai T	4. 巻 5
2. 論文標題 Living donor liver transplantation for more than 30-year survived patients with native liver after Kasai operation for biliary atresia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Reports	6. 最初と最後の頁 100052
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kobayashi T, Miura K, Ishikawa H, Toge K, Hirose Y, Takizawa K, Sakata J, Wakai T, Kinoshita Y
2. 発表標題 Effect of exenatide on swine islet autotransplantation model
3. 学会等名 The 17th Congress of the Asian Society of Transplantation（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kobayashi T, Kinoshita Y, Takahashi Y, Ohyama T, Arai Y, Sugai Y, Hamasaki Y, Miura K, Ishikawa H, Moro K, Sakata J, Wakai T.
2. 発表標題 Improving endocrine function of transplanted islets by ceramide in rat islet autotransplant model
3. 学会等名 The 35th International Symposium on Pediatric Surgical Research（国際学会）
4. 発表年 2022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	木下 義晶 (Kinoshita Yoshiaki)  (80345529)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究分担者	松田 康伸 (Matsuda Yasunobu)  (40334669)	新潟大学・医歯学系・准教授  (13101)	
研究分担者	永橋 昌幸 (Nagahashi Masayuki)  (30743918)	新潟大学・医歯学総合病院・研究准教授  (13101)	
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	廣瀬 雄己 (Hirose Yuki)  (10737365)	新潟大学・医歯学総合病院・特任助教  (13101)	
研究分担者	油座 築 (Yuza Kizuki)  (00745565)	新潟大学・医歯学総合病院・専任助教  (13101)	
研究分担者	諸 和樹 (Moro Kazuki)  (10745566)	新潟大学・医歯学総合病院・専任助教  (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------