

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390310

研究課題名(和文) チオレドキシン及び補体阻害ペプチドを基盤と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) Establishment of a next generation cell therapy for diabetes based on Thioredoxin and C5a inhibitory peptide

研究代表者

後藤 昌史 (Goto, Masafumi)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授

研究者番号：50400453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、チオレドキシン(TRX)とグルココルチコイドを組み合わせる事により分離膵島の阻血障害を効果的に制御できる事が判明した。また、移植膵島に限局したTRXの発現だけでは膵島生着促進には不十分であるが、TRXの全身投与によりIL-1b抑制を介して移植膵島保護効果が発揮される事が明らかとなった。さらにTRXと補体阻害ペプチドを組み合わせる事でレシピエントに投与する事により、移植後の炎症性メディエーター及び補体・凝固活性の効果的制御が可能となる事が判明した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have clarified that combining Thioredoxin (TRX) with glucocorticoids during pancreas preservation might offer an effective therapeutic strategy for protecting isolated islets from ischemic stress. Moreover, it was shown that overexpression of TRX on the islet grafts is not sufficient to improve engraftment. In contrast, TRX administration to the recipients exerted protective effects on transplanted islet grafts by suppressing the serum levels of interleukin-1b;. Furthermore, we have demonstrated that an administration of TRX together with C5a inhibitory peptide to the recipients was effective for regulating inflammatory mediators and complement/coagulation cascades.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植・再生医療 糖尿病 細胞・組織 膵島

## 1. 研究開始当初の背景

膵島移植は細胞療法という最先端医療技術の中でも、最も社会的なインパクトの大きい糖尿病根治療法である。これまで主流であった膵臓移植に比し、安全・簡便・低侵襲であり患者に優しい画期的治療法であるため、欧米の一部では既に保険適応となっている。しかし、一人の患者の治療に複数ドナーを要するという致命的課題を有しているため、ドナー不足が深刻な我が国においては未だ一般医療に至っていない。膵島移植で複数ドナーを要する要因の一つとして、移植後早期のグラフト機能不全が挙げられる。申請者はこれまでにその機序解明に取り組み、膵島自身が発現する Tissue Factor(TF) や **Monocyte Chemoattractant Protein-1(MCP-1)** といった炎症性メディエーターに起因する一連の反応に対し Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) と命名し、その治療法を考案する上で有用なモデルの確立にも成功してきた。

## 2. 研究の目的

本研究においては申請者のこれまでの移植後早期グラフト障害に関する詳細な研究成果に基づき、分子生物学・免疫学・移植外科学・内分泌学の最新知見を革新的に融合させ、独創的な着眼に基づく多角的アプローチの導入により膵島グラフトの生着促進を試み、膵島移植を国民病である糖尿病に対する理想的な次世代細胞療法として確立するための学理究明を目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究においては、下図のように膵島グラフトの生着を促進するためのグラフト側及びホスト側因子それぞれの学理を究明し、チオレドキシ( TRX ) / 補体阻害ペプチドの有効性や作用機序の解明を試みた。それにより、TRX / 補体阻害ペプチドを基盤とする次世代細胞移植療法の構築が可能になると期待される。

- (1) TRX による膵島グラフトの質の向上  
(グラフト側因子の改善)

- (2) TRX による炎症性メディエーター制御及びグラフト保護 (ホスト側因子の改善)

- (3) TRX / 補体阻害ペプチドによる早期グラフト障害の制御 (ホスト側因子の改善)

## 4. 研究成果

本研究は、各年度ごとに上記テーマを集約的に検証した。いずれもほぼ計画通りに進行し、一部は予想以上の結果を得る事ができた。以下に各テーマごとに研究成果の概要を記載する。

- (1) TRX による膵島グラフトの質の向上  
(グラフト側因子の改善)

まず温阻血障害や冷阻血障害といった臓器保存に伴う阻血障害がグラフト自身の炎症性メディエーター産生や機能へ及ぼす影響に関し、解析を実施した。その結果、冷阻血障害により膵島収量が大きく影響を受け、そこに膵島分離作業などの温阻血障害が加わることにより、移植後の膵島グラフト生着を妨げる炎症起因性メディエーターである Tissue factor、MCP-1、MIF などが著しく誘導されることが明らかとなった。また、阻血障害により先にダメージを被る組織は膵外分泌組織であり、膵島は膵外分泌組織に比べると比較的阻血ストレスに耐性を有しており、初期における有効なプロトコルの導入などにより、阻血障害ストレスの影響から回復し得ることが示唆された。

次に、この阻血障害からグラフトを保護するプロトコルの確立に取り組み、リコンビナントタイプのヒトチオレドキシ( TRX ) と副腎皮質コルチコイドを組み合わせることにより、相乗的に強い抗炎症効果を発揮することが確認できた。TRX は阻血障害により分離膵島から放出される MCP-1 などの炎症性メディエーターを有意に制御するが、膵島の収量を維持する効果は大きくないことも、あわせて判明した。一方、強い抗炎症作用を有するグルココルチコイドは、分離膵島の収量を飛躍的に増加させることが判明した。さらに両剤を組み合わせる事により、分離膵島の収量および

viability が有意に改善され、阻血障害下においても分離膵島を十分に保護し得ることを見出した。

(2) TRX による炎症性メディエーター制御及びグラフト保護 (ホスト側因子の改善)

TRX 過剰発現マウス、およびリコンビナントタイプの TRX を使用してマージナルドーズモデルの膵島移植実験を実施し、TRX による炎症性メディエーター制御およびグラフト保護効果について検証した。その結果、移植膵島に限局した TRX の発現だけでは膵島生着促進には不十分であるが、TRX の全身投与は、酸化ストレスではなく血清 IL-1 $\alpha$  の抑制を介して移植膵島保護効果を発揮することが明らかとなった。

(3) TRX/補体阻害ペプチドによる早期グラフト障害の制御 (ホスト側因子の改善)

TRX と補体阻害ペプチドを組み合わせることにより、移植膵島グラフトに起因する炎症性メディエーターである MCP-1 や MIF の効果的制御が可能となり、また補体阻害ペプチドによりホスト内の補体活性および内因系凝固活性が効果的に制御され、グラフト生着に関してある程度の相乗作用が認められた。しかし、これらの組み合わせでは移植グラフト由来の Tissue Factor の制御は不十分であり、外因系凝固活性の効果的制御がさらなる課題であることが同時に明らかとなった。TRX の炎症制御作用に関しては、小胞体に局在する膜貫通型チオレドキシン関連蛋白質 (TMX) が、炎症細胞の浸潤や膵島移植のターゲット臓器である肝臓の機能障害に防御的に働くことを TMX ノックアウトマウスにて明らかとした。さらに、その傷害は抗 TNF 抗体の投与により減弱するため、チオレドキシン関連分子の防護作用は TNF シグナルの制御を介していることが判明した。

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 25 件)

#### 論文は全て査読有り

1. A novel resting strategy for improving islet engraftment in the liver  
Jimbo T, Inagaki A, Imura T, Sekiguchi S, Nakamura Y, Fujimori K, Miyagawa J, Ohuchi N, Satomi S, **Goto M**  
*Transplantation* 2014;97(3):280-286  
10.1097/01.tp.0000437557.50261.b9.
2. A comparison of the main structures of N-glycans of porcine islets with those from humans  
Miyagawa S, Maeda A, Kawamura T, Ueno T, Usui N, Kondo S, Matsumoto S, Okitsu T, **Goto M**, Nagashima H  
*Glycobiology* 2014;24(2):125-138  
10.1093/glycob/cwt088
3. Collagenase H is crucial for isolation of rat pancreatic islets  
Fujio A, Murayama K, Yamagata Y, Watanabe K, Imura T, Inagaki A, Ohbayashi N, Shima H, Sekiguchi S, Fujimori K, Igarashi K, Ohuchi N, Satomi S, **Goto M**  
*Cell Transplantation* 2013 Jun 13
4. Thioredoxin-1 attenuates early graft loss after intraportal islet transplantation in mice  
Asami K, Inagaki A, Imura T, Sekiguchi S, Fujimori K, Masutani H, Yodoi J, Satomi S, Ohuchi N, **Goto M**  
*PLOS ONE* 8 (8):e70259. 2013 Aug 9 10.1371/journal.pone.0070259
5. Clinical Experiences in the Treatment of Pancreatic Arteriovenous Malformation by Total Pancreatectomy with Islet Autotransplantation  
Sakata N, **Goto M**, Motoi F, Hayashi H, Nakagawa K, Mizuma M, Yamaya H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Sawada S, Ottomo S, Okada T, Fukase K, Yoshida H, Ito T, Hirota M, Ishigaki Y, Sekiguchi S, Rikiyama T, Katayose Y, Fujimori K, Egawa S, Shimosegawa T, Katagiri H, Satomi S, Unno M

- Transplantation* 96 (5):e38-e40:2013  
10.1097/TP.0b013e3182a01333
6. Postoperative Cholestasis and Cholangitis after Total Pancreatectomy with Biliary Reconstruction Impair the Function of Autotransplanted islets.  
Hata T, Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hayashi H, Motoi F, **Goto M**, Katayose Y, Egawa S, Unno M  
*Transplantation* 96 (5):e40-e43:2013  
10.1097/TP.0b013e3182a049bb
  7. Effects of glucagon-like Peptide 1 analogue on the early phase of revascularization of transplanted pancreatic islets in a subcutaneous site  
Nishimura R, Ushiyama A, Sekiguchi S, Fujimori K, Ohuchi N, Satomi S, **Goto M**  
*Transplantation Proc.* 45 (5):1892-1894:2013  
10.1016/j.transproceed.2013.01.047
  8. Tacrolimus inhibits the revascularization of isolated pancreatic islets  
Nishimura R, Nishioka S, Fujisawa I, Shiku H, Shimada M, Sekiguchi S, Fujimori K, Ushiyama A, Matsue T, Ohuchi N, Satomi S, **Goto M**  
*PLOS ONE* 8(4):e56799 Apr 17 2013  
10.1371/journal.pone.0056799
  9. A lectin microarray study of glycoantigens in neonatal porcine islet-like cell clusters  
Maeda A, Ueno T, Nakatsu S, Wang D, Usui N, Takeishi S, Okitsu T, **Goto M**, Nagashima H, Miyagawa S  
*J. Surgical Research*  
183(1):412-418:2013  
10.1016/j.jss.2012.12.037
  10. Nitrosative/oxidative stress conditions regulate thioredoxin-interacting protein (TXNIP) expression and thioredoxin-1 (TRX-1) nuclear localization  
Ogata FT, Batista WL, Sartori A, Gesteira TF, **Masutani H**, Arai RJ, Yodoi J, Stern A, Monteiro HP  
*PLOS ONE* 8(12):e84588 2013  
10.1371/journal.pone.0084588
  11. The protective role of the transmembrane thioredoxin-related protein TMX in inflammatory liver injury  
Matsuo Y, Irie K, Kiyonari H, Okuyama H, Nakamura H, Son A, Lopez-Ramos DA, Tian H, Oka S, Okawa K, Kizaka-Kondoh S, **Masutani H**, Yodoi J  
*Antioxid Redox Signal* 18 (11):1263-1272:2013  
10.1089/ars.2011.4430
  12. Ductal injection does not increase the islet yield or function after cold storage in a vascular perfusion model  
Nakanishi W, Imura T, Inagaki A, Nakamura Y, Sekiguchi S, Fujimori K, Satomi S, and **Goto M**  
*PLOS ONE* 7 (8):e42319. Epub 2012 Aug 10  
10.1371/journal.pone.0042319
  13. Intraoperative ultrasound examination is useful for monitoring transplanted islets  
Sakata N, **Goto M**, Gumpei Y, Mizuma M, Motoi F, Satomi S, Unno M  
*Islets* 4 (5): 1-4 2012 10.4161/isl.22384
  14. Enhancement of the structural stability of full-length clostridial collagenase by calcium ions  
Ohbayashi N, Yamagata N, **Goto M**, Watanabe K, Yamagata Y, Murayama K.  
*Appl Environ Microbiol* 78 (16): 5839-5844:2012
  15. Solution structure of clostridial collagenase H and its calcium-dependent global conformation change  
Ohbayashi N, Matsumoto T, Shima H, **Goto M**, Watanabe K, Yamano A, Kato Y, Igarashi K, Yamagata Y, Murayama K  
*Biophysical Journal* 104: 1538-1545:2013  
10.1016/j.bpj.2013.02.022
  16. Encapsulated islets transplantation: Past, present and future  
Sakata N, Sumi S, Yoshimatsu G, **Goto**

- M.** Egawa S, Unno M  
*World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 3 (1):19-26:2012  
10.4291/wjgp.v3.i1.19
17. A precise analysis of C5a inhibitory peptide on inflammatory mediators induced after islet transplantation  
Nakanishi W, **Goto M**, Inagaki A, Sekiguchi S, Fujimori K, Okada N, **Okada H**, Satomi S  
*Transplantation Proc.* 43 (9):3235-3238:2011  
10.1016/j.transproceed.2011.10.026
18. Expression of receptors for anaphylatoxins c3a and c5a on rat islet preparations  
Tokodai K, **Goto M**, Inagaki A, Imura T, Nakanishi W, Satomi S  
*Transplantation Proc.* 43 (9):3179-3180:2011  
10.1016/j.transproceed.2011.10.006
19. Utility of co-transplanting mesenchymal stem cells in islet transplantation  
Sakata N, **Goto M**, Yoshimatsu G, Egawa S, Unno M  
*World Journal of Gastroenterology* 17 (47):5150-5155:2011  
10.3748/wjg.v17.i47.5150
20. Assessment for revascularization of transplanted pancreatic islets at subcutaneous site in mice with a highly sensitive imaging system.  
Nishimura R, **Goto M**, Sekiguchi S, Fujimori K, Ushiyama A, Satomi S  
*Transplantation Proc.* 43 (9):3239-3240:2011  
10.1016/j.transproceed.2011.09.095
21. Effect of synthetic protease inhibitor gabexate mesilate on attenuation of coagulant activity and cytokine release in a rat model of islet transplantation  
Tokodai K, **Goto M**, Inagaki A, Imura T, Satomi S  
*Transplantation Proc.* 43 (9):3176-3178:2011  
10.1016/j.transproceed.2011.10.035
22. Monitoring transplanted islets by high-frequency ultrasound  
Sakata N, Kodama T, Chen R, Yoshimatsu G, **Goto M**, Egawa S, Unno M  
*Islets* 3 (5):259-266 2011
23. 吸入麻酔イソフルランが膵島移植に及ぼす影響  
山谷英之、**後藤昌史**、Feng Zhaoqiang、猪村武弘、小林英司、里見 進  
移植 46 (2 & 3):154-162:2011
24. 脳死および膵島分離操作が膵島の発現する炎症性メディエーターへ及ぼす影響  
齋藤之彦、**後藤昌史**、真屋 梢、藤盛 啓成、黒川良望、里見 進  
移植:46 (4 & 5):353-359:2011
25. C5a阻害による補体系・凝固系の cross-talkの抑制を介した移植後早期膵島障害の制御  
戸子台和哲、**後藤昌史**、稲垣明子、中西 渉、小川則彦、佐藤和重、川岸直樹、関口 悟、Bo Nilsson、岡田則子、**岡田秀親**、里見 進  
移植:46 (4 & 5):343-352:2011
- 〔学会発表〕(計 16 件)
1. 膵島移植を医療として確立するための技術革新  
**後藤昌史**  
第41回日本膵膵島移植研究会  
2014, March 8, 名古屋
2. Distinct role of collagenase subtypes in the isolation of large animal pancreatic islets  
**後藤昌史**  
2013 International Pancreas and Islet Transplant Association  
2013, Sep 25, Monterey (USA)
3. 安全で高性能な膵島分離用酵素剤の開発  
**後藤昌史**  
第49回日本移植学会  
2013, Sep 7, 京都
4. 膵島移植の現状と将来

後藤昌史

第 44 回日本膵臓学会  
2013, July 26, 仙台

5. Translational Research としての膵島移植

後藤昌史

第 25 回日本肝胆膵外科学会  
2013, Jun 12, 宇都宮

6. ドナー膵臓に至適化するテラーメード型膵島分離の実現へ向けて

後藤昌史

第 40 回日本膵膵島移植研究会  
2013, March 2, 高松

7. 急性炎症を伴う膵全摘疾患を対象とした自家膵島移植における膵島分離・移植法に関する提言

後藤昌史

第 48 回日本移植学会  
2012, Sep 22, 名古屋

8. The lessons learned from three cases of islet autotransplantation with a severe inflammatory status due to a rupture of a pancreatic arteriovenous malformation

後藤昌史

XXIV International Congress Of The Transplantation Society  
2012, July 17, ベルリン

9. リコンビナントタイプ新規膵島分離用酵素剤による分離膵島に起因する炎症性メディエーターの制御

後藤昌史

第 112 回日本外科学会  
2012, April 12, 東京

10. 高度炎症を伴う膵動静脈奇形に対する自家膵島移植 3 例の検証

後藤昌史

第 39 回日本膵膵島移植研究会  
2012, March 10, 旭川

11. 糖尿病治療のメディカルイノベーション

後藤昌史

第 47 回日本移植学会  
2011, Oct 5, 仙台

12. 臨床応用を目的とした大動物モデルにおける新規膵島評価法の有用性に関する検証

後藤昌史

第 47 回日本移植学会  
2011, Oct 5, 仙台

13. グラフト保護プロトコールの導入により良好な結果を得た急性腹膜炎下における

自家膵島移植症例の報告

後藤昌史

第 47 回日本移植学会  
2011, Oct 5, 仙台

14. A novel potency test for assessing the quality of isolated pancreatic islets using a scanning electrochemical microscopy

後藤昌史

2011 International Pancreas and Islet Transplant Association  
2011, June 2, プラハ (チェコスロバキア)

15. Development of a highly efficient collagenase for isolating pancreatic islets

後藤昌史

2011 International Pancreas and Islet Transplant Association  
2011, June 2, プラハ (チェコスロバキア)

16. Successful islet autotransplantation under severe inflammatory status due to a rupture of the pancreatic arteriovenous malformation by introducing a novel graft protecting protocol

後藤昌史

2011 International Pancreas and Islet Transplant Association  
2011, June 2, プラハ (チェコスロバキア)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 昌史 (GOTO, Masafumi)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授

研究者番号: 50400453

(2)研究分担者

増谷 弘 (MASUTANI, Hiroshi)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号: 50252523

(3)連携研究者

岡田 秀親 (OKADA, Hidechika)

名古屋市立大学・医学部免疫学教室・名誉教授

研究者番号: 30160683