

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890132

研究課題名（和文）肝臓内 NK 細胞の膵島移植に対する細胞傷害活性制御法の開発

研究課題名（英文）Regulation of cytotoxic activity of liver NK cells against islet graft

研究代表者

石山 宏平 (Ishiyama Kohei)

広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：50437589

研究成果の概要（和文）：1 型糖尿病に対する根治的治療法として期待されている膵島移植の成績向上の為に、肝臓内に存在するナチュラルキラー(NK)細胞の細胞傷害活性を制御することを目的とした研究を行った。サイトカイン刺激により活性化した NK 細胞の細胞傷害活性を、生理活性物質であるプロスタグランジン E2、TGF $\beta$ により抑制できることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：Islet transplantation becomes one of the therapeutic option for cure of type 1 diabetes. In this study, we have researched the possibility of regulation of natural killer cells cytotoxicity against transplanted islet graft. Co-culture with both prostaglandin E2 and TGF-beta can suppress the cytokine stimulated-NK cells cytotoxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：膵島移植、NK 細胞

### 1. 研究開始当初の背景

膵島移植は、1 型糖尿病患者の重度高血糖、コントロールに難渋する致命的な低血糖性ショックに対する根治的治療である。もうひとつの根治的治療である膵臓移植と比べて低侵襲かつ全身麻酔手術に伴う重篤な合併症が回避可能であるが、臨床膵島移植の成績は、1 年後、5 年後のインシュリン離脱率がそれぞれ 70%、10%と不良である。原因として膵島分離操作に伴う膵島の機能低下、肝臓内投与後の膵島グラフトの血流障害、IBMIR、免疫抑制剤による細胞毒性などが報告され

ているが、細胞免疫学的観点からの検討は未だ不十分である。

申請者は、肝臓内免疫細胞の細胞傷害活性が末梢血免疫細胞と比べて強く、中でも NK 細胞の細胞傷害活性が強力であることを証明した背景から、現在行われている臨床膵島移植のほぼ全例が移植部位として肝臓を選択し、経門脈的に膵島を投与していることに注目した。「膵島移植のグラフト生着率が不良である理由は、肝臓内 NK 細胞の強力な細胞傷害能によって肝臓内に移植された膵島グラフトが傷害を受けるためである」と仮説

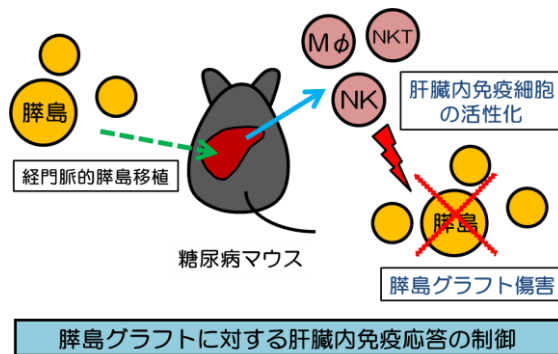
を立て、経門脈的膵島移植により肝臓内 NK 細胞の細胞傷害能が活性化されることで膵島グラフトが傷害を受けることを証明し、臨床膵島移植の際に NK 細胞の細胞傷害活性を制御する必要性について報告した。

## 2. 研究の目的

本研究では、臨床膵島移植の成績向上のために膵島グラフトに対する肝臓内 NK 細胞の細胞傷害活性を抑制するための新しい免疫抑制療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

下記の図に示す現象を解明するための研究方法を計画した。



### (1) NK 細胞の細胞傷害活性抑制シグナルを増強する因子の検討

当研究室では、肝臓内 NK 細胞上の CD81 分子の架橋形成が NK 細胞の細胞傷害活性を抑制することや、プロスタグランジン E2 による肝臓内 NK 細胞の活性抑制効果を確認しており、これらの研究背景を応用して肝臓内 NK 細胞の細胞傷害活性抑制因子を多方面から検索する。また、NK 細胞には阻害受容体シグナル制御蛋白・(SIRP  $\alpha$ ) が表出していることも確認しており、このレセプターを介した細胞傷害活性抑制効果も期待される。これら抑制レセプターに対するアゴニスト抗体やプロスタグランジン E2、IDO などの生理活性物質による NK 細胞の細胞傷害活性抑制効果を細胞株 (NK 細胞感受性株、 $\beta$  細胞株) に対する細胞傷害性試験を行い評価する。同時に、抗 CD81 分子抗体による抑制刺激後に TRAIL の表出が減弱していたことから、CD69、NKG2D、Nkp30 などの活性化シグナルや、CCR5、CXCR3 などのケモカイン表出も減弱していることが予測されるため、NK 細胞のフェノタイプをフローサイトメトリーで解析する。

### (2) 抑制因子刺激 NK 細胞の膵島に対する細胞傷害活性抑制効果の確認

研究計画 1. の後、抑制因子シグナル増幅刺激を受けた肝臓内 NK 細胞のマウス膵島に対する細胞傷害活性の抑制効果を細胞傷害性試験を行い評価する。膵島は TRAIL 受容体や、

MCP-1、CXCL10 などのケモカインを表出していることから、NK 細胞の表面抗原表出 (TRAIL、CCR5、CXCR3 など) の変化を調べると同時に、抑制因子刺激後の NK 細胞遊走能をマイグレーションアッセイやトランスウェルシステムを用いて評価し、細胞傷害能の機能的解析を行う。更に、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン濃度を測定し、免疫応答のバランスを調べる。

### (3) 抑制因子による経門脈的膵島移植の生着率延長効果の確認

STZ 投与により糖尿病マウスを作成する。NK 細胞抑制因子を投与した糖尿病マウスに対して経門脈的膵島移植を行いグラフト生着率を評価する。膵島グラフト機能は移植後にグルコース測定、血清 C ペプチド測定を定期的に行い評価する。また、膵島移植後にコントロール群、抑制因子投与群からそれぞれ肝臓を摘出し、NK 細胞の膵島グラフトに対する集積能を NK 細胞に特異的な NKp46 抗体を用いた免疫染色を行い評価する。

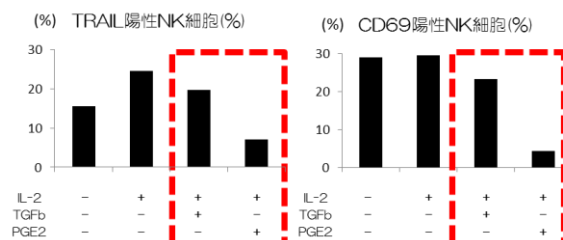
### (4) 抑制因子による肝臓内 NK 細胞抑制効果の確認

研究計画 3. と同様に、NK 細胞抑制因子を投与した糖尿病マウスに対して経門脈的膵島移植を行う。細胞傷害活性の抑制効果は、移植後にレシピエントから肝臓内 NK 細胞を採取して細胞株 (NK 細胞感受性株、 $\beta$  細胞株)、マウス膵島に対する細胞傷害性試験を行い評価する。同時に、膵島移植後の肝臓内 NK 細胞のフェノタイプを解析するために、研究計画 2. と同様に NK 細胞上の活性化シグナルやケモカイン表出をフローサイトメトリーで確認する。

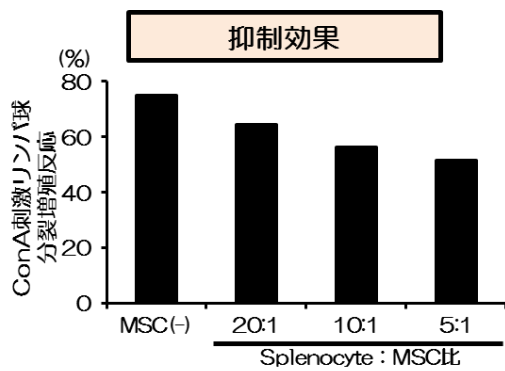
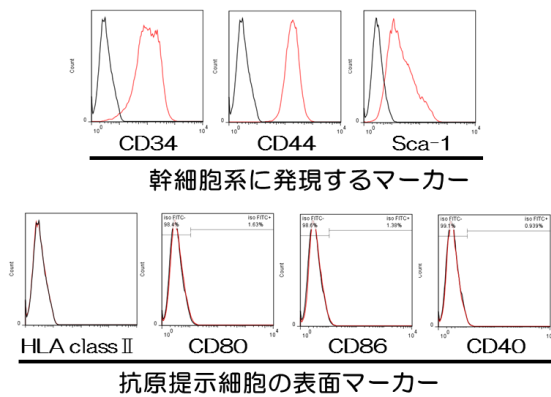
## 4. 研究成果

### (1) NK 細胞の細胞傷害活性抑制シグナルを増強する因子の検討

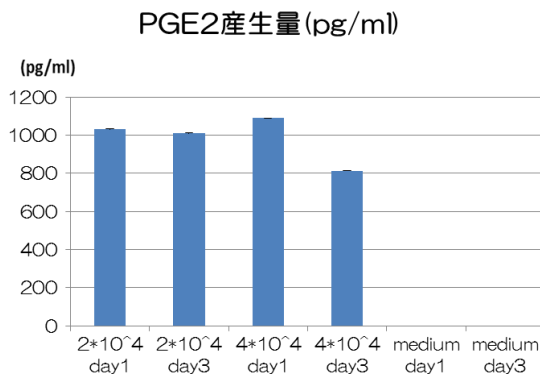
生理活性物質であるプロスタグランジン E2 や TGF  $\beta$  による NK 細胞活性抑制効果の検討を行った。サイトカイン (IL-2) 刺激を行った肝臓内 NK 細胞は予想通り細胞傷害分子 TRAIL を表出した。サイトカイン刺激下にプロスタグランジン E2 と TGF  $\beta$  を培養システム内に添加し、NK 細胞活性抑制効果をフローサイトメトリーで確認したところ、TRAIL 陽性肝臓内 NK 細胞や CD69 陽性肝臓内 NK 細胞の減少傾向を認めた。



引き続き、生理活性物質投与による検討を計画していたが、大量の投薬が必要になる点や薬剤の安定性についての懸念が生じてきたために、近年、免疫抑制作用について注目されている間葉系幹細胞 (MSC) を用いた研究の継続を行う事とした。まず、マウス骨髄から MSC を培養樹立することとした。樹立細胞のフェノタイプ解析の結果と、コンカナバリン A 刺激活性化リンパ球の分裂増殖能抑制効果により同細胞が MSC であることを確認した。

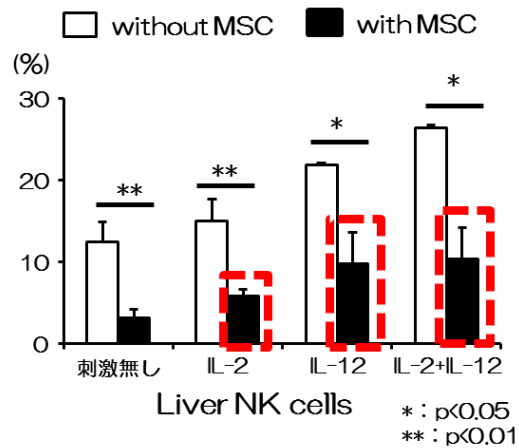


MSC から産生される生理活性物質を調べた結果、高容量のプロスタグランジン E2 が培養早期から検出されることが判明した。

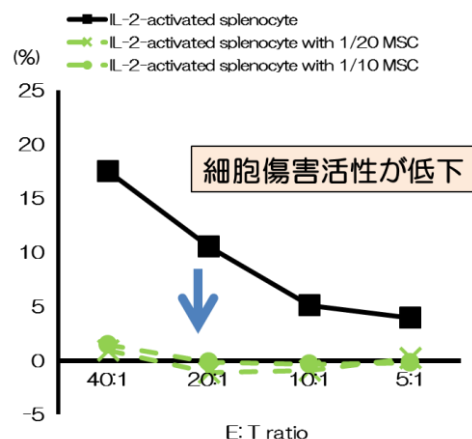
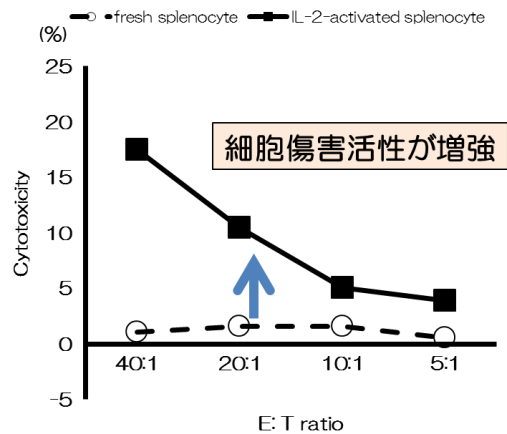


(2) 抑制因子刺激 NK 細胞の脾臓に対する細胞傷害活性抑制効果の確認  
活性化 NK 細胞に対する抑制因子による活性化抑制効果について MSC を用いた検討を行っ

た。まず、MSC と共培養することにより肝臓内 NK 細胞の活性化が抑制できるか研究を行った。サイトカイン (IL-2、IL-12) 刺激により細胞傷害分子 TRAIL を表出した NK 細胞の割合が増加するのに対して、MSC 存在下では有意に TRAIL 陽性 NK 細胞の抑制効果が認められた。



次に、細胞傷害性試験を行い MSC による細胞傷害能抑制効果の検討を行った。NK 細胞感受性株 Yac-1 に対する NK 細胞傷害活性はサイトカイン (IL-2) 刺激により増強していたが、MSC との共培養により、著明に減少していることが証明できた。



培養上清中のサイトカイン濃度の測定に関しては、現在、サンプルを保存している状態である。また、膵島に対する細胞傷害活性抑制効果の確認については、現在、進行中である。

(3) 抑制因子による経門脈的膵島移植の生着率延長効果の確認

現在、進行中である。

(4) 抑制因子による肝臓内 NK 細胞抑制効果の確認

In vitro でアッセイを確立した。現在、進行中である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

1. Yoshihiro Saeki, Kohei Ishiyama, et al, Mesenchymal Stem Cells Suppress Cytotoxic Activity of Natural Killer Cells in Islet Cell, Transplantation, American Transplant Congress 2013, 18~22 May 2013, Seattle USA
2. 石山 宏平、その他、肝臓内免疫応答制御による膵島グラフト機能傷害克服の試み、2013年3月1~2日、第40回日本膵・膵島移植研究会、高松
3. 平田 文宏、石山 宏平、その他、間葉系幹細胞産生プロスタグランディン E2 を介した肝臓内 NK 細胞活性抑制効果の検討、2013年3月1~2日、第40回日本膵・膵島移植研究会、高松
4. 平田 文宏、石山 宏平、その他、間葉系幹細胞を用いた肝臓内 NK 細胞活性化制御による移植膵島生着率改善の検討、2012年11月16~17日、第39回日本臓器保存生物医学会、福島
5. 石山 宏平、その他、肝臓内免疫応答による移植後膵島グラフト機能傷害克服の試み、2012年9月17~19日、第48回日本移植学会、名古屋
6. 石山 宏平、その他、TRAIL-TRAIL 受容体を介した肝臓内 NK 細胞による移植膵島傷害の解明、2012年4月12~14日、第112回日本外科学会定期学術集会、千葉

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石山 宏平 (Ishiyama Kohei)

広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教  
研究者番号：50437589

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：