

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240078

研究課題名(和文) 膵島細胞と免疫抑制細胞とからなる複合細胞凝集体の形成とその移植

研究課題名(英文) Transplantation of co-aggregates of islet cells and immune suppressor cells

研究代表者

岩田 博夫 (IWATA, Hiroo)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：30160120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制効果を有するセルトリ細胞、制御性T細胞または間葉系幹細胞と膵島細胞から成る複合細胞凝集体を作成し、これを移植することで免疫抑制剤の投与を必要としない膵島移植を実現することを目指した。免疫抑制効果を有するセルトリ細胞または制御性T(Treg)細胞と膵島細胞から複合細胞凝集体を糖尿病モデル同種異系マウスの肝臓内へ移植したところ、拒絶されることなく100日を超える長期生着し、血糖値がほぼ正常域に保たれていた。また、間葉系幹細胞(MSC)と膵島細胞の複合細胞凝集体については、リンパ球培養試験での間葉系幹細胞の免疫抑制効果を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of islets has been carried out to treat insulin-dependent diabetes mellitus. However, islet grafts must be maintained by administration of immunosuppressive drugs, which can lead to complications in the long term. An approach that enables to avoid immunosuppressive drug use is desirable. In this study, we examined the transplantation of co-aggregates of islet cells and other types of cells which have immune suppressive functions, such as regulatory T cells and Sertoli cells and mesenchymal stem cells (MSC). After intraportal transplantation of the co-aggregates into chemically induced diabetic mice, Treg cells or Sertoli cells in the aggregates enabled the long-term survival of allogeneic islet cell grafts in the liver without any use of immunosuppressive drugs. Functional evaluation of MSC-islet co-aggregates confirmed normal insulin secretory function and partial suppression of anti-CD3-activated splenocyte proliferation.

研究分野：総合領域

キーワード：ランゲルハンス氏島 膵島 制御性T細胞 糖尿病 血糖値 移植 皮下移植

1. 研究開始当初の背景

ランゲルハンス氏島(膵島)移植はI型糖尿病の根本的治療として期待され、また、その臨床応用は世界で年間数百例が行われている。臓器移植の免疫抑制剤としてよく用いられるステロイドは膵島に毒性を与えることから、ステロイドフリーのエドモントンプロトコルが導入されて、移植膵島の機能維持期間が格段に延長された。しかしながら、移植後5年経過後のインスリン注射の必要のない移植患者は依然として10%程度と報告されていた。その後、anti-thymocyte globulin(ATG)とTNF- α antagonistを用いた免疫抑制剤プロトコルが導入されると、膵島の機能維持期間が飛躍的に延長し、移植後5経過時のインスリン注射の必要のない移植患者は50%以上と全膵臓の移植と機能維持期間が遜色なくなるまで改善された。

特殊な例外を除いて総ての移植医療では免疫抑制剤の投与が行われている。現在、世界で年間300例程度が行われている総ての膵島移植においても、移植膵島の拒絶を防止するために免疫抑制剤の投与が行われている。しかし、免疫抑制剤の投与による副作用として、免疫能の低下に伴う易感染性、さらに、悪性腫瘍の発生などの致死的な副作用がある。また、ほとんどの臨床例では経門脈的に肝臓内の血管に膵島を移植している。近年では重篤な合併症が起きたとの報告はないものの、肝臓のような重要臓器への移植は避けたい。新たな移植部位の検討が必要である。

ドナーから提供された膵島を移植した場合には拒絶反応が当然起きる。また、I型糖尿病は自己免疫疾患であり、患者自身のiPS細胞から膵島が分化誘導されたとしても、移植すると自己免疫疾患が再燃する。免疫反応を抑えるために免疫抑制剤を飲む必要があるため、その副作用を考えると膵島移植を躊躇する患者も多い。免疫抑制剤を用いない膵島移植が関係者の夢である。免疫抑制剤の投与の必要としない膵島移植法について多くの研究が行われてきた。体の中には、制御性T細胞や精巣のセルトリ細胞など免疫系を抑制する細胞が存在する。さらに間葉系幹細胞など免疫系を抑制する細胞が存在することが知られている。特に、セルトリ細胞と膵島の共移植に関しては比較的多くの研究がある。これらの細胞をまずレシピエントに投与しておき、その後膵島を移植することで拒絶反応を制御する試みが行われてきた。その多くは、抑制性の細胞を静脈内に投与し、全身的に免疫反応を抑制し移植膵島の拒絶を防止しようとする試みである。

2. 研究の目的

免疫抑制剤の投与を必要としない膵島移植を実現することを目的とした。具体的には、出来るだけ少数のセルトリ細胞または制御性T細胞を用いて、移植膵島が存在する部位でのみ免疫反応を抑制し、膵島の肝臓内での

長期間の生着を目指した。

3. 研究の方法

免疫抑制効果を有するセルトリ細胞または制御性T細胞と膵島細胞から複合細胞凝集体を作成した。それらの複合細胞凝集体をストレプトゾトシンの投与で糖尿病を誘導した同種異系マウスの肝臓内へ移植した。移植後、免疫抑制剤の投与は一切行わなかった。もう一つの免疫抑制効果が期待できる間葉系幹細胞(MSC)と膵島細胞の複合細胞凝集体については、*in vitro*での間葉系幹細胞の免疫抑制効果を調べた。

4. 研究成果

セルトリ細胞と膵島細胞からなる複合細胞凝集体: BALB/c 膵島を分離精製しさらに酵素処理を行い単個細胞にした。別途、BALB/c マウスから調整しておいたセルトリと膵島細胞を混合し、ハンギングドロップ法を用いて複合凝集体を作成した。その複合細胞凝集体をストレプトゾトシンの投与で糖尿病を誘導したC57BL/6の肝臓内に移植した。7匹中6匹で100日以上血糖値が正常化した。複合細胞凝集体内ではセルトリ細胞がコアに、周辺に膵島細胞が位置すること、また、移植後取り出した後の組織像の解析から移植後100日以上経過した後もインスリンを含む細胞が存在し、その周囲にリンパ球が多数存在する像を得た。またネガティブな知見としては、移植膵島周囲の肝細胞にかなり厳しい空胞変性を認めた。

制御性T細胞と膵島細胞からなる複合細胞凝集体: BALB/c 膵島を分離精製しさらに酵素処理を行い単個細胞にした。別途、C57BL/6 マウスから調整しておいた制御性T細胞と膵島細胞を混合し、多くの凹(well)を有するアガロースゲル上へ細胞を播種し、4日間培養を行うと各wellの底に細胞凝集体が形成された。この複合細胞凝集体を免疫染色またFACSで分析したところ制御性T細胞(Foxp3 陽性)が凝集体細胞の約12%程度含まれていた。この共凝集体400個をストレプトゾトシンで糖尿病を誘導したC57BL/6の肝臓に経門脈的に移植した免疫抑制剤の投与は一切行っていない。移植共凝集体は9匹中6匹のレシピエントマウス中で拒絶されることなく100日を超える長期生着し、血糖値がほぼ正常域に保たれていた。また、移植後取り出した後の組織像の解析から、移植後100日以上経過した後もインスリンを含む細胞が多数存在し、セルトリ細胞との複合細胞凝集体の移植のときに見られた肝細胞の空胞変性は認められなかった。

間葉系幹細胞と膵島細胞から複合細胞凝集体: 間葉系幹細胞と膵島細胞から複合細胞凝集体をROCK inhibitor Y-27632の存在下または非存在下で作成した。非存在下では、異種細胞間の接着が極小となるよう両細胞が分離し、個別に凝集体を形成した。Y-27632

の存在下では、間葉系幹細胞 - 膵島細胞間のカドヘリンを介する細胞間相互作用が安定化され、複合細胞凝集体内では間葉系幹細胞がコアに、周辺に膵島細胞が位置していた。また、Y-27632 の存在下で作成した複合細胞凝集体について、糖負荷試験を行ったところ、グルコース濃度に応じてインスリンの分泌量を変化させ、膵島機能を維持していることが分かった。さらには、リンパ球培養試験で間葉系幹細胞の免疫抑制効果を明らかにした。

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 8 件)

Takemoto N, Konagaya S, Kuwabara R, Iwata H. Coaggregates of Regulatory T Cells and Islet Cells Allow Long-term Graft Survival in Liver Without Immunosuppression. Transplantation. 2015;99(5):942-947. 査読有

DOI: 10.1097/TP.0000000000000579.

Takemoto N, Liu X, Takii K, Teramura Y, Iwata H. Transplantation of co-aggregates of Sertoli cells and islet cells into liver without immunosuppression. Transplantation. 2014;97(3):287-293. 査読有

DOI: 10.1097/01.TP.0000438198.76531.03.

Hoffecker IT, Iwata H. Manipulation of cell sorting within mesenchymal stromal cell-islet cell multicellular spheroids. Tissue Eng Part A. 2014;20(11-12):1643-1653. 査読有

DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0305.

Takemoto N, Teramura Y, Iwata H. Immobilization of Sertoli cells on islets of Langerhans.

Biomater. Sci.2013;1(3):315-321. 査読有

DOI: 10.1039/C2BM00048B

[学会発表](計 12 件)

小長谷 周平, 竹本 直紘, 岩田 博夫: 膵島再構築 - 制御性 T 細胞による免疫抑制能の付与 -. 2015 年 3 月 19-21 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
岩田 博夫: 組織修復材料 + 細胞による糖尿病の治療. 京都市成長産業創造センター 一周年記念フォーラム 今を支え未来を創るケミストリー. 2014 年 11 月 27 日, 京都市成長産業創造センター (京都市伏見区)

Takemoto, N., Liu, X., Takii, K., Iwata, H. : Co-aggregates of Sertoli cells and islet cells allow long-term graft survival in liver without immunosuppression. 14th World Congress of International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA), 2013 年 9

月 24 - 27 日 Monterey Plaza Hotel (Canada, Monterey)

Nguyen, M.L., Iwata, H. : Layer-by-layer Co-immobilization of soluble complement receptor 1 and heparin on islets. 第 62 回高分子学会年次大会. 2013 年 5 月 29 - 31 日, 京都国際会館 (京都市左京区)

竹本 直紘, 劉 喜宝, 滝井 健人, 岩田 博夫: 免疫抑制剤を用いない膵島移植法へ - セルトリ細胞の利用可能性 -. 第 62 回高分子学会年次大会. 2013 年 5 月 29 - 31 日, 京都国際会館 (京都市左京区)

Hoffecker, I.T., Iwata, H. : In vitro control of mouse co-BMSC-islet spheroid organization through ROCK inhibition. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月 21 - 23 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

竹本 直紘, 劉 喜宝, 滝井 健人, 岩田 博夫: セルトリ細胞と膵ランゲルハンス島の複合細胞凝集体による糖尿病治療. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月 21 - 23 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Hoffecker, I.T., Iwata, H. : Protecting pancreatic islets with immuno-privileged cell types : co-aggregation and manipulation of emergent organization. R-GIRO ミニシンポジウム ~ 革新的アプローチで膵 β 細胞の生理機能 に迫る ~. 2013 年 1 月 28 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市)

Takemoto, N., Liu, X., Takii, K., Iwata, H. Transplantation of co - aggregates of dissociated islet cells and Sertoli cells to treat type 1 diabetes in mice, 3rd TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine) World Congress, 2012 年 9 月 6 日, Hofburg Congress Center (Austria, Vienna).

岩田 博夫: 細胞のレゴ、私のエゴ、組織のエゴ, 第 41 回医用高分子シンポジウム, 2012 年 6 月 26 日, 東京大学先端科学技術研究センター (東京都目黒区).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田 博夫 (IWATA, Hiroo)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号： 30160120

(2)研究分担者

平芳 一法 (HIRAYOSHI, Kazunori)
京都大学・再生医科学研究所・講師
研究者番号： 80199108

(3)連携研究者

なし