

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 6 日現在

機関番号：32682

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659596

研究課題名(和文)免疫抑制剤の膵ランゲルハンス島に及ぼす影響を解析する生体類似システムの構築

研究課題名(英文) A new selection system of suitable immunosuppressive drugs for each pancreatic islet transplantation using epigenetic analysis in a three-dimensional culture system

研究代表者

長屋 昌樹 (MASAKI, NAGAYA)

明治大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：90329300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病患者に対する治療、膵ランゲルハンス島移植(以下、膵島)の問題点には「膵島に対する免疫抑制剤の影響」がある。本研究では、「免疫抑制剤が膵島に及ぼす影響を解析できる生体類似三次元培養システムの構築」を目的とした。1) 膵島が緑色発光するブタから膵島を分離、培養下にて免疫抑制剤を添加、3) 経時的に膵島に対するエピジェネティックな遺伝子解析を行った。膵島は形態には異常を認めなくても、時間、濃度により遺伝子の変化がおきる群がある事が判明した。本システムは短時間の培養のみで長期の膵島の挙動を捕え、ヒトの膵島移植時の膵島の一部に本システムを用いれば個々の膵臓に適切な免疫抑制剤の選択が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The problem with pancreatic islet transplantation for type 1 diabetes is that the immunosuppressive drugs used can damage pancreatic beta cells. This project aimed to establish a new selection system of suitable immunosuppressive drugs for each islet transplantation using epigenetic analysis in a three-dimensional culture system. We first isolated islets from a transgenic pig specifically expressing the green fluorescent protein in the beta cells. These islets were cultured in the presence of an immunosuppressive drug. Thereafter, epigenetic analysis of the islets was performed. With time, we observed epigenetic changes in the insulin gene promoter of the islets in a certain group, although there was no change in their configuration. Our system can evaluate the short-term influence of immunosuppressive drugs on pancreatic islets, the system may be used to determine which immunosuppressive drugs are specifically suitable for each human islet transplantation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：糖尿病 膵ランゲルハンス島 膵島移植 免疫抑制剤 ヒト糖尿病類似モデルブタ エピゲノム パーソナライズド

1. 研究開始当初の背景

インスリン依存状態の1型糖尿病患者には、生活の質を改善させるべく膵ランゲルハンス島（以下、膵島）移植療法が行われている。膵島移植を受けた患者数は2005年まで増加したが、この年を境に漸減した (Diabetes. 2005; 54: 2060-9.)。検証にて、(1) 移植膵島の生着率の低さ、(2) 免疫抑制剤の副作用、(3) 免疫抑制剤の膵島への影響、が問題点としてあげられた。(1) に対するよい策がない今、(2, 3)への対応が現実的である。細胞治療が盛んな北米では、新しい免疫抑制剤の組み合わせにもと組み込んできているものの、免疫抑制剤は膵島移植療法の目的に反し、いまだ骨髄抑制、口腔内潰瘍、蛋白尿、感染など、様々な副作用を引き起こす事があり、患者の生活の質を落とすばかりか、時には命をも脅かす。また免疫抑制剤自身が、インシュリン mRNAの転写を阻害したり、膵島の機能低下を引き起こす事が判明してきている (Cell Transplant. 2009; 18: 833-45.)。これまで膵島移植における免疫抑制剤の使用法は、2000年にカナダのアルバータ大学から発表されたエドモントンプロコール (N Engl J Med. 2000; 343: 230-8.) をもとに改善、改良を加えたもので、免疫抑制剤の評価は、後ろ向きに臨床判断のもと検証せざるを得なかった。すなわち、免疫抑制剤が膵島に及ぼす影響を評価出来るシステムが存在しないことが、(2, 3)の克服を遅らせている。

2. 研究の目的

In vitro にて、短時間の培養のみで長期の膵島の挙動を捕え、免疫抑制剤の膵島への影響を最小に抑える薬剤を検索、また濃度、組み合わせが検証でき、膵島移植に最適な免疫抑制剤の選定が可能となる生体類似三次元培養システムを開発する。ヒトの膵島移植時の膵島の一部に本システムを用いる事により個々の膵臓に適切な免疫抑制剤の選択が

可能となる。

3. 研究の方法

本システムを開発するために、(1) 生体類似三次元培養法を用いた抗癌剤感受性試験、温度感受性ポリマー法を応用、(2) 膵島が緑色発光する pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx-1*)-Venus トランスジェニック (tg) ブタを使用、(3) 短時間の培養のみで長期の膵島の挙動を捕らえるため、エピジェネティックな遺伝子解析を行った。

(1) 筆者らが開発した生体類似三次元培養法を用いた抗癌剤感受性試験、温度感受性ポリマー法 (Surgery. 2007;142:741-8. Eur Surg Res. 2007;39:41-50. Surgery. 2006;140:387-95.) を応用した。温度感受性ポリマー法は非常に簡便な試験法であるが、正診率は約 90%と高く、適切な抗癌剤の選定、化学療法の臨床効果(奏効率)、致死的な副作用の回避に寄与してきた(先進医療; 平成 14 年 5 月 22 日保医発第 1522006 号)。

(2) Mouse *Pdx-1* 遺伝子 promoter 下に *Venus* 蛍光発色遺伝子を連続させ、膵島を恒常的に緑色発光させる事を可能にした tg ブタ (*Pdx-1* Venus tg ブタ)の膵島を使用した。膵島が発する緑色信号により細胞の純化、培養下における細胞の機能、生死の判別に有用となった。

(3) エピジェネティックな遺伝子解析手法を用いた。エピジェネティックな遺伝子解析は、短時間培養という時間的限界の中、免疫抑制剤の膵島への将来的な影響も遺伝子変化で予測できる。

膵島分離と培養; 膵島分離は *Pdx-1*-Venus Tg ブタの膵臓よりを行った (J Reprod Dev. 2014 Apr 21. [Epub ahead of print])。膵島は純化率 90%以上で、パステールピペットを用い約 150-200 μ m の膵島のみを 96 well/plate 上で温度感光性ポリマーに 1 膵島/well ずつ包埋した後、温度変化によりポリマーを三次元化させ膵島の培養を

行った。

免疫抑制剤；日本で行われる臨床試験、「重症低血糖発作を伴うインスリン依存性糖尿病に対する心停止ドナーからの膵島移植」で使用される、エタネルセプト、ミコフェノール酸モフェチル、タクロリムス(FK 506)の中から、最も解析が進んでいる FK 506 を用いた。培養下にある膵島に対し様々な濃度の FK506 (0.01、0.1、1、10 ug/ml)を添加した。

膵島の viability と機能評価；培養下にある膵島は緑色光を発するため、プレートリーダーにて real-time に viability を知ることができる。Pdx1-venus の緑色輝度を持って膵島の viability と機能を評価した。また一部の膵島に対し経時的に Propidium iodide(PI) 染色を行い、プレートリーダーによる Viability 評価法の精度を評価した。さらに機能評価には培養日数ごとに一部の膵島に対しインシュリン染色を行った。

エピジェネティックな遺伝子解析；Pdx1、インスリンプロモーター領域におけるメチル化の解析を行った。解析は6日ごとに培養開始後 30 日目まで行い、遺伝子変化を追跡した。

4 . 研究成果

本システムの構築に当たり、Pdx-1-Venus Tgブタを用いた理由は下記の通りである。Pdx-1-Venus tgブタから膵島は緑色信号を発するので膵島のみを回収できる。緑色信号からViability、及び機能をreal-timeにlive cellで判定できるなど、迅速性、簡便性、再現性、などの観点からも優れている。この検討をtracerのない膵島で同様に行う場合、腺房細胞、膵管細胞の混入は避けられず、正確性を欠いてしまう。事実、本プロジェクトにおいて膵島の純化率とそのviabilityの評価は極めて容易で、分離後の膵島はviability、純化率ともに90%以上であった。それゆえ、

システムの構築に当たり、安定した膵島の評価が可能であった。またブタ膵島はヒト糖尿病患者に対する異種膵島移植療法に使用されており、ニュージーランドでPhase1 trial、ロシアでPhase1/ IIa trialとして臨床試験が行われている (Living cell technologies (<http://www.lctglobal.com>)). ブタの膵島における検討は、ヒトへの臨床情報として収集するには好都合である。加えて、筆者らはヒト膵島移植とすべての工程において同様の手技を行うことが出来る“ヒト膵島移植類似モデル”を所有している。このヒト膵島移植類似モデルとは、ヒトの膵島移植と全てにおいて同じ工程が完遂できるモデルで、ブタ膵島をヒト糖尿病類似モデルブタに移植するものである。免疫抑制剤の免疫抑制効果の評価、副作用の観察はもとより、移植時から発生しうる全ての問題点の検証が可能である。In vitroの検討で選択された免疫抑制剤に対し、ヒト膵島移植類似モデルで免疫抑制効果を検証した結果はヒトの膵島移植へ外創できる。

免疫抑制剤添加下で培養される膵島を経時的に追跡した結果、培養30日目においては、培養開始時の膵島数の70%以上において形態に変化を認めることなく生存していた事が確認できた。培養30日目において、以下の3群の結果が確認できた。A 群；培養日数とともにPdx1-venusの蛍光が減弱し、細胞死が始まった膵島。B 群；培養日数には影響を受けることなくPdx1-venusの蛍光が確認でき生存していた膵島。C 群；長期培養下でPdx1-venusの蛍光が減弱したが、生存していた膵島。A 群は上述の長期培養に耐えられず生存できなかった30%以下の膵島と考えられる。これに関しては長期培養下では当然考えられる結果で検討に値しない。B 群は長期培養下でありながらも膵島が正常な機能を維持している可能性が高いと考えられた群で、今回の検討からは外れる。B群の膵島に対するインスリン染色でもインスリンの発現は確認でき、長期培養

下でも膵島の機能が維持されていた群であったことが確認された。システム構築の目的は、短時間の培養で、長期間、免疫抑制剤にさらされる膵島の変化を捕らえる事で、C群の結果が目的を反映していると推測した。筆者らの仮説の通り、C群は膵島の形態は維持されているもののインスリンのプロモーター領域がメチル化されていた群であった。膵島のインスリンプロモーター領域に対するメチル化の検討では、コントロール、FK506; 0.01、0.1ug/ml群においてメチル化は認められた膵島はごく僅かであった一方で、FK506; 1、10ug/ml群では多くの膵島でメチル化が始まっていた。FK506; 1、10ug/ml群の膵島は形態に変化は認めなくても免疫抑制剤の影響を受けていた群と考えられた(図1)。

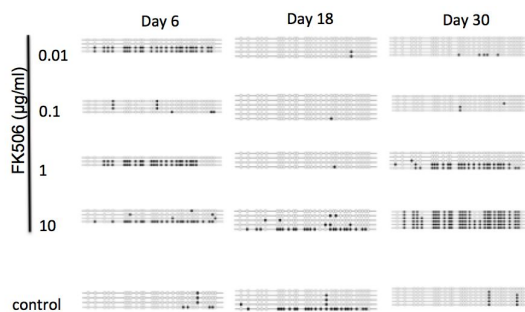


図1.ブタ膵島のインシュリンプロモーターに対するDNAメチル化解析.

本システムは免疫抑制剤を添加し30日間の膵島の培養を行うことにより、免疫抑制剤が膵島におよぼす影響が確認できるシステムである事が判明した。このシステムは現在、特願2014-027655.として特許申請中である。膵島移植は単一の免疫抑制剤の使用にとどまらず、いくつかの免疫抑制剤の組み合わせが行われる。ヒトの膵島移植時において、分離した膵島の一部に対し本システムを用いて検証することにより、個々の膵臓に適切な免疫抑制剤の選択が可能となる。

平成25年度の達成目標にはヒト糖尿病類似モデルブタに膵島のAllo-transplantationを行い、in vitroで選択された免疫抑制剤のin

vivoにおける免疫抑制効果の評価と、副作用の観察を行い、ヒトへの外創化を目的としたシステムの構築があった。膵島のヒト糖尿病類似モデルブタへの移植は2頭にとどまり、詳細な検討は今後の課題である。

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4件)

1. Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe M, Umeiyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. J Reprod Dev. 2014 Apr 21. [Epub ahead of print] 査読有。
2. Umeiyama K, Honda K, Matsunari H, Nakano K, Hidaka T, Sekiguchi K, Mochizuki H, Takeuchi Y, Fujiwara T, Watanabe M, Nagaya M, Nagashima H. Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs. J Reprod Dev 59: 599-603, 2013. 査読有。
3. Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeiyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg LA, Nakauchi H. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:4557-62. 査読有。
4. Nagashima H, Matsunari H, Nakano K, Watanabe M, Umeiyama K, Nagaya M. Advancing pig cloning technologies towards application in regenerative

medicine. *Reprod Domest Anim.* 2012;47
Suppl 4:120-6. 査読有。

〔学会発表〕(計 15 件)

(国際学会)

1. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeiyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H. In vivo exogenic organ generation with organogenesis-disabled cloned pigs as a platform. 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
2. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeiyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H. In vivo generation of exogenic pancreas in apancreatic cloned pigs via blastocyst complementation. 12th Congress of International Xenotransplantation Association: 10-13 Nov 2013; Osaka.
3. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Sakai R, Watanabe M, Umeiyama K, Kobayashi T, Yamaguchi T, Shiota A, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H. Generation of a double-transgenic pig with pancreas-specific green and liver-specific red fluorescence. 39th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. Jan 19-22, 2013; Hannover, Germany.
4. Nakano K, Watanabe M, Matsunari H, Matsuda T, Honda K, Maehara M, Kanai T, Hayashida G, Kobayashi M, Umeiyama K, Fujishiro S, Mizukami Y, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H. Production of chimeric porcine fetuses by aggregation method using parthenogenetic embryos. 39th Annual Conference of the International Embryo

Transfer Society. Jan 19-22, 2013; Hannover, Germany.

5. Tafaleng EN, Han B, Hale P, Nagaya M, Duncan SA, Stols DB, Strom SC, Fox IJ. In vitro modeling of α 1-antitrypsin deficiency using induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes from α 1-antitrypsin deficient patients. The 63rd annual meeting of the American Association for the Study of Liver disease. Nov 11-13, 2012; Boston, USA.
6. Kanai T, Matsunari H, Takeuchi Y, Honda K, Maehara M, Nakano K, Takayanagi S, Watanabe M, Umeiyama K, Tada N, Onodera M, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H. Transmission and expression of a retrovirally introduced red fluorescent protein gene in successive generations of transgenic pigs. International Congress on Animal Reproduction. July 29 - Aug 2, 2012; Vancouver, Canada.
7. Nakano K, Watanabe M, Matsunari H, Matsuda T, Honda K, Maehara M, Kanai T, Arai Y, Umeiyama K, Fujishiro S, Nagaya M, Nagashima H. Development of a feasible verification system for pluripotent stem cells using porcine parthenogenetic embryos. 10th International Society for Stem Cell Research. June 13 - 16, 2012; Yokohama.

(国内学会)

1. 松成ひとみ、浅野吉則、小林美里奈、内倉鮎子、渡邊将人、梅山一大、長屋昌樹、中内啓光、長嶋比呂志。膵臓欠損ブタ胎仔を用いた外来性細胞由来膵臓形成の試み。第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都。
2. 松村幸奈、前原美樹、本田香澄、林田豪太、倉本桃子、中野和明、松成ひとみ、

- 小林美里奈, 内倉鮎子, 浅野吉則, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志. ガラス化保存された体外成熟/体外受精胚を用いた糖尿病モデル遺伝子改変ブタの作出. 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
3. 渡邊将人, 松成ひとみ, 小林美里奈, 中野和明, 竹内靖浩, 前原美樹, 金井貴博, 松村幸奈, 林田豪太, 倉本桃子, 坂井理恵子, 梅山一大, 渡辺信之, 小野寺雅史, 長屋昌樹, 長嶋比呂志. 遠赤色蛍光蛋白 monomeric Plum を発現するトランスジェニックブタの作出とその利用. 第35回日本分子生物学会大会: 11-14 Dec 2012; 福岡.
4. 中野和明, 渡邊将人, 松成ひとみ, 松田泰輔, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 金井貴博, 新井良和, 梅山一大, 藤城修平, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志. ブタ単為発生胚を用いた凝集キメラ作出法. 第105回日本繁殖生物学会大会: 5-8 Sep 2012; 筑波.
5. 松成ひとみ, 金井貴博, 坂井理恵子, 中野和明, 渡邊将人, 梅山一大, 高柳就子, 小林俊寛, 山口智之, 塩田明, 長屋昌樹, 中内啓光, 長嶋比呂志. 豚・肝二色蛍光発現するトランスジェニックブタの開発. 第105回日本繁殖生物学会大会: 5-8 Sep 2012; 筑波.
6. 渡邊将人, 松成ひとみ, 小林美里奈, 中野和明, 前原美樹, 金井貴博, 松村幸奈, 林田豪太, 倉本桃子, 坂井理恵子, 梅山一大, 渡辺信之, 小野寺雅史, 長屋昌樹, 長嶋比呂志. 遠赤色蛍光蛋白 monomeric Plum を発現するトランスジェニックブタの作出. 第105回日本繁殖生物学会大会: 5-8 Sep 2012; 筑波.
7. 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 中野和明, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹. 再生医療研究のための大型動物モデルの開発. 第12回日本抗加齢医学会総会: 22-24 June 2012; 横浜.
8. 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹. 遺伝子改変ブタ・クローンブタのトランスレショナルリサーチへの応用. 日本実験動物医学会: 23 May 2012; 大分県.
- 〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)
名称: 免疫抑制剤の評価方法、及び免疫抑制剤評価キット.
発明者: 長屋昌樹, 長嶋比呂志.
権利者: 同上
種類: 特許 番号: 特願2014-027655.
出願年月日: 26年2月17日
国内外の別: 国内
〔その他〕 ホームページ等
明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート
<http://muiibr.com/institute/institute.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
長屋昌樹 (MASAKI NAGAYA).
明治大学・研究・知財戦略機構・客員教授.
研究者番号: 90329300
(2) 研究分担者
長嶋比呂志 (HIROSHI NAGASHIMA).
明治大学・農学部教授.
研究者番号: 50318664
梅山一大 (KAZUHIRO UMEYAMA).
明治大学・研究・知財戦略機構・特任准教授.
研究者番号: 70342699
渡邊将人 (MASATO WATANABE).
明治大学・研究・知財戦略機構・特任講師.
研究者番号: 00321688
新井良和 (YOSHIKAZU ARAI).
明治大学・研究・知財戦略機構・研究推進員.
研究者番号: 70639517