

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293281

研究課題名(和文) 移植膵島内 細胞再生誘導：マウス並びに米国より搬送されたヒト膵島を用いた実験研究

研究課題名(英文) Induction of pancreatic beta cell expansion in transplanted mouse and human islets by targeting receptor of advanced glycation endo products

研究代表者

安波 洋一 (Yasunami, Yohichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：00166521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵島細胞障害制御後には再生が誘導されるのではないかと想定し、同種同系マウス膵島移植、さらに米国より搬送されたヒト膵島を免疫不全マウスに移植する実験系を用いて、移植膵島を対象に膵細胞の再生について解析した。その際、Receptor for Advanced Glycation Endoproducts (RAGE)に着目した。その結果、RAGE欠損マウス膵島ではGLP-1Rの発現が優位に上昇し、移植膵島障害は発現しないのみならず、移植膵島のインスリン含有量が2倍に上昇することが判明し、移植膵島の再生を示す知見が得られた。ヒト膵島ではマウスで有用性が判明したRAGE阻害剤を用いて検討している。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to determine whether expansion of transplanted islets is induced when the injury of transplanted islets is prevented after transplantation. For those purposes, RAGE^{-/-} vs wild-type mouse islets are used as donors since RAGE signals have been reported to be involved in beta cell failure. It was found that RAGE^{-/-} islets are not only protected from the injuries but also expand after transplantation. The array analysis revealed that the beneficial effect of RAGE^{-/-} islets was mediated through the upregulation of GLP-1 R expression. In addition, RAGE inhibitors including soluble form RAGE (sRAGE) was found to have the similar beneficial effect when applied to wild-type islets prior to transplantation. In case of human islets, the effect of sRAGE was not evident when treated human islets were grafted beneath the kidney capsule of STZ-diabetic NOD/scid mice and therefore, the effects of other RAGE inhibitors are currently under investigation.

研究分野：移植外科学

キーワード：膵島移植 糖尿病 細胞再生 ヒト膵島 移植膵島再生

1. 研究開始当初の背景

臨床膵島移植は2000年にカナダのグループによる成功例が報告され(N Engl J Med 343:230, 2000), 米国、ヨーロッパを中心に実施例が増加している。我が国に於いても2004年に開始され、現在までに18例行われている。申請者施設では2006年に第一例目を実施した。臨床膵島移植の現在の最も重要な課題は一人の糖尿病レシピエントの治療成功に2-3回の膵島移植、すなわち2-3人分のドナー膵臓を必要とする事が挙げられる。一人のドナー膵臓より得られた1回の膵島移植では生着する膵島数が少なく、移植膵島から分泌されるインスリンだけでは不十分で、減量できるもののインスリン注射を移植後に継続する必要がある。この問題が細胞移植である膵島移植が同じ目的で行われている膵臓器移植に比し、未だ実験的治療といわれる所以であり、その解決が臨床膵島移植の急務となっている。この問題の解決には2つの方向性があり、一つは移植膵島喪失の原因解明と制御法開発、もう一方は生着した移植膵島の再生誘導法の開発である。

申請者は前者の移植膵島喪失の最も重要な因子である拒絶反応に関して、近年見出された免疫担当細胞であるNKT細胞が膵島移植の拒絶反応制御に必須の役割を担っていることを世界に先駆けて明らかにした((J Clin Invest 105: 1761-1767, 2000, Diabetes 55: 34-39, 2006)。更には膵島移植特有の拒絶反応として、移植部位(経門脈的肝内)の特性、すなわち生体の第一線防御臓器として機能している肝臓内への移植に着目し、膵島移植後には肝臓内で種々の生体防御反応、特に炎症反応を含む“自然免疫拒絶反応”が惹起され、移植膵島自身が障害される機序とその制御法を明らかにした(J Exp Med 202:913-918, 2005)。具体的にはマウス実験系を用い、肝内移植後には移植局所でNKT細胞依存性に浸潤好中球が活性化され、IFN- γ を産生、エフェクターとして機能し、移植膵島の50%以上を24時間以内に破壊する機序を明らかにした。そしてこのNKT細胞好中球IFN経路を標的にした治療法によりマウスでは1匹のドナーより2匹のレシピエントへの膵島移植を成功に導くことができた。この成果は臨床膵島移植の成績向上に極めて重要な知見を提示しており、内容が高く評価され、ハイライトセッションに取り上げられ、組織データが表紙に採用、また Nature Rev Immunol (5: 830, 2005)で紹介された。引き続き研究ではNKT細胞好中球IFN経路活性化の上流因子が移植膵島自身より放出される炎症惹起因子(HMGB1)であることを明らかにし、HMGB1を標的にした抗体療法で自然免疫拒絶反応が制御できることを報告した(J Clin Invest 120: 735-743, 2010)。更には移植膵島からのHMGB1放出の成因は、膵島の門脈内移植に伴う虚血(低酸素)障害であり、その際に膵島細胞膜に存在する

Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX)を介した細胞外から細胞内へのCa²⁺流入が移植膵島細胞死の必須因子として機能していることを見出した(submitted)。最も重要な知見はドナー膵島のNCX-inhibitorによる移植前pretreatmentにより、移植後膵島障害が制御できることを明らかにできた点にある。

自然免疫拒絶反応による肝内移植膵島障害(喪失)に関し、最近になり、我々の見出したNKT細胞好中球IFN経路をケモカインの観点から標的にした臨床膵島移植(第2相試験)の成績がイタリアのグループより発表された(J Clin Invest 122: 3647-3651, 2012)。それによると新規治療法により自然免疫拒絶反応による移植早期膵島障害が制御でき、一回の膵島移植後生着率が著しく向上することが示された。

上記知見により申請者は現在の臨床膵島移植が直面する課題、移植膵島喪失に起因する非効率性に関しては新規治療法開発の目的が立ち、今後の研究の方向性としては、もう一方の課題解決策である生着した膵島の再生誘導法の開発に注力すべきと考え、本研究申請に至った。

2. 研究の目的

インスリン産生細胞の再生については、従来ES細胞、iPS細胞、体性幹細胞よりインスリン産生細胞を創生する研究が主体である。そして、現在までにヒトES細胞からインスリン産生細胞の創生(Nature Bio Tech 24: 1392, 2006)、1型糖尿病患者の皮膚線維芽細胞より作成したiPS細胞よりインスリン産生細胞の創生(PNAS 106: 15768, 2009)の報告がなされている。しかしながら、インスリン産生細胞は得られたものの、細胞数は極端に少なく、また細胞の重要な機能、すなわちグルコース応答性インスリン分泌能の欠如、更には未分化細胞の移植に伴う腫瘍形成など、多くの課題があり、臨床応用には程遠く、その後の進展を示す報告は皆無である。一方、体性幹細胞に関しては新しい知見が蓄積されている。身体を構成する全ての細胞は、程度の差異はあるものの少しずつ入れ替わってホメオスタシスが維持されおり、膵細胞も同様と考えられる。その過程に於いて、膵前駆細胞より内分泌前駆細胞、外分泌前駆細胞、膵管前駆細胞、そして最終的には内分泌細胞(、、PP)、外分泌細胞、膵管細胞に分化する。最近の研究では特に膵内分泌細胞に関して、種々の遺伝子改変マウスを駆使して、膵前駆(幹)細胞より内分泌細胞の分化に係わる転写因子(Pdx1, Ngn3, NeuroD, FoxO1, MafA, MafB, Nkx2.2, Nkx6.1)が明らかにされ、今後の研究の進展が期待されている。すなわち、膵内分泌細胞の幹細胞を標的にしたインスリン産生細胞の再生誘導である。

本研究では膵島移植の手法を用い、移植膵島の内分泌幹細胞の動態解析、インスリン産生細胞の再生誘導に関する研究を行う。イ

インスリン産生細胞誘導にはグルコースシグナルが必須と考えられているが、持続する高血糖は膵細胞に対しては通常は毒性を有し、細胞死を招来する。申請者は仮説として、持続高血糖による細胞死を防止できれば再生シグナルが活性化され、インスリン産生細胞再生誘導が発現するのではないかと想定した。そして、種々のノックアウトマウス膵島をドナーとした同種同系膵島移植の予備実験の結果、幸いにも高血糖による膵島細胞死が Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) を介した経路によることを見出し、RAGE 欠損移植膵島では糖毒性は発現せず、移植後 30 日には Pdx1⁺Ki67⁺細胞が認められ、インスリン産生細胞の再生誘導を示唆する知見が得られた。本研究では、これらの予備実験結果を基盤に、マウス移植膵島、更には STZ-糖尿病 NODscid マウスに移植したヒト移植膵島について、インスリン産生細胞再生誘導を解析し、誘導因子、誘導法を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウス膵島を対照に Receptor for Advanced Glycation Endproducts(RAGE)欠損マウス膵島をドナーとして STZ-糖尿病マウスの腎皮膜下に移植する同種同系膵島移植の実験系で、経時的に移植膵島の機能(レシピエント血糖値)、光顕および電顕観察、ホルモン含有量測定を行った。また、米国から搬送されたヒト単離膵島を STZ-糖尿病 NODscid マウスに移植する実験系を確立した。次に膵細胞分化に關与する転写因子を含めた免疫組織学的、分子生物学的解析、並行して RAGE 欠損マウス vs 野生型単離膵島 (in vitro), 移植膵島 (in vivo) に関し、高濃度グルコース下での糖毒性に対する感受性相違の責任遺伝子をマイクロアレーで抽出し、RAGE に関連した膵島の糖毒性機序解析と制御法を見出した。ヒト膵島ではマウスと同様に移植膵島のインスリン産生細胞再生誘導を証明し、免疫組織学的、分子生物学的解析を行った

4. 研究成果

高血糖による膵島細胞死が Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) を介した経路によるとの予備実験結果に基づき、RAGE ノックアウトマウスの単離膵島をドナーとして用い、STZ 糖尿病同種同系マウスの腎皮膜下移植の実験系で、以下の成果を得た。

野生型マウス単離膵島をドナーとして用いる場合、一匹のドナーから単離できる膵島数、200個の移植で STZ 糖尿病マウスレシピエントの血糖は正常化した。50個の移植では高血糖で推移した。対照的に、RAGE ノックアウトマウス膵島がドナーの場合、50個膵島の移植で STZ 糖尿病レシピエントの血糖は正常化した。

野生型 vs RAGE ノックアウトマウスの

移植膵島を光顕ならびに電顕で観察した。移植後 60 日目の光顕で野生型移植膵島は明らかに変性し、免疫染色で細胞の脱顆粒が認められたが、RAGE ノックアウト移植膵島は正常形態を示した。移植後 14 日目の電顕像では野生型膵島細胞の細胞質に著しい空胞変性があったが、RAGE ノックアウトマウス移植膵島細胞は正常形態を保持していた。

RAGE の効果をブロックする soluble RAGE (sRAGE) を実験に用いた。野生型単離膵島に移植前 in vitro で sRAGE を作用させ、ドナーとして用いた。sRAGE 処置野生型膵島 50 個の移植で STZ 糖尿病マウス血糖は正常化した。

STZ-糖尿病 NODscid マウスの腎皮膜下に単離ヒト膵島を移植し、移植後レシピエント血糖が正常化しない、最大の膵島数をドナー膵島数 (marginal mass) として決定する必要があり、実験の結果、1000 IEQ (Islet Equivalent) であることが判明した。

RAGE 欠損 vs 野生型マウス単離膵島を用いて両者の違いをマイクロアレーで抽出し、RAGE 欠損膵島では *GLP-1R* の発現が優位に上昇していること、また RAGE 欠損膵島を GLP-1 阻害剤 (Exendin 9-37) で移植前処置すると効果がなくなることにより、RAGE 欠損膵島の生着率向上は GLP-1R を介した経路によるが証明できた。更には野生型マウス単離膵島に GLP-1 アナルグ (liraglutide) で前処置、移植後はレシピエントに投与 (皮下、60 日間) すると移植膵島障害が制御できることも明らかにした。

移植膵島再生に関し RAGE 欠損マウス移植膵島は移植後 120 日でインスリン含有量が 2 倍になることが判明した。 *InsI*, *InsII*, *glucagon*, *somatostatin*, *PP*, *Pdx1*, *Ngn3* の検索と染色は現在進行しており間もなくデータが完結する予定である。

RAGE 阻害剤に関してはすでに臨床使用されている薬剤で RAGE 阻害作用を有する化合物を見出しており、現在マウスならびにヒト膵島での効果を検討している。

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 7 件)

Inada A, Inada O, Fujii NL, Nagafuchi S, Katsuta H, Yasunami Y, Matsubara T, Arai H, Fukatsu A, Nabeshima YI. Adjusting the 17 β -Estradiol-to-Androgen Ratio Ameliorates Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol. In press. DOI: 10.1681/ASN.2015070741
Honda K, Kobayashi M, Okusaka T, Rinaudo JA, Huang Y, Marsh T,

Sanada M, Sasajima Y, Nakamori S, Shimahara M, Ueno T, Tsuchida A, Sata N, Ioka T, Yasunami Y, Kosuge T, Miura N, Kamita M, Sakamoto T, Shoji H, Jung G, Srivastava S, Yamada T. Plasma biomarker for detection of early stage pancreatic cancer and risk factors for pancreatic malignancy using antibodies for apolipoprotein-AII isoforms. *Sci Rep.* 5: 15921, 2015
DOI: 10.1038/srep15921

Itoh T, Nitta T, Nishinakamura H, Kojima D, Mera T, Ono J, Kodama S, Yasunami Y. HMGB1-mediated early loss of transplanted islets is prevented by anti-IL-6R antibody in mice. *Pancreas.* 44(1): 166-171, 2015
DOI:

10.1097/MPA.0000000000000188

Anazawa T, Saito T, Goto M, Kenmochi T, Uemoto S, Itoh T, Yasunami Y, Kenjo A, Kimura T, Ise K, Tsuchiya T, Gotoh M.

Long-term outcomes of clinical transplantation of pancreatic islets with uncontrolled donors after cardiac death: a multicenter experience in Japan. *Transplant Proc.* 46(6): 1980-4, 2014
DOI:10.1016/j.transproceed.2014.06.006

Mera T, Itoh T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M, Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y. Pretreatment of donor islets with the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. *Am J Transplant* 13(8): 2154-60, 2013
DOI: 10.1111/ajt.12306

Kuwahara G, Nishinakamura H, Kojima D, Tashiro T, *Kodama S. (*Corresponding Author) Vascular endothelial growth factor-C derived from CD11b⁺ cells induces therapeutic improvements in a murine model of hind limb ischemia. *J Vasc Surg.* 57(4): 1090-9, 2013
DOI: 10.1016/j.jvs.2012.08.121

Sorelle JA*, Itoh T*, Peng H, Kanak MA, Sugimoto K, Matsumoto S, Levy MF, Lawrence MC, Naziruddin B. Withaferin A inhibits pro-inflammatory cytokine-induced damage to islets in culture and following transplantation.

Diabetologia. 56(4): 814-24, 2013
DOI: 10.1007/s00125-012-2813-9

〔学会発表〕(計 11 件)

安波 洋一, 棟居 聖一, 新田 直柔, 濱口 百合子, 山本 靖彦 ドナー膵島の RAGE を標的にした移植膵島障害の新規制御法 第 43 回日本膵・膵島移植研究会 2016 年 3 月 4 日 ホテルグランヴィア広島 (広島市)

Yasunami Y, Seiichi M, Naoyoshi N, Yasuhiko Y. Early loss of transplanted islets is prevented by targeting receptor for advanced glycation end products of donor islets in mice. IPITA - IXA - CTS 2015 Joint Congress. November 18, 2015 Melbourne, Australia

Yasunami Y, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H. Rage of donor islets is a novel target to improve the efficiency of islet transplantation. 12th International symposium on the Maillard Reaction. September 4, 2015 ITO International Research Center, The University of Tokyo, Japan

Itoh T, Mera T, Nishinakamura H, Kodama S, Yasunami Y. Addition of a specific Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor into collagenase solution prevents hypoxic damage of islets during isolation, facilitating to improve the efficiency of islet transplantation in mice. The 2014 World Transplant Congress. July 29, 2014 San Francisco, USA

Tanaka T, Itoh T, Matsumoto M, Kojima D, Mera T, Nishinakamura H, Kodama S, Ono J, Yanase T, Yasunami Y. Expansion of Transplanted Islets by Co-transplantation of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells in Mice. 74th Scientific Sessions of American Diabetes Association. June 16, 2014 San Francisco, USA

田中智子, 伊東 威, 松本 征仁, 小島 大望, 米良 利之, 西中 村 瞳, 小玉 正太, 小野 順子, 柳瀬 敏彦, 安波 洋一 脂肪組織由来間葉系幹細胞による移植膵島生着率改善と膵島量増加効果 第 57 回日本糖尿病学会 2014 年 5 月 24 日 大阪国際会議場 他 (大阪市)

Yasunami Y. Current status and future direction of pancreatic islet transplantation. The 8th Spring Cell Therapy Symposium of IRICT. May 22, 2014 Seoul, Korea

田中智子, 伊東威, 松本征仁, 小島大望, 米良利之, 西中村瞳, 小玉正太, 小野順子, 柳瀬敏彦, 安波洋一 脂肪組織由来間葉系幹細胞による移植膵島生着率改善と膵島量増加効果 第41回日本膵・膵島移植研究会 2014年3月8日 ミッドランドホール(名古屋市)

Yasunami Y. A novel strategy to improve the efficiency of islet transplantation targeting Na⁺/Ca²⁺ exchanger of donor islets prior to transplantation. The 12th Beta Cell Research and Islet Transplantation Symposium. November 23, 2013 Seoul, Korea

Itoh T., Mera T, Kita S, Kodama S., Kojima D, Nishinakamura H, Iwamoto T, Omori K, Ono J, Watarai H., Taniguchi M., Yasunami Y. The early loss of transplanted islets is prevented by targeting Na⁺/Ca²⁺ exchanger of donor islets prior to transplantation. IPITA 14th World Congress. September 25, 2013 Monterey, USA

Itoh T., Mera T, Kita S, Kojima D, Nishinakamura H, Ono J, Iwamoto T, Kodama S., Yasunami Y. Pretreatment of Donor Islets with a Specific Inhibitor of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Prior to Transplantation Improves the Efficiency of Islet Transplantation. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation September 5, 2013 Kyoto, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安波 洋一 (YASUNAMI, Yohichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：00166521

(2) 研究分担者

小玉 正太 (KODAMA, Shohta)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：90549338

伊東 威 (ITOH, Takeshi)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70634400

三角 佳生 (MISUMI, Yoshio)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：10148877

(3) 連携研究者

谷口 克 (TANIGUCHI, Masaru)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：80110310

渡会 浩志 (WATARAI, Hiroshi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：70415339