

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461946

研究課題名(和文) 臨床膵島移植の成績を改善するための次世代ストラテジーを用いた包括的研究

研究課題名(英文) Comprehensive characterization of next generation strategy to improve clinical islet transplantation

研究代表者

川本 弘一 (Kawamoto, Koichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：30432470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、臨床膵島移植の成績を改善するための方法として、免疫抑制プロトコールでは、なるべくautophagyを誘導しない薬剤を選択し、さらに肝細胞再生におけるニッチの構築同様、膵島細胞も膵ニッチの構築が必要となる可能性が示唆された。また、膵細胞の誘導効率を改善する方法として条件培地を用いることで、比較的簡便に膵細胞様細胞が得られた。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we have demonstrated that immunosuppressants, which induce autophagy, might be avoided. Furthermore, pancreatic niche formation like liver niche would be good option for both islet transplantation and stem cell differentiation. The use of conditioned medium could improve beta cell differentiation.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵島 細胞 再生医療 移植

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は、自己免疫的反応のため、患者自身のインスリン産生細胞が破壊されてしまうことで絶対的なインスリン量の不足が原因で発症する。1 型糖尿病では強化インスリン療法が必要となる。さらに、その中には糖尿病専門医が外来経過観察しても血糖コントロールが困難な症例も存在する (Brittle 型糖尿病)。このような 1 型糖尿病患者に対し、脳死または心停止ドナーから提供された膵臓から分離した膵島をレシピエント患者に移植する同種膵島移植は、血糖コントロール困難である 1 型糖尿病の根治的治療法として期待されている。本研究では、臨床膵島移植の成績を改善するための新規治療法の開発を目的として研究計画を立案した。これまでに我々の研究グループでは、膵島に mTOR 阻害剤である rapamycin を投与すると autophagy が誘導されることを示しており、薬剤投与による autophagy の意義を解明することで治療成績の改善が得られる可能性が示唆される。また膵島移植時に幹細胞等と共移植することで成績を改善する方法がこころみられており、マウスレベルでは有効性が証明されている。ただし、臨床レベルでの報告は少ないため、より共移植の成績を改善する方法の開発も必要とされている。また、これまで多くの研究がなされてきたが、いまだに再生医療に応用可能な細胞が開発されていない現状を鑑みると、より簡便に細胞様細胞を誘導するストラテジーも要求される。

2. 研究の目的

本研究では、まず、臨床膵島移植の成績を改善するために、どのような分画の幹細胞が共移植に有効であるか解析する。次に、臨床応用可能で、幹細胞から細胞様細胞への分化効率を改善するなるべく簡便な方法を開発する。さらに、薬剤誘導性の autophagy により本来の薬効が阻害されている可能性を検討し、どのような免疫抑制プロトコルが必要か検討する。個別のテーマで得られた結果を総合的に解析することも目的としている。また、必要であれば細胞の分化効率を高めるための in silico での検討も試行する (文献 4)。

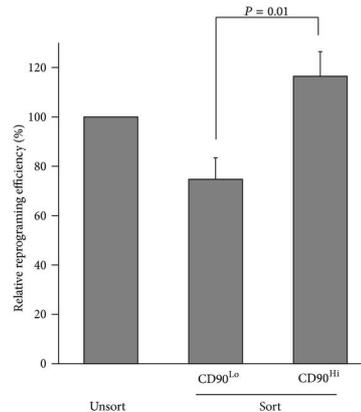
3. 研究の方法

マウス脂肪組織から脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose-derived mesenchymal Stem Cell; ADSC) を分離、細胞表面マーカーを FACS 等で確認する。どのような分画において、リプログラミング効率が高いか解析する。次にインスリノーマ細胞株である MIN-6 から得られた条件培地を用いて ADSC を培養することで分化効率を改善可能か解析する。本研究では、in vitro および in vivo において BRAF 阻害剤で autophagy が誘導されるか解析する。また、autophagy 阻害剤で薬効が増強されるか

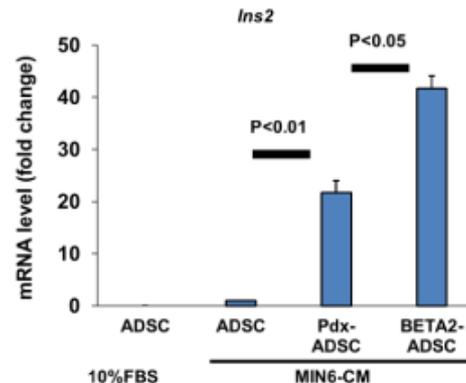
検討する。

4. 研究成果

CD90^{high} 分画は CD90^{low} 分画と比較してリプログラミング効率が高かったため、このような細胞分画が移植医療に上乗せする時のマーカーとなることが示唆された (文献 11)。



また、マウス ADSC に BETA2 を導入した上で、MIN-6 の培養上清から得られた条件培地で培養することで、ADSC の分化効率は改善した (文献 9)。



BRAF 阻害剤投与で autophagy が誘導され、これは autophagy 阻害剤を併用することで薬剤の作用を増強した (文献 1)。免疫抑制プロトコルから autophagy が亢進する薬剤を用いる場合は注意が必要である可能性が示唆された。また、糖鎖マーカー等の新規分化マーカーを引き続き探索する必要性も示唆される。同種臨床膵島移植の成績は欧米の成績は比較的安定しており (CIT-07)、本邦でも同様の臨床試験の結果が期待される。

一方で、臓器移植法改正にも関わらずドナー提供数は頭打ちとなっている印象もあるため、ドナー不足の改善が困難である場合を想定し、引き続き他のソースの臨床応用も考慮する可能性もある。例えばブタ膵島を用いる異種移植も本邦で実施可能となった背景もあり、パイロットスタディの遂行と、その結果に期待が寄せられている。

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 11 件)

1. BRAF V600E inhibition stimulates AMP-activated protein kinase-mediated autophagy in colorectal cancer cells. Sueda T, Sakai D, Kawamoto K, Konno M, Nishida N, Koseki J, Colvin H, Takahashi H, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H. *Sci Rep*. 2016 Jan 11;6:18949.
2. Maekawa T, Kamada Y, Ebisutani Y, Ueda M, Hata T, Kawamoto K, Takamatsu S, Mizutani K, Shimomura M, Sobajima T, Fujii H, Nakayama K, Nishino K, Yamada M, Kumada T, Ito T, Eguchi H, Nagano H, Miyoshi E. *World J Gastroenterol*. 2016 May 7;22(17):4403-10.
3. A CD13 inhibitor, ubenimex, synergistically enhances the effects of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma. Yamashita M, Wada H, Eguchi H, Ogawa H, Yamada D, Noda T, Asaoka T, Kawamoto K, Gotoh K, Umeshita K, Doki Y, Mori M. *Int J Oncol*. 2016 in press.
4. A Trans-omics Mathematical Analysis Reveals Novel Functions of the Ornithine Metabolic Pathway in Cancer Stem Cells. Koseki J, Matsui H, Konno M, Nishida N, Kawamoto K, Kano Y, Mori M, Doki Y, Ishii H. *Sci Rep*. 2016 Feb 11;6:20726.
5. Pyruvate kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells. Konno M, Ishii H, Koseki J, Tanuma N, Nishida N, Kawamoto K, Nishimura T, Nakata A, Matsui H, Noguchi K, Ozaki M, Noguchi Y, Shima H, Gotoh N, Nagano H, Doki Y, Mori M. *Regenerative Therapy*. 2015, 63-71.
6. Prognostic Impact of Peritumoral IL-17-Positive Cells and IL-17 Axis in Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma. Asukai K, Kawamoto K, Eguchi H, Konno M, Nishida N, Koseki J, Noguchi K, Hasegawa S, Ogawa H, Yamada D, Tomimaru Y, Tomokuni A, Asaoka T, Noda T, Wada H, Gotoh K, Marubashi S, Nagano H, Doki Y, Mori M, Ishii H. *Ann Surg Oncol*. 2015 Dec;22 Suppl 3:S1524-31.
7. Clinicopathological Significance of Leucine-Rich 2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients With Pancreatic Cancer. Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tanida T, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T, Satomura S, Ito T, Serada S, Naka T, Mori M, Doki Y, Miyoshi E, Nagano H. *Pancreas*. 2015 Jan;44(1):93-8.
8. Embryonic MicroRNA-369 Controls Metabolic Splicing Factors and Urges Cellular Reprograming. Konno M, Koseki J, Kawamoto K, Nishida N, Matsui H, Dewi DL, Ozaki M, Noguchi Y, Mimori K, Gotoh N, Tanuma N, Shima H, Doki Y, Mori M, Ishii H. *PLoS One*. 2015 Jul 15;10(7):e0132789.
9. NeuroD1 with conditioned medium efficiently induce ASC to insulin-producing cells both in vitro and in vivo. Kawamoto K, Yabe S, Konno M, Ishii H, Nishida N, Koseki J, Fukuda S, Tomimaru Y, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Tanemura M, Ito T, Lee EY, Mukai E, Miki T, Doki Y, Mori M, Hamazaki TS, Nagano H, Okochi H. *J Stem Cell Res Ther* 4:221, 2014.
10. Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. Hamabe A, Konno M, Tanuma N, Shima H, Tsunekuni K, Kawamoto K, Nishida N, Koseki J, Mimori K, Gotoh N, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ishii H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 28;111(43):15526-31.
11. CD90- (Thy-1-) high selection enhances reprogramming capacity of murine adipose-derived mesenchymal stem cells. Kawamoto K, Konno M, Nagano H, Nishikawa S, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Tanemura M, Ito T, Doki Y, Mori M, Ishii H. *Dis Markers*. 2013;35(5):573-9.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 伊藤 壽記:異種移植に対する日本膵・膵島移植研究会からの提言. ジョイントシンポジウム. 第 15 回日本再生医療学会総会
2. 川本弘一:平成 25 年度日本臓器保存生物医学会奨励賞 受賞記念講演,臨床膵島移植成績の改善を目指した基礎研究-共移植モデルと新規 細胞誘導法の効果について-, 2014 年 11 月
3. Kawamoto K. The Qatar-Japan Symposium on Tissue Regeneration Therapy 招請講演(invited lecture) Islet Cell Biology, Regeneration, and Transplantation. Doha, Qatar in 2014.

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www001.upp.so-net.ne.jp/CancerPr
ofiling/index.htm](http://www001.upp.so-net.ne.jp/CancerPr
ofiling/index.htm)

第15回日本再生医療学会総会：査読審査

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本弘一 (Kawamoto, Koichi)
大阪大学大学院，医学系研究科，
特任助教（常勤）

研究者番号：30432470

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：