

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26293294

研究課題名(和文) 脾臓が誘導する移植膵島の再生機構

研究課題名(英文) The spleen is an ideal site for inducing transplanted islet graft expansion

研究代表者

小玉 正太 (KODAMA, SHOHTA)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：90549338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)： 現行の膵島移植部位である肝臓は、炎症(IBMIR)と障害を受けた膵島から放出されるタンパク(DAMPs)により、細胞障害を増長し自然免疫を介した炎症の負のスパイラルを呈することが知られている。膵島を脾臓に移植した結果、MCP-1、G-CSF、HMGB1などによる早期炎症反応が制御され、肝臓の1/4、腎皮膜下の1/2の膵島移植量で糖尿病マウスの血糖を正常化することが可能であり、さらに長期では、Tlx1(Hox11)関連遺伝子の検索で、増殖に関わるRrm2bと調節性T細胞やマクロファージなどで抗炎症に関わるPla2g2dの高発現が認められ、肝臓の1/8の膵島移植量で十分であることが判明した。

研究成果の概要(英文)： Previously, we reported that T cell leukemia homeobox 1 (Tlx1)+ stem cells in the spleen effectively regenerated into insulin-producing cells in the pancreas of non-obese diabetic mice with end-stage disease. Thus, we investigated the spleen as a potential alternative islet transplantation site. Streptozotocin-induced diabetic C57BL/6 mice received syngeneic islets into the portal vein (PV), beneath the kidney capsule (KC), or into the spleen (SP). Some plasma inflammatory cytokine levels in the SP group were significantly lower than those of the PV group after receiving a marginal number of islets, indicating reduced inflammation in the SP group. Insulin contents were increased 280 days after islet transplantation compared with those immediately following transplantation ($p<0.05$). Additionally, Tlx1-related genes, including Rrm2b and Pla2g2d, were up-regulated, which indicates that islet grafts expanded in the spleen.

研究分野：再生医学、幹細胞治療、膵島移植、

キーワード：膵島移植 膵島再生 膵島移植部位 脾臓 DAMPs IBMIR Rrm2b, Pla2g2d Tlx1(Hox11)

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は1型糖尿病の低侵襲根治術であるにもかかわらず、その初回移植のみによるインスリン離脱率は低く、更にドナー不足による国内移植の低迷など、1型糖尿病患者を取り巻く膵島移植環境は未だ厳しいと言わざるを得ない。更に一回の膵島移植でインスリン離脱は難しく、インスリン離脱に至る為には数度の移植を余儀なくされているのが現状である。これらの問題から1型糖尿病患者を解放する治療戦略として、早期移植膵島細胞の生着不良を回避し、更に移植膵島再生を考慮した新たな治療法の確立が急務である。再生機転を促す効率的な移植部位の検討は、一人のドナーからの単離膵島で、複数レシピエントのインスリン離脱をもたらす有力な手法となる可能性がある。

現在臨床で行われる膵島の移植部位として、経門脈的に移植膵島を移入する肝臓が選択されている。これは肝臓が、膵臓から分泌されたインスリンと、生理的に同じ門脈血流により運搬される事や、1980年代から始まった大型動物の実験成果に起因する。しかし近年、免疫担当臓器である肝臓に膵島を移植することは、特異な免疫応答により早期移植膵島細胞の生着不良を惹起されることや、低酸素状態により移植膵島が機能不全に至る結果の為であることを、明らかとしている。従って、これら移植膵島の生着不良や機能不全を生じる事なく、生着効率が良い移植部位を確立することは、初回移植のみによるインスリン離脱率を改善する重要な意義がある。

今回我々が移植候補部位として挙げる脾臓と膵島や、インスリン依存型糖尿病発症に関連する研究は、意外にも古くから行われているが、それを知る研究者は少ない。成人膵臓に於ける膵島の分布は膵頭部・膵体部に少ない一方、脾臓に隣接する膵尾部に最も多く密に存在している。マウス・ラットの小型動物からブタ・サルに至る大型動物、実際臨床施行時のヒトに至るまで、膵尾部の膵島単離効率が膵島収量を大きく左右する事は経験的に広く知られている事であった。ではこの膵島分布が何に起因し、どのような意味があるのだろうか。我々は膵島再生を促す因子として、Hox11をはじめとする転写因子や脾細胞が膵島への分化を誘導したり、分泌する成長因子や増殖因子に注目してきた。

元来、脾臓はインスリンの mRNA を保持しながら、インスリン蛋白を通常は発現していない臓器である。しかし、ストレプトゾチン誘導膵島障害や高脂肪食によって、プロインスリンやインスリン蛋白が発現する事が他のグループから報告されている(Chan L., et.al. Proc Natl Acad Sci 101, 2458, 2004)。更に我々は脾臓で免疫応答を改編する処置を行うと iPS 細胞の初期化遺伝子を発現する事を報告した。これらは脾細胞が膵島分化や誘導に関与する可能性を強く示唆する結果であった。加えて驚くべき事実であるが、脾合併膵体尾部切除は単に膵体尾部切除を行うより1型糖尿病の発症を誘発する事(Br J Surg 86, 895, 1999, Ann Surg 236, 612, 2002)や摘脾術は耐糖能障害を誘発する事(J Surg Res 177,

152, 2012)が以前より報告されてきている。また、我々の成果を参考文献に挙げ、「脾臓 - 移植であらたな膵島を提供出来る可能性-」といった論文まで *Oxford University, UK* のグループから報告されている(J Pediat Surg 43, 274, 2008)。これは脾臓が再生機転の働く、新たな候補移植部位となる事を強く示唆するものであった。

2. 研究の目的

1型糖尿病の根治治療である膵島移植は膵臓器移植に比べ低侵襲で合併症も少なく、低血糖発作やインスリン治療から解放される治療法として期待されている。さらに、移植成績はその単離法と免疫抑制剤の改良と共に、数年後は膵臓器移植成績と並ぶ可能性が高い。また現在、厚労科で進行する、新たな免疫抑制剤を用いた膵島移植の治験成果により、将来保険診療として数年後認可される可能性が高い。しかし、今後脳死ドナー提供が多く、数回に渡りレシピエントに移植される機会の多い欧米と異なり、初回一回の移植によりインスリン離脱を成功させる事が、膵島移植が膵臓器移植に代わる低侵襲治療法として国内で定着する、最大の課題となっている。

我々は前段階試験で Streptozotocin(STZ)による膵島障害、糖尿病モデルマウスの脾臓へ膵島を移植したところ、他の膵島移植部位候補である肝臓、腎被膜下の 14%、33%の総膵島量で血糖が正常化することいが判明した。組織染色では生着グラフト内部にリンパ管ネットワークの構築を認め(LYVE-1 陽性細胞の進展)、血管内皮(vWF 陽性)細胞の多寡に比べ有意な因子となっていた。

前段階試験の結果を踏まえ、1型糖尿病のモデルマウスである NOD マウスが糖尿病発症後、臨床膵島移植導入療法で使用される抗サイモグロリン抗体を用い、肝臓で正常血糖化する膵島総量の 14%で脾臓へ膵島移植を行う。正常化した脾臓と同量の膵島移植を行った肝臓、腎被膜下でのグラフト生着結果や膵島再生に起因する候補蛋白・遺伝子を、蛋白質質量分析や遺伝子解析で検索し、リンパ管増殖因子も含め関連する調節機構を明らかにする。更に、本邦で今後増加が予想される、慢性膵炎の自家移植での臨床応用も念頭におき、カニクイザルを使った実験により、安全性の確認を時限内に行なうことを目的とした。

3. 研究の方法

再生機転を促す効率的な移植部位である脾臓に、単一ドナーからの単離膵島を移植し、複数レシピエントのインスリン離脱をもたらす事を、自然発症1型糖尿病モデル(Nonobese Diabetic: NOD)マウスで証明する。更に膵島再生に起因する候補蛋白・遺伝子を、蛋白質質量分析や遺伝子解析で検索し、リンパ管増殖因子も含め関連する調節機構を明らかにする。申請研究のゴールとして、臨床応用を目指しカニクイザルで膵島脾内移植プロトコルを確立する。

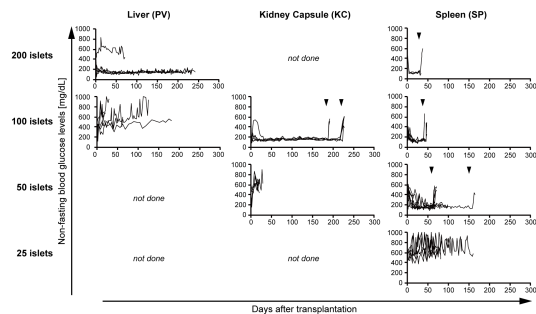
<1> 自然発症1型糖尿病モデル NOD マウスを

用いた同種同系および同種異系の膵島脾内移植

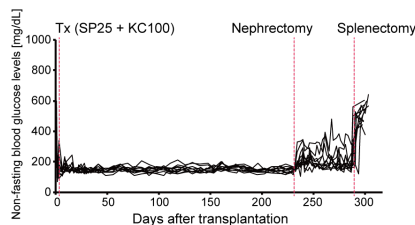
<2> STZ 追加膵切除により糖尿病を発症したカニクイザルへの自家および同種膵島脾内移植を当初予定した。

4. 研究成果

野生型である C57BL/6 マウスを用いたドナーからの単離膵島を、Streptozotocin(STZ)で誘導した糖尿病の同種同型マウスに移植を行なった、移植部位の違いによる生着成績は、

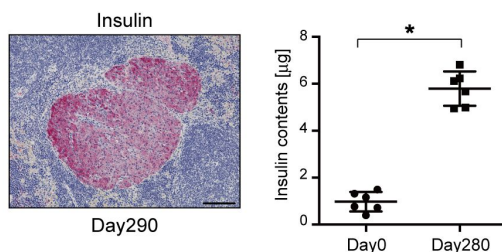


脾内移植 100 個(SP100)はグラフト脾を摘出するまで正常血糖を示し、脾内移植 50 個(SP50)でも同様の結果であった(n=3 は Day120 まで脾摘出を施行せず)。脾内移植 25 個(SP25)では移植後 90 日間で正常血糖に至る事は無かったが、単独 STZ 180mg/kg 経尾静脈投与、高血糖群に比べ有意に糖尿病による死亡率が低かった。



更に脾内移植 25 個(SP25)に加え、腎皮膜下移植 100 個(SP100)を行なった系では、移植後約 32 週の腎摘出後も 11 匹中 8 匹は正常血糖を推した。移植部位として膵島を脾臓に移植した結果、肝臓の 1/4、腎皮膜下の 1/2 の膵島移植量で糖尿病マウスの血糖を正常化することが可能であり、さらに長期で血糖推移の観察を行った実験では、現在臨床で移植される肝臓の 1/8 の膵島移植量で十分であることが判明している。

長期生着を得た膵島の移植部位である脾臓ではインスリン含有量が増大し、

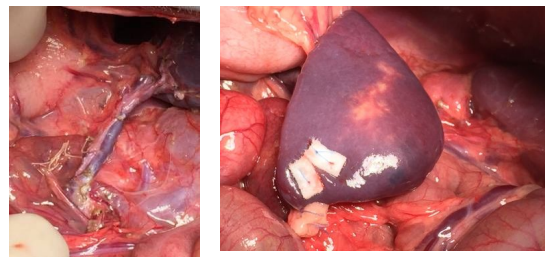


MCP-1、G-CSF、HMGB1 などによる早期炎症反応が制御され、Tlx1(Hox11)関連遺伝子の検索では、細胞増殖に与関する Rrm2b と制御性 T 細胞やマクロファージなどで抗炎症に与関する

Pla2g2d の高発現が認められ、膵島の長期生着に関わることが明らかとなっている。

<1> 自然発症 1 型糖尿病モデル NOD マウスを用いた同種同系および同種異系の膵島脾内移植を 6 週齢メス NOD から単離した膵島 50 個を糖尿病自然発症したメスレシピエントに移植 抗サイモグロブリン抗体投与による自己免疫応答改変レシピエントで 同様の移植を行なった。 は 10 日前後で前例拒絶されたが、ではリンパ球減少症をはじめとする所見が、TNF-alpha 投与時の随伴効果に酷似しており、約 30 日間のグラフト生着をみた。

<2> 膵全摘術により糖尿病を発症するカニクイザルへの自膵島脾内移植では、カニクイザルを(n=2)を全身麻酔下に開腹し、脾臓温存膵全摘術を行なった。摘出された膵臓は膵管カニューレーション後、リベレース MTF-S 注入し膨化、38 度で静置消化後、非連続比重遠心法により純化した。平均膵島収量は 5107 ± 423 IEQ で各々に移植した。移植後は 1 月間ほぼ正常血糖を続け 1 月後 IVGTT でも術前と比べ正常パターンを示し、C-peptide も陽性であった。



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 7 件)

Itoh T, Nishinakamura H, Kumano K, Takahashi H, Kodama S.*

The spleen is an ideal site for inducing expansion of transplanted islet grafts in mice

PLoS One 査読有り, 12(1), e0170899, 2017

Itoh T, Hata Y, Nishinakamura H, Kumano K, Takahashi H, Kodama S.*

Islet-derived damage-associated molecular pattern molecule contributes to immune responses following microencapsulated neonatal porcine islet xenotransplantation in mice.

Xenotransplantation, 査読有り, 23(5):393-404, 2016

Kumano K, Nishinakamura H, Mera T, Itoh T, Takahashi H, Fujiwara T, Kodama S.*

Pretreatment of donor islets with papain improves allograft survival without systemic immunosuppression in mice.

Islets, 査読有り, 8(5):145-55, 2016

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 査読有り, 44(1):166-171, 2015

Kojima D, Nishinakamura H, Itoh T, Kodama S.
An extremely weak electric current system induces anti-apoptotic effects and anti-ecrotic effects in living cells.
Current Tissue Engineering 査読有り, 3(2): 102-111, 2014

Kuwahara G, Nishinakamura H, Kojima D, Tashiro T, Kodama S.
GM-CSF treated F4/80+ BMCs improve murine hind limb ischemia similar to M-CSF differentiated macrophages
PLoS One 査読有り, 9(9): e1069871-e1069877, 2014

Naito R, Nishinakamura H, Watanabe T, Nakayama J, Kodama S. (*Corresponding Author)
Edaravone, a Free Radical Scavenger, Accelerates Wound Healing in Diabetic Mice
WOUNDS 査読有り, 26(6): 163-171, 2014

〔学会発表〕(計 11 件)

西中村瞳, 秦優子, 高橋宏幸, 伊東威, 小玉正太
極性を有するマクロファージ投与によるマウス虚血肢血流改善効果における IL-10 の作用機序の解析
第 16 回再生医療学会総会(3/8, 2017, 仙台)

Kumano K, Nishinakamura H, Mera T, Itoh T, Takahashi H, Fujiwara T, Kodama S.
Pretreatment of donor islets with papain improves allograft survival without systematic immunosuppression in mice
TTS 2016
20 August, 2016 (Hong Kong)

西中村瞳, 秦優子, 熊野健二郎, 高橋宏幸, 伊東威, 岩本隆宏, 小玉正太
虚血肢マウスを用いた細胞治療における IL-10 の作用機序の解析
第 15 回日本再生医療学会総会 (3/17, 2016 大阪)

小玉正太
アロ細胞移植と再生医療法
第 15 回日本抗加齢医学会総会 (5/31, 2015, 福岡)

Itoh T.
Anti-inflammatory strategy towards islet xenotransplantation
Joint Congress of IPITA- I X A-CTS
18 November 15-19, 2015 (Melbourne, Australia)

Itoh T, Hata Y, Nishinakamura H, Kumano K, Takahashi H, Kodama S.
Profiling of inflammatory reactions caused by intraperitoneal transplantation of alginate-PL0-alginate microencapsulated porcine islets in mice
Joint Congress of IPITA- I X A-CTS
17 November, 2015(Melbourne, Australia)

西中村瞳, 桑原豪, 小島大望, 伊東威, 田代忠, 小玉正太
M-CSF あるいは GM-CSF 培養 F4/80 陽性細胞投与によるマウス虚血肢モデルを用いた血流改善効果の比較検討
第 14 回日本再生医療学会(3/19, 2015, 横浜)

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
29 July, 2014 (San Francisco, USA)

Nishinakamura H, Kuwahara G, Kojima D, Tashiro T, Kodama S.
M1 macrophages induce therapeutic improvements in a murine model of hind limb ischemia similar to M2 macrophages
TERMIS-EU
12 July, 2014 (Genova, Italy)

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
16 June, 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 (5/24, 2014, 大阪)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小玉 正太 (KODAMA, Shohta)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：90549338

(2) 研究分担者

伊東 威 (ITO, Takeshi)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：70634400

西中村 瞳 (NISHINAKAMURA, Hitomi)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：90597692

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()