

膵島移植の手法を用いた インスリン産生細胞再生に関する研究

再生医療研究チーム（課題番号：117019）

研究期間：平成 23 年 7 月 22 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者：安波洋一

研究員：松岡信秀（平成 25 年 3 月 31 日まで）、伊東 威（平成 25 年 4 月 1 日から）

はじめに

重症糖尿病に対するインスリン産生細胞（膵島）移植は 21 世紀の細胞移植、再生医療の先駆的治療法として今後の発展が期待されている。臨床膵島移植の現在の最も重要な課題は一人のインスリン依存糖尿病レシピエントの治療に 2 - 3 回の膵島移植、すなわち 2 - 3 人分のドナーを必要とする非効率性が上げられる。この問題は移植後に種々の原因により移植膵島が障害され、生着する膵島数が十分でないことに起因している。その解決策としては移植膵島障害機序の解析による新たな制御法開発、および移植膵島再生による、移植膵島量増加因子の解明が考えられる。筆者は現在までに、平成 15 - 17 年度、18 - 20 年度、22 - 24 年度、25 - 27 年度に渡り、それぞれ文部科学省基盤研究 (B) の助成をうけ、研究を推進し、世界に先駆けて移植膵島障害の新たな機序、ならびに制御法を見出し、この課題に対する解決法を明らかにした (J Exp Med 2005, J Clin Invest 2010, Am J Transplant 2013)。

本推奨研究に於いては我々独自の膵島移植の手法を用いて移植膵島障害、再生機序、因子の解明を目指した。本稿ではその成果を報告する。

方法・結果

1. 移植膵島障害に於ける $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ トランスポーター (NCX) の役割解析

移植膵島障害の新規制御法開発は膵島細胞死の機序解明に深く関与している。膵島移植に於いてドナー膵島は経門脈的肝内に移植される。従って移植膵島は血管新生により動脈血の供給を受けるまでの間は静脈血下の環境におかれる。すなわち低酸素状態となり、移植膵島は障害を受ける。

これまで、臓器再灌流障害による細胞死には細胞膜上に存在する $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ トランスポーター (NCX) を介

した細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入が細胞死の原因となり、NCX の特異的阻害剤により Ca^{2+} の流入を阻止することにより細胞死が防止できるとの報告がある。本研究では低酸素によると考えられる肝内移植膵島障害に NCX が関与しているのではないかと想定し、検討した。

(1) 膵 β 細胞に於ける NCX mRNA ならびに蛋白発現

まず、膵 β 細胞に NCX が存在するかどうかを mRNA ならびに蛋白レベル (蛍光免疫染色) で検討した。その結果、NCX には 3 つの isoforms がある中で、マウス膵島細胞には NCX1 が優位に存在することが判明した (図 1)。

(2) MIP-GFP マウス膵 β 細胞に発現する NCX の機能解析

次に、膵 β 細胞 NCX の機能について、単一の培養 β 細胞を *in vitro* で還流し、NCX に依存して細胞外から細胞内への Ca の取り込みがあるかを測定した。この実験に β 細胞に GFP がラベルされた MIP-GFP マウス単離膵島 (図 2 左) を用いた。

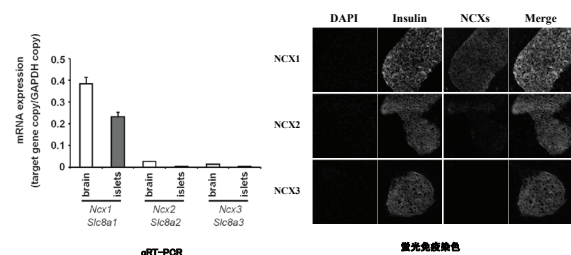


図 1 NCX1 がマウス膵島細胞に優位に存在 (文献 3 より改変)

単離膵島を分散単細胞（図2右）にして培養し、実験に供した。その結果、β細胞での生理的NCX機能が証明でき、またその特異的阻害剤の効果も確認できた（図3）。

(3) 単離膵島の In vitro 低酸素下培養障害に於ける NCX 阻害剤の効果

低酸素下膵島障害時に NCX が機能しているかを明らかにする為に MIN6(β細胞株) を実験に用いた。実際、MIN6 細胞を低酸素下で培養し、正常酸素下に戻した際に細胞内 Ca の上昇が認められ、更にはその上昇は NCX 阻害剤で抑制された(図4)。

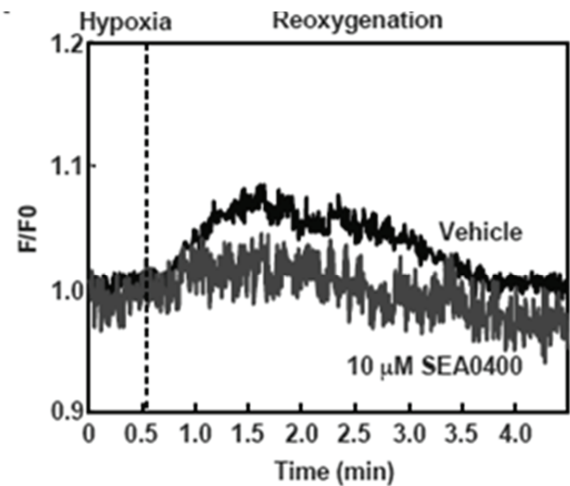


図4 MIN6 細胞内 Ca 流入を阻害 (文献3より改変)

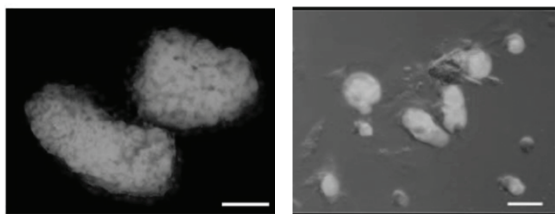


図2 MIP-GFP マウス単離膵島と単細胞 (文献3より改変)

(4) 単離膵島の in vitro 低酸素障害に対する NCX 阻害剤の効果

MIN 6 細胞で得られた再酸素化時の NCX 阻害剤による細胞内 Ca 流入抑制効果が細胞障害の軽減をもたらしているかどうかについて単離膵島を用いて検証した。

実験系として培養チャンバー（図5左上）に単離膵島を入れ、内部を低酸素ガス（1%O₂, 5%CO₂, 94%N₂）で満たした。この系で容器内に留置した培養液の酸素濃度は1時間以内に20mmHgに下降、以後12時間以上同レベルを維持した（図5左下）。この低酸素状態で単離膵島を培養すると6時間で膵島中心部に壊死が発現した（図5右）。この系で単離膵島を NCX 阻害剤存在下で3時間培養後に低酸素下培養を行うと6時間後の膵島中心部の壊死は認められなかった（図6左）。膵島が障害されると膵島細胞より HMGB1 が放出されるが、培地内 HMGB1 を測定すると NCX 阻害剤存在下で前もって培養した膵島では低酸素下培養後の培地内 HMGB1 濃度は有意に低値を示した（図6右）。

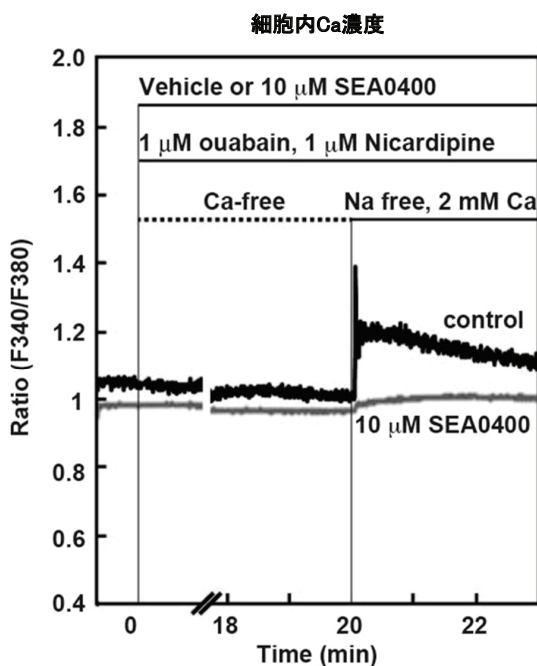


図3 膵島β細胞 NCX 機能は特異的インヒビターで阻害される単細胞 (文献3より改変)

(5) NCX 阻害剤によるドナー膵島移植前治療の効果検討

上記の NCX 阻害剤の in vitro 効果が移植後に得られるか膵島移植実験で検討した。STZ 糖尿病マウス (C57BL/6) の経門脈的肝内に200個の同種同系膵島を移植した。対照群レシビエントマウスは移植後全て高血糖で推移したが、同数の NCX 阻害剤で移植前処置を行った膵島の移植後ではレシビエントマウスは全て正常血糖となった（図7）。

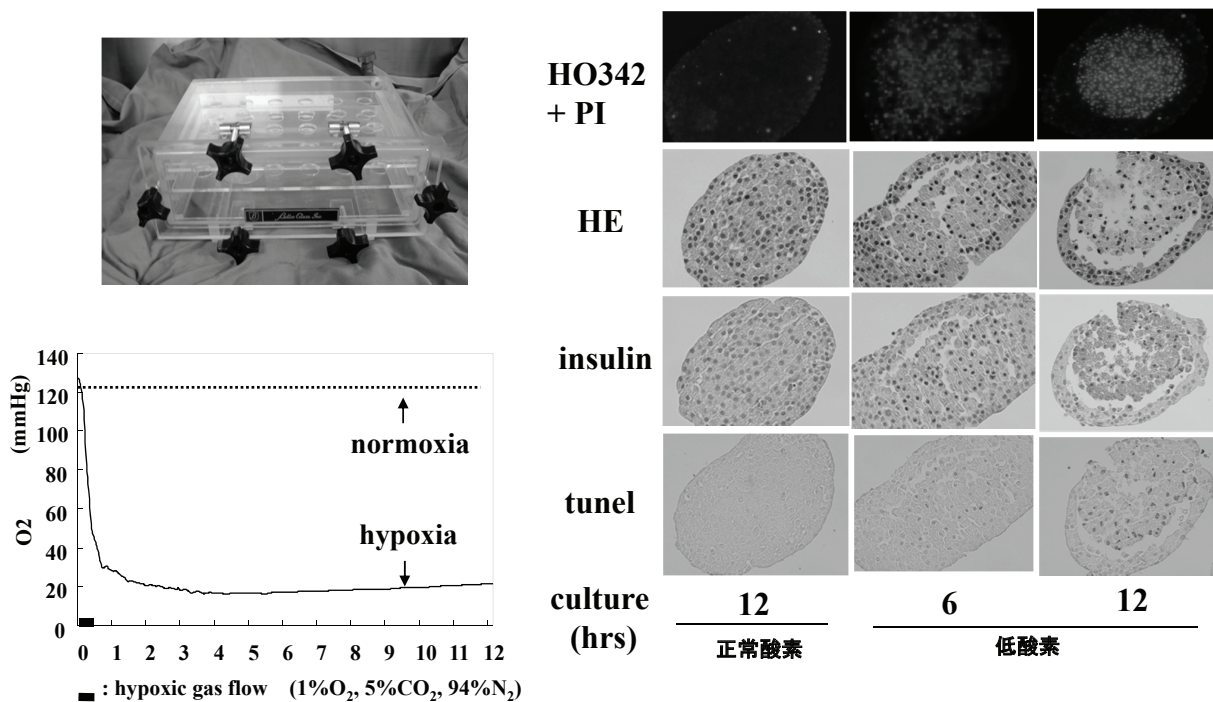


図5 単離膵島低酸素下培養 (文献3より改変)

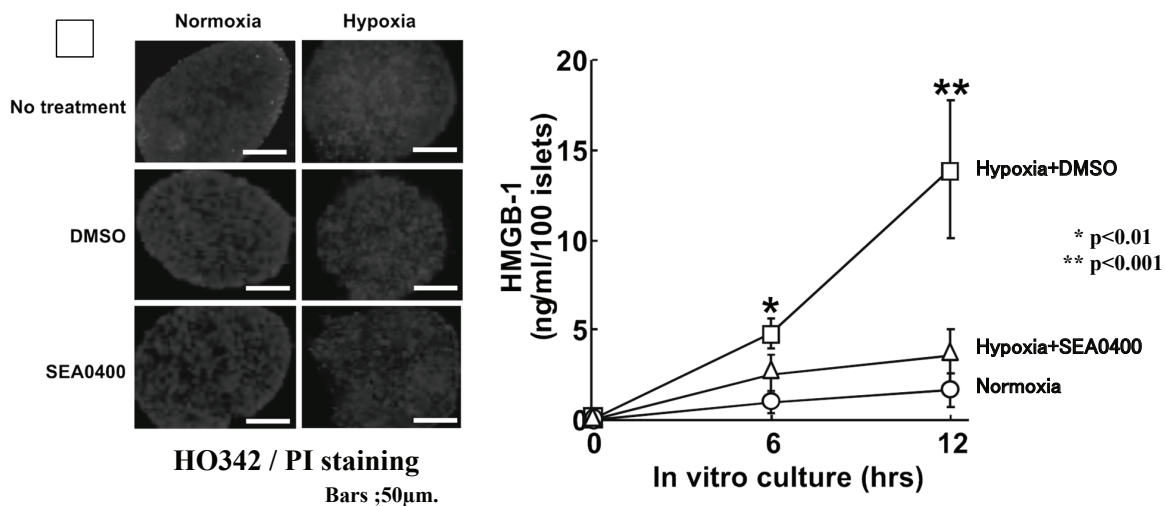


図6 in vitro 低酸素膵島障害は NCX 阻害剤により制御できる (文献3より改変)

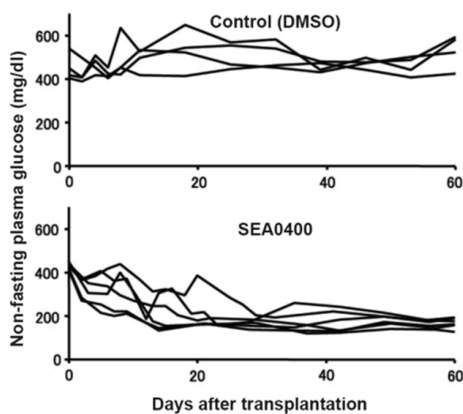


図7 肝内移植膵島障害はドナー膵島のNCX阻害剤による移植前治療で制御できる(文献3より改変)

この成果はレシピエントではなくドナー膵島の移植前処置で移植後膵島障害を制御できることを示した世界初の報告であり、今後の臨床導入が期待される。

2. マウス同種同系膵島移植に於ける間葉系幹細胞による移植膵島増量効果

間葉系幹細胞には細胞保護効果があることが報告されている。我々は間葉系幹細胞、特に皮下脂肪由来間葉系幹細胞の移植膵島保護効果、更には移植膵島再生作用を想定し、以下の実験を行った。

(1) 間葉系幹細胞、胸腺、脾細胞との共移植の効果

膵島移植単独では(ストレプトゾトシン)糖尿病マウスの血糖値が移植後に低下しない膵島数(50個)をドナーとして用い、インスリン産生細胞の再生因子を有すると思われる種々の細胞群(間葉系幹細胞、胸腺、脾細胞など)を移植膵島と共にレシピエントの腎皮膜下に移植した。その結果、皮下脂肪由来間葉系幹細胞(adipose-derived mesenchymal stem cell, ADSC)が最も効率よい血糖降下作用を有することが判明した。また、移植後120日に膵島を移植した腎臓を摘出すると移植後に血糖が正常化していたレシピエントは直ちに高血糖となり、移植後の正常血糖が移植膵島により維持されていることが証明された。更に、ADSCと50個膵島を別々に左右の腎皮膜下に移植した場合、糖尿病レシピエントの高血糖は正常化せず、両者が同時に混在することが必須であることが判明した。

(2) 腹腔内糖負荷試験(IPGTT)

膵島50個移植とADSCを共移植し、移植後

正常血糖となったレシピエントに対し、移植後120日にグラフトを摘出し、その前後でIPGTTを行った。移植膵島摘出後では、明らかな耐糖能の悪化が認められ、移植膵島が機能していたことが示された。同時に実施した血中インスリン測定で、移植膵島摘出前に認められていた血中インスリンが移植膵島提出後には測定感度以下となった。

(3) 移植膵島免疫組織学的解析

共移植膵島を摘出後にホルマリン固定し、薄切後に免疫組織染色を行った。移植膵島内にインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、PP陽性細胞が混在していたが、興味深いことにグルカゴン陽性細胞は移植膵島中心部を含め全体に散在していた。ちなみに対照のマウス膵臓内膵島ではグルカゴン細胞は膵島の辺縁にのみ存在し、中心部には認められなかった。この知見は極めて興味深い。げっ歯類膵島に於けるグルカゴン細胞の配置ならびに移植膵島での相違の意義は不明である。

(4) 移植膵島の電子顕微鏡による観察

移植後120日経過した移植膵島を摘出、電顕固定後に薄切切片を作成し、電子顕微鏡で観察した。対照として単離膵島を用いた。移植膵島β細胞内には単離膵島に比し、β顆粒の数のみならず、電子密度の薄い、未熟β顆粒を多く認めた。

(5) インスリン、プロインスリン含有量測定

上記の移植膵島に於ける未熟β顆粒の出現は移植膵島でのインスリン産生細胞の再生を示唆している。未熟β顆粒の増加はプロインスリン量に反映されると想定し、120日移植膵島のプロインスリン、ならびにインスリン含有量を測定した。対照としてドナーに用いた50個膵島を使用した。その結果、移植膵島のプロインスリン、インスリン含有量共に対照に比し、有意に増加していることが明らかになった。

(6) 移植膵島のKi67染色による増殖能の検討

移植膵島再生に関し、増殖能を検討する為に経時的に移植膵島を摘出し、Ki67染色を行った。その結果移植後30日の移植膵島に於いてKi67陽性細胞が有意に増加した。更にKi67とPdx1、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチンまたはPPホルモン産生細胞の二重染色でKi67陽性細胞はPdx1+insulin+細胞であることが判明した。

(7) 移植膵島内インスリン産生β細胞の起源について

以上より、移植膵島内インスリン産生細胞が増量していることは間違いないものと思われる。その際、 β 細胞の起源は移植膵島 β 細胞、共移植した脂肪由来幹細胞、更にはレシピエント由来細胞が考えられる。この起源を明らかにするために β 細胞にGFPがラベルされたMIP-GFPマウスを実験に使用した。MIP-GFPマウス単離膵島をドナーとし、糖尿病野生型マウスに移植した場合、移植膵島はGFP+insulin+であった。MIP-GFPマウスのADSCと野生型単離膵島を糖尿病野生型マウスに移植した場合、移植膵島にはGFP+細胞は認められなかった。ADSCと単離膵島は共に野生型でレシピエントにMIP-GFPを用いた場合、移植膵島内にはGFP+細胞は認められなかった。以上より、移植膵島増量は移植膵島自身によるものと推察された。

3. 受容体 x の移植膵島障害、膵島再生に対する効果

移植膵島障害には種々の成因があるが、我々は受容体 x がその主因ではないかと考え、以下の実験を行った。特許の関係で現時点では詳細を明らかにできない点をお許し願いたい。

(1) 受容体 x 欠損マウス単離膵島移植

野生型の単離膵島移植単独では(ストレプトゾトシン)糖尿病マウスの血糖が移植後に低下しない膵島数(50個)をドナーとして用い、レシピエントの腎皮膜下に移植、経時的に血糖と体重を測定した。移植後野生型レシピエントは高血糖で推移したが、同数の x 欠損マウス単離膵島移植後には血糖は正常化した。このことは移植膵島の x が移植膵島障害(細胞死)に必須の役割を担っていることを示している。移植後120日に膵島を移植した腎臓を摘出するとレシピエントは直ちに高血糖となり、移植後の正常血糖が移植膵島によって維持されていたことが証明できた。

(2) 移植膵島の免疫組織学的検討(光顕、電顕像)

移植膵島障害が最も高度と思われる移植後14日目に移植膵島を摘出し、光顕電顕で観察した。野生型移植膵島では著名に変性していたが、 x 欠損膵島の形態は正常に保たれていた。電顕所見で野生型移植膵島 β 細胞の細胞質に多数の空胞変性があった。一方、 x 欠損移植膵島では空胞変性はなく、移植膵島 β 細胞は正常形態であった。

(3) x リガンドの移植膵島障害に対する効果

ドナー膵島の x 受容体欠損により移植膵島障害

が制御できることより、次に x 受容体阻害リガンドを用い、 x 受容体シグナルをブロックすることにより野生型膵島の移植後障害を制御できないか検討した。

野生型単離膵島を移植前 x 受容体阻害リガンドで処置(培養)後に50個を野生型STZ糖尿病マウスに移植した。対照として無処置膵島を用いた。対照群膵島移植の糖尿病レシピエントは高血糖で推移したが、 x 受容体阻害リガンド処置膵島の移植レシピエントは移植後に全て正常血糖になった。

(4) 移植膵島再生に関する検討

x 欠損マウス膵島移植で移植後再生を示唆する移植膵島量の増加がないか、インスリン含有量を測定した。その結果、120日後の移植膵島ではドナーとして用いた50個膵島の約2倍のインスリン含有量があることが判明した。

総括

以上、移植膵島障害に関わる因子として、新たにNCXならびに受容体 x を見出した。これら2つの因子が細胞内で共通のシグナル経路を有するか興味深い在今后解明すべき重要な課題である。脂肪由来間葉系幹細胞による移植膵島ならびに受容体 x マウスの移植膵島インスリン含有量増加は再生を示唆する知見で、ヒト膵島でも同様の効果があるか、今後ヒト単離膵島の糖尿病免疫不全マウスへの移植実験系で検証する予定である。

我々の移植膵島インスリン産生細胞再生研究の独創性は従来の膵臓内膵島を対象にした研究では見出せない再生現象を明らかにできる点にある。現在までに新たな知見が得られており、今後糖尿病の画期的治療法の開発に繋がる可能性が高く、鋭意研究を推進している。今後とも皆様方のご支援をお願いしたい。

特許申請

1. 米国特許仮出願。(FU-214KUS)(・US 61/979,229)

研究業績

原著

1. 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. Transplantation Proceedings 46:1980-1984, 2014
2. 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* 2014 Jul 23. [Epub ahead of print] (Manuscript ID: PANCREAS 13541), 2014
- 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
 - Kojima D, Mera T, Nishinakamura H, Itoh T, Ogata T, Matsuoka N, Kodama S, Yasunami Y. Prevention of High-Mobility Group Box 1-Mediated Early Loss of Transplanted Mouse Islets in the Liver by Antithrombin III. *Transplantation* 93(10): 983-88, 2012.

国際学会発表

- Takeshi Itoh, Toshiyuki Mera, Hitomi Nishinakamura, Shohta Kodama, Yohichi Yasunami. 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, 26-31 July, 2014, San Francisco, CA
- 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. 13-17 June, 2014, San Francisco, USA
- Yasunami Y. Current status and future direction of pancreatic islet transplantation. The 8th Spring Cell Therapy Symposium of IRICT. 21-22 May, 2014, Seoul, Korea.
- 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. International Pancreas and Islet Transplantation Association, 14th World Congress. September 24-27, 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 2-6, 2013, Kyoto, Japan.
- Kojima D, Nishinakamura H, Ogata T, Nagaishi M, Mera T, Itoh T, Matsuoka N, Kodama S, Yasunami Y. Inhibitory Effect of Thrombomodulin on HMGB1-Stimulated IFN- γ Production of Hepatic NKT and Gr-1+ Cells, Facilitating to Prevent Early Loss of Transplanted Islets in the Liver of Mice. 24th International Congress of The Transplantation Society. July 15-19, 2012, Berlin, Germany.
 - Yasunami Y. Innate Immunity in Transplantation Role of Innate Immunity in Islet Cell Transplantation. The 2011 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists. November 17-18, 2011. Seoul, Korea.
 - Yasunami Y. Targeting HMGB1 in Transplantation. 3rd HMGB-1 International Workshop. October 28, 2011, Pittsburgh, USA.

国内学会発表

- 伊東威 (ワークショップ) 単離ドナー膵島の Na⁺/Ca²⁺ 交換体を標的とした移植前治療による肝内移植早期膵島障害の制御 第49回日本移植学会 9/5-7, 2013 9/6 京都
- 米良利之, 伊東威, 喜多紗斗美, 小島大望, 西中村瞳, 永石美晴, 小方貴子, 金城亜哉, 岩本隆宏, 小玉正太, 安波洋一 単離ドナー膵島の Na⁺/Ca²⁺ 交換体を標的にした移植前治療による肝内移植早期膵島障害の新規制御法 第40回日本膵・膵島移植研究会 3/1-2, 2013 3/2 高松
- 金城亜哉, 安波洋一, 穴澤貴行, 後藤満一, 島崎修次, 北村惣一 臨床膵島移植の現況と今後の展望第25回日本脳死・脳蘇生学会総会・学術集会 5/16-17, 2012 5/16 宮崎
- 小島大望, 米良利之, 西中村瞳, 伊東威, 松岡信秀, 小玉正太, 安波洋一 (Award Session) トロンボモデュリンによる移植膵島早期膵島障害の制御 第39回日本膵・膵島移植研究会 3/9-10, 2012 3/10 旭川
- 安波洋一 (教育講演) 肝内移植早期膵島障害の機序と制御法 第39回日本膵・膵島移植研究会 3/9-10, 2012 3/9 旭川
- 金城亜哉, 明石優美, 岡野友貴, 福島茉莉, 岩田誠司, 島崎修次, 北村惣一郎, 安波洋一 福岡県における心停止後皮膚提供体制整備後報告と今後の課題 第10回日本組織移植学会総会・学術総会 8/6, 2011 8/6 東京

謝辞

本研究は福岡大学研究推進部の研究経費によるものであり、ここに感謝の意を表します。