

移植膵島再生におけるリンパ管新生因子の関与

移植膵島再生誘導因子探索チーム（課題番号：147105）

研究期間：平成 26 年 7 月 29 日～平成 29 年 3 月 31 日

研究代表者：伊東 威 研究員：西中村 瞳

【研究成果】

背景と目的

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て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方法として期待されている。その移植成績は単離方法と免疫抑制剤の改良に伴い、数年後には膵臓器移植成績と並ぶ可能性が高い。しかしながら膵島移植は初回のみでの移植でインスリン離脱へ至ることが難しく、2 回ないし 3 回の移植が必要である。なぜ初回の膵島移植のみでインスリン離脱に至ることが困難なのだろうか。理由の一つとして、提供されたドナーから単離した膵島の収量が手技的な問題により少ないだけでなく、レシピエント側の問題も存在する。過去の報告から、免疫担当臓器である肝臓に膵島を移植することで特異的な免疫応答を惹起し、早期に移植膵島の生着不良が生じることや、膵島が肝臓に生着するまでの間に低酸素状態となって機能不全に至ることが明らかになっている。そこで膵島の移植部位としてより良い環境を提供できる場所を調べた結果、脾臓が候補の一つである。脾臓内への移植では肝臓を移植部位とする場合に比べて 1/4 量の膵島量で膵島が生着し、糖尿病マウスの血糖を正常化することが認められた。この脾臓内膵島移植における作用機序の解析を目的とする。

方法

〈マウス〉

マウスは C57BL/6J の♂（8-16 週齢）を用いた。移植用のレシピエントマウスは 180 mg/kg ストレプトゾトシン（STZ）を尾静脈より投与後、血糖値が 400 mg/dL を超えたものを使用し、これを 1 型糖尿病モデルとした。マウスを用いた実験は福岡大学アニマルセンターの承認を得ている。

〈膵島単離と移植〉

膵島単離はコラゲナーゼを用い、Ficoll-Conray の濃度勾配による比重遠心法によって行った。単離した 150～250 μ m の膵島塊の数を数えて肝臓内、脾臓内、腎被膜下に移植を行った。

〈組織学的検討〉

肝臓内、脾臓内、腎被膜下の膵島組織は HE 染色を行って形態を観察するとともに、インスリン、F4/80、Gr-1、von Willebrand factor（vWF）、LYVE-1、Rrm2b 及び Pla2g2d の染色も行った。

〈サイトカイン及びケモカイン測定〉

HMGB1 の濃度は ELISA 法によって測定を行い、マウス血漿サンプルのサイトカイン及びケモカインは MLLIPLEX MAP mouse cytokine/chemokine/TGF- β panel を用いて測定した。

〈インスリン内容量の測定〉

組織に含まれるインスリンの内容量は acid-ethanol 法を用いて測定した。

〈遺伝子発現マイクロアレイとデータ解析〉

脾臓内 25 個膵島移植 + 腎被膜下 100 個膵島移植群の脾臓を移植当日に採取して sample1 とし、2 日後に採取した脾臓を sample2 とした。加えて移植 100 日後に腎臓を摘出してから 39 日後の脾臓を sample3 として RNA を精製し、アレイ解析を行った。解析データは Gene expression omnibus database（accession number GSE84612）に公開済みである。

結果

〈STZ 投与による糖尿病マウスの血糖値が正常化するために最低限必要な膵島数について〉

最初に、STZ 投与による糖尿病マウスの血糖値が正常化するために必要な最小の膵島数を調べるため、同種同型の膵島移植を肝臓（PV）、腎被膜下（KC）、脾

臓 (SP) で行った。Fig. 1A に示すように、PV の場合には膵島数200個、KC の場合には100個が血糖値正常化には必要であったが、SP の場合には50個で血糖値が正常化することが明らかになった。50個の膵島を脾臓内移植した場合の経時的な脾臓組織を採取してHE染色およびインスリン染色を行った結果、生着した膵島が認め

られた (Fig. 1B)。次に、50個の膵島を脾臓内移植して50日後の腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) を行った。Fig. 1C, 1D に示すように未処置の naïve マウスと非常に類似した結果となった。以上の結果より、STZ糖尿病マウスの脾臓内に50個の膵島を移植した場合の耐糖能は未処置の naïve マウスと同等であることが示された。

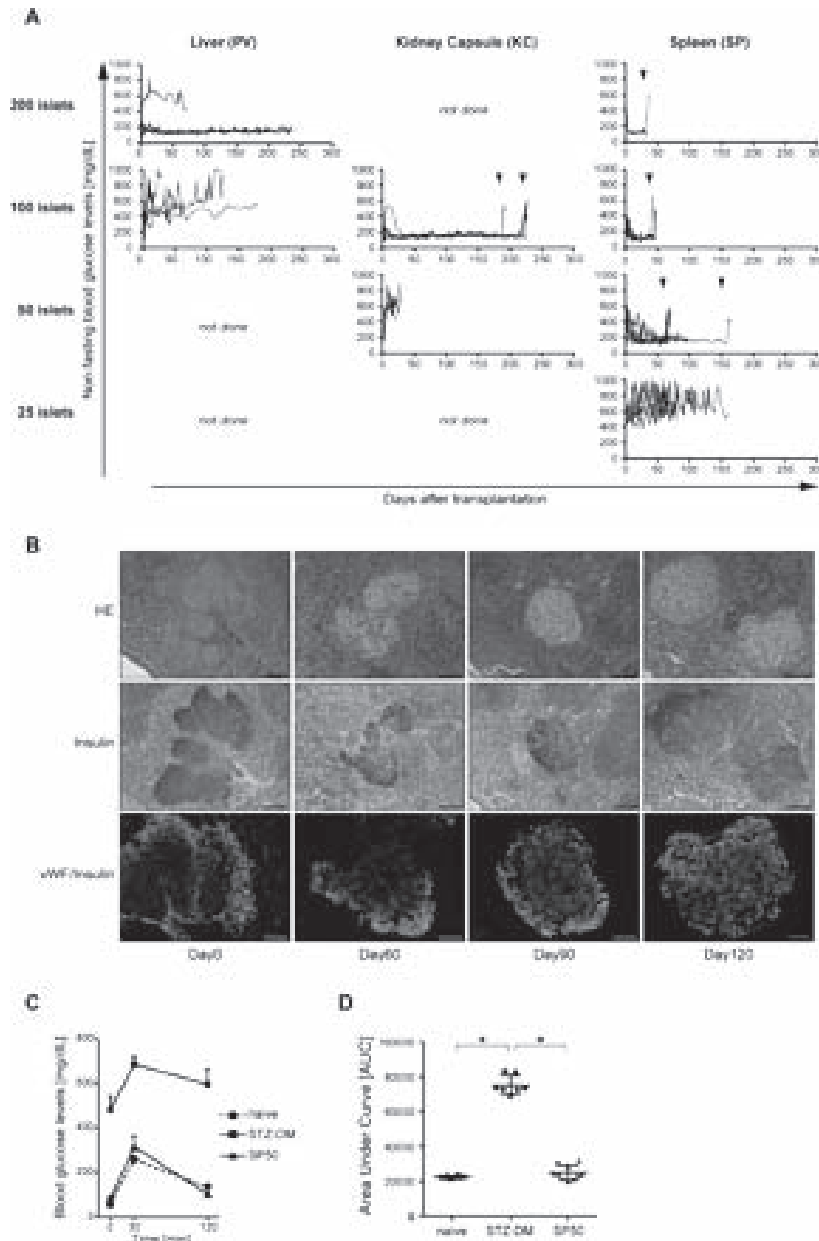


Fig. 1 STZ投与による糖尿病マウスの血糖値が正常化するために最低限必要な膵島数の検討
 (A) マウスの血糖値をグラフ化したものである。肝臓内への膵島移植をPV、腎臓被膜下への膵島移植をKC、脾臓内への膵島移植をSPと表記している。
 (B) 移植後のHE染色とインスリン染色、血管内皮細胞のマーカーであるvWF染色を示す。
 (C) 腹腔内ブドウ糖負荷試験の結果である。
 (D) それぞれのマウスの腹腔内ブドウ糖負荷試験の結果を曲線下面積 (AUC) で示す。

〈膵島移植時の早期炎症反応〉

各々の移植部位への膵島移植における早期の炎症反応を比較した。移植6時間後の血漿サンプルを採取して炎症性サイトカイン及びケモカインの定量を行った結果、MCP-1では未処置naïveマウスに比べてPV200マウス、KC100マウスでは有意に高かった。またPV200に比べてSP50では有意に低かった。G-CSFは未処置naïveマウスに比べてPV200マウス、KC100マウス、SP50マウスで有意に高くなり、PV200に比べるとKC100、SP50で

有意に低い値だった。HMGB1についても調べた結果、naïveマウスに対してPV200マウスでは有意に増加が認められたが、PV200に対してKC100、SP50では有意に低かった。その他のサイトカインやケモカインの発現については有意な差は認められなかった。また、組織学的な解析よりGr-1陽性の好中球が肝臓、腎被膜下、脾臓内に生着した膵島組織へ浸潤しており、F4/80陽性のマクロファージは脾臓内の膵島周囲に認められた (Fig 2D)。

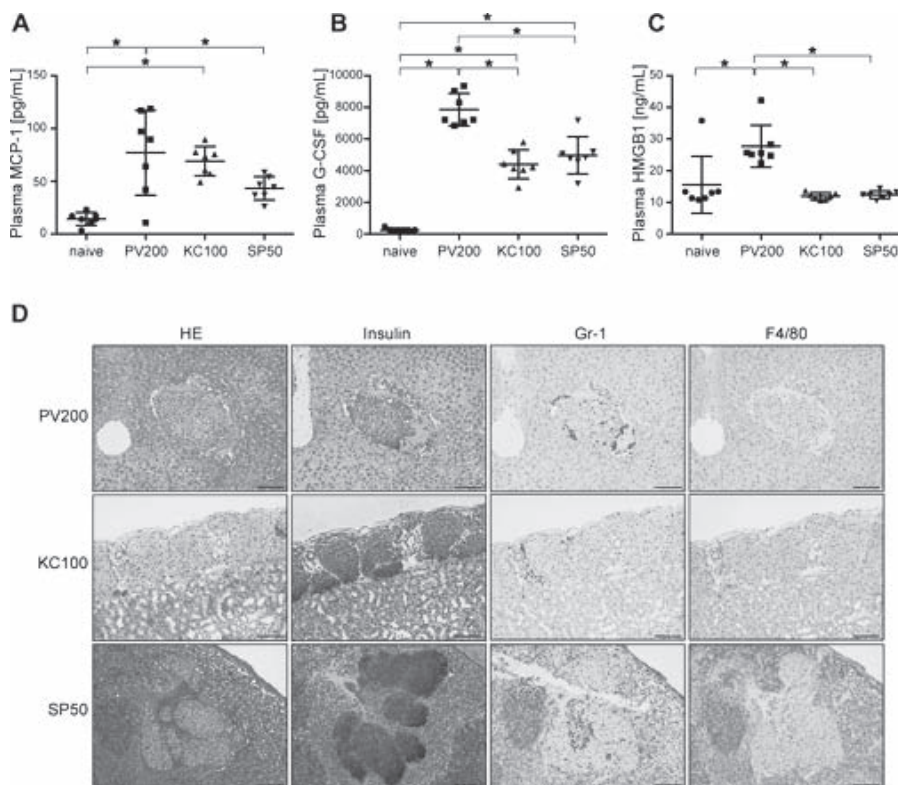


Fig. 2 膵島移植時の早期炎症反応

(A, B, C) それぞれの膵島移植の早期炎症反応におけるMCP-1, G-CSF, HMGB1の変化を示す。
(D) 移植してから6時間後の組織のHE染色及びGr-1, F4/80染色の結果である。

〈脾臓内膵島移植の長期的な効果について〉

Fig. 1Aの結果より脾臓内への50個の膵島移植ではSTZ糖尿病マウスの血糖値が徐々に正常化することが明らかとなった。これは移植膵島組織が増加している可能性を示唆する。この可能性を証明するため、25個の膵島を脾臓内へ移植して長期的な検討を行うことにした。脾臓内への25個の膵島移植ではSTZ糖尿病マウスの血糖値を正常化するには不十分である (Fig. 1A)。そこで一時的にレシピエントの血糖値を正常化するため、同時に腎被膜下に100個の膵島を移植しておく。Fig. 3Aのグ

ラフから分かるように、11匹の全てのマウスにおいて移植後240日までは正常血糖に保たれ、腎臓摘出を行った場合には11匹中8匹が正常血糖のまま維持された。さらに脾臓を摘出した際には全てのマウスにおいて高血糖となった。この時の脾臓組織内にはインスリン陽性細胞が認められた (Fig. 3B)。以上の結果より、25個の移植膵島は生着し、脾臓内で増殖している可能性がある。脾臓内膵島移植後、0日と280日での脾臓内インスリン量を定量した結果、有意な増加が認められた (Fig. 3C)。

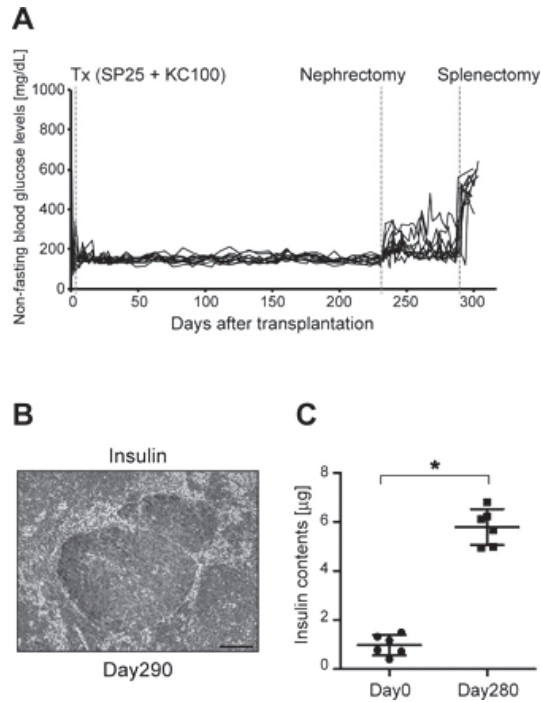


Fig. 3 脾臓内膵島移植の長期的な効果について

- (A) STZ 投与マウスに脾臓内25個膵島移植、腎被膜下100個膵島移植を行った後の血糖値の経時変化を示すグラフである。
- (B) 移植後290日での脾臓内膵島のインスリン染色を示す。スケールバーは100 μm である。
- (C) 脾臓内膵島移植後0日と280日でインスリン量を測定した結果を示す。

〈遺伝子発現解析〉

脾臓内の膵島生着における遺伝子変化を解析するためマイクロアレイを行った。血管やリンパ管新生因子などの検索を行ったが、遺伝子変動が大きなものは少なく、脾臓の発生に重要な役割を果たす *Tlx1* の関連遺

伝子群である *Rrm2b*, *Pla2g2d*, *Spib*, *Cd19*, *Fcrla* などが sample3 では有意に上昇していることが分かった。染色によって確認したところ、*Rrm2b* は膵島移植後脾臓内の膵島組織の周辺に局在し、インスリンとともに共染色される細胞もわずかに存在することが分かった。同様

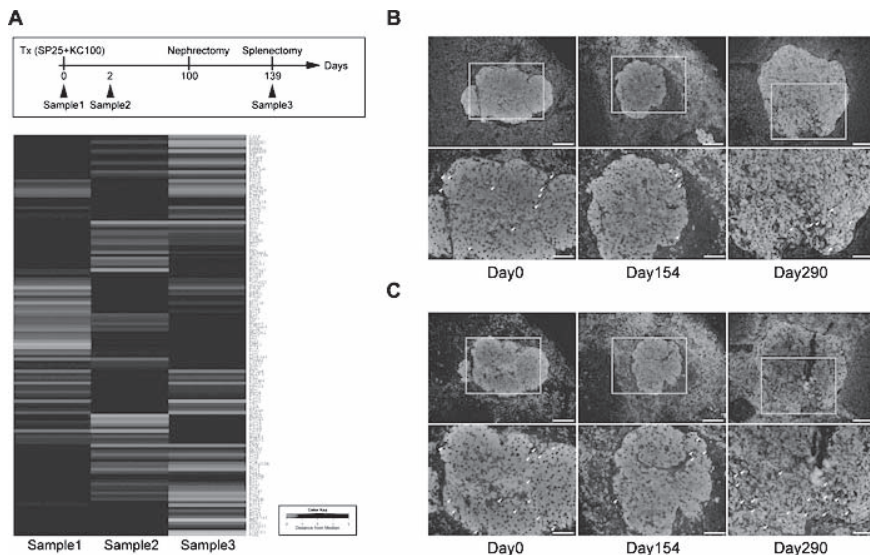


Fig. 4 膵島移植後の脾臓内遺伝子の発現解析

- (A) アレイに用いたサンプルとマイクロアレイの結果を示す。
- (B) インスリンと *Rrm2b* の染色を示す。上段写真のスケールバーは100 μm である。黄色い枠部分を拡大したのが下段写真であり、スケールバーは200 μm である。陽性細胞を矢印で示している。
- (C) インスリンと *Pla2g2d* の染色を示す。上段写真のスケールバーは100 μm である。黄色い枠部分を拡大したのが下段写真であり、スケールバーは200 μm である。陽性細胞を矢印で示している。

にPla2g2dの場合も脾臓内膵島に陽性細胞が認められたが、day290ではインスリンとPla2g2dの共陽性細胞は見られなかった。

考察

STZ投与によって高血糖になったマウスへ移植する膵島の最小個数を調べる検討を行った。膵島を移植する部位として肝臓、腎被膜下、脾臓を比較した結果、肝臓では膵島200個、腎被膜下では100個、脾臓では50個が最小個数であった。特に脾臓へ移植する場合において膵島が最も少ない個数で生着し、血糖値を正常化できることが明らかになった。この時のグルコース負荷試験の結果は未処置のコントロールマウスと同様の結果だった。過去の報告では脾臓内膵島移植には短所が存在する。その報告の多くは脾臓内の血管に膵島が流入するというものであり、肝臓への移植と比較しても良い結果は得られていない。脾臓内血管は門脈と繋がっているため肝臓に流れてしまうからである。本研究ではこれを防ぐため脾臓表面に膵島を移植している。

さらに膵島移植後早期の炎症反応についても解析を行った。過去の報告のように、肝臓への移植の場合には血漿中のMCP-1, G-CSF, HMGB1が有意に高い値だった。HMGB1についてはヒト自家膵島移植(肝臓へ移植する)の場合にも血漿中で上昇し、HMGB1を介した炎症反応が惹起されるが、本研究の脾臓内移植においては肝臓に比べてHMGB1が有意に低いことが明らかになった。MCP-1もG-CSFも同じ傾向にあったが、脾臓内と腎被膜下の場合に差は認められなかった。早期の炎症反応が起りにくいということは移植部位としての利点となる。

脾臓内に移植した50個の膵島が生着し、増殖している可能性を検討するため、血糖値正常化には不十分な25個の脾臓内膵島移植と、それをサポートするための腎被膜下100個の膵島移植を行って経時的変化を長期間観察した。補助的な膵島が移植された腎臓の摘出後も正常血糖が維持され、脾臓内のインスリン量がコントロールに比べて有意に増加していたことから膵島が増殖している可能性が示唆される。当初の目的では移植膵島再生におけるリンパ管新生因子の関与を考え、実験を進めていたが、本研究のアレイの結果では大きな変動が認められなかった。しかしながら、脾臓の発生に重要な役割を担うTlx1関連遺伝子に動きが見られた。大きな上昇が認められたRrm2bについてはp53チェックポイントに直接関わるタンパクであり、細胞増殖に関与する。インスリンと共陽性の細胞が見られることから、インスリンを産生する細胞で細胞周期が増殖方向へ進んでいる可能性がある。また、Pla2g2dは炎症に関わる脂肪分解酵素の一つであり、産生する細胞は樹状細胞、マクロファージ、制御性T細胞など様々考えられるが、本研究では特定に至っていない。今後、ノックアウトマウスなどを用いた

検討を考えている。以上より、脾臓は新たな膵島移植の場であることを示すことができた。

【研究業績 平成26年4月～平成29年3月まで】

Itoh T, Nishinakamura H, Kumano K, Takahashi H, Kodama S. The spleen is an ideal site for inducing transplanted islet graft expansion in mice. Plos ONE 12(1): e0170899, 2017.

【謝辞】

本研究の一部は福岡大学研究推進部の研究経費によるものである(課題番号147105)。