

わって、生体適合性に優れた PVA を用いて大型デバイスの作製につながる作製方法を開発し、また、その PVA に血管誘導機能の付加する可能性を追求した。

## B. 研究方法

### 1. PVA を用いたバイオ人工膵

PVA ゲル内に従来の方法で分離したラット膵島を混合し、 $20 \times 15 \times 1$  mm に整形した後、物理的強度を付与するために両面から polyethylene terephthalate (PET) メッシュでサンドイッチ状に挟んだ。これを凍結して PVA を架橋し、解凍して実験に用いた。対照としては PVA に混入しない遊離膵島を用いた。

解凍後の膵島数を実体顕微鏡下に計測して、膵島回収率を計算した。デバイスおよび遊離膵島を RPMI-1630 中で培養し、1日、7日、14日後にインスリン分泌試験を行った。3.3mM と 16.7mM のブドウ糖濃度中で1時間静置培養し、溶液中に分泌されたインスリン分泌量を測定した。

### 2. コラーゲン被覆 PVA ゲルによる血管誘導

既報の方法 (Hayashi H, et al. Transplant Proc 27: 3358-3361, 1995) で作成したメッシュ補強 PVA バッグ (MRPB) をテトラポランで表面処理した後、1型コラーゲンあるいは1型/4型混合 (6 : 4 v/v) コラーゲン溶液に浸し、 $37^{\circ}\text{C}$  でクロスリンクさせた。

ラットの皮下に作製したポケットに、コラーゲン被覆 MRPB を埋入し、その部位に酸性ゼラチン微粒子に含浸させた bFGF (0, 5, 10, 50  $\mu\text{g}$ ) を散布した。2週間後に同部位を摘出して、H-E 染色を施行して MRPB 周囲の血管新生を観察、比較検討した。なお、血管新生は von Willebrand Factor や PECAM-1 の免疫染色によって確認した。

### 3. 倫理面への配慮

本研究で行った動物実験は、科学的かつ

倫理的な実施を図るため、「動物の保護および管理に関する法律」に基づき、「京都大学動物実験に関する指針」に準拠し、「京都大学再生医科学研究所動物実験委員会」において承認された実験計画に従って実施された。

## C. 研究結果

### 1. PVA を用いたバイオ人工膵

膵島回収率は遊離膵島とデバイスで差がなく (図2)、デバイス作製中の膵島の損失は最小限に抑えられていると考えられた。

培養1日目のインスリン分泌量は遊離膵島とデバイスで差が無く、両者とも良好な反応性を示した。1日目に比べ7および14日目ではインスリン分泌量が減少したが、遊離膵島で14日目にはほとんど分泌が無くなったのに比べ、デバイスではなおブドウ糖濃度に反応した分泌が観察され (図3)、膵島の機能が相対的に良好に保たれていることが示唆された。

### 2. コラーゲンコーティング PVA ゲルによる血管誘導

5  $\mu\text{g}$  の bFGF 含浸ゼラチン微粒子をゼラチン微粒子を散布した場合、1型/4型混合コラーゲン処理の方が1型コラーゲン処理よりも新生血管が多く観察された。bFGF を 10  $\mu\text{g}$  散布した群では、より多くの新生血管がみられた。一方、bFGF を含浸しないゼラチン微粒子を散布した場合は、コラーゲンの種類によらず、新生血管はわずかであった。また、50  $\mu\text{g}$  の bFGF を含浸したゼラチン微粒子を散布しても、MRPB を埋入しなかった場合は、新生血管はわずかであった。

## D. 考察

PVA は生体適合性に優れ、我々の MRPB 等の研究でも長期間有効なバイオ人工膵の材料として期待される。しかし、従来の

MRPB ではデバイスの大型化や、大型バッグの整形後に膵島細胞を封入することに困難があり、改良の余地があった。今回この問題を解決すべく、PVA が凍結によって架橋することを応用して、ゾル状態の PVA に直接膵島を混入してこれを凍結することで、容易に大型化できる PVA デバイスの作製を試みた。今のところ *in vitro* での機能評価に止まっているが、従来作製した *in vivo* で有効な各種デバイスの *in vitro* での機能評価と比較しても、今回の PVA デバイスは遜色ないものである。今後、マウスやイヌの糖尿病モデルを用いて、*in vivo* での機能評価を行う予定である。

従来の我々の実験では、バイオ人工膵の皮下移植予定部位に、bFGF 含浸ゼラチン微粒子やコラーゲンスポンジを用いて血管誘導の前処置を行っていたが、デバイス自体をコラーゲンで被覆することで移植後早期に血管を誘導できれば、血管誘導の前処置が不要になる可能性があると考えられる。今回試作した 1 型 / 4 型混合コラーゲン被覆 PVA デバイスは、bFGF 含浸ゼラチン微粒子と併用することで、周囲に良好な微小循環環境を形成することが確認された。実際の膵島細胞を組み込んだデバイスで、前処置なしで皮下移植後の膵島機能が維持できるか否かは今後検討する必要があるが、前述の新型 PVA デバイスとこの方法を併用すれば、大動物にも応用可能な大型で血管誘導作用を有するデバイスの開発に大きく一歩を踏み出すことになるものと思われる。

#### E. 結論

ヒトへの臨床応用を目指したバイオ人工膵開発の一環として、今回、生体適合性に優れた PVA を素材とし、大型化が容易なマクロデバイスの作製法を開発した。本法は *in vitro* では良好な機能を示し、今後の

*in vivo* 実験でも有効性が確認されるものと期待される。また、PVA デバイスの表面を 1 型 / 4 型混合コラーゲンで被覆し、従来から用いていた bFGF 含浸ゼラチン微粒子と併用することで、皮下組織に良好な血管新生が確認された。今後、これらの方法を併用することで、大動物に対して血管誘導前処置なしのバイオ人工膵移植が実現する可能性がある。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Wang W.J., Gu Y.J., Tabata Y., Miyamoto M., Hori H., Nagata N., Toma M., Balamurugan A.N., Kawakami Y., Nozawa M., and Inoue K.: Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* **73** : 122-129, 2002
2. Wang WJ, Gu YJ, Hori H, Sakurai T., Hiura H., Sumi S., Tabata Y. and Inoue K.: Restoration of normoglycemia in diabetic mice by xenotransplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine cells into a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* (in press).
3. Balamurugan AN, Gu Y, Miyamoto M, Wang W, Inoue K, Tabata Y. Streptozotocin (STZ) is commonly used to induce diabetes in animal models. *Pancreas*. 26(1): 102-3, 2003
4. Balamurugan AN, Gu Y, Miyamoto

- M, Hori H, Inoue K, Tabata Y. Hepatocyte growth factor (HGF) is a mitogen and an insulinotropic agent for fetal islet cells in vitro. *Pancreas*. 26(1): 103-4, 2003
5. Balamurugan A.N., Gu Y.J., Tabata Y., Miyamoto M., Wang W.J., Inoue K.: Isolation, culture and functional characteristics of "diabetic islets". *Pancreas* (in press)
  6. Balamurugan A.N., Inoue K.: Effect of hepatocyte growth factor (HGF) on adult islet function in vitro. *Pancreas* (in press)
  7. Balamurugan A.N., Inoue K.: Bioartificial pancreas transplantation at prevascularized intermuscular space: Effect of angiogenesis induction on islet survival. *Pancreas* (in press)
  8. Miyamoto M., Inoue K.: Development of pancreatic transplantation in the new decade. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg* (in press)
  9. 堀 洋, 井上一知: 再生膵島細胞移植の現状と展望. *日本再生医療学会誌* 1(2): 69-77, 2002
  10. 井上一知: 膵島再生医療. *糖尿病学の進歩* 2002 (36): 229-234, 2002
  11. 井上一知: 再生医療. 1型DMフォーラムレポート: 21世紀のニッポンの1型DM医療のあり方を求めて: 33-34, 2002
  12. 井上一知: 再生医療の展望. *Imidas* 2003: 26, 2002
  13. 角 昭一郎, 井上一知: 再生医学. 外科エンサイクロペディア. 外科 (増刊号) 64(12): 1490, 2002
  14. 角 昭一郎, 北村義則: 膵再生. 大槻眞監修, 臨床医のための膵炎. 東京, 現代医療社. 253-256, 2002
  15. 角 昭一郎, 井上一知: 膵移植の現状と展望. *Annual Review 消化器 中外医学社* (東京) 2003
  16. 角 昭一郎, 井上一知: 人工膵臓. 人工生体材料の設計・作製および評価. 新訂版表面科学の基礎と応用 (印刷中)
  17. 日裏彰人, 井上一知: バイオ人工膵. 新時代の糖尿病学—病因・診断・治療の進歩—. *日本臨牀 増刊号* 625-630, 2002
  18. 井上一知, 堀 洋: 膵島の再生医療—Regenerative Medicine for Pancreatic Islet Cells. *Organ Biology* 9 (4): 2002
  19. 井上一知: 糖尿病における移植・再生医療の展望. *内科 特集「糖尿病—成因解明と治療の進歩—* (印刷中)
  20. 角 昭一郎, 井上一知: 糖尿病と再生医療. *Medico* 33 (8): 1-4, 2002
  21. 日裏彰人, 櫻井智徳, 堀 洋, 顧 元駿, 井上一知: バイオ人工膵 特集 糖尿病と再生医療. *Diabetes Frontier*: 13: 55-59, 2002
  22. 日裏彰人, 井上一知: 膵ラ島移植. *成人病と生活習慣病* 32:777-779, 2002
  23. 日裏彰人, 井上一知: 膵臓再生医療の開発. 月刊「化学工業」(印刷中)
  24. 堀 洋, 井上一知: 膵島の再生医療 再生医療の展望. *Medicina* 39: 500-505, 2002
2. 学会発表等
    1. 王 文敬, 顧 元駿, 堀 洋, 奇梅日更, 日裏彰人, 井上一知: Macroencapsulization of porcine pancreas endocrine cells as

- bioartificial pancreas for subcutaneous xenotransplantation. 第 29 回 膝・膝島移植研究会 (2002.3.16 福島)
2. 王 文敬, 顧 元駿, 堀 洋, 櫻井智徳, 日裏彰人, 角 昭一郎, 井上一知: マイクロカプセル化ブタ膵内分泌細胞の皮下異種移植による糖尿病治療の検討. 第 1 回日本再生医療学会 (2002.4.18 京都)
  3. 顧 元駿, 王 文敬, 堀 洋, 奇梅日更, 日裏彰人, 井上一知: Isolation and xenotransplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine cells in pig-to-mouse model. 第 29 回 膝・膝島移植研究会 (2002.3.16 福島)
  4. 顧 元駿, 王 文敬, 堀 洋, 奇 梅日更, 日裏彰人, 角 昭一郎, 井上一知: マイクロカプセル化ブタ膵内分泌細胞の腹腔内移植の関する検討. 第 1 回日本再生医療学会 (2002.4.18 京都)
  5. 堀 洋, 井上一知: 再生膝島細胞移植の現状と展望. 第 1 回日本再生医療学会シンポジウム (2002.4.18 京都)
  6. 堀 洋, 角 昭一郎, 井上一知: 糖尿病に対する膝島再生医療. 第 9 回日本臓器保存生物医学会総会シンポジウム (2002.5.25 東京)
  7. 堀 洋, 井上一知: 再生膝島細胞移植とステムセルバイオロジー. 第 75 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム (2002.6.28)
  8. Akihito Hiura: Regenerative Islet therapy for diabetes mellitus. 5<sup>th</sup> World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary association. Symposium 14 "Stem cell biology and bioengineering" (2002.4.28 Tokyo)
  9. 日裏彰人, 井上一知: ー再生医療とアフエレシスー: 膝島再生医療. 第 22 回日本アフエレシス学会ワークショップ (2002.6.16 札幌)
  10. Akihito Hiura, Kazutomo Inoue: Subcutaneous implantation therapy of macroencapsulated islets for diabetes mellitus. 29<sup>th</sup> Annual Meeting and Exposition of Controlled Release Society. Mini-Symposia " Drug Delivery for Diabetic Disease Treatment Symposium, Second Department of Internal Medicine" (2002. 7.22 Seoul)
  11. 櫻井智徳, 佐竹 晃, 顧 元駿, 田畑泰彦, 角 昭一郎, 井上一知: 血管新生誘導効率に優れた免疫隔離デバイスの開発. 第 1 回日本再生医療学会 (2002.4.18 京都)
  12. 櫻井智徳, 佐竹晃, 井上一知, 宮越順二: The effects of magnetic field on pancreatic islets and insulinoma cells. International Symposium on Bioelectromagnetics (2002. 10.9 Kyoto)
  13. 角 昭一郎, 井上一知: 指定シンポジウム「再生医療のがん治療への応用」, 膝島再生医療の展望. 第 40 回日本癌治療学会総会(2002.10.16 東京)
  14. 奇 梅日更, 顧 元駿, 金 度勲, 堀 洋, 日裏彰人, 角 昭一郎, 井上一知: 新しいシートタイプバイオ人工膝に関する検討. 第 1 回日本再生医療学会 (2002.4.18 京都)
  15. 佐竹 晃, 櫻井智徳, 岩永飛鳥, 日裏彰人, 堀 洋, 顧 元駿, 角 昭一郎, 田畑泰彦, 井上一知: ラット膝島の同種皮下移植における bFGF 除放デバイ

スの効果. 第 1 回日本再生医療学会  
(2002.4.18 京都)

16. 井上一知：特別講演 21 世紀の再生医療—現状と展望—. 日本医学会 100 周年記念式典 (2002.6.06 東京)
17. 井上一知：教育講演 再生医療の動向と将来展望. 日本人工臓器学会 (2002.10 札幌)
18. 井上一知：特別講演 膝島再生医療. 第 38 回日本移植学会総会 (2002.10 東京)

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

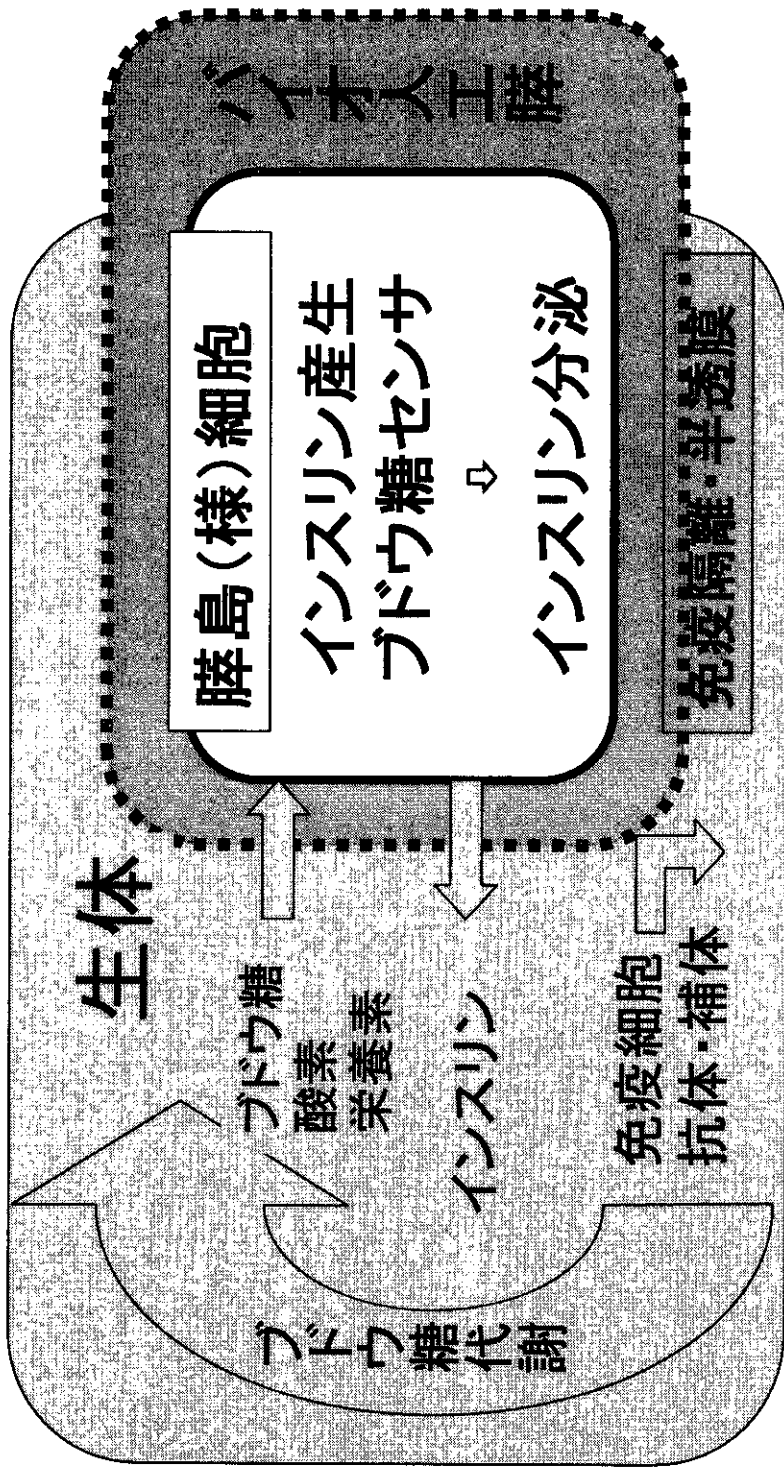


図1: バイオ人工膵の模式図。  
 半透膜で膵島(様)細胞を免疫反応から防御することで免疫抑制剤が不要となり、  
 ヒト膵島にかわる各種の膵島(様)細胞が利用可能となることで、ドナー不足が  
 解消すると考えられる。

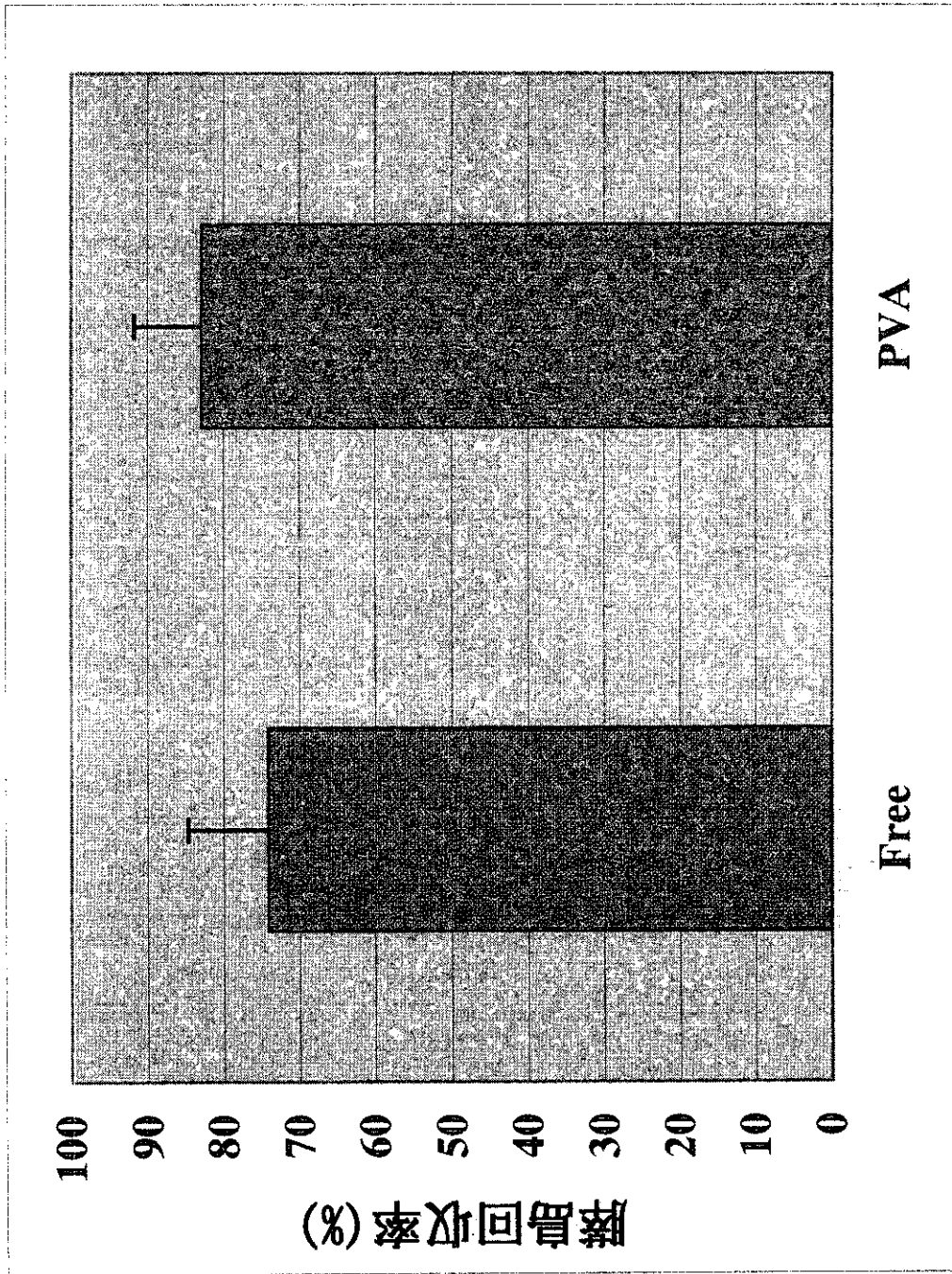
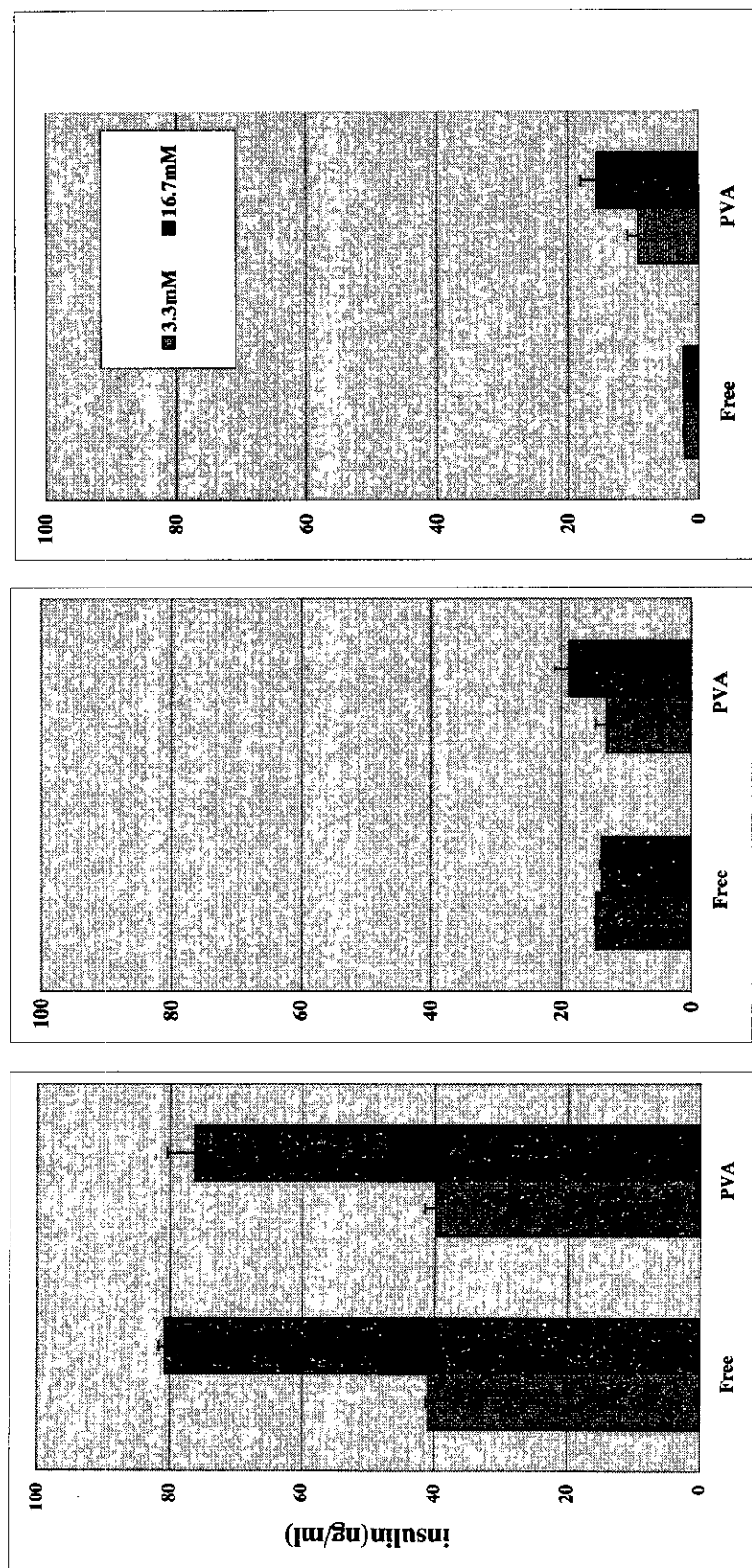


図2: 遊離腓島とPVAデバイスの腓島回収率

# インスリン分泌能



培養日数 1日 7日 14日

図3: ブドウ糖(3.3mMと16.7mM)に対する遊離臍島 (Free, 左)とPVAデバイス(PVA, 右)のインスリン分泌能



厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
分担研究報告書

NKT 細胞移入による移植免疫制御

分担研究者 中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究院・教授

研究要旨 患者本人の NKT 細胞や樹状細胞を *in vitro* で増殖・活性化させ、自己の細胞を使った細胞療法によって、これまでの免疫抑制剤だけではコントロールできなかった移植の慢性拒絶をコントロールすることを目的としている。今年度の研究から、つぎの3点が明らかになった。(1) アロのラ氏島の移植実験モデルでは、免疫寛容の誘導は抗 CD4 抗体の移入、FK506 投与などで可能である。その免疫寛容の維持(慢性拒絶の回避)には、NKT 細胞の存在が必須であることが分かった。(2) *In vitro* でヒトの NKT 細胞を増殖させる実験条件、ヒト末梢血から樹状細胞を増殖・活性化させる条件について検討し、GMP 基準に沿った細胞調整の大量培養系を樹立した。その細胞を用いて、Phase I 相当の研究を行った。重篤な有害事象は観察されなかった。(3) リンパ球への遺伝子治療が可能なモデル実験動物として、T 細胞や NKT 細胞特異的にアデノウイルスレセプターが高発現する遺伝子導入マウスを樹立した。非常に高い効率でアデノウイルスベクターが感染することがわかった。寛容誘導にも有用であった。今後は、NKT 細胞由来の抑制性サイトカインや抑制シグナル誘導分子などに焦点を当てて、免疫寛容維持をにう分子機序の解明を進める。アデノウイルスレセプターの遺伝子導入マウスを用いて *in vivo* の実験を開始する。ヒトの NKT 細胞や樹状細胞の培養で、GMP グレードに沿った大量培養系の樹立を目指す。

A. 研究目的

ラ氏島移植は、最近注目を浴びるようになった新しい糖尿病の治療法である。治療自体の侵襲が小さく、確立されれば貢献度は計り知れない。米国では、これまでに約 450 例の実績が報告されている。しかし、現在のところ免疫抑制剤だけで移植拒絶を十分コントロールできていない。ラ氏島移植が遅れている一因として、免疫寛容の誘導機序が十分解明されていないことがあげられる。これまでに、細胞療法については、ガ

ン患者で LAK 療法などが行われてきたが、移植医療の分野での報告はまだない。

NKT 細胞は、NK 細胞のマーカーである NK1.1 と T 細胞に特異的な T 細胞抗原レセプター(TCR)を両方発現している細胞集団で、ヒトでは末梢血リンパ球の約 0.1%以下と少なく、これまで解析が遅れていた。この NKT 細胞抗原受容体の多様性は非常に限られていて、マウスでは V $\alpha$ 14、ヒトでは V $\alpha$ 24 を選択的に使ってい

る。リガンドも通常の TCR での MHC (主要組織適合遺伝子複合体) 分子と蛋白ペプチドではなく、CD1d 分子と糖脂質であることが分かっている。NKT 細胞は、CD1d 分子に提示された糖脂質( $\alpha$ GalCer) を認識すると、活性化されて短時間のうちに IL-4 や IFN- $\gamma$  を産生する。これによって、獲得免疫系のタイプ 1(Th1) やタイプ 2(Th2) のヘルパー T 細胞の分化を調節している。さらに、未知の分子で腫瘍細胞を認識し、強力なパーフォリン依存性の抗腫瘍細胞活性を発揮する。そのほかに、アレルギーの発症制御、自己免疫疾患の発症制御をしていると言われ、本研究では、NKT 細胞が移植免疫系で機能しているかどうか調べる。また、患者本人の NKT 細胞や樹状細胞を *in vitro* で増殖・活性化させ、自己の細胞を使った細胞療法によって、これまでの免疫抑制剤だけではコントロールできなかった移植の慢性拒絶をコントロールすることを目的としている。

## B. 研究方法

1) ラ氏島移植：まず、ゼノおよびアロのラ氏島移植の実験プロトコルを説明する。まず、7-10 週令の C57BL/6 マウスや V $\alpha$ 14NKT ノックアウトマウスに、streptozotocin(STZ; 200mg/Kg) を静注し、膵臓のラ氏島を破壊する。1-2 日後には、血漿中のグルコースレベルが 400mg/dl になり、糖尿病がおこる。STZ 投与後、5-8 日目に、分離した Lewis ラットのラ氏島 500 個または、アロ (BALB/c) のラ氏島 500 個を経門脈的に注射する。移植が成功すれば、血糖値が正常範囲(100mg/dl 以下)に戻る。その後、血糖値が 2 日以上 200mg/dl に上昇した場合に第 1 日目を拒絶日とする。通常は 1 週間程度でほとんど拒絶が起こるが、移植後、0, 2, 4 日後に 50 $\mu$ g の抗 CD4 抗体を注射すると、トレランスが誘導され、30 日以上の上生着マウスの比率は 75%以上となる。これは、CD4 陽性の T 細胞がマウスの生体からいなくなることで、約 14 日目に NKT 細胞が復帰し

てくることに関係があるようである。また、FK506 を移植の次の日から 6 日間(3mg/kg) 投与すると、やはり拒絶の抑制が起こる。これらの系を使い、ホストに V $\alpha$ 14NKT ノックアウトマウスなどを用いてトレランス誘導と NKT 細胞の必要性について検討した。

- 2) アデノウイルスを用いた遺伝子治療のための基礎実験：アデノウイルスレセプターのトランスジェニックマウスを用いて行った。T 細胞、NKT 細胞をはじめとするリンパ球にはアデノウイルスのレセプターが発現しておらず、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験はリンパ球では非常に難しいのが現状である。しかし、アデノウイルスの遺伝子導入の系は、増殖していない細胞にも感染し遺伝子導入が出来ること、7-9kb といった大きな遺伝子が入ること、数時間で遺伝子発現が起こること、高いタイターのウイルス液が容易に調整できることなどの、大きなメリットがある。そこで、ヒトのアデノウイルスレセプター(CAR)を T 細胞と NKT 細胞に強制発現させたマウスを樹立し、そのマウスの T 細胞への感染実験を行った。
- 3) 自己の末梢血から調整した単核球分画を *in vitro* で GM-CSF と IL-2 で培養し、糖脂質( $\alpha$ GalCer) をパルスした後、人に戻す実験を行い、重篤な有害事象(National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria に沿った)が起こるかどうかについて検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は千葉大学の動物実験指針に従った。ヒトの末梢血の NKT 細胞の計測や臨床研究も、倫理委員会で承認されたプロトコル(平成 11 年 8 月、平成 13 年 2 月)に従ってインフォームドコンセントを十分に行った。

### C. 研究結果

今回の我々の実験で、FK506 で誘導したゼノのラ氏島の移植免疫寛容にも NKT 細胞の存在が必須であることが分かった。FK506(1mg/kg)では 60 日目のアロの臍島の survival rate が % から 20 % になり、FK506(3mg/kg)では、67%であった。レシピエントに V $\alpha$ 14NKT ノックアウトマウスを用いると、FK506 で誘導される免疫寛容の成立が非常に困難になる。約 2 週間ではほとんどのマウスでは拒絶が起こり、25 日では全て拒絶された。これらの実験から、NKT 細胞の存在がアロのラ氏島の移植免疫寛容誘導にも必須であることが分かった。この実験は、前年度から行ってきたが実験動物数が増え、結論を導き出すと同時に、論文発表できる段階になった。

アデノウイルスレセプターのトランスジェニックマウスの樹立には、CD2 のエンハンサー、Ick のプロモーター、ヒト成長ホルモンエンハンサーの入ったトランスジェニック作成用のカセットに、細胞質内部分の欠損したヒトの CAR 遺伝子(CARD1)をいれてトランスジェニックマウスを作成した。このマウスの末梢 T 細胞では 60-80 の効率でアデノウイルスが感染し、組み込んだベクターが発現することが、GFP を組み込んだアデノウイルスベクターでの実験で確かめられた。IL-10 遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んだ。これを用いて、アロの皮膚移植、アロの臍島移植の系で IL-10 遺伝子導入 T 細胞を移入して、とくにアロの皮膚移植の系で有意に移植片の生着延長が見られた。

また、末梢血から分離した単核球を GM-CSF と IL-2 で培養し、IL-4 がなくても $\alpha$ GalCer の提示による NKT 細胞の増殖、活性化による細胞障害活性の誘導は大丈夫であることが判明した。NKT 細胞の細胞治療の自主研究 (phase I study 相当) をがん患者を対象に行っている。5x10<sup>7</sup>, 2.5x10<sup>8</sup>, 1x10<sup>9</sup> の 3 レベルの dose-escalation study を行い、現在までに計 11 例が終わった。特に重特な有害事象は出ていない。

### D. 考察

今回、免疫抑制剤で誘導されるアロの臍島の移植の系でも免疫寛容の誘導に NKT 細胞の存在が必須であることが明らかになった。このことは、移植免疫における免疫寛容の誘導において、NKT 細胞の関与が免疫寛容誘導方法に依存せず、かなり一般的なメカニズムを使っていることを示唆している。

T 細胞にアデノウイルスを感染させる系については、IL-10 などの抑制性のサイトカインを導入する実験を進めた。アロの皮膚移植の系では有意な生着延長が見られ、低容量の FK506 との併用でかなりの効果が得られた。IL-10 を導入する細胞を、CD8T 細胞、抑制性 T 細胞、NKT 細胞などにかえて、最も効果のある手法を樹立したいと考えている。

将来的には 移植拒絶、特に慢性拒絶のコントロールに遺伝子治療を施した患者自身のリンパ球を用いる細胞療法は、非常に有望であると思われる。NKT 細胞や樹状細胞の培養で、GMP グレードに沿った大量培養系の樹立を目指し、そのための試薬・機器などを調達している。

### E. 結論

今年度の研究での達成された点。

- \* アロのラ氏島移植において NKT 細胞の必要性を明らかにした。
- \* IL-10 遺伝子導入 T 細胞の移入 (遺伝子細胞治療) でアロの皮膚移植の生着延長が見られた。
- \*  $\alpha$ GalCer を用いた自己 DC 移入臨床研究 (Phase I 相当) を、GMP 基準に準拠した形で開始し、現在までに 11 例を行い、特に重特な有害事象は出なかった。

### F. 研究発表

#### 1. 発表論文

1. Duthie, M. S., Wlekinski-Lee, M., Smith, S.,

- Nakayama, T., Taniguchi, M., and Kahn, S. J.:** During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycosphosphoinositol-modified surface protein. *Infect. Immun.* 70:36-48 (2002).
2. Suto, A., Nakajima, H., Ikeda, K., Kubo, S., **Nakayama, T., Taniguchi, M., Saito, Y., and Iwamoto, I.:** CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms. *Blood* 99:555-560 (2002).
  3. Gonzalez-Aseguinolaza, G., Van Kaer, L., Bergmann, C. C., Wilson, J. M., Schmieg, J., Kronenberg, M., **Nakayama, T., Taniguchi, M., Koezuka, Y., and Tsuji, M.:** Natural killer T cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J. Exp. Med.* 195:617-624 (2002).
  4. Akutsu, Y., **Nakayama, T., Harada, M., Kawano, T., Motohashi, S., Shimizu, E., Ito, T., Kamada, N., Saito, T., Matsubara, H., Miyazawa, Y., Ochiai, T., and Taniguchi, M.:** Expansion of lung V $\alpha$ 14 NKT cells by administration of  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed dendritic cells. *Jpn. J. Can. Res.* 93:397-403 (2002).
  5. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Yara, S., Miyagi, K., Koguchi, Y., **Nakayama, T., Taniguchi, M., and Saito, A.:** Minimal contribution of V $\alpha$ 14 natural killer T cells to Th1 response and host resistance against mycobacterial infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 46:207-210 (2002).
  6. Shibata, Y., Kamata, T., Kimura, M., Yamashita, M., Wang, C.-R., Murata, K., Miyazaki, M., Taniguchi, M., Watanabe, N., and **Nakayama, T.:** Ras activation in T cells determines the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation. *J. Immunol.* 169:2134-2140 (2002).
  7. Sfondrini, L., Besusso, D., Zoia, M. T., Rodolfo, M., Invernizzi, A. M., Taniguchi, M., **Nakayama, T., Colombo, M. P., Menard, S., and Balsari, A.:** Absence of the CD1 molecule up-regulates antitumor activity induced by CpG oligodeoxynucleotides in mice. *J. Immunol.* 169:151-158 (2002).
  8. Kikkawa, E., Yamashita, M., Kimura, M., Omori, M., Sugaya, K., Shimizu, C., Katsumoto, T., Ikekita, M., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.:** T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2 cell differentiation of developing CD4 single-positive thymocytes. *Int. Immunol.* 14:943-951 (2002).
  9. Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Kimura, M., Omori, M., Inami, M., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.:** Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal of the IL-13 gene locus. *J. Biol. Chem.* 277:42399-42408 (2002).
  10. Motohashi, S., Kobayashi, S., Magara, K., Iizasa, T., **Nakayama, T., Fujisawa, T., and Taniguchi, M.:** Preserved IFN- $\gamma$  production of circulating V $\alpha$ 24 NKT cells in primary lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 102:159-165 (2002).
  11. Asai, K., Hachimura, S., Kimura, M., Toraya, T., Yamashita, M., **Nakayama, T., and Kaminogawa, S.:** T cell hyporesponsiveness induced by oral administration of ovalbumin is associated with impaired NFAT nuclear translocation and p27<sup>kip1</sup> degradation. *J. Immunol.* 169:4723-4731 (2002).

12. Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang C.-R., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: *src* homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Inv.* 111:109-119, 2003.

13. Kubo, S., Nakayama, T., Matsuoka, K., Yonekawa, H., and Karasuyama, H.: Long term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE. *J. Immunol.* 170:775-780, 2003.

## 2. 学会発表

1. 中山俊憲、藤澤武彦、谷口克 NKT 細胞とがん免疫療法 第 61 回日本癌学会総会シンポジウム 2002 年 10 月 1-3 日、東京

2. Nakayama, T.: Regulation of histone hyperacetylation at the Th2 cytokine gene loci. 第 32 回日本免疫学会総会シンポジウム 2002 年 12 月 4-6 日、東京

3. 小池順造、石塚祐子、佐藤高明、濱沖勝、古関明彦、中山俊憲、谷口克 新規 C-type lectin family NK receptor, NKG2Dh の機能解析 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京

4. 中井之人、岩淵和也、藤井聡、石森直樹、綿野敬子、三島鉄也、中山俊憲、谷口克、Van KaerLuc、三宅幸子、山村隆、小野江和則  $\alpha$ -GalCer および OCH による NKT 細胞の活性化はいずれも動脈硬化促進性に寄与する 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京

5. 山下政克、鶴飼磨貴、谷口克、中山俊憲 Th2 サイトカイン遺伝子座クロマチンリモデリングに必要な GATA3 結合部位の同定 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京

6. 鶴飼磨貴、山下政克、谷口克、中山俊憲 Cre/loxP を用いた新しい Th1/Th2 細胞分化解析系の開発 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京

7. 勝本拓夫、信賀順、木村元子、谷口克、古関明彦、中山俊憲 新規ポリコム群遺伝子 MBLR の T 細胞のサイトカイン産生における役割 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京

8. 若尾宏、近藤英介、伊藤俊広、柴田陽一、古関明彦、竹森利忠、中山俊憲、谷口克 パイエル板成熟 T 細胞における RAG2 の発現とその機能 第 32 回日本免疫学会総会 2002 年 12 月 4-6 日、東京

9. 鶴飼磨貴、山下政克、谷口克、中山俊憲 Cre/loxP システムを使った *in vitro* Th1/Th2 細胞分化解析系の開発 第 25 回日本分子生物学会年会 2002 年 12 月 11-14 日、横浜

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
特になし。

2. 実用新案登録  
特になし。

3. その他  
特になし。

「基礎研究の臨床成果とその社会的影響」

分担研究者 篠崎 尚史 東京歯科大学市川総合病院角膜センター センター長

研究協力者 長谷川友紀 東邦大学医学部公衆衛生学講座 助教授

研究要旨

本研究では、腎移植における HLA マッチングのルール変更（2002年1月発令）に伴い、術後短期の拒絶反応の発生率や長期予後に与える影響を考察する。また、より精緻な HLA タイピング法を用いたタイピングが移植医療の治療成績を向上させる可能性について検討する。また、近年の免疫抑制剤、並びにステロイド剤の発達により、感染症の危険性も高まっている。さらに、Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)の発症と Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)の関連が指摘される中、わが国でも5頭目のBSEが認められ（平成14年8月現在）、臓器移植における感染症への概念も変貌しつつあるため、そのリスクと予後についての研究を実施した。

A. 研究目的

阻血時間の変化と阻血における腎機能の評価を行なうことで、2002年の腎配分ルール変更による変化を検討して、それらのファクターについての医学的安全性を検討する。また、臓器移植における感染症、特にvCJD等のドナースクリーニングにおける、リスク vs. ベネフィットの観点からのクライテリアの検証を実施した。

B. 研究方法

1. 羊膜上に培養角膜上皮細胞を生着させ、In vivoへ移植することについて基礎的ならびに臨床的検討を行った。倫理面への配慮では帝王切開時に採取する羊膜と、培養角膜上皮移植について大学倫理委員会の承認を受け、その範囲内の中で行っている。

2. 腎臓移植を受けた患者を対象に、2002年1月のルール変更前と変更後の2群に分類し、温阻血時間、及び提供腎臓の品質に係るファクター、並びに術後管理の状況を比較検討し、移植前後で採取された患者尿中のL-FABPを測定し、阻血時間の変更に伴う腎臓に与える虚血によるストレスの解析より、リスクファクターを評価する。同時に、腎移植後に感染症などの発

生した症例を解析し、その調査を行なう。

3. vCJDに代表されるプリオン病や他の感染症に関しても、他国のクライテリアと照らせ合わせながら、わが国でのこれまでの対応と比較して、臓器移植におけるリスク vs. ベネフィットについての考察を行なう。

（倫理面への配慮）本研究では、阻血時間、移植術前後の尿の採取、評価、並びに術後感染症情報等、すべて匿名化した後のドナー及びレシピエント情報を取扱った。結果の公表に際しても、統計的集計結果のみに限定し、個人の同定は不可能なためプライバシーの問題は生じないものとする。

C. 研究結果

2002年1月に施行されたミスマッチ方式でのレシピエント選択の方法ではHLAのタイピングの他に、居住地域として従来のブロック内での配分から都道府県を重視するものである。2002年に実施された腎臓移植（124例）の総阻血時間(TIT: Total Ischaemic Time)は平均12時間13分（最短4時間00分、最長24時間31分）であり、前年の平均13時間49分、（社）日本臓器移植ネットワーク発足から2001年までの898

例の TIT 平均 14.5 時間と比較してもそれぞれ、1 時間 36 分、2 時間 17 分の短縮、1999 年～2001 年までの 455 例 (TIT、13 時間 33 分)と比較しても 1 時間 20 分の短縮となった。L-FABP の値は、阻血時間が採尿された中で最短の症例 (210 分) の場合では、血流再開後 75 分で移植前の 1/5 にまで減少したが、阻血時間延長 (特に温祖血時間) に伴い、尿中 L-FABP の最大値は高値となり、翌朝においても虚血ストレスが継続していた。(添付資料-1)

海外においてもドナー数の不足により、従来のマージナルドナーからの提供腎の利用について、新たなクライテリア (Expanded Criteria Donors for Kidney Transplantation) (添付資料-2) が施行されており、臓器配分、特に腎臓の斡旋基準の変更が医学的に与えるインパクトに関しては、わが国のみならず、ドナー数の不足に伴い、世界的な問題として議論されている。また、ルール変更に伴うリスクバロメーターとして、移植後の死亡者数も検討されたが、1999 年 14 名、2000 年 9 名、であるのに対して 2001 年は、8 名と有意な変動は見られなかった。

移植に伴うリスクとして、vCJD 感染のドナークライテリアに関して、特に BSE 発症国への渡航歴、その他のリスクファクターについての取り扱いの検討を行った。我が国では、既に 7 例の国内牛 BSE が確認されており、また 2003 年 4 月からの病死牛を含む全牛の BSE 検査実施に伴い、BSE 感染牛の報告数が増加することも予想される。海外の臓器提供に関するクライテリアの検討も行ったが、既に英国では感染症予防の立場と、社会的ベネフィットの相関に鑑みて作成されたクライテリアが作成されており(添付資料-3)、

- ① 移植による vCJD 感染防止対策の検討にあたっては、vCJD 感染リスクと移植医療のベネフィットが比較考量される必要がある。
- ② 移植医療を一律に取り扱うことは合理的ではなく、緊急性、代替可能性が考慮される必要があること、また vCJD の感染リスクについても同

様に考慮される必要がある。

- ③ 血液については代替可能性から vCJD 感染防止を重視した対策に一定の合理性が有る。レシピエントが生命の危険に晒される臓器移植、一部組織 (骨髄) 移植においては、十分な説明に基づく同意を条件に、移植の実施が考慮される必要がある。

とのリスク vs. ベネフィットの考え方の枠組みが確立されていた。

#### D. 考察

##### 1) 達成度について

本年度における当該研究では、阻血に対する腎近位尿管細胞へのストレスにより Induce される L-FABP により腎への疎血による影響を評価した。本法が臨床的に確立されれば、移植時のみでなく腎不全の評価にも用いられる可能性があり、初年度としての達成度は満足するものの、サンプル採取のクライテリアを徹底して対象症例数を増加させて有意差を解析できなかった点での達成度は低いと認識している。さらに、今回の症例では、移植後の初尿を対象とした測定であったため、移植後のサンプル採取時間自体が腎機能の左右され、今後の血液中での測定方法の確立が望まれる。また、感染症に対しての国際比較については、BSE が 7 例発症しているわが国での vCJD 対策等、状況も刻々と変化している環境で国策としてのドナースクリーニングクライテリアとして、vCJD 発症症例数の少ないドナープールに対して、臓器移植におけるリスク v s. ベネフィットにおいてその他の医療行為との分別化が必要であると提言する。

##### 2) 研究成果の学術的・国際社会的意義について

従来の腎機能評価においては、尿蛋白排泄量のように腎臓にてろ過されなかった物質により評価されていたが、本法では腎そのものの機能評価として、尿管細胞で Induce された物質による測定法を確立するものであり、学術的にも臨床的にもそ

の意義は大きいと考える。昨年のルール改正に伴い阻血時間が 1 時間 36 分短縮 (2001 年比) されたことは、腎臓への阻血ストレス上、良好であると思われるが、さらに多くの症例についての評価が必要と思われる。感染症のクライテリアに関しては、欧米ではリスク vs. ベネフィットの議論がなされた上での exclusion criteria が形成されているが、わが国におけるドナークライテリアにおいては、その症例数の少なさにもかかわらず、危険性を過度に高く評価しているとも思われる criteria が実施されており、今後、BSE 発症数などの環境因子を考慮した上でのリスク、ベネフィットの比較考量が必要である。

### 3) 今後の展開について

2002 年度は腎移植数が 124 例と減少傾向にあり、さらに本研究は新制度導入と同時に進行したため、十分な症例数を用いた、拒絶反応、生着率などの臨床指標を用いた移植成績を加味した詳細な検討については今後の課題である。特に本年度ツールとして用いられた L-FABP の測定方法は、温阻血、冷阻血時間との相関が統計学的に処理でき得るサンプル数を調査することが必要と考える。さらに多くの症例にて実証を得ることで、臨床的にも腎機能評価方法として確立できるものと確信する。

## E. 結論

今回の腎配分ルールにおいて阻血時間が短縮されたことは腎ストレスを L-FABP でスクリーニングした場合に良好であると思われる。2002 年の総腎移植 (死体腎) 数は、124 例で総阻血時間は最長 24 時間 31 分、最短 4 時間 00 分、平均 12 時間 13 分であった。2001 年の総阻血時間の平均は 13 時間 49 分であり 1 時間 36 分短縮された。移植後に尿中の L-FABP が測定された症例では、最短の症例 (210 分冷阻血) においては、再開後 75 分で移植前値の 1/5 にストレスが軽減したが、阻血

時間の延長と共に最大値は高値となり、さらにストレスから回復する時間も延長することが証明された。これらの結果により、腎移植における阻血時間と腎ストレスの関係について、L-FABP による測定は、阻血時間の変化により大きく変化し、特に移植後の初尿による検査において、有意な差を生み出していることが確認された。しかし、本研究で実施された方法では、尿中の L-FABP を測定するため、初尿までの測定が不可能であるため、血中の L-FABP の測定により、阻血時間と腎ストレスの関係を明らかにすることにより、移植後の腎機能の回復を測定できるシステム構築が必要と考えられた。また、待機患者、もしくは腎機能の低下している患者の尿中もしくは血中 L-FABP の測定を行うことで、腎機能の判定ができるものと推定され、今後の研究が望まれる。1999 年から 2002 年の間の腎移植者志望症例数は、それぞれ 14 例、9 例、8 例、11 例と推移しており、死亡者数により統計学的有意差は見られなかった。死因も感染症 4 例 (間質性肺炎、敗血症、セラチア菌感染、ウイルス性肺炎)、心疾患 3 例 (動脈硬石灰化による心不全、心筋梗塞、うっ血性心不全)、移植術関連合併症 2 例 (腹膜炎による肺水腫、HD 開始直前に心停止、呼吸停止)、その他 2 例 (SMA 塞栓症、誤嚥による呼吸不全) であった。

また、移植へのリスクファクターとしてあげられる感染症などへのクライテリアに関しては、個々の臓器ごとにリスク vs. ベネフィットの比較考量を行なう必要があり、専門家など関係諸団体を交えたパネルなどによりコンセンサスの確立を行なうことが重要と考える。

今回の調査においてデータの収集、集計にご協力を頂いた(社)日本臓器移植ネットワークに深謝いたします。



F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 特になし
2. 学会発表 特になし

H. 知的財産権の出願、登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 特願 2003-071029 「腎臓幹細胞/前駆細胞、腎臓幹細胞/前駆細胞の分離方法、及び腎疾患の治療方法
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 添付資料—1

### 腎移植における阻血時間と尿中の L-FLBP 量の変化

1998 年の Remuzzi らの報告 1) でも明らかなように、尿蛋白排泄量が腎疾患進展の重要な規定因子の一つであることは広く認められるところとなった。従来、尿中の腎機能マーカーとしては、糸球体の濾過機能が破綻した結果として血中から漏出するアルブミンや、尿細管機能が低下した結果として再吸収されずに出現する低分子蛋白が知られている。しかし、腎移植後の予後管理に尿蛋白排泄量は十分に有効ではない。

我々は、よりの確に病態の進展を予測できるモニタリングマーカーの確立を目指して、腎機能の破綻の結果ではなく、腎疾患進展の原因となる種々のストレスを反映する尿中蛋白の探索を、厚生労働省医療委託費研究事業(平成 12, 13 年度)において行ってきた。その結果、既存の尿中マーカーとその性質を異にし、近位尿細管細胞において種々のストレスに応答して遺伝子発現が誘導され、尿中に排出される L-FABP (L-type Fatty Acid Binding Protein) を同定し、尿中測定法を確立したことを報告して来た。そこで、新しい臨床マーカーの探索に着手し、尿中の肝型脂肪酸結合蛋白 (liver type fatty acid binding protein; L-FABP) の検出法を確立した。これまでの検討で、尿中 L-FABP は、腎臓の機能低下に先行して、種々のストレスにより誘導される、極めてユニークな予後診断マーカーであることが見出されている 2)。

### ヒト L-FABP 遺伝子の転写調節領域の構造

4 つのエクソンからなるヒト L-FABP 全翻訳領域を含む染色体遺伝子をクローニングした。ヒト L-FABP 転写調節領域 4.7kb には、hypoxia-inducible factor 1(HIF-1), hepatocyte nuclear factor 4(HNF-4), chicken ovalbumin upstream promoter(COUP), HNF-1, peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)などの虚血や脂質代謝に関わる転写因子の結合領域が存在しており、近位尿細管における遊離脂肪酸負荷の増大をもたらすストレスに応答して、L-FABP が発現誘導されることが予想された。

### 低酸素暴露による L-FABP 遺伝子発現

近位尿細管細胞に対するストレスの中で高度蛋白尿と同様、細胞内遊離脂肪酸を増大させる刺激に、低酸素暴露が考えられる。低酸素時には、ホスホリパーゼ A2 が活性化され、細胞膜の構成成分であるリン脂質が加水分解を受け、アラキドン酸などの脂肪酸が細胞内に蓄積することが知られている。そこで、培養近位尿細管細胞を用いて、虚血ストレスによる L-FABP 発現に関して検討を行った。

ヒト L-FABP 遺伝子の転写調節領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドを作製し、ブタ近位尿細管細胞由来の細胞株である LLC-PK1 細胞に一過性に導入した。転写調節領域の長さの異なるレポータープラスミドを用い、嫌気性チャンバーを使用して低酸素暴露 24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。ヒト L-FABP 遺伝子の転写調節領域 4.7kb 内の低酸素に応答する領域を探索した結果、HIF-1 結合領域のコンセンサス配列が存在することが明らかになった。

HIF-1 は、虚血刺激により erythropoietin(EPO)遺伝子上流の hypoxia response elements(HREs)に結合する核因子として同定され、basic helix-loop-helix-per-arnt-sim(bHLH-PAS)ファミリーに属するヘテロダイマーよりなる。EPO, vascular endothelial growth factor(VEGF), inducible nitric oxide synthase(iNOS), heme oxygenase 1(HO-1)をはじめ

め、生理的、病理的な低酸素ストレス時に誘導される種々の遺伝子発現調節に関わっている。

つぎに、LLC-PK1 細胞を、嫌気性チャンバーを使用して低酸素暴露し、培地中に遊離された LDH 活性を測定して細胞障害の指標とした。L-FABP mRNA の発現を RT-PCR で検出したところ、低酸素暴露により、8 時間から 48 時間まで経時的に L-FABP mRNA の発現が上昇した。一方、ブタ L-FABP の antisense RNA を一過性に LLC-PK1 細胞に発現させて L-FABP 発現を抑制すると、低酸素暴露 24 時間後では、コントロールと差は見られなかったが、さらに再酸素化 24 時間後の培地中への LDH 活性遊離が antisense 処置により有意に上昇した。以上より、L-FABP は、近位尿細管細胞において虚血時に発現が上昇し、再酸素化により生じる酸化ストレスから細胞を保護する機能を保持している可能性が示唆された。虚血/酸化ストレスに対する L-FABP の尿細管保護作用についての仮説を下図に示す。

### 腎移植時の虚血時間と初尿確認後の尿中 L-FABP との関係

細胞レベルの検討により、尿細管細胞の虚血後再還流障害と尿中 L-FABP 排泄には、過酸化脂質からの細胞保護作用という生理的因果関係が予想された。そこで、生体腎移植時のドナー腎動脈クランプから移植後血流再開時までの阻血時間と、再開後初尿から経時的に尿中 L-FABP 測定値との関係を調べた。

- 141 分冷阻血→330 ng/mL
- 210 分冷阻血→613 ng/mL
- 50 分温阻血+250 分冷阻血→1075 ng/mL

その結果、尿中 L-FABP は再開後 20 分で最も高値となり、阻血時間が最短で 210 分の場合は、再開後 75 分後には移植前値の約 1/5 にまで減少し、虚血ストレスが軽減されていることが示された。反面、阻血時間（特に、温阻血時間）が長くなるに従い、尿中 L-FABP の最大値は高値となり、翌朝においても虚血ストレスが継続していることが明らかとなり、このことは、①阻血により、近位尿細管細胞膜上のホスホリパーゼ A2 が活性化され、細胞内遊離脂肪酸が増大、②血流再開による再酸素化が脂肪酸を過酸化、③過酸化脂質と阻血により遺伝子発現誘導された L-FABP が結合し、細胞外へ排泄（図-1）という仮説を裏付けていると考えられる。

尿中 L-FABP が腎移植後の予後管理マーカーとして有用である可能性が示唆された。

### [文献]

- 1) Remuzzi G and Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. N. Engl. J. Med., 339:1448-1456, 1998
- 2) Kamijo A, Yamanouchi M, Sugaya T et al. Urinary excretion of fatty acid binding protein (L-FABP) reflects the stress on the proximal tubule and a marker of progression of renal damage. J Am Soc Nephrol 10: 106A.1999

# The hypothesis of cytoprotective effects of L-FABP

