

った。

死体内灌流は 13 例(56.5%)がローラーポンプによる強制灌流法、10 例(43.5%)が滴下灌流法であった。搬送は 17 例(73.9%)が2層法で、他の 6 例(26.1%)が UW 液単純浸漬保存法で施行した。

2) 膵島分離結果

膵島収量は、400~491,040IEQ(平均 148,511 IEQ)で、純度は1~70%(平均 35.3%)とばらつきが大きかった。図4のごとく、不良例では膵島の破壊、外分泌組織の混入が見られた。

Static incubation による膵島内分泌機能の評価では、Stimulation index は 1.38-11.69 であった。

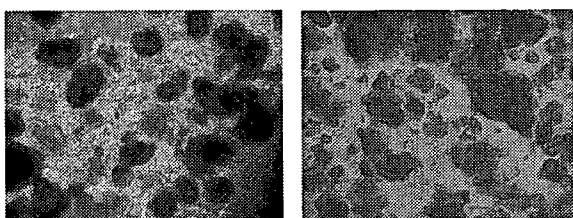


図4. 膵島分離良好例(左)、不良例(右)

膵島分離成功(高収量、高純度)に影響する因子として、心停止エピソードが無いこと、死因が脳血管障害でないこと、無尿時間が短いこと、総阻血時間が短いこと、2層法で保存・搬送することなどがあげられた。23 例のうち 6 例(26.1%)がわが国の新鮮膵島移植基準を満たし、移植に用いられ、15 例(65.2%)は凍結保存された。他の 2 例は、膵島が得られず、焼却処分した。

3) 膵島凍結保存結果

今回検討に用いた 15 例の凍結保存膵島の分離時のデータでは、年齢は 10 歳~69 歳、収量は 394.17~2264.39IEQ/g であった。Static incubation にて算出した stimulation index は 1.4~5.83 とインスリン分泌能を有していた。15 例ともに細菌、嫌気性菌、真菌、抗酸菌の培養で発育せず、陰性であった。サンプルの機能検査が施行し得た 12 例の検討では、分離直後の膵島機能検査(Static incubation)から算出した Stimulation index(SI)が ≥ 1.2 を示す機能良好群が 8 例、 < 1.2 であった機能不良群は 4 例であった。以下 2 群につき形態学的に比較検討した。

機能良好群では形態が良好に保持されたものが 7/8(87%)であったのに対し、機能不良群では 1/4(25%)と機能不良群では形態の保持が困難であった。形態良好群の Dithizone 染色像(図5)、HE 染色像(図6)、電子顕微鏡像(図7)ではいずれも正常の膵島の形態が保持されていた。

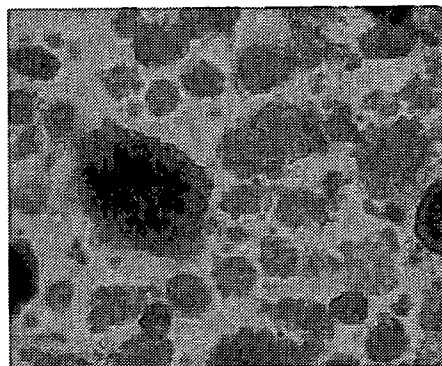


図5. Dithizone 染色像

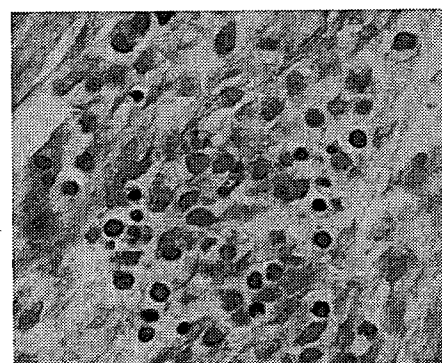


図6. HE 染色像

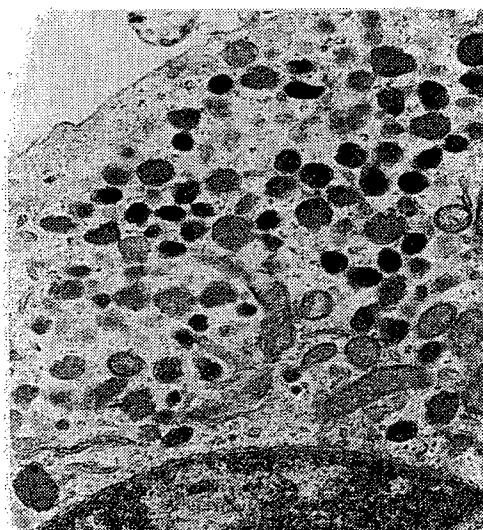


図7. 電子顕微鏡像

4) 臨床膵島移植結果

23 例の分離のうち新鮮膵島移植基準を満たした 6 例の分離膵島を 4 名の 1 型糖尿病患者に移植した。2 例が 2 回移植例であった。全例移植中の Vital sign に著変なく、自覚症状も全く認めなかった。門脈圧も軽度上昇のみであった。移植後は出血などの合併症無く、血糖コントロールの改善と低血糖発作の消失、

インスリン使用量の減少が得られ、高感度 C-peptide 値は陽性化した(表2.)。HbA1c も血糖値の安定化に伴い、著明に低下した。インスリン離脱は得られなかったが患者 QOL の著明な改善がみられた。免疫抑制剤による副作用として 3 例に口内炎が発現したが、Rapamycin の減量により消失した。

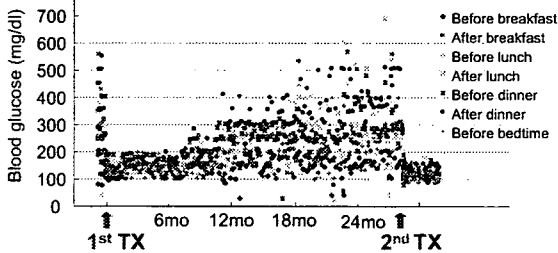
表2. 臨床膵島移植結果

- 国立病院機構千葉東病院外科 -

症例	年齢・性	移植回数	低血糖発作	インスリン量	CPR	合併症
					Pre→Post	
#1	16・♀	2	消失	1/2 <0.05→0.8		口内炎
#2	21・♀	2	消失	1/3 <0.05→0.6		口内炎
#3	33・♂	1	減少	2/3 <0.03→0.2		なし
#4	29・♀	1	消失	1/3 <0.03→0.6		口内炎・皮膚炎

図8に、2回膵島移植を受けた症例1の血糖値の推移を示した。1回目の膵島移植後血中 C-peptide 値は 0.8ng/ml と陽性化し、低血糖発作の消失、インスリン投与量の減少、血糖値の安定化が得られたが、1年後より血中 C-peptide 値の低下、血糖値の不安定化、インスリン必要量の増加が見られた。2回目の移植により再度血糖値は安定化した。臨床膵島移植においては、短いインターバルでの再移植の必要性が示唆され、また長期の膵島機能維持の困難性も明らかと

移植後経過(症例#1、16歳、女性)



なった。

図8. 膵島移植臨床例(症例1)

D. 考察

わが国において膵島移植の臨床が開始されたが、わが国の臨床例の経験より、悪条件の心停止ドナー(いわゆるマージナルドナー)からは、高収量、高純度の膵島が得られないことも多い。本年度の研究結果として、大動物実験において、純度が低い場合にも膵島移植が可能かどうかイヌ膵島自家移植モデルにて検討した。In vitro の膵島機能評価(perfusion study)においては、非純化膵島の機能は低いと評価されたが、自家移植では長期の正常血糖維持が可能であり、今後低純度でも十分な収量がある場合には新鮮膵島移植に使用できる可能性を示唆した。このデータをもとに今後新

鮮膵島移植の純度の基準(現在は $\geq 30\%$)の見直しが必要と考えられた。

凍結保存膵島を公平・公正に膵島移植に用いるためには膵島バンク構築が急務と考えられる。そのためには安全な膵島凍結保存法が必須である。現在われわれは独自のバッグ一括大量凍結保存法を臨床に応用している。今回、すでに当院バンクに凍結保存されている15例の膵島を解凍し、その安全性・有効性を評価した。感染は1例もみられず、当院 GMP 準拠 CPC における凍結保存技術の安全性が確認された。また機能評価においては、凍結保存により形態、機能低下が約 1/3 の例にみられたが、サンプルのチェックにより解凍前に評価しえるため、新鮮膵島移植に比較して有効性の予測が可能であり、有用であると考えられた。

新鮮膵島移植を行なった4例はいずれも血中 C-peptide 値の陽性化、低血糖発作の消失、血糖値の安定化が得られた。1-2回の移植でインスリン離脱は得られていないが、患者の QOL の格段の向上が確認され、膵島移植の臨床的有効性が証明された。

E. 結論

臨床膵島移植はわが国で着実に症例の積み重ねがされており、今後の成績改善が期待される。また種々の問題点も本研究の基礎的実験にて徐々に解決されており、凍結膵島移植の実施も間近である。

F. 健康危険情報

エドモントンプロトコールに利用されるシロリムスにより、特に、口腔内潰瘍が認められた。シロリムス減量により改善した。

G. 研究発表

1. 論文発表(書籍)

1. 剣持 敬. 膵島移植の現状と将来の可能性 カラー版糖尿病学 ー基礎と臨床ー pp1040-1044、門脇 孝ら編、西村書店、2007.6、東京
2. 剣持 敬. 膵島移植 南山堂 医学大辞典 第19版1刷 pp1307、2007年3月
3. 剣持 敬. 膵臓移植ー糖尿病根治を目指して。 出月康夫、野澤真澄(編)、シュプリンガー・ジャパン、東京、(2008年、印刷中)

(雑誌)

1. Kenmochi T, Maruyama M, Mullen Y, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Ohtsuki K, Suzuki A, Miyazaki M. Successful Engraftment of Cryopreserved Human Pancreatic Islets into Diabetic Nude Mice. *Low Temp Med* 33:4-7, 2007
 2. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Ohtsuki K, Suzuki A, Miyazaki M. Cryopreservation of Human Pancreatic Islets from Non-heart Beating Donors using Hydroxyethyl Starch and Dimethyl Sulfoxide as Cryoprotectants. *Cell Transplantation* (in press)
 3. T. Kenmochi, K. Saigo, M. Maruyama, N. Akutsu, C. Iwashita, K. Otsuki, T. Ito, A. Suzuki, M. Miyazaki. Results of kidney transplantation from ABO-incompatible living donors in a single institution. *Transplant Proc* (in press)
 4. T. Kenmochi, M. Maruyama, K. Saigo, N. Akutsu, C. Iwashita, K. Otsuki, T. Ito, A. Suzuki, M. Miyazaki, T. Saito. Successful Islet transplantation from the pancreas of non-heart beating donors. *Transplant Proc* (in press)
 5. C. Iwashita, T. Kenmochi, K. Saigo, M. Maruyama, N. Akutsu, K. Otsuki. Three cases of pneumocystis pneumonia after kidney transplantation. *Transplant Proc* (in press)
 6. A. Suzuki, T. Kenmochi, M. Maruyama, K. Saigo, N. Akutsu, C. Iwashita, K. Otsuki, M. Miyazaki. Evaluation of quality of life after simultaneous pancreas and kidney transplantation from living donors using the Short Form 36. *Transplant Proc* (in press)
 7. K. Otsuki, T. Kenmochi, K. Saigo, M. Maruyama, N. Akutsu, C. Iwashita, T. Kono, S. Okazumi, T. Asano, K. Yoshikawa. Evaluation of segmental pancreatic function using ¹¹C-methionine positron emission tomography: for the safe donor operation of living pancreas transplantation. *Transplant Proc* (in press)
 8. M. Maruyama, T. Kenmochi, K. Saigo, N. Akutsu, C. Iwashita, K. Otsuki. Retroperitoneoscopic nephrectomy for live donor renal transplantation: Comparison to the open method. *Transplant Proc* (in press)
 9. M. Maruyama, T. Kenmochi, K. Saigo, N. Akutsu, C. Iwashita, K. Otsuki. Treatment of symptomatic lymphoceles after renal transplantation. *Transplant Proc* (in press)
 10. 剣持 敬. 膵臓移植の最近の動向。臨床外科 62 (13) :1719-1726, 2007
 11. 剣持 敬, 浅野武秀, 丸山通広, 西郷健一, 坪 尚武, 岩下 力, 大月和宣。膵臓移植と膵島移植 —世界の現状— 移植 42 : 536-544, 2007
 12. 剣持 敬. 特集「生体ドナーに関する適応と諸問題」生体膵臓移植。移植 42: 514-522, 2007
 13. 剣持 敬. 本邦における生体膵臓移植の導入と手術手技。手術 62 : 91-105, 2008
 14. 剣持 敬. Q & A / 1 型糖尿病。世界の膵島移植の介入研究から何を学びましたか? 肥満と糖尿病 7: 61-63, 2008
 15. 鈴木亜希子, 宮崎麻里子, 今野弘子, 丸山通広, 剣持 敬. 生体膵臓移植におけるレシピエントコーディネーターの役割。移植 42(1) : 2-6, 2007
2. 学会発表 (移植関連、First author のみ)

国際学会

1. T. Kenmochi, Takehide Asano, Michihiro Maruyama, Ken-ichi Saigo, Naotake Akutsu, Chikara Iwashita, Kazunori Ohtsuki. Successful simultaneous pancreas and kidney transplantation from ABO-incompatible living donors. 2007 Joint Conference -CTS-IPITA-IXA 2007/9/15-20, Minneapolis, MN, USA
2. T. Kenmochi, Session 305 Oral abstract Pancreas Transplant, other. Chairman. 2007 Joint Conference -CTS-IPITA-IXA 2007/9/15-20, Minneapolis, MN, USA
3. T. Kenmochi, K. Saigo, M. Maruyama, N. Akutsu, C. Iwashita, K. Otsuki, T. Ito, A. Suzuki, M. Miyazaki. Results of kidney transplantation from ABO-incompatible living donors in a single institution. 10th Congress of Asian Society of Transplantation. 2007/12/1-4, Pattaya, Thailand.
4. T. Kenmochi, M. Maruyama, K. Saigo, N. Akutsu, C. Iwashita, K. Otsuki, T. Ito, A. Suzuki, M.

Miyazaki, T. Saito. Successful Islet transplantation from the pancreas of non-heart beating donors. 10th Congress of Asian Society of Transplantation. 2007/12/1-4, Pattaya, Thailand.

坏 尚武、岩下 力、大月和宣。1 型糖尿病腎不全に対する生体膵・腎同時移植の導入と治療成績(ワークショップ) 第19回日本肝胆膵外科学会 2007.6.7 横浜

国内学会

1. 剣持 敬。腎疾患 update : 腎移植 (講演) 平成 18 年度国立病院機構腎疾患研修会。2007/1/25 千葉
2. 剣持 敬、丸山通広、西郷健一、坏 尚武、岩下 力、大月和宣、西村元伸、関 直人、鈴木亜希子、宮崎麻里子。ABO 不適合生体膵・腎同時移植の 1 例 (一般口演)。2007/2/28 山代温泉
3. 剣持 敬。糖尿病は移植で治るんですか? (特別講演) 第 10 回栃木県ヤング・小児糖尿病講演会 2007/3/25 宇都宮
4. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、坏 尚武、岩下 力、大月和宣。シンポジウム「糖尿病根治へのブレイクスルー」生体膵臓移植の治療成績と将来展望 (シンポジウム) 第 3 4 回膵・膵島移植研究会 2007.3.30 大阪
5. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、坏 尚武、岩下 力、大月和宣。ABO 血液型不適合生体膵・腎同時移植の 1 例 (一般口演) 第 3 4 回膵・膵島移植研究会 2007.3.30 大阪
6. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、坏 尚武、岩下 力、大月和宣。生体膵臓移植の治療成績と今後の展望 (パネルディスカッション) 第 107 日本外科学会定期学術集会 2007.4.11 大阪
7. 剣持 敬。わが国の膵島移植の現状と将来展望 (特別講演) 第 1 4 回 HAB 研究機構学術年会 2007.5.18 東京
8. 剣持 敬。本邦における生体膵臓移植の導入と手術手技 (特別講演) 第 61 回手術手技研究会 2007.5.19 新潟
9. 剣持 敬。当院における移植医療の現況ー腎移植を中心にしてー (講演) 第 1 回千葉・茨城腎移植セミナー 2007.6.2 東京
10. 剣持 敬、浅野武秀、西郷健一、丸山通広、坏 尚武、岩下 力、大月和宣。1 型糖尿病腎不全に対する生体膵・腎同時移植の導入と治療成績(ワークショップ) 第19回日本肝胆膵外科学会 2007.6.7 横浜
- 1 1. 剣持 敬。当院における移植医療の現況 (特別講演) 中外製薬社内講演 2007.6.22 千葉
- 1 2. 剣持 敬。1 型糖尿病に対する膵臓移植・膵島移植の臨床 (特別講演) 第 215 回茨城外科学会 2007.7.7 水戸
- 1 3. 剣持 敬。当院における移植医療の現状ー腎移植を中心にしてー (特別講演) 房総移植医療カンファレンス 2007.7.8 千葉
- 1 4. 剣持 敬。当院の腎臓移植・膵臓移植・膵島移植の現状と成果 (特別講演) 臓器移植についての公開講座「千葉県の移植医療の現状と成果」 2007.7.20 鴨川
- 1 5. 剣持 敬。腎移植 (特別講演) 2007 年度 国立病院機構腎疾患研修会 2007.7.24 千葉
- 1 6. 剣持 敬。組織移植医療の定着を求めてー膵島移植の立場からー (シンポジウム) 2007 年度 第 6 回日本組織移植学会・学術集会 2007.8.4 大阪
- 1 7. 剣持 敬。移植と免疫遺伝学 (教育講演) 第 1 7 回遺伝医学セミナー 2007.9.9 千葉
- 1 8. 剣持 敬。膵島移植ー臨床成績と将来展望ー (特別講演) 第 1 9 回新潟分子病態・再生医学セミナー 2007.9.14 新潟
- 1 9. 剣持 敬。当院における生体膵・腎同時移植の経験 (特別講演) 第 5 回 Transplantation Update 研究会 2007.9.23 滋賀
- 2 0. 剣持 敬。糖尿病治療としての腎移植、膵・膵島移植 (特別講演) 第 20 回腎臓病を考える会 2007.10.28 千葉
- 2 1. 剣持 敬。当院の腎移植医療の現況と腎ネット研究への展開 (シンポジウム) 第 2 回腎ネットシンポジウム 2007.11.15 名古屋
- 2 2. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健

- 一、 坏 尚武、岩下 力、大月和宣、伊藤泰平。
糖尿病根治療法のオプションとしての ABO 血液
型不適合生体膵臓移植の導入と成績(シンポジウ
ム) 第43回日本移植学会 2007.11.22 仙台
- 2 3. 劍持 敬、浅野武秀、西郷健一、丸山通広、
坏 尚武、岩下 力、大月和宣、伊藤泰平。1型
糖尿病腎不全に対する生体膵・腎同時移植一
手技と成績－(一般口演) 第 19 回 千葉
Critical Care Medicine 研究会 2007.12.8 千
葉
- 2 4. 劍持 敬。わが国の膵島移植の現状と展
望(特別講演) 第 37 回 日本内科学会生涯
教育講演会 2007.12.9 東京
- 2 5. 劍持 敬、浅野武秀、西郷健一、丸山通広、
坏 尚武、岩下 力、大月和宣、鈴木亜希子、
宮崎麻里子。ABO 不適合生体膵・腎同時移植
の導入(一般口演) 平成19年度千葉大学先端
応用外科例会 2007.12.23 千葉
- 2 6. 劍持 敬、西郷健一、丸山通広、坏 尚武、
大月和宣、岩下 力、伊藤泰平、宮崎麻里子、
鈴木亜希子。わが国の献腎移植の問題点－
当院での経験からの考察－(シンポジウム) 第41
回日本臨床腎移植学会 2008.1.23 浜名湖
- 2 7. 劍持 敬、西郷健一、丸山通広、坏 尚武、
大月和宣、岩下 力、伊藤泰平、宮崎麻里子、
鈴木亜希子。1 型糖尿病腎不全に対する ABO
不適合生体膵・腎同時移植(一般口演) 第41
回日本臨床腎移植学会 2008.1.23 浜名湖
- 2 8. 劍持 敬。膵臓移植・膵島移植の臨床
－糖尿病根治への挑戦－(教育講演) 自治医
科大学大学院特別講義 2008.2.14 栃木
- 2 9. 劍持 敬、浅野武秀、西郷健一、丸山通広、
坏 尚武、岩下 力、大月和宣、伊藤泰平、鈴
木亜希子、宮崎麻里子。重症糖尿病に対するβ
細胞移入治療法の選択－膵臓移植と膵島移植
－(コメンテーター) 第35回 膵・膵島移植研究会
2008.03.07 京都
- 3 0. 劍持 敬、浅野武秀、西郷健一、丸山通広、
坏 尚武、岩下 力、大月和宣、伊藤泰平、鈴
木亜希子、宮崎麻里子。ABO 血液型不適合ド
ナーからの生体膵・腎同時移植 3 例の成績(一
般口演) 第35回 膵・膵島移植研究会
2008.03.07 京都
- 3 1. 劍持 敬。肝胆膵・移植外科領域の手術
(特別講演) タイコヘルスジャパン社内講演
会 2008.3.22 富士宮
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他

－探索医療の成果としての膵島移植医療の確立膵島分離法の改良と分離膵島中の β cell viability 評価法
に関する研究－

分担研究者 岩永 康裕 京都大学医学部附属病院臓器移植医療部 助教

研究要旨：本邦では、重症糖尿病に対する治療法として臨床膵島移植が2004年から始まった。この医療を確立するためには、良質の膵島を安定して得ることができ、さらに移植後の膵島生着率を改善して、中長期の移植成績を向上させることが重要である。本年度は、1)膵島分離法の改良、2)分離膵島の機能評価法の開発、3)移植膵島の生着率の改善について、心停止ブタ膵臓を用いて基礎的研究を行なった。まず、1)膵島分離法の改良では従来使用していた酵素に代わって、他の酵素を使用し検討したが、純化後の膵島回収率が低くなるという問題点が明らかになり、さらなる改良が必要であることが分かった。次に、2)分離膵島の機能評価法については、大動物実験で心停止ドナーを用いた場合でも膵島細胞中の β 細胞自体のviabilityを調べられることが分かったので、臨床応用可能と考えられた。3)移植膵島の生着率の改善では、移植後まず起こる血液凝固性炎症反応を効果的に抑制し、かつ生体に優しい物質としてオリゴ糖（トレハロース）に着目し、予備実験では有効性が示唆された。

A. 研究目的

膵島移植は、2000年にカナダのアルバータ大学からいわゆるエドモントンプロトコールが発表されて移植成績が向上し、世界中に広まった。日本では、2004年に開始されたばかりである。この医療を確立するためには、良質の膵島を安定して得ることができて、そして移植後より多くの膵島が生着できるようにしなければならない。そこで、本研究では、1)膵島分離法の改良、2)分離膵島の機能評価法の開発、3)移植膵

島の生着率の改善を行なう。

B. 研究方法

1) 膵島分離法の改良

これまで膵臓保存液、消化液、膵島純化液を改良して心停止ドナーに特化した膵島分離法（KYOTO膵島分離法）を開発してきた。この際に膵臓を消化するための酵素はLiberase HIを使用してきた。しかし、臨床膵島分離では従来のLiberase HIが使用不可となったため、新たな酵素としてServa Collagenaseがその代替

品となりうるか大動物（ブタ）を用いて検証する。

心停止ブタの膵臓を用いてServa Collagenaseを使用した膵島分離をKYOTO法で行なった。対照群として従来のLiberase HIを使用した膵島分離を同様にKYOTO法で行ない、未消化組織量、膵島収量、純度、回収率、パイアビリティー（AO/PI）、ADP/ATP比（APOGLOW）を比較検討した。

2) 分離膵島の機能評価法の開発

膵島細胞のなかで β 細胞は、 α 細胞よりも障害を受け易く、ドナーの状態、膵臓の摘出や保存状態により、そのviabilityが左右されやすいため、従来の膵島viability assayではその結果と移植成績が必ずしも相関していなかった。正確に分離膵島の機能を評価するためには、 β 細胞自体のviabilityを調べる必要がある。

心停止ブタを用いて膵島を分離し、まず膵島をsingle cellにし7-AAD（死細胞を検出）で染色した後、FACSscanで解析して、死細胞と生細胞に分ける。次に生細胞をNewport Green（NG： β cellは亜鉛を多く含んでいるのでzinc binding dyeであるNGは β 細胞を標識する）で β 細胞と β 細胞でない細胞に分け、さらにTetramethylrhodamine ethyl ester（TMRE）（ミトコンドリアの膜電位を検出することでviabilityを測定）で β 細胞のviabilityを測定する。

さらに膵島中の各細胞の構成率を下記のようにLaser Scanning Cytometry（LSC）を用い

て解析する。膵島をsingle cellにしてスライドガラス上でparaformaldehyde固定し、膵島の各構成細胞から分泌されるホルモン（Insulin, Glucagon, Somatostatin, PP）の抗体で標識した後、Laser Scanning Cytometry（LSC）で解析して、 β 細胞構成率（ β cell composition）を求める。

β 細胞のviability結果と β 細胞構成率を合わせて膵島の機能評価を行なう。

これらを米国マイアミ大学及び藤田保健衛生大学との共同研究で行ない、心停止ドナーから分離した膵島の機能評価法を開発する。

3) 移植膵島の生着率の改善

膵島移植後即座に引き起こされる血液凝固性炎症反応（Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction:IBMIR）は、移植膵島の生着を著しく阻害するため解決策が求められている。そこで、IBMIRを抑制する機序を解明すると同時に、より効果的に抑制し、かつ生体に優しい物質を探索する。今回オリゴ糖（トレハロース）を用いて、in vitro実験を行なった。ループチューブ内で、ブタ膵島とオリゴ糖（トレハロース）を添加したヒト血液（糖類添加群）、または添加していないヒト血液（対照群）をそれぞれ揺動させながら共培養し、直後に採取した血液の組成を分析した。

C. 研究結果

1) 膵島分離法の改良

Liberase HIを使用した膵島分離（対照群）で

は未消化組織量 6g、純化前分離膵島数 8570 IE/g、純化後分離膵島数 4300 IE/g、純度80%、回収率 50%、viability (AO/PI) 97.5%、ADP/ATP 比 -0.069 であった。Serva 社製 Collagenaseを使用した場合は、未消化組織量 9g、純化前分離膵島数 5054 IE/g、純化後分離膵島数 373 IE/g、純度85%、回収率 7%、viability (AO/PI) 75%、ADP/ATP比 -0.126と、膵島収量、回収率、AO/PIによるviability がLiberase HIに比べて低い結果となった。

2) 分離膵島の機能評価法の開発

心停止ブタ膵から分離した膵島を用いて pilot studyを行なったところ、生細胞中の β 細胞のviabilityをFACScanで解析して測定しえた(図1)。さらに膵島中の各細胞の構成率についても各ホルモンの抗体で標識し Laser Scanning Cytometry (LSC)を用いて測定しえた(図2)。

図1. β cell viability

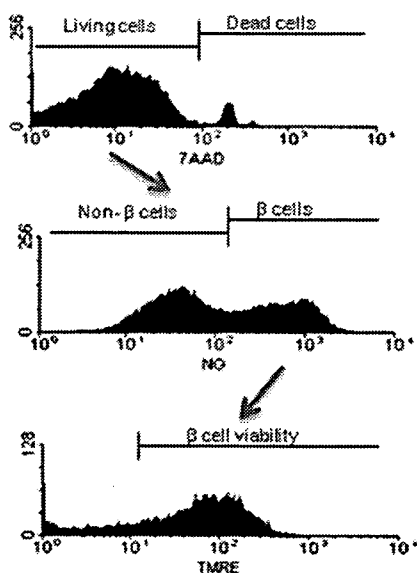
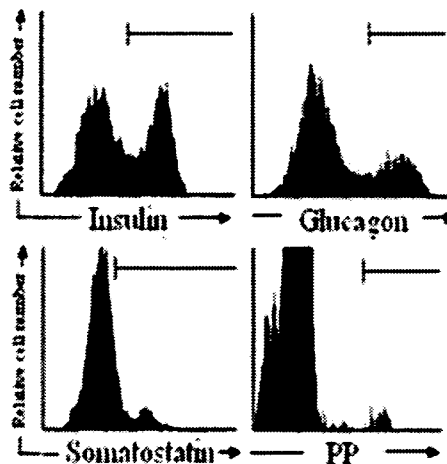


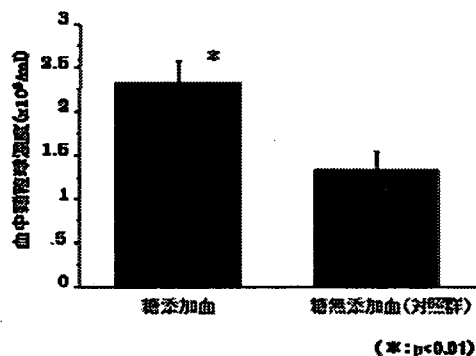
図2. β cell composition



3) 移植膵島の生着率の改善

共培養後のヒト血液組成の分析で、オリゴ糖添加血では顆粒球濃度が 2.34 ± 0.24 で、対照群 (1.31 ± 0.22) に比べて有意に高値であった(図3)。

図3 血中顆粒球濃度



D. 考察

膵臓から安定して十分量の膵島を得ることは、膵島移植医療を確立する上で非常に重要なことである。特に種々の悪条件が重なった心停止ドナー膵を使用しているわが国では大きな課題である。これまでに膵島分離の各行程を改良して心停止ドナーに特化した膵島分離法 (KYOTO 膵島分離法) を開発してきたが、膵臓

を消化するための酵素として従来使用してきた Liberase HI を臨床使えなくなったため、代替品を見つけなければならなくなった。そこで今回、欧米で使用され始めた Serva collagenase について検証した。Serva collagenase を使用した場合、ブタ膵臓を消化することはできても、そこから膵島を純化することが困難であった。欧米の膵島分離施設において Serva Collagenase を使用した膵島分離では純化後の膵島回収率が低くなるのが問題となっているが、今回の私達の結果は、その問題点と一致した。まだ予備的なデータであるが、Serva Collagenase を使用する場合、純化工程においてさらなる改良が必要であることが示唆された。

正確に分離膵島の機能を評価する方法があれば、膵島分離後に質の良い膵島のみを患者に移植することができ、それが移植後成績の向上につながる。また、膵島分離法を改良した際に、その評価を正確に行なうこともできる。共同研究施設であるマイアミ大学では、 β cell viability index (X) を (β cell viability index (X)) = (β cell content in islet) x (β cell viability) と定義して、脳死ドナーからの分離膵島の評価を行ない、回復率 (糖尿病マウスを移植によって回復させる率) が $0.3 < X \leq 0.4$ で 69%、 $0.4 < X$ で 100% となることを示している (Ichii et al., *American Journal of Transplantation* 2005)。今回、心停止ブタを用いた場合でも、膵島細胞中の β 細胞自体の viability を調べること

ができることが分かったので、今後、ブタを用いて心停止ドナーからの分離膵島における β cell viability index (X) と回復率の関係を求め、さらに心停止ドナーを用いた臨床膵島移植においては、 β -cell viability index (X) と臨床経過の相関を検討することを計画している。

共培養後のヒト血液組成の分析で、オリゴ糖添加血では対照群に比べ顆粒球濃度が有意に高値を示し、オリゴ糖添加により顆粒球の消費が抑制されたものと考えられた。反応初期段階の IBMIR 抑制作用を解析するため、補体 (C3a)・サイトカイン (TNF α) の解析を行なう必要がある。

E. 結論

今回、膵島移植医療を確立するために、新しい酵素を使って膵島分離法の改良を始めた。問題点が明らかになってきたことで、改善可能であると考えている。

分離膵島の機能評価については、マイアミ大学で開発された方法が動物実験のレベルではあるが、心停止ドナーを用いた場合でも評価可能であることが実証されたので、この方法は心停止ドナー膵を使用しているわが国の臨床膵島移植に応用可能であると判断できた。移植膵島の生着率を改善するために、IBMIR の抑制をターゲットにしているが、その他多方面に改善改良を加えることによって、膵島移植の成績は向上し、それがこの医療の確立につながると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(著書)

岩永康裕 「進みつづける細胞移植治療の実際」 膵島移植の現況 遺伝子医学MOOK 別冊 編集 田畑泰彦 株式会社メディカルドゥ (In press)

(雑誌)

- 1) Noguchi H, Ueda M, Hayashi S, Kobayashi N, Nagata H, Iwanaga Y, Okitsu T, Matsumoto S. Comparison of M-Kyoto solution and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution with a trypsin inhibitor for pancreas preservation in islet transplantation. *Transplantation*. 84(5):655-8. 2007
- 2) Ikemoto M, Matsumoto S, Egawa H, Okitsu T, Iwanaga Y, Umemoto S, Itoh H, Murayama H, Fujita M. A case with transient increases in serum S100A8/A9 levels implying acute inflammatory responses after pancreatic islet transplantation. *Ann Clin Biochem*. 44(Pt 6):570-2. 2007
- 3) Kim JY, Kina T, Iwanaga Y, Noguchi H, Matsu- mura K, Hyon SH. Tea polyphenol inhibits allo- stimulation in mixed lymphocyte culture. *Cell Transplant*. 16(1):75-83. 2007
- 4) Iwanaga Y, Sutherland D.E.R., Papas K. K. Harmon J.V. Pancreas Preservation for Pancreas and Islet Transplantation *Current*

Opinion in Organ Transplantation (In press)

- 5) 岩永康裕 (2007) 特集 糖尿病の新しい治療戦略 膵臓・膵島移植による糖尿病治療—現況と展望— 編集 稲垣暢也 62(4) 940-948 最新医学社

2. 学会発表

招待講演

- 1) Iwanaga Y. Islet Transplantation using Non-Heart Beating Donors The 17th International Association of Surgeons and Gastroenterologists and Oncologists (IASGO) 2007 Sep. p.5-8

パネルディスカッション

- 2) 岩永康裕、興津 輝、川口道也、古山賢一郎、児玉創太、堀口雅史、米川幸秀、野口洋文、永田英生、松本慎一、川口義弥、上本伸二 当院における心停止および生体ドナー膵島移植症例の検討 第107回日本外科学会定期学術集会 2007. 4. 11

レクチャー

- 3) 岩永康裕 膵臓・膵島移植による糖尿病治療 第42回 糖尿病学の進歩 2008. 2. 15

シンポジウム

- 4) 興津 輝、岩永康裕、松本慎一、川口義弥、川口道也、福田一仁、豊田健太郎、堀口雅史、古山賢一郎、児玉創太、藪中重美、倉本科学子、真鍋佳子、前川平、稲垣暢也、和

田洋巳、上本伸二 京都大学における心停止ドナー膵島移植 第34回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2007. 11. 16

- 5) 興津 輝、岩永康裕、松本慎一、川口義弥、川口道也、豊田健太郎、福田一仁、野口洋文、永田英生、堀口雅史、古山賢一郎、児玉創太、前川平、稲垣暢也、和田洋巳、上本伸二 膵島分離技術改良による膵島移植の可能性の拡大 第35回膵・膵島移植研究会 2008. 3. 8

一般演題

- 6) 野口洋文、上田路子、林衆治、興津 輝、岩永康裕、永田英生、小林直哉、松本慎一 膵島移植のための膵保存におけるウリナスタチンとメシル酸ナファモスタットの比較 第34回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2007. 11. 16
- 7) 興津 輝、岩永康裕、川口義弥、川口道也、上本伸二、渋谷佑一、岡林孝弘、堀見忠司、野村伊作、高原史郎 免疫抑制維持療法にステロイドを併用する腎移植後膵島移植2例の報告 第43回日本移植学会 2007. 11. 23
- 8) 藪中重美、井山なおみ、梅谷由美、渋谷直美、興津 輝、岩永康裕、豊田健太郎、福田一仁、浜本芳之、井澤ひとみ、川口義弥、川口道也、上本伸二 膵島移植患者における移植後患者満足についての検討ー膵島廃絶症例の経過を通して移植コーディネータの関わり方 第43回日本移

厚生労働科学研究費補助金(医療技術実用化総合研究事業)

基礎研究成果の臨床応用推進研究

分担研究報告書

—探索医療の成果としての膵島移植医療の確立移植後早期膵島傷害の機序とその制御法の開発に関する研究—

分担研究者:福岡大学医学部再生・移植医学 安波洋一

研究要旨:膵島移植の現況として、一人のインスリン依存糖尿病レシピエントを膵島移植後にインスリン治療より離脱するのに2-3回の膵島移植、すなわち2-3人のドナーを要し、さらにインスリン治療より離脱できたとしても移植後時間の経過とともに、再度インスリン治療が必要になる。この問題の解決が臨床膵島移植の今後の発展には必須である。本研究では移植後早期の膵島障害に着目、その機序を解析し、新たな制御法による移植膵島の生着率改善を試みた。更に新規知見に基づき、既に臨床で使用されている薬剤で、移植膵島障害に有効な薬剤の検索を行った。その結果、幾つかの有望な薬剤を見出した。本研究成果により移植後膵島障害の制御による生着率改善により、一人のドナーより一人のレシピエントへの膵島移植が実現する可能性が示され、今後の臨床応用による成果が期待される。

1. 研究目的

臨床膵島移植で最も重要な課題である移植膵島障害、特に移植早期膵島障害について、その機序ならびに臨床導入可能な制御法を見出す。

2. 研究方法

移植早期膵島障害に関し、その機序を解析するために、移植部位である肝臓に於ける膵島移植後早期の免疫反応をマウス実験系で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究プロジェクトは福岡大学アニマルセンター動物実験倫理委員会で承認された。

3. 研究結果及び考察

先の研究(JEM 202: 913, 2005)でマウス肝内同種同系膵島移植後早期、6時間をピークにNKT細胞、Gr-1+CD11b+細胞が活性化、炎症性サイトカインを産生し、移

植膵島を破壊するメカニズムが明らかとなった。このメカニズムに基づき、炎症性サイトカインを標的にした抗体療法により、移植早期膵島障害が制御でき、マウスでは一匹のドナーより2匹のレシピエントへの移植が可能となることが判明した。更に臨床導入の観点より抗IL-6R抗体の効果を検討した。抗IL-6R抗体はキャスルマン病の治療薬として我が国ですでに承認されている。その結果、抗IL-6R抗体により移植早期膵島障害を制御できることが明らかとなった。

4. 評価

1) 達成度について

臨床応用可能な移植早期膵島障害の制御法を明らかにすることができ、平成19年度の研究目的は達成できた。

2) 研究の意義について

本研究成果の臨床応用によりインスリン

依糖尿病の新規治療法である膵島細胞移植の臨床成績の向上に大きく貢献することが期待できる。

3) 今後の展望

今回の成果の臨床導入、さらには新規治療法の開発を目指す。

4. 結論

膵島移植早期に発現する移植膵島障害に関し、臨床応用可能な制御法を見出した

5. 研究発表

原著論文による発表

- ① T Kajiwara, Y Tomita, S Okano, T Iwai, Y Yasunami, Y Yoshikai, K Nomoto, R Tominaga, H Yasui. Effects of cyclosporin A on the activation of NKT cells induced by α -galactosylceramide. Transplantation 83:184-192, 2007
- ② Masayuki Satoh, Yohichi Yasunami, Nobuhide Matsuoka, Masahiko Nakano, Takeshi Itoh, Tomoyuki Nitta, Keizo Anzai, Junko Ono, Masaru Taniguchi, Seiyo Ikeda. Successful islet transplantation to two recipients from a single donor by targeting pro-inflammatory cytokines in mice. Transplantation 83(8):1085-1092, 2007
- ③ Iwai T, Tomita Y, Kajiwara T, Onzuka T, Okano S, Yasunami Y, Yoshikai Y, Nomoto K, Tominaga R. The immunoregulatory role of NKT cells in cyclophosphamide-induced tolerance. Transplantation 84(12): 1686-95, 2007

6. 知的所有権の出願、取得状況: 特になし

研究要旨： α 1,3 ガラクトース転移酵素遺伝子ノックアウトブタの開発によりブタ異種グラフトの長期生着への道が開けた。しかし、移植後慢性期に誘導、活性化されるレシピエント由来のヒト $CD8^+$ CTL はブタ異種膵島に対し強い直接細胞傷害性を持っていることが示唆され、ブタ膵島グラフト長期生着を阻むハードルとなると考えられる。今回の研究で我々は、ヒト decoy Fas 及び膜結合型ヒト FasL という新しい傷害性制御分子をブタ膵島に過剰発現させることで、ブタ膵島に対するヒト $CD8^+$ CTL 細胞傷害性を制御できることを示した。今後、これらの細胞傷害制御分子をブタに発現させた transgenic pig を作出しヒトに長期生着可能な移植用ブタ膵島を開発したいと考えている。

1. 研究目的

ヒト膵島移植は分離・純化した移植用膵島を門脈内に点滴にて移植する方法で、手術侵襲は膵臓移植に比べ極端に少なく理想的な 1 型糖尿病根治療法と考えられる。しかし、極端なドナー不足にある本邦の現況では膵島移植の恩恵にあずかる 1 型糖尿病患者は少ない。そこで我々は新しいドナーソースとして臓器の生理機能がヒトに最も近く、インスリンのホモロジーが最もヒトに類似している「ブタ」にいち早く着目し、ブタ異種膵島移植が、次世代の糖尿病根治療法と考え臨床応用に向けて研究を進めてきた。

ブタ臓器をヒトに移植すると、ヒトに対し高い抗原性を持つ異種糖鎖抗原 α -gal エピトープとヒト自然抗体 anti-Gal (ヒト IgG の約 1% を占める) が激烈に反応する超急性拒絶反応により分単位で拒絶される。しかしブタ膵島では、この α -gal エピトープは発現しておらず、移植後急性期の拒絶反応は回避され一時的に生着することになる。しかし、ノックアウトマウス (α 1,3-galactosyltransferase knock out mouse) を用いた我々の研究では、移植後週単位での慢性期にブタ異種細胞はレシピエント (ヒト) 由来 $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes (CTL) を介した細胞性免疫により確実に拒絶されることが証明されている。従って、ブタ膵島グラフトを 1 型糖尿病患者に移植、臨床応用するためには、ヒト CTL $CD8^+$ 細胞傷害性を制御することが必須となる。今回の研究では、このヒト $CD8^+$ CTL による異種細胞傷害性の新しい制御法の開発を目的として研究を進めた。

2. 研究方法

1) 標的細胞

ブタ血管内皮細胞株, MYP-30 (PEC) を DMEM complete

medium 中で培養し、ヒト $CD8^+$ CTL の直接細胞傷害性アッセイの標的細胞とした。また、slaughterhouse にて体重 300 kg の大ブタ (White/Landrace X Duroc) より膵臓を摘出し、modified Ricordi's method にてブタ膵島を分離・純化し標的細胞とした。

2) ヒト $CD8^+$ CTL の誘導

健常人末梢血より Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) を用いた遠心分離により PBMC を採取し、放射線照射 (50 Gy) した PEC を stimulator cell とし 37°C, 5% CO_2 の条件下にて RPMI 1640 complete medium 中で培養を開始し、培養 3 日目に 50 U/ml の低濃度ヒト rIL-2 を加え約 2 週間混合培養することによって活性化ヒト $CD8^+$ CTL を誘導した。最後に anti- $CD8$ mAb で coating した磁気ビーズを用いて $CD8^+$ CTL のみ positive selection しアッセイに用いた。

3) 細胞傷害性アッセイ

Parental PEC または遺伝子導入 PEC、parental pig islets または遺伝子導入 pig islets を標的細胞として ^{51}Cr release assay にて CTL による直接細胞傷害性を解析した。また、ヒト CTL 細胞傷害性のメカニズムを解析するため perforin/granzyme 系の阻害剤として Concanamycin A (Sigma-Aldrich)、Fas/FasL 系の阻害抗体として抗 FasL 抗体 (4H9, MBL, Nagoya, Japan) を用いてヒト CTL の細胞傷害性抑制テストも行った。

4) ヒト decoy Fas 及び膜結合型ヒト FasL の遺伝子構築と遺伝子導入

ヒト Fas の全長 cDNA より細胞質内 death domain を delete した decoy Fas cDNA を構築し、強力な発現ベクター

pEF-BOS (human elongation factor 1 α promoter gene and the SV40 replication origin with a neomycin-resistant gene)に挿入した(図1,A)。また、ヒト FasL の全長 cDNA より metalloproteinase の potential site を delete した shedding を受けにくい膜結合型 FasL cDNA を構築し、同様に発現ベクターに挿入(図1,A)、lipofection 法(LipofectAMINE 2000 Regent, Life Technologies, Inc)にて PEC に遺伝子導入した。遺伝子導入後、ネオマイシン存在下(G-418 1mg/ml)にて培養、selection を行い安定した発現クローンを樹立した。さらにヒト decoy Fas 及び膜結合型ヒト FasL の open reading frame をアデノウイルスベクターに挿入し(図1,B)、ブタ膵島に感染させこれらの分子を膵島上に発現させ傷害性解析を行った。

5) Flow cytometry analysis

遺伝子導入 PEC およびブタ膵島上の decoy Fas 及び膜結合型 FasL の発現は mAb (PE conjugated anti-human Fas mAb (DX2, BD biosciences Pharmingen, San Jose, CA), PE-anti-human FasL (4H9))にて染色し FACS にて解析した。

6) 移植実験

decoy Fas 及び膜結合型 FasL 発現の in vivo での有効性を解析するため、 2.5×10^6 cells の遺伝子導入 PEC および 3000 IEQ の遺伝子導入ブタ膵島をラット腎被膜下に移植し、ブタグラフトの生着延長効果を parental PEC、parental pig islets と比較し検討した。

3. 研究結果

1) ヒト CD8⁺ CTL の細胞傷害性メカニズム

Concanamycin A による perforin/granzyme 系阻害では一部傷害性は抑制されたが、抗 FasL 抗体による Fas/FasL 系阻害では 1/16~1/20 まで傷害性は強く抑制された(図2,A)。この結果よりヒト CD8⁺ CTL のブタ異種細胞に対する細胞傷害性は主に Fas/FasL pathway を介して発揮されることが示唆された(図2,B)。ブタ膵島においても同様で、Concanamycin A によるブロッキングでは約 20~30% 傷害性は抑制されたが、抗 FasL 抗体によるブロッキングでは約 80% 傷害性が抑制され、ヒト CD8⁺ CTL によるブタ膵島傷害性は主に Fas/FasL pathway を介して発揮されることが示唆された(data not shown)。

2) decoy Fas 及び膜結合型 FasL の遺伝子導入 PEC の樹

立とヒト CD8⁺ CTL 細胞傷害性からの抑制効果

lipofection 法による PEC への遺伝子導入により、decoy Fas PEC transfectants を 3 クローン、膜結合型 FasL-PEC transfectants を 2 クローン樹立した(図3)。decoy Fas transfectants に対するヒト CD8⁺ CTL 細胞傷害性は、decoy Fa の細胞表面発現量に比例して傷害性を強く抑制でき、高発現クローン decoy-3 では E/T ratio=25:1 及び 12.5:1 両方で 70~80% 細胞傷害性を抑制できた(図4,A)。一方、低発現クローン decoy-1 では 12.5:1 の低い E/T ratio では約 50% 抑制できたが、50:1 と高い E/T ratio では、20% の傷害性抑制効果にとどまった。膜結合型 FasL-PEC transfectants においても同様に、細胞傷害性は膜結合型 FasL 発現量に比例して強く抑制でき、特に高発現クローン membrane-2 では、すべての E/T ratio において 70% 以上安定した抑制効果を示した(図4,B)。従って、decoy Fas 及び膜結合型 FasL 両分子共に、ヒト CD8⁺ CTL 細胞傷害性制御に対し有効であることが証明された。

3) decoy Fas 及び膜結合型 FasL 発現ブタ膵島の樹立とヒト CD8⁺ CTL 細胞傷害性からの抑制効果

アデノウイルスベクターの multiplicity of infection (MOI) に比例して、ブタ膵島上に decoy Fas 及び膜結合型 FasL の発現を認めた。FACS による発現解析では、100 MOI のアデノウイルスの感染により decoy Fas 発現ブタ膵島で 81.4% の膵島に、膜結合型 FasL 発現ブタ膵島で 79.3% の膵島にそれぞれの分子発現を認めた(図5)。細胞傷害アッセイでは、E/T ratio=50:1 および 25:1 における parental pig islets の傷害性はそれぞれ $36.7 \pm 3.9\%$ 、 $25.5 \pm 5.6\%$ であったが、decoy Fas 発現ブタ膵島の傷害性は $18.8 \pm 1.0\%$ 、 $8.7 \pm 3.5\%$ にまで抑制され、膜結合型 FasL 発現ブタ膵島では $5.7 \pm 1.8\%$ 、 $2.1 \pm 2.0\%$ と強く細胞傷害性を制御できた(図6)。

4) decoy Fas 及び膜結合型 FasL 発現ブタ細胞グラフトの生着延長効果

ラット腎被膜下に移植した parental PEC および parental pig islets グラフトでは、移植後 3 日目までは生着しグラフトの存在を確認できたが、移植後 5 日目には完全に拒絶されていた。一方、decoy Fas、膜結合型 FasL 発現ブタ細胞、ブタ膵島では、移植後 5 日目でもグラフトの残存を確認でき、ブタ膵島グラフトではインスリン染色陽性の膵島グラフトの残存も確認できた。これらの遺伝子導入ブタ細胞グラフトは移植後 7 日目まで生着の延長効果を認め、移植後 9~10 日目には拒絶された(図7)。

4. 考察

$\alpha 1,3$ ガラクトース転移酵素遺伝子ノックアウトブタ誕生は、異種移植の臨床応用を可能にする大きなブレイクスルーであり、ブタ異種グラフト生着の最大のハードルとされてきた”超急性拒絶反応をほぼ克服したと言える。しかし、ブタ異種グラフトの長期 bridge use さらには permanent use を達成するためにはブタ異種グラフトに対する delayed rejection, chronic rejection のメカニズムの解明と、その制御法を開発する必要がある。

今回の研究では、レシピエントであるヒトのリンパ球は、刺激細胞 PEC とヒト IL-2 を用いた *in vitro* 混合培養により高度細胞傷害性を持った CD8⁺ CTL へと誘導され、その細胞傷害活性は主に Fas/FasL pathway を介して発揮されることを示し (図 2, B)、細胞性免疫制御の重要性を示唆した。

このヒト CD8⁺ CTL 細胞傷害性をブタ細胞表面レベルで特異的に制御する方法として、我々は 1, ブタ異種細胞上に細胞質内 death domain を持たないヒト decoy Fas 分子を過剰発現させブタの endogenous Fas とヒト CD8⁺ CTL 上の FasL との会合を競合阻害することによって異種細胞を保護する、2, ブタ異種細胞上に shedding を受けない膜結合型ヒト FasL 分子を発現させ攻撃してきたヒト CD8⁺ CTL を迎撃する 2 つのストラテジーを提唱し (図 8)、その有効性を解析した。ブタ血管内皮細胞を用いた傷害アッセイでは、ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 両分子共に CD8⁺ CTL 細胞傷害性に対し強い抑制効果を持っていることを示した。さらに、アデノウイルスを用いてこれらの分子を実際にブタ膵島に発現させたところ、強い細胞傷害性抑制効果を確認した。また、ラット腎被膜下への *in vivo* 移植実験でも decoy Fas、膜結合型ヒト FasL を発現したブタ血管内皮細胞グラフト、ブタ膵島グラフト共に生着期間の延長を確認した。

6. 結論

ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 過剰発現によるブタ細胞表面のデスレセプター、デスリガンドのリモデリングは、ブタ異種細胞および膵島グラフトに対するヒト CD8⁺ CTL 細胞傷害性から回避できる。すなわち、ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 遺伝子を用いた transgenic pig 作出は、

臨床応用可能な移植用ブタ膵島開発のストラテジーとなりうる。

7. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanemura M, Kawamoto K, Ito T, et al. *In vitro* and *in vivo* prevention of human CD8⁺ CTL-mediated xenocytotoxicity by pig c-FLIP expression in porcine endothelial cells. *Am J Transplant* 8;288-97 (2008)

2) Tanemura M, Kawamoto K, Ito T, et al. Pig cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIP) overexpression in pig xenograft cells induces resistance to human CD8⁺ CTL-mediated xenocytotoxicity. *Transplant Proc.* (In press, 2008)

3) Kawamoto K, Tanemura M, Ito T, et al. Adenoviral-mediated overexpression of either membrane-bound human FasL or human decoy Fas can prolong pig islet xenograft survival in rat transplant model. *Transplant Proc.* (In press, 2008)

2. 学会発表

1) 種村匡弘 I 型糖尿病に対する異種膵島移植療法の確立—レシピエント細胞性拒絶会費の免疫学的戦略—
第 107 回 日本外科学会定期学術集会 (大阪・2007)

2) 嵯峨礼美 ブタ cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) 過剰発現による細胞内シグナル伝達リモデリングを応用したヒト CD8⁺ CTL 細胞傷害性の制御
第 43 回日本移植学会総会 (仙台・2007)

3) 川本弘一 ブタ膵島長期生着にむけた免疫学的技術革新
第 43 回日本移植学会総会 (仙台・2007)

4) Tanemura M. Pig cellular FLICE-like Inhibitory Protein (c-FLIP) overexpression in pig xenograft cells induces resistance to human CD8⁺ CTL mediated xenocytotoxicity. CTS, IPITA, IXA joint Conference (Minneapolis・2007)

※図 1~8 については、別紙参照

< Figure legend >

図 1 : ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL の遺伝子構造とアデノウイルスベクターの構築

図 1, A : ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL の遺伝子構造

wild type human Fas antigen は全長 319 アミノ酸からなり、細胞外ドメインは 157 アミノ酸、細胞質内ドメインは 145 アミノ酸から構成されている。細胞外ドメインはさらに 3 つのシステイン rich subdomain に分割される。細胞質内ドメインには 68 アミノ酸からなる death domain を含んでおり、Fas/FasL 結合によりアポトーシス誘導シグナルを伝達する。decoy Fas では細胞質内の 234-319 アミノ酸が delete され、例え FasL がこの decoy Fas に結合したとしても death domain をもっていないためアポトーシスシグナルを伝達することはできない。wild type human FasL は 281 アミノ酸からなる II 型膜蛋白である。FasL は TNF ファミリーに属する death ligand で標的細胞上の Fas antigen と結合することでアポトーシスを誘導する。膜結合型ヒト FasL では metalloproteinase cleavage site である 111-133 アミノ酸を欠損させることで、soluble form FasL になることを阻止し、膜結合型蛋白として発現する。

図 1, B : ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL の cDNA を含んだ adenovirus vector の構築

cytomegalovirus promoter を含んだ adenovirus-based cosmid vector (Ad-), pAxcwit (Takara Bio, Otsu, Japan) の Swal cloning site に、ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL の open reading frame を含んだ expression unit を挿入し発現ベクターを構築した。ヒト decoy Fas には EGFP を、膜結合型ヒト FasL には DsRed を expression unit の上流に挿入し、目的分子の発現と同時にそれぞれの蛍光を発色するようにした。

図 2 : ブロッキングアッセイとヒト CD8⁺ CTL によるブタ異種細胞に対する細胞傷害性メカニズム

図 2, A : Concanamycin A、抗 FasL 抗体によるブロッキングアッセイ

Concanamycin A Perforin/Granzyme 系の傷害性をブロックするために ATPase inhibitor である Concanamycin A を用いて傷害アッセイを行った。Concanamycin A の前処置濃度は 5 nM (□), 10 nM (△), 20 nM (◇) で行った。Concanamycin A 前処置により約 30% の傷害性を抑制できたが大部分の CTL 傷害性は残存した。また Concanamycin A の濃度に相関しなかった。Fas/FasL 系をブロックするために anti-human FasL mAb (4H9, MBL, Nagoya, Japan) を用いて傷害アッセイを行った。抗 FasL 抗体の前処置濃度は 5 μg/ml (■), 10 μg/ml (◆) で行った。抗 FasL 抗体により CTL 傷害性は約 80% 抑制された。さらに Concanamycin A と抗 FasL 抗体両者を用いたダブルブロッキングでは CTL 傷害性はほぼ 100% 抑制された (◎)。

図 2, B : ヒト CD8⁺ CTL は perforin/granzyme 系及び Fas/FasL 系の 2 経路を介して標的細胞を傷害する。Concanamycin A、抗 FasL 抗体によるブロッキングアッセイの結果よりブタ異種細胞に対しては主に Fas/FasL 系を介して細胞傷害性を発揮することが示唆された。

図 3 : ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL の遺伝子導入ブタ血管内細胞株の樹立

decoy Fas 導入 PEC では低・中・高発現の 3 クローンを樹立した。膜結合型 FasL 導入 PEC では中・高発現の 2 クローンを樹立した。

図 4: ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL の遺伝子導入ブタ血管内細胞株における傷害性抑制効果

図 4, A: ヒト decoy Fas 遺伝子導入ブタ血管内細胞株における傷害性抑制効果

ヒト CD8⁺ CTL の parental PEC に対する細胞傷害性は E/T 比 50:1 で 80%を超える強い細胞傷害性を発揮した。ヒト decoy Fas transfectants では decoy Fas の発現量に比例して細胞傷害性を強く抑制でき、ヒト decoy Fas 高発現株では約 65~70%傷害性を抑制した。低発現クローン (□)、中発現クローン (△)、高発現クローン (○)。

図 4, B: 膜結合型ヒト FasL の遺伝子導入ブタ血管内細胞株における傷害性抑制効果

膜結合型 FasL-PEC transfectants においても、細胞傷害性は膜結合型 FasL 発現量に比例して強く抑制でき、特に高発現クローン membrane-2 では、すべての E/T ratio において 70%以上安定した抑制効果を示した。中発現クローン (△)、高発現クローン (○)。

図 5: アデノウイルスベクターを用いたブタ臍島へのヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL の遺伝子導入

アデノウイルスベクターの multiplicity of infection (MOI)に比例して、ブタ臍島にそれぞれの目的分子の発現マーカーである EGFP、DsRed の蛍光の増強を認め、ブタ臍島上に decoy Fas 及び膜結合型 FasL の発現を確認した。FACS による発現解析では、100 MOI のアデノウイルスの感染により decoy Fas 発現ブタ臍島で 81.4%の臍島に、膜結合型 FasL 発現ブタ臍島で 79.3%の臍島にそれぞれの分子発現を認めた。

図 6: ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 発現ブタ臍島における傷害性抑制効果

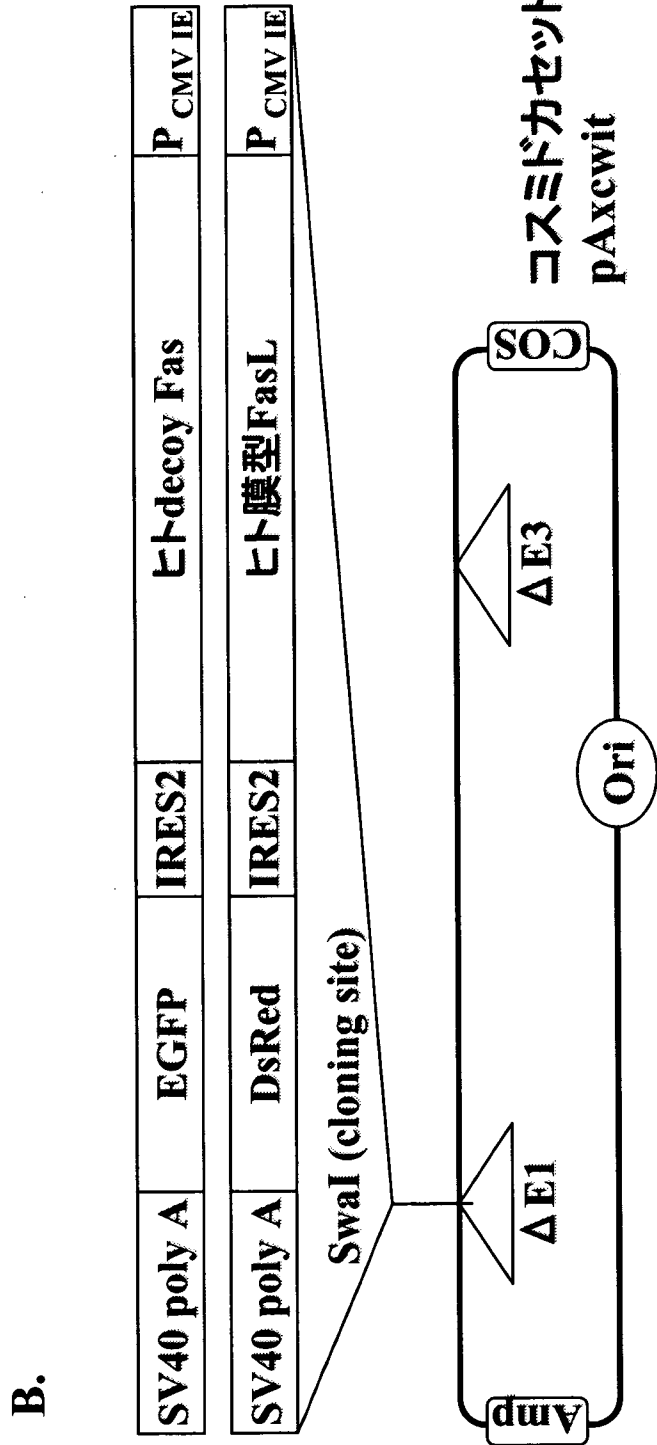
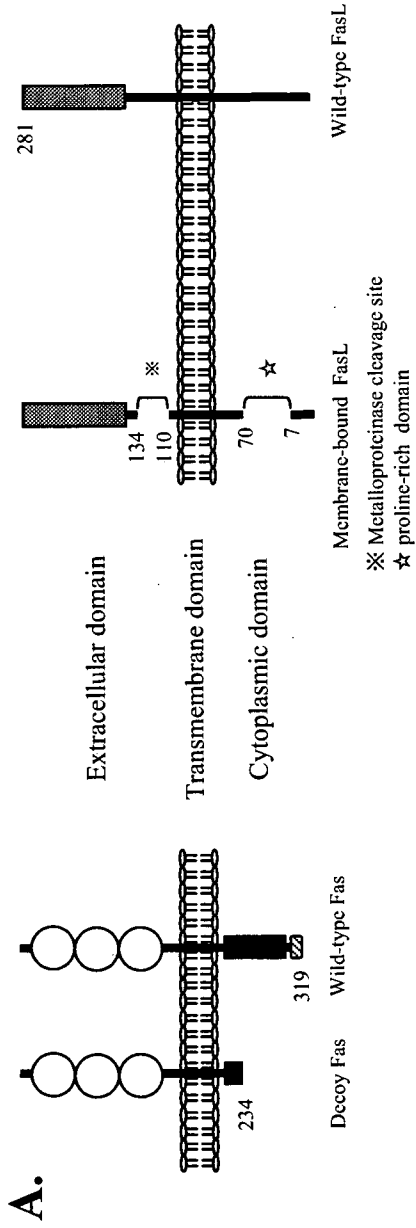
E/T 比 50:1 で parental pig islets に対しヒト CD8⁺ CTL は 37%の傷害性を発揮し、MOCK islets である EGFP transfected pig islets では E/T 比 50:1 で約 50%の傷害性を発揮した。decoy Fas 発現ブタ臍島に対する傷害性は 18.8±1.0%、8.7±3.5%にまで抑制され、膜結合型 FasL 発現ブタ臍島では 5.7±1.8%、2.1±2.0%と強く細胞傷害性を制御できた。

図 7: ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 遺伝子導入ブタ血管内細胞株の生着延長効果

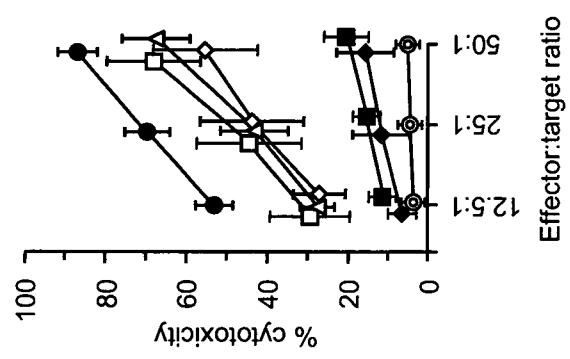
ラット腎被膜下に移植した parental PEC グラフトでは移植後 3 日までは生着しグラフトの存在を確認できたが、移植後 5 日目には完全に拒絶されていた。decoy Fas、膜結合型 FasL 発現ブタ細胞では、移植後 5 日目でもグラフトの残存を確認できた。

図 8: ヒト CD8⁺ CTL によるブタ異種細胞細胞傷害性回避の新しいストラテジー

ヒト CD8⁺ CTL は perforin/granzyme 系及び Fas/FasL 系の 2 経路を介して標的細胞を直接傷害する。ブタ異種細胞に対しては主に Fas/FasL 系を介して細胞傷害性を発揮する。ヒト decoy Fas または膜結合型ヒト FasL の 2 つの新しい細胞傷害抑制分子をブタ異種細胞上に発現させ、ヒト CD8⁺ CTL からの直接細胞傷害性を回避するストラテジーを提唱する。



A.



B.

