

- Kurokawa Y, Matsue T, **Satomi S**  
*Transplantation Proc.* 41  
(1):311-313:2009
3. The influence of brain death on tissue factor expression in the pancreatic tissues and isolated islets in rats  
Saito Y, Goto M, Maya K, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, **Satomi S**  
*Transplantation Proc.* 41  
(1):307-310:2009
4. Superiority of fresh islets compared with cultured islets  
Takahashi H, Goto M, Ogawa N, Saito Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Doi H, **Satomi S**  
*Transplantation Proc.* 41  
(1):350-351:2009
5. C5a inhibitory peptide combined with gabexate mesilate is a clinically available candidate for preventing the instant blood-mediated inflammatory reaction  
Tokodai K, Goto M, Imura T, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, Okada H, **Satomi S**  
*Transplantation Proc.* 41  
(1):67-68:2009
6. ラット膵島移植モデルにおける移植前培養膵島に対する新鮮膵島の優位性の検証  
高橋英幸、後藤昌史、小川則彦、藤盛啓成、黒川良望、土井秀之、**里見進**  
移植:44 (1):82-90:2009
7. Dissecting the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet xenotransplantation.  
Goto M, Tjernberg J, Dufrane D, Elgue G, Brandhorst D, Ekdahl KN, Brandhorst H, Wennberg L, Kurokawa Y, **Satomi S**, Lambris JD, Gianello P, Korsgren O, Nilsson B  
*Xenotransplantation*  
15(4):225-234:2008
8. Optimization of a Prominent Oxygen-Permeable Device for Pancreatic Islets  
Goto M, Yoshikawa Y, Matsuo K, Shirasu A, Ogawa N, Takahashi H, Saitoh Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Tamai M, **Satomi S**  
*Transplantation Proc.*  
40(2):411-412:2008
9. Influence of a current style of culture on the quality of isolated pancreatic islets  
Takahashi H, Goto M, Ogawa N, Saitoh Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Doi H, **Satomi S**  
*Transplantation Proc.* 40(2):  
358-359: 2008
2. 学会発表
- (1) The impact of ischemic stress on the quality of isolated pancreatic islets  
Masafumi Goto, Takehiro Imura, Akiko Inagaki, Norihiko Ogawa,

- Hideyuki Yamaya, Keisei Fujimori, Yoshimochi Kurokawa, **Susumu Satomi**  
2009 International Pancreas and Islet Transplant Association, 2009, Oct 12-16, Venice
- (2) A STRONG CANDIDATE APPROACH TO PREVENT THE INSTANT BLOOD-MEDIATED INFLAMMATORY REACTION IN CLINICAL ISLET TRANSPLANTATION  
Kazuaki Tokodai, Masafumi Goto, Akiko Inagaki, Wataru Nakanishi, Noriko Okada, Hidechika Okada, **Susumu Satomi**  
2009 International Pancreas and Islet Transplant Association, 2009, Oct 12-16, Venice
- (3) C5a を標的とした補体阻害ペプチド AcPepA 導入による移植後早期膵島障害の抑制  
戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中西 渉、岡田則子、岡田秀親、**里見 進**  
第 46 回補体シンポジウム、2009, Aug 21-22、福岡
- (4) 臓器の阻血障害が膵島分離へ及ぼす影響に関する検討  
後藤昌史、猪村武弘、稲垣明子、小川則彦、山谷英之、Feng Qiang 藤盛啓成、黒川良望、**里見 進**  
第 45 回日本移植学会、2009, Sep 16-18、東京
- (5) C5a を標的とした補体阻害ペプチド 導入による移植後早期膵島障害の抑制  
戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、岡田則子、岡田秀親、**里見 進**  
第 45 回日本移植学会、2009, Sep 16-18、東京
- (6) 臨床再開へ向けた膵島分離用酵素剤の比較検討  
後藤昌史、山形洋平、渡邊君子、村山和隆、猪村武弘、稲垣明子、山谷英之、小川則彦、藤盛啓成、黒川良望、**里見 進**  
第 37 回膵膵島移植研究会、2010, Mar 12-14、宇都宮
- (7) 膵島分離用酵素剤の活性評価システムの構築  
後藤昌史、山形洋平、國定孝夫、間塚風介、矢内耕二、永里敏秋、渡邊君子、村山和隆、猪村武弘、藤盛啓成、黒川良望、**里見 進**  
第 37 回膵膵島移植研究会、2010, Mar 12-14、宇都宮
- (8) 長期冷保存を伴う膵島移植を対象

- とした臓器保存溶液に関する検討  
猪村武弘、後藤昌史、藤盛啓成、  
黒川良望、里見 進  
第 37 回膵膵島移植研究会、  
2010, Mar 12-14、宇都宮
- (9) 移植後早期膵島障害の抑制を目的とした新規プロトコールの有効性の評価および作用機序の解明  
戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中西 渉、岡田則子、岡田秀親、里見 進  
第 37 回膵膵島移植研究会、2010, Mar 12-14、宇都宮
- (10) 細胞シートによる膵島の新規移植方法の検討  
稲垣明子、後藤昌史、小林英司、大橋一夫、里見 進  
第 9 回日本再生医療学会、2010, March 18-19、広島
- (11) 膵島移植におけるトランスレーショナルリサーチ  
後藤昌史、里見 進 (依頼講演)  
第 4 回臓器保護と治療研究会、2010, Apr 8、仙台
- (12) C5a を標的とした補体阻害ペプチド AcPepA 導入による移植後早期膵島障害の制御  
第 43 回補体シンポジウム・2008,
- 7 月 10-12 日 札幌
- (13) A NOVEL PREDICTIVE METHOD FOR ASSESING THE QUALITY OF ISOLATED PANCREATIC ISLETS USING A SCANNING ELECTROCHEMICAL MICROSCOPY  
XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008, Aug 10-14 Sydney
- (14) Predictive methods for assessing the quality of isolated pancreatic islets  
XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008, Aug 10-14 Sydney, *invited speaker*
- (15) THE INFLUENCE OF BRAIN DEATH ON TISSUE FACTOR EXPRESSION IN THE PANCREATIC TISSUES AND ISOLATED ISLETS IN RATS  
XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008, Aug 10-14 Sydney
- (16) C5A INHIBITORY PEPTIDE COMBINED WITH GABEXATE MESILATE IS A CLINICALLY AVAILABLE CANDIDATE FOR PREVENTING THE INSTANT BLOOD-MEDIATED INFLAMMATORY

- REACTION  
XXII International Congress Of  
The Transplantation Society,  
2008, Aug 10-14 Sydney
- (17) C5a inhibitory peptide AcPepA  
is a clinically available  
candidate for preventing rapid  
loss of intraportally  
transplanted islets  
XXII International Complement  
Workshop, 2008, Sep 28-Oct 2  
Basel (Switzerland)
- (18) 有用な膵島評価法である呼吸活性  
計測法の実際  
第44回日本移植学会・2008,  
9月19-21日 大阪
- (19) 東北大学における膵島移植の取  
り組み  
第44回日本移植学会・2008,  
9月19-21日 大阪
- (20) 補体阻害ペプチド導入による移植  
後早期膵島障害の制御  
第44回日本移植学会・2008,  
9月19-21日 大阪
- (21) 脳死状態が膵島の Tissue Factor  
発現へ及ぼす影響に関する検討  
第44回日本移植学会・2008,
- 9月19-21日 大阪
- (22) Key issues in islet  
xenotransplantation  
4th Xenotransplantation Seoul  
Forum, 2008, Nov 8 Seoul  
*invited speaker*
- (23) Improvement of preservation and  
evaluation for pancreatic  
islets by introducing  
bioengineering approach  
第35回日本低温医学会総会,  
2008, Nov 22-23 Tokyo  
*invited speaker*
- (24) 脳死状態が膵島の炎症性メディエ  
ーター発現へ及ぼす影響  
第35回日本臓器保存生物医学会  
定期学術集会・2008, 11月22-23  
日 東京
- (25) 膵島移植の現在と未来  
第8回東北小児糖尿病研究会・  
2008, 11月29日 仙台  
**招待講演**
- (26) 今後の膵島移植発展への試み  
第36回膵膵島移植研究会・2009,  
2月27-28日 福岡  
**シンポジウム講演**

- |   |   |
|---|---|
| <p>(27) 長期保存を要する心停止ドナーからの膵島分離への対策<br/>第 36 回膵膵島移植研究会・2009,<br/>2 月 27-28 日 福岡</p>                               | <p>G. 知的財産権の出願・登録状況</p> <p>1. 特許取得<br/>なし</p> |
| <p>(28) 凝固・補体系の制御による移植後早期膵島障害の抑制<br/>第 36 回膵膵島移植研究会・2009,<br/>2 月 27-28 日 福岡</p>                                | <p>2. 実用新案登録<br/>なし</p> <p>3. その他<br/>なし</p>  |
| <p>(29) 膵島移植の現状と今後の展望<br/>第 8 回日本再生医療学会・2009,<br/>3 月 5-6 日 東京<br/><b>シンポジウム依頼講演</b></p>                        |   |
| <p>(30) 異種膵島移植実現へ向けたブタ膵島の大量安定供給と品質評価システムの構築<br/>第 12 回日本異種移植研究会・<br/>2009, 3 月 7 日 鹿児島<br/><b>ワークショップ講演</b></p> |   |

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立：  
移植後膵島障害の制御法開発

研究分担者 安波洋一 福岡大学医学部教授

### 研究要旨

臨床膵島移植で克服すべき最も重要な課題は一人の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ことが上げられ、この解決策を見出せば臨床膵島移植のブレイクスルーとなる。本研究ではこの課題が膵島移植後早期の生着に伴う自然免疫拒絶反応による移植膵島喪失に起因していると想定した。研究成果として、肝内移植後早期に発現する自然免疫拒絶反応の機序の全貌ならびに新規制御法を見出した。本研究成果の臨床導入により臨床膵島移植の成績向上が期待できる。

### A. 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。

### B. 研究方法

- ① 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。
- ② 門脈内移植膵島の生着に関連した早期膵島障害を解析し、候補薬剤の有用性を検討した。
- ③ 新たに解明した移植後早期膵島障害の全貌下明らかにしその成果を基盤に、制御法を開発する。

(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。

### C. 研究結果

- ① 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。

② 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。

③ 移植早期膵島障害に関し、HMGB1の関与を解析し以下の知見を得た。

・抗HMGB1抗体投与により早期移植膵島障害が制御でき、糖尿病マウスの血糖は正常化した。

・HMGB1が膵島核内に豊富に存在し、移植後に移植膵島の細胞質から細胞外へ放出された。

・膵島移植の代わりにHMGB1を投与すると膵島移植後と同様に肝内浸潤細胞、特にNKT細胞、好中球のIFN- $\gamma$ 産生が増強した。

・HMGB1の直接作用をin vitroで検索した。HMGB1はCD40-CD40Lを介して肝内樹状細胞、好中球に直接作用し、IL-12を産生した。

・IL-12はNKT細胞を活性化し、INF-g産生を増強、その作用により好中球はIFN- $\gamma$ を産生した。

・抗IL-12, 抗CD40L抗体投与により移植膵島障害は制御できた。

・移植膵島障害を有するHMGB1の受容体はTLR-2ならびにRAGEであることが判明した。

④ マウス単離膵島を用いた低酸素下培養の in vitro 実験、ならびにマウス膵島移植の in vivo 実験で以下の知見を得た。

・単離膵島を低酸素ガス(1%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>+94%N<sub>2</sub>)で満たされたチャンバーで培養(37°C)すると6時間で軽度の中心壊死が発現し、12時間ではさらに進行し単離培養膵島の辺縁を残して中心部はすべて壊死に陥った。細胞死の評価はPI染色で行い、ホルマリン固定標本のパラフィン切片のHE、インスリン、タネル染色で確認した。

・単離膵島の低酸素下培養時の培養液中HMGB1ならびにインスリン濃度を測定した。培地中インスリン濃度は6時間では対照群と変わらず、12時間で有意に上昇した。培地中HMGB1濃度は培養6時間で有意に上昇、12時間ではさらに高値を示した。

・臨床で既に使用されている薬剤としてPPAR $\gamma$ アゴニスト(pioglitazon, アクトス)の効果を検討した。その結果、in vitro において pioglitazon が低酸素下培養膵島細胞障害を軽減する効果を有することが明らかになった。また、in vivo マウス膵島移植実験でドナー膵島を移植前3時間のみ pioglitazon 存在下で培養後に移植すると移植早期膵島障害が制御できることが判明した。

#### D. 評価

##### 1) 達成度について

HMGB1を介した移植早期に発現する移植膵島の自然免疫拒絶反応のメカニズム、ならびにその制御法を明らかにすることができ、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

に画期的成果をもたらすことが期待できる。

#### 3) 今後の展望

本研究で明らかになった移植早期膵島障害の全貌、ならびにその制御法に関する新規知見の臨床導入により、臨床膵島移植成績の向上が期待できる。

#### E. 結論

現在の臨床膵島移植では一人のレシピエントの治療に2-3人のドナーを必要としていることが上げられ、この課題の克服が最も重要な課題となっている。本研究ではブレイクスルーとなる知見を見出し、今後の臨床応用での成果が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 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  $\alpha$ -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
- ④ T Nitta, T Itoh, N Matsuoka, T Mera, D Kojima, M Nakano, Y Yamashita, Y Yasunami. Prevention of early loss of transplanted islets in the liver of mice by adenosine. *Transplantation* 88(1):49-56,

2009

- ⑤ Nobuhide Matsuoka, Takeshi Itoh, Hiroshi Watarai, Etsuko Sekine-Kondo, Naoki Nagata, Kohji Okamoto, Toshiyuki Mera, Hiroshi Yamamoto, Shingo Yamada, Ikuro Maruyama, Masaru Taniguchi, and Yohichi Yasunami. High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets. JCI 120(3): 735-743, 2010
- ⑥ 安波洋一。NKT細胞の新展開； 膵島移植拒絶反応とNKT細胞。医学のあゆみ 225(2): 151-155, 2008

## 2. 学会発表 国際学会

- ① Nobuhide Matsuoka, Takeshi Itoh, Tomoyuki Nitta, Masahiko Nakano, Keizo Anzai, Junko Ono, Yohichi Yuichi Yamashita, Masaru Taniguchi, Yohichi Yasunami. Timing of the Second Grafts is Crucial in Sequential Islet Transplantations to Prevent Early Loss of Islets in the Liver of Mice in Relation to Induction of Hypo-responsiveness of NKT Cells. 67th Scientific Sessions of American Diabetes Association. June 22-26, 2007. Chicago, USA.
- ② Takeshi Itoh, Nobuhide Matsuoka, Tomoyuki Nitta, Masahiko Nakano, Toshiyuki Mera, Yuichi Yamashita, Junko Ono, Yohichi Yasunami. Successful islet transplantation from one donor to one recipient by targeting IL-6 / IL-6 receptor signaling in mice. Joint Conference of Cell Transplantation Society, International Pancreas and Islet transplant Association and Xenotransplantation Association
- ③ T Nitta, N Matsuoka, T Itoh, T Mera, A Kinjo, M Nakano, Y Yamashita, Y Yasunami. Adenosine has an inhibitory effect on NKT cells facilitating to

prevent early loss of transplanted islets in association with engraftments. X XII International Congress of the Transplantation Society (Transplantation 86(2S):447,2008), August 10-14, 2008, Sydney, Australia

- ④ T Itoh, R Nakagawa, N Matsuoka, N Nagata, T Nitta, T Mera, Y Yamashita, K Okamoto, H Yamamoto, S Yamada, I Maruyama, M Taniguchi, Y Yasunami. A novel mechanism involved in early loss of transplanted islets in the liver mediated by HMGB1. 69th Scientific Sessions of American Diabetes Association. New Orleans, USA, June 5-9, 2009.

## 国内学会

- ① 金城亜哉、岩田誠司、中野昌彦、松岡信秀、伊東 威、新田智之、米良利之、塚本美保、安波洋一。膵島提供時の『I.C一括化』を実現した活動の紹介。第6回日本組織移植学会総会・学術集会。2007年8月4日、大阪。
- ② 金城亜哉、岩田誠司、塚本美保、中野昌彦、安波洋一。臓器提供と組織提供のI.Cを一括して行うための体制整備について。第43回日本移植学会総会。2007年11/22-24、仙台。
- ③ 安波 洋一。今後の展望、膵臓移植vs膵島移植膵島移植の今後の展開。第35回膵・膵島移植研究会。2008年3月7-8日、京都。
- ④ 新田智之、松岡信秀、伊東威、米良利之、中野昌彦、金城亜哉、安西慶三、安波洋一。アデノシンによるNKT細胞、Gr-1+CD11b+細胞を介した移植早期膵島障害の制御。第35回膵・膵島移植研究会。2008年3月7-8日、京都。
- ⑤ 新田智之、松岡信秀、伊東威、米良利之、中野昌彦、山下裕一、安波洋一。アデノシンによるNKT細胞、Gr-1+CD11b+細胞を介した移植早期膵島障害の制御。第108回日本外科学会定期学術集会。2008年5月16日、長崎。



⑥ 新田智之、伊東威、米良利之、小島大望、中野昌彦、松岡信秀、金城亜哉、山下裕一、安波洋一。移植早期膵島障害に対するアデノシンの効果 - one donor - one recipient の実現に向けて。第7回日本組織移植学会総会・学術集会。2008年8月26日、札幌。

⑦ 伊東 威、新田智之、米良利之、小島大望、松岡信秀、中野昌彦、金城亜哉、山下裕一、安波洋一。移植膵島からHMGB1が放出され早期グラフト障害を惹起する。第36回膵・膵島移植研究会。2009年2/27-28, 福岡。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

① 名称: Inhibition of transplanted islet dysfunction in islet transplantation

発明者: 安波洋一  
権利者: 福岡大学  
種類: 特許権  
番号: 2005-300489  
出願年月日: H17.10.14  
国内外の別: 国内

② 名称: 抗HMGB1抗体を含む臓器移植拒絶抑制剤

発明者: 安波洋一  
権利者: 福岡大学  
種類: 特許権  
番号: 2007-034280  
出願年月日: H19.2.15  
国内外の別: 国内

総合研究報告書

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立

アポトーシスシグナルブロッキングによる移植膵島の生着延長効果と  
膵島組織におけるオートファジー様細胞死の意義と分子機構の解析

伊藤 壽記 大阪大学大学院医学系研究科 生体機能補完医学講座 教授

研究要旨：平成19年度では、移植膵島生着延長に向けた免疫学的修飾について研究を行った。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<sup>+</sup> CTL は同種・異種を含めた移植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、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 という新しい傷害制御分子を膵島に過剰発現させることで、膵島に対するヒト CD8<sup>+</sup> CTL 細胞傷害性を制御できることを示した。平成20年度では、膵島移植における遠隔成績向上に向けた研究を行い、オートファジー様細胞死と移植膵島の機能傷害との関連を解析した。ラパマイシンは、膵島移植後に用いられる免疫抑制療法・エドモントンプロトコール(Edmonton protocol)の中心的な免疫抑制剤であり、その薬理作用は mammalian target of rapamycin (mTOR) を阻害することにより、細胞周期を止め細胞増殖を抑制することである。mTOR 阻害剤は各種の細胞でオートファジーを誘導することが報告されている。本研究では 1 ng/ml または 10 ng/ml のラパマイシン濃度でマウス膵島を処理し、その結果、in vitro において膵島組織にオートファジーが誘導されることを確認し、膵島の viability も低下させることを確認した。さらに、膵島のインスリン分泌能も 10 ng/ml ラパマイシン処理ではインスリン分泌はほぼ完全に抑制されることを示した。一方、オートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) で追加処理することによりオートファジー誘導は回避され、膵島 viability さらに膵島インスリン分泌能も有意に改善させることができた。平成21年度では、マウスモデルを用いて in vivo においても移植膵島にオートファジーが誘導されるか否かを解析した。ラパマイシン、0.2 mg/kg、ip にて LC3-GFP transgenic mice を 1 週、2 週、3 週間処理し生体内での膵島オートファジー誘導を解析した。その結果、ラパマイシン 1 週間処理では膵島にオートファジーの誘導は認められなかったが、2 週間を超えるラパマイシン処理では、実際に in vivo においても膵島に LC3-GFP dot の集積を認めオートファジーの誘導が確認された。しかし、この in vivo での誘導はオートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) を 10 mM で同時投与することにより、LC3-GFP dot の膵島内蓄積は著明に抑制されオートファジー誘導は阻止された。平成20年度でのわれわれの in vitro での研究成果において、ラパマイシン処理による膵島へのオートファジー誘導は膵島の viability を低下させ、さらに膵島インスリン分泌能を有意に抑制することを考慮すると、膵島移植での遠隔成績不良の原因の一つとして、移植後投与されるラパマイシンの毒性によることが示唆され、その傷害メカニズムは移植膵島におけるオートファジー誘導が主たる要因ではないかと考えられた。

A. 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。

平成19年度では、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。ブタ膵島では、超急性拒絶反応の原因である異種糖鎖抗原  $\alpha$ -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( $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase knock out mouse)を用いたわれわれの研究により、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<sup>+</sup> 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、異種、同種を含めた膵島グラフトを 1 型糖尿病患者に移植、長期生着させるためには、レシピエント由来の CD8<sup>+</sup> CTL による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<sup>+</sup> CTL による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。

平成20年度では、膵島移植における遠隔成績不良の間

題解決が膵島移植発展の急務と考え研究を行った。移植膵島の長期生着不良の原因として primary non-function、や免疫学的機序(拒絶反応)によるところが指摘されているが、世界中の90%以上の膵島移植患者に使われているラパマイシンの薬物毒性による移植膵島の傷害も指摘されている。mTOR 阻害剤であるラパマイシンが哺乳類細胞にオートファジーを誘導することは報告されているが、オートファジー自身の生体内における生理機能は十分に明らかにされておらず、また疾患との関係も現在、解明途上である。もちろん、膵島組織とオートファジーとの関連性はこれまで報告はなく、オートファジーの誘導が膵島の機能や viability、ひいては品質管理にどのように作用するかは全く不明である。平成20年度では、ラパマイシンを用いて膵島にオートファジーが誘導されるのか、さらに誘導後、膵島の生物学的機能・活性はどのように変化するのかを解析した。

引き続き平成21年度では、実際に生体内(in vivo)においてもラパマイシン投与により移植膵島にオートファジーが誘導されるか否かを詳細に解析した。

## B. 研究方法

### 平成19年度での免疫修飾について

#### 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<sup>+</sup> CTL の直接細胞傷害性試験の標的細胞とした。また、slaughter house にて体重 y 約 300 kg 大のブタ(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<sup>+</sup> CTL の誘導

健康人末梢血より Histopaque-1077(Sigma-Aldrich)を用いた遠心分離法により PBMC を採取し、放射線照射(50 Gy)した PEC を stimulator cell とし 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> CTL のみ positive selection シアッセイに用いた。

#### 3, 細胞傷害性試験

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、<sup>51</sup>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 の細胞傷害性抑制試験も行った。

#### 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 $\alpha$  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 を受けない膜結合型 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の解析を行った。

#### 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 の発現を 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 x 10<sup>6</sup> 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。

### 平成20年度でのオートファジー様細胞死の意義と分子機構の解析について

#### 1, Isolation of pancreatic islets

B6 mice の膵島を本研究の解析に用いた。マウスを全身麻酔下にて開腹し、総胆管からカニューレーションの上、

1 mg/ml の collagenase を含んだ ET-Kyoto 液を 3 ml 注入しマウス膵臓を十分に膨化し摘出し、摘出膵臓をさらに collagenase VIII で消化した。引き続き、膵消化液より Ficoll 非連続勾配法で膵島の分離・純化を行った。分離膵島は complete RPMI-1640 culture medium にて培養した。

## 2, Western blot analysis

オートファジー誘導のマーカーである LC3-II タンパク (LC3-phospholylated conjugate) の細胞内蓄積を確認するために Western blot を行い解析した。Fresh mice islets (30 islets/well) を 1 または 10 ng/ml の rapamycin 存在下または非存在下で 24 時間、膵島を培養し、その培養膵島より lysis buffer を用いて膵島組織由来タンパクを抽出し 15 % SDS/PAGE にて展開・分離した。泳動タンパクを PVDF membrane に転写後、anti-LC3 mAb (MBL) にて LC3-II タンパクの発現を detect した。タンパクの発現量は、それぞれの膵島 lysate 内の内因性 GAPDH 発現量も確認、LC3-II タンパクおよび内因性 GAPDH の発現量を Fluor-chem image analyzer (BioRad) にて定量化した後、LC3-II/GAPDH 比にて比較した。

## 3, Islet viability assay

Fresh mice islets (30 islets/well) を 1 または 10 ng/ml の rapamycin 存在下または非存在下で 24 時間膵島を培養し、その培養膵島の viability を colorimetric methyltetrazolium salt (MTS) Cell Titer 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (Promega) を用いて解析した。膵島の viability は MTS assay を用いて 490 nm 吸光度にて計測し、ラパマイシン処理していない膵島の viability を 100 (control) とし、ラパマイシン処理した膵島の viability を % absorbance として計算し比較検討した。

## 4, Blocking assay of autophagic signaling

Rapamycin 処理と同時にオートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) (10 mM の 3-MA 存在下または非存在下で培養) を用いてマウス膵島を 24 時間培養し、Western blot、MTS assay、static glucose challenge assay を行い LC3-II タンパクの蓄積、islet viability、インスリン分泌がどのように変化するか解析した。

## 5, Glucose-stimulated insulin release and stimulation index

膵島へのオートファジー誘導が、インスリン分泌にどう

のように影響するかを解析した。ラパマイシン処理またはラパマイシン+3-MA 処理した膵島を 2.8-mM (低血糖) または 20-mM glucose (高血糖) を含んだ培養液中にさらに 2 時間培養した。培養液中に分泌されたインスリンを ELISA を用いて定量化し、高血糖培養液中のインスリン量と低血糖培養液中のインスリン量の比 (stimulation Index: SI) を算出し比較検討した。

## 平成 21 年度での in vivo モデルを用いたオートファジー誘導の有無について

### 1, Mice and isolation of pancreatic islets

GFP-LC3 transgenic mice を理研バイオリソースセンター (RBRC00806) より購入し in vitro, in vivo でのオートファジー誘導を解析した。マウスを全身麻酔下にて開腹し、総胆管からカニキュレーションの上、1 mg/ml の collagenase を含んだ ET-Kyoto 液を 3 ml 注入し、膵臓を十分に膨化し摘出し、摘出膵臓をさらに collagenase VIII で消化した。引き続き、膵消化液より Ficoll 非連続勾配法で膵島の分離・純化を行った。分離膵島は complete RPMI-1640 culture medium にて培養した。Tg mice 由来の膵島を 1 または 10 ng/ml の rapamycin 存在下または非存在下で 24 時間培養し、蛍光顕微鏡にて膵島細胞内の LC3-GFP dot の増加と dots の形状を観察した。さらに、この GFP-LC3 transgenic mice にラパマイシンを 0.2 mg/kg/ip で 1 週、2 週、3 週間投与し、それぞれの投与期間でマウスを犠牲死させマウス膵臓を摘出、凍結切片を作成した。蛍光顕微鏡にて標本を観察し膵島および膵外分泌組織での in vivo オートファジー誘導を検討した。さらに同一連続切片のインスリン染色も行い膵島におけるインスリン顆粒の状態も観察した。

### 2, Islet viability assay

平成 20 年度では、培養膵島の viability を colorimetric methyltetrazolium salt (MTS) Cell Titer 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (Promega) を用いて解析した。平成 21 年度では、ラパマイシン処理前後で TMRE および 7-AAD を用いて膵島の viability を解析した。

### 3, Blocking assay of autophagic signaling

Rapamycin 処理と同時に、オートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) (10 mM の 3-MA 存在下または非存在下で培養) を用いてマウス膵島を 24 時間培養し、TMRE assay、7-AAD assay を行い、viability がどのように

変化するか解析した。また、GFP-LC3 transgenic mice より分離した膵島でも同様にラパマイシン処理と同時に3-MA にも処理しオートファジー誘導が阻止されるかを *in vitro* にて確認した。また、*in vivo* での解析では GFP-LC3 transgenic mice にラパマイシン 0.2 mg/kg、ip 投与と同時に 10 mM の 3-MA を腹腔内投与しオートファジー誘導の抑制を検討した。

## C. 研究結果

### 移植膵島への免疫修飾の研究結果

#### 1, ヒト CD8<sup>+</sup> CTL による細胞傷害性のメカニズム

Concanamycin A による perforin/granzyme 系の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 系の阻害では傷害性は 1/16~1/20 と強く抑制された (図 2, A)。この結果よりヒト CD8<sup>+</sup> 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に、Concanamycin A による阻害では約 20~30% 傷害性は抑制されたが、抗 FasL 抗体による阻害では約 80% 傷害性が抑制され、ヒト CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> CTL 細胞傷害性は、decoy Fas 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 の両方で 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 において、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 両分子は共に、ヒト CD8<sup>+</sup> CTL 細胞傷害性に対する抑制効果が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<sup>+</sup> 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)。細胞傷害試験では、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±3.9%、25.5±5.6% であったが、decoy Fas 発現ブタ膵島の傷害性はそれぞれ 18.8±1.0%、8.7±3.5% にまで抑制され、膜結合型 FasL 発現ブタ膵島ではそれぞれ 5.7±1.8%、2.1±2.0% と強く細胞傷害性を抑制できた (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 グラフトにおいて、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)。

### 膵島組織におけるオートファジー様細胞死の意義と分子機構の解析結果

#### 1, LC3-II タンパク発現量の変化

ラパマイシン処理していないコントロール膵島においても endogenous な LC3-II タンパクの発現を認め、LC3-II/GAPDH 比は 0.5 であった。しかし、ラパマイシン処理することにより LC3-II タンパクの発現は有意に増加した。1 ng/ml の rapamycin 存在下では、LC3-II タンパクの過剰発現は認められず、LC3-II/GAPDH 比も 0.46 とコントロールと差は認めなかったが、10 ng/ml の rapamycin 存在下では、LC3-II タンパクの過剰発現を認め、LC3-II/GAPDH 比でも 1.08 とほぼ 2 倍の発現量を認め、ラパマイシンによりマウス膵島にオートファジーが誘導されていることが確認できた。また、3-MA によるオートファジーブロックでは、約 32% LC3-II タンパクの発現

を抑制することができた。

## 2, 膵島 viability の変化

Western blot により LC3-II タンパクの過剰発現を認め、マウス膵島にオートファジーが誘導されているのを確認できたが、その現象が膵島の viability にどのように影響するかを MTS assay にて解析した。コントロール膵島の viability を 100 とすると、1 または 10 ng/ml の rapamycin 存在下では、それぞれ 56.8、49.0 と有意に viability は低下した。一方、3-MA によるオートファジーブロックングでは、1 ng/ml rapamycin + 10 mM 3-MA または 10 ng/ml rapamycin + 10 mM 3-MA 処理により、膵島の viability は無処理膵島の viability と比し、それぞれ 68.5%、75.8% まで回復した。

## 3, インスリン分泌能の変化

膵島にオートファジーを誘導することによりインスリン分泌能がどのように変化するかを static glucose challenge test を行い stimulation index (SI) を算出し解析した。ラパマイシン処理していないコントロール膵島の SI は 1.38 でグルコース負荷によりインスリンが膵島より分泌されているのを確認した。しかし、1 ng/ml rapamycin 処理により SI は 1.17 まで低下し、10 ng/ml rapamycin 処理では、SI は 1.11 まで低下しインスリン分泌はほぼ完全に抑制された。しかし、3-MA によるオートファジーブロックングにより SI はそれぞれ 1.48、1.32 まで回復した。

### in vivo モデルを用いたオートファジー誘導の研究結果

#### 1, GFP-LC3 transgenic mice を用いた in vitro でのオートファジー誘導

ラパマイシン処理していないコントロール膵島においては endogenous な蛍光のみ観察でき、膵島細胞全体にびまん性に蛍光が観察された。しかし、ラパマイシン処理することにより膵島組織内に GFP-LC3 dots の蓄積が観察され、その dots は cup-shape 様に集属しオートファジーの誘導を肉眼的に確認できた。また、3-MA によるオートファジーブロックングでは、cup-shape 様に集属していた GFP dots は消失しコントロール膵島と同じく diffuse な蛍光を観察するのみとなり、オートファジー誘導を抑制することができた。

## 2, 膵島 viability の変化

GFP-LC3 transgenic mice を用いて、マウス膵島にオートファジーが誘導されているのを確認できたが、その現象が膵島 viability にどのように影響するかを TMRE および 7-AAD assay を用いて解析した。TMRE assay では無処置膵島および 3-MA のみ処理した膵島では約 80% が viable な膵島であったが、1 または 10 ng/ml の rapamycin 存在下ではそれぞれ 62.4%、52.1% まで viable な膵島は減少していた。一方、3-MA によるオートファジーブロックングでは、1 ng/ml rapamycin + 10 mM 3-MA または 10 ng/ml rapamycin + 10 mM 3-MA 処理により膵島 viability は無処理膵島の viability と比し、それぞれ 80.1%、84.3% まで回復した。さらに、死細胞を detect する 7-AAD assay では、無処置膵島および 3-MA のみ処理した膵島では 3.9~4.7% が non viable islets として detect されたが、1 または 10 ng/ml の rapamycin 存在下ではそれぞれ 17.7%、18.7% まで non viable islets は増加した。しかし、3-MA によるブロックングでは 1 ng/ml rapamycin + 10 mM 3-MA または 10 ng/ml rapamycin + 10 mM 3-MA では、各々 5.0%、12.7% まで non viable islets は減少した。

#### 3, GFP-LC3 transgenic mice を用いた in vivo でのオートファジーの誘導

GFP-LC3 transgenic mice にラパマイシンを 0.2 mg/kg、ip で 1 週投与した膵臓では、膵島、膵外分泌組織ともに GFP-LC3 dots の蓄積は観察されなかった。しかし、2 週間投与群では膵島、膵外分泌組織両者に GFP-LC3 dots の蓄積が観察され、3 週間投与群でも同様に GFP-LC3 dots の蓄積が観察された。3-MA とラパマイシンの同時投与群では、2 週間、3 週間投与群ともに膵島内での GFP-dots の集積は認められず、組織内の蛍光は観察されなかった。また、膵島のインスリン染色では、オートファジーを誘導していない無処置膵島では、膵島内に均一かつ明瞭にインスリンが染色されたが、ラパマイシン処理したオートファジー誘導膵島では、インスリン染色の染色強度が現弱している所見が認められ、3-MA によるブロックングでは、コントロール膵島と同様に、明瞭にインスリンは染色された。しかし、ラパマイシン投与中のマウスの血糖値の推移を測定したが、投与前後で特に変動は認めなかった。

#### D. 考察

われわれの研究成果では、レシピエントであるヒトのリンパ球が、刺激細胞 PEC とヒト IL-2 を用いた *in vitro* 混合培養により、高度の細胞傷害性を持った CD8<sup>+</sup> 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が示唆された。

このヒト CD8<sup>+</sup> CTL 細胞傷害性を細胞表面レベルで特異的に制御する方法として、1) 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て、膵島または細胞上の endogenous Fas とヒト CD8<sup>+</sup> CTL 上の FasL との会合を競合阻害することによって細胞を保護する、2) 膵島または細胞上に shedding を受けない膜結合型ヒト FasL 分子を発現させて、攻撃してきたヒト CD8<sup>+</sup> 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。血管内皮細胞を用いた細胞傷害試験では、ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 両分子は共に CD8<sup>+</sup> CTL 細胞傷害性に対して、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 を発現した血管内皮細胞グラフト、ブタ膵島グラフトは共に生着期間の延長が認められた。

レシピエントにかかる手術侵襲の程度、移植手技の簡便さなどを考慮すると膵島移植は、より患者に優しい根治療法と言える。しかしながら、インスリン離脱 (insulin free) からみた遠隔成績では膵臓移植を凌駕するまでには至らず、今後の改善が求められる。膵島移植の遠隔成績不良の原因として勿論、移植膵島の拒絶反応が第 1 の原因と考えられるが、膵島移植で広く使われている免疫抑制剤・ラパマイシンによる膵島毒性の可能性も考えられる。われわれの研究成果により、膵島組織にオートファジーが誘導されることを確認し、それにより膵島の viability および膵島からのインスリン分泌が低下することを見出した。すなわち、ラパマイシンによるオートファジーの過剰誘導は膵島にとって悪影響を及ぼすことが示唆された。さらに 3-MA を併用することによりオートファジーの過剰誘導およびそれに伴う機能傷害は回避されることも見出した。

さらに最終年度の研究成果では、ラパマイシン投与により生体内、*in vivo* においても膵島にオートファジーが過剰誘導されることを確認できた。しかし、今回の研究ではラ

パマイシンの投与期間が 3 週間までの短期投与であったため、レシピエントの血糖値に変化を及ぼすまでには至らなかった。したがって、月単位でのラパマイシンの投与実験を行えば、オートファジーの過剰誘導による分泌インスリン量の低下に起因する高血糖化が再現できる可能性がある。また、*in vitro*、*in vivo* の研究成果により 3-MA を併用することによりオートファジーの過剰誘導およびそれに伴う機能障害は回避されることも見出しており、今後、3-MA などを用いた膵島保護のプロトコールの確立が期待される。

#### E. 結論

ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 過剰発現による膵島組織表面のデスレセプター、デスリガンドのリモデリングは、膵島グラフトに対するヒト CD8<sup>+</sup> CTL による細胞傷害性から回避でき、これらの分子のタンパク導入などにより安定した膵島の生着が期待できる。

また、ラパマイシン投与により生体内でも膵島にオートファジーが過剰誘導されることを確認し、膵島の viability、インスリン分泌を抑制する結果を得た。しかし、オートファジー阻害剤・3-MA の同時投与によりオートファジーの過剰誘導は回避され、膵島機能への悪影響も制御できた。従って、膵島移植後の遠隔成績改善に 3-MA の同時投与の有用性が期待でき、移植膵島の保護プロトコールへの展開につながると考えられた。

#### F. 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<sup>+</sup> CTL-mediated xenocyto-toxicity by pig c-FLIP expression in porcine endothelial cells. *Am J Transplant* 8; 288-97. 2008.

2、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. *Transplantation Proceedings*. 40(2); 477-9. 2008

3、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<sup>+</sup> CTL-mediated xenocytotoxicity. *Transplantation Proceedings*. 40(2); 559-63. 2008

- 4、 Kawamoto K, Tanemura M, Ito T, Doki Y, Mori M, Sawa Y, et al. Prolonged survival of pig islets xenograft by adenovirus-mediated expression of either membrane-bound human FasL or human decoy Fas antigen gene. *Xenotransplantation* 15(5); 333-343, 2008.
- 5、 Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Adenovirus-mediated gene expression of human c-FLIPL protects pig islets against human CD8+ CTL-mediated cytotoxicity. *Transplantation Proceedings*. 41 (1) 319-322, 2009
- 6、 K. Kawamoto, M. Tanemura, Y. Sawa, Y. Doki, M. Mori, T. Ito, et al. In Vivo Controlling of Cellular Response to Pig Islet Xenografts by Adenovirus-Mediated Expression of Either Membrane-Bound Human FasL or Human Decoy Fas. *Transplantation Proceedings*. 41(1); 331-333, 2009
- 7、 Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Rapamycin induces autophagy in islets : Relevance for islets transplantation. *Transplantation Proceedings*. 41 (1) 334-338, 2009
- 8、 Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M, Ito T. Intra- and extracellular remodeling effectively prevent human CD8+ CTL-mediated xenocytotoxicity by coexpression of membrane-bound human FasL and pig c-FLIPL in pig endothelial cells. *Transplantation Proceedings*. 41 (1) 391-394, 2009
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ーレシピエント細胞性拒絶会費の免疫学的戦略ー第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<sup>+</sup> 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)
- 5、種村匡弘：移植膵島でのオートファジー誘導の臨床的意義ー膵島移植後免疫抑制療法としてラパマイシンは妥当か？ー 第44回日本移植学会総会 (大阪・2008)
- 6、 Tanemura M : Intra- and extracellular remodeling effectively prevent human CD8+ CTL-mediated xenocytotoxicity by coexpression of human membrane-bound FasL and pig c-FLIPL in pig endothelial cells. 22th International congress of the transplantation society. (Sydney; 2008,8.9-14)
- 7、 Tanemura M : Adenovirus-mediated gene expression of human c-FLIPL protects pig islets against human CD8+ CTL-mediated cytotoxicity. 22th International congress of the transplantation society. (Sydney; 2008,8.9-14)
- 8、 Tanemura M : Rapamycin induces autophagy in islets : Relevance for islets transplantation. 22th International congress of the transplantation society. (Sydney; 2008,8.9-14)
- 9、 Tanemura M., Ito T., Machida T., Deguchi T., Kobayashi S., Marubashi S., Takeda Y., Nagano H., Sawa Y., Mori M., Doki Y. Rapamycin Induces Autophagy in Islets and Impairs Islet Function. *American Transplantation Congress*. (Boston; 2009, 5/30-6/2)
- 10、種村匡弘、伊藤壽記、永野浩昭、出口貴司、町田智彦、小林省吾、丸橋繁、武田裕、北川透、堂野恵三、門田守人、森正樹、土岐祐一郎 異種膵島移植療法の臨床応用に向けた先端研究 第21回 日本肝胆膵外科学会・学術集会 (名古屋 ; 2009, 6/10-12)
- 11、種村匡弘、出口貴司、町田智彦、永野浩昭、小林省吾、丸橋繁、江口英利、武田裕、塚本里加子、伊藤壽記、森正樹、土岐祐一郎 ラパマイシン毒性としての移植膵島におけるオートファジー誘導の意義 第45回 日本移植学会総会 (東京 ; 2009, 9/16-18)
- 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
- ※図1～8については、別紙参照



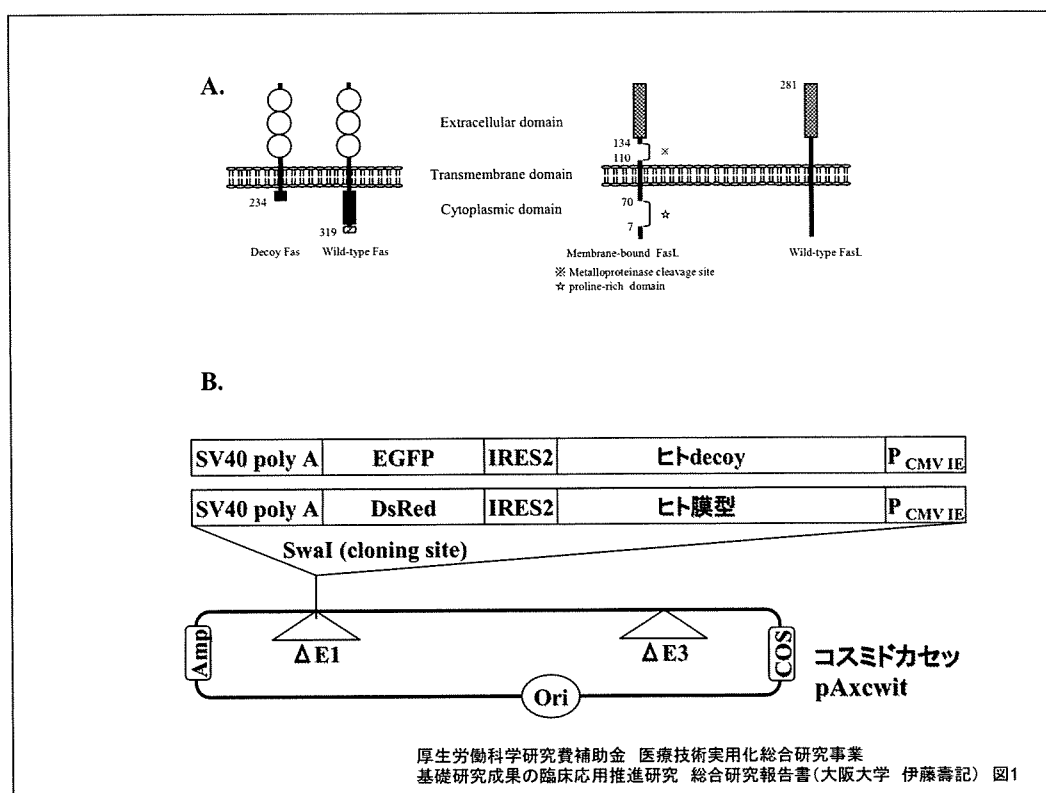


図1: ヒトdecoy Fas、膜結合型ヒトFasLの遺伝子構造とアデノウイルスベクターの構築

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、例えば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。

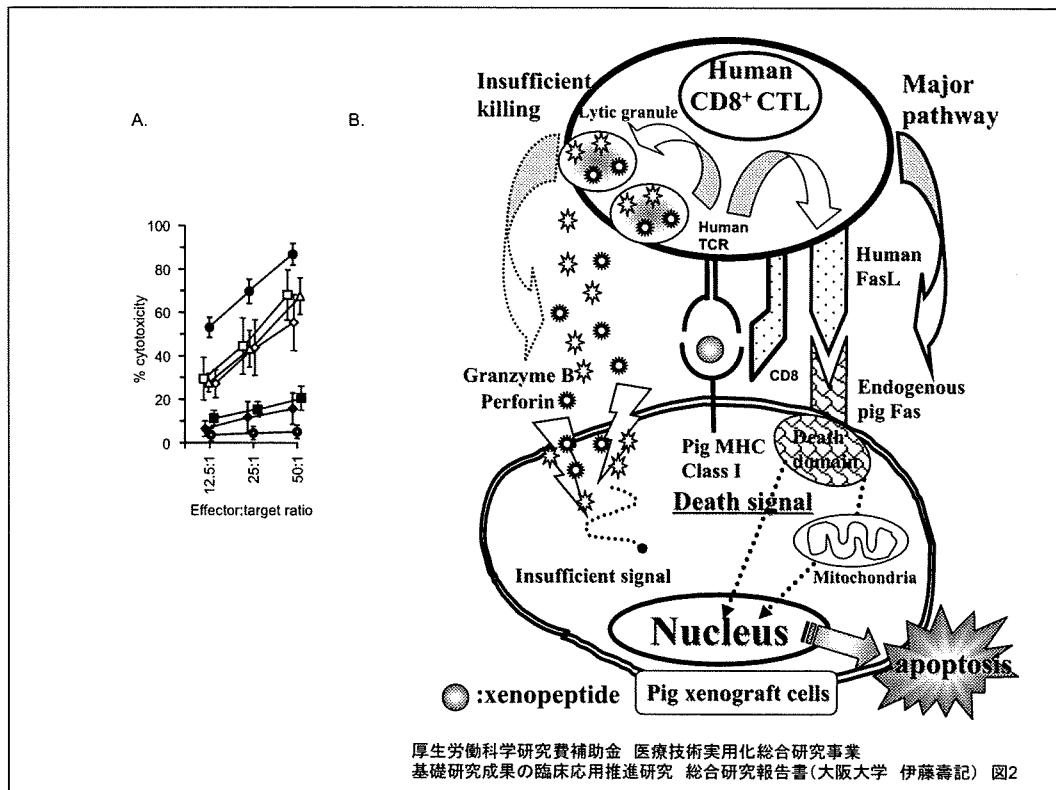


図2: ブロッキングアッセイとヒトCD8<sup>+</sup> CTLによるブタ異種細胞に対する細胞傷害性メカニズム

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<sup>+</sup> 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。

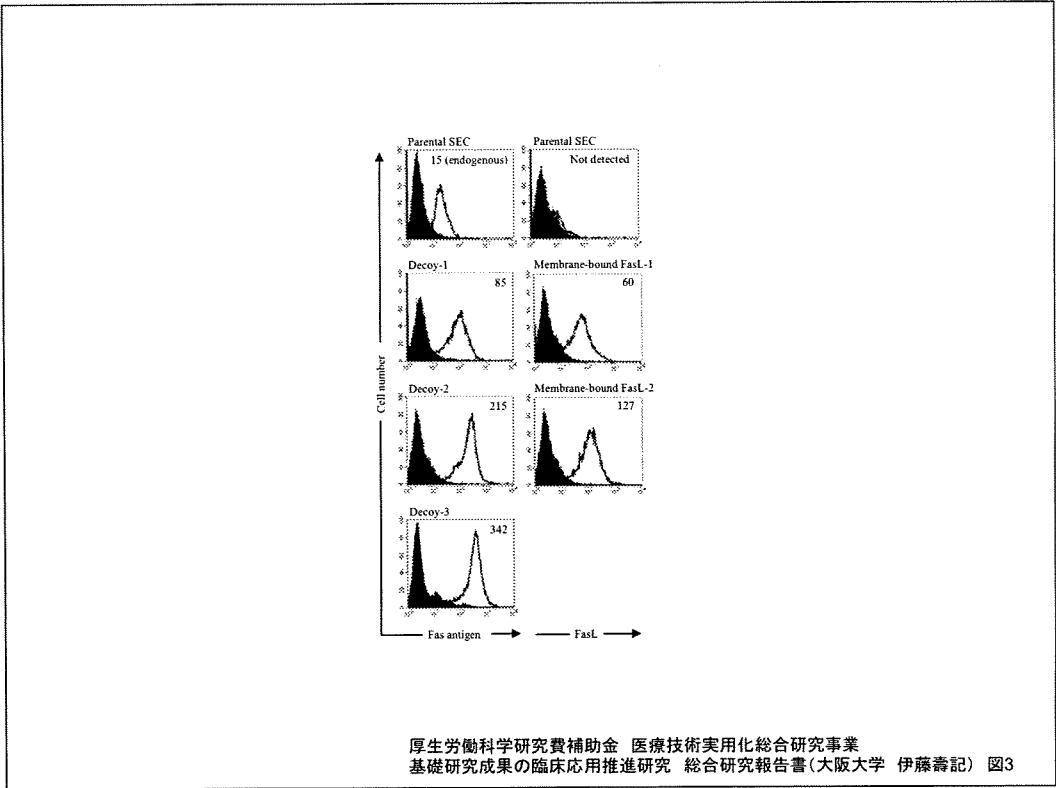
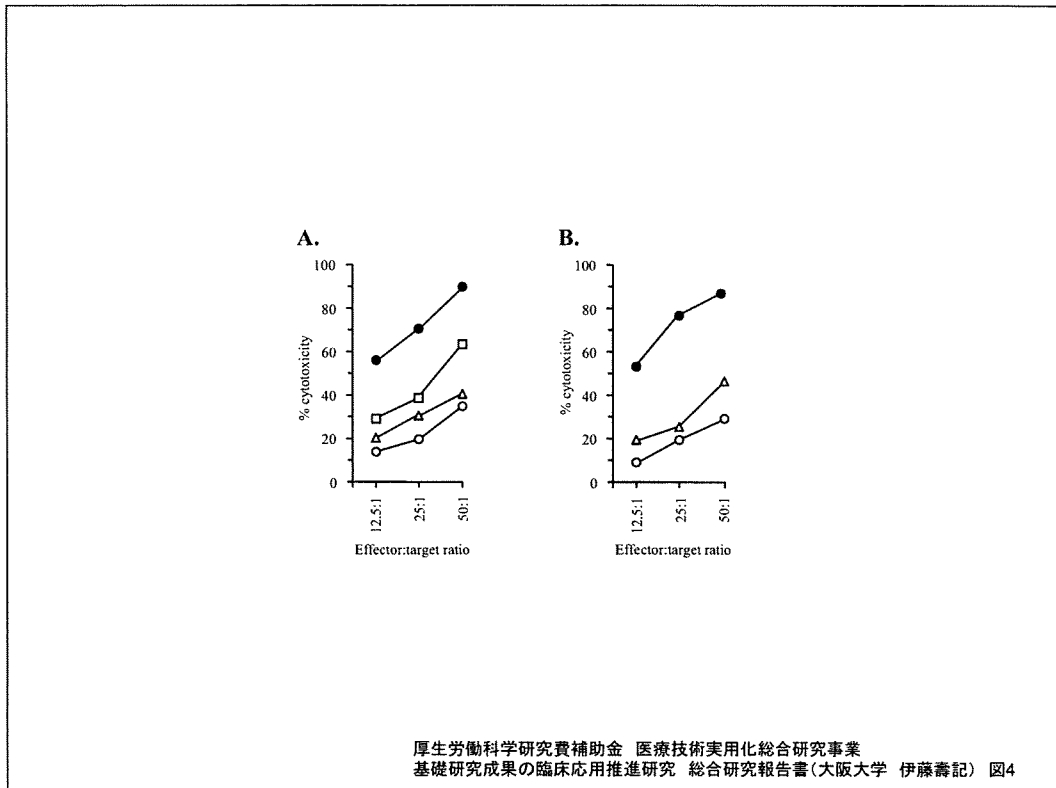


図3:ヒトdecoy Fas、膜結合型ヒトFasLの遺伝子導入ブタ血管内細胞株の樹立  
decoy Fas導入PECでは低・中・高発現の3クローンを樹立した。膜結合型FasL導入PECでは中・高発現の2クローンを樹立した。



#### 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(○)。