

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Pretreatment of donor islets with papain improves allograft survival without systemic immunosuppression in mice

(マウスにおいてパパインによるドナー膵島の移植前処理は全身免疫抑制剤の投与なしに同種異系膵島移植成績を向上させる)

熊野健二郎、西中村 瞳、米良利之、伊東 威、高橋宏幸、藤原俊義、小玉正太

Islets 8(5): 145-155, 2016

平成 28 年 8 月 第 26 回 国際移植学会 (香港) に発表

主 論 文

Pretreatment of donor islets with papain improves allograft survival without systemic immunosuppression in mice

(マウスにおいてパパインによるドナー膵島の移植前処理は全身免疫抑制剤の投与なしに同種異系膵島移植成績を向上させる)

【緒言】

臨床膵島移植は1型糖尿病に対する治療としてすでに受け入れられた治療法となっている。さらに近年のカルシニューリン阻害剤に TNF α 阻害剤を併用した免疫抑制療法はグラフト生着率を確実に高めている。しかしながらグラフト機能不全や喪失は依然として膵島移植成功の壁となっている。さらに免疫抑制剤投与による副作用として感染や発癌リスクの増加が明らかとなっており、薬剤の必要量の可能な限りの減量が求められている。

同種異系拒絶反応は T 細胞を介して起こり、グラフト喪失の主要な要因の一つである。これまでのところ、同種異系拒絶反応を十分コントロールできるだけの免疫抑制プロトコールは存在しない。同種異系拒絶反応は細胞表面に発現している主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex ; 以下 MHC)クラス I と II を介して起こる。MHC クラス I はほぼ全ての有核細胞で発現しており、一方クラス II はマクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞として知られる免疫担当細胞上に発現している。宿主の CD8 陽性 T 細胞は T 細胞レセプターを介して同種異系 MHC クラス I とペプチドの複合体を同種異系抗原として認識する。同様に CD4 陽性 T 細胞は MHC クラス II を認識する。

同種異系拒絶のメカニズムは direct、indirect、semidirect pathway の 3 経路に分けられる。direct pathway には MHC クラス I と II の両方が関与しており、同種異系急性拒絶反応において重要な役割を担う。すなわち宿主 CD8 陽性 T 細胞はこの反応の主要なエフェクター細胞であり、グラフト上に発現している同種異系 MHC クラス I を認識してグラフトを破壊する。Makhlouf らは C57BL/6 マウスに関して CD8 陽性 T 細胞は CD4 陽性 T 細胞よりも、より同種異系グラフト拒絶反応に関与している事を示した。また Markmann らは遺伝子改変による MHC クラス I 欠損膵島を移植されたマウスにおいて同種異系グラフトサバイバルが著明に改善される事を示した。さらにいくつかのドナー MHC クラス I 除去戦略は他の動物モデルにおいても膵島移植やブタ胎児神経移植などの細胞移植で成功している。

本研究では膵島表面に発現している MHC クラス I をより実用的な方法で除去する方法を探索した。

パパインはグリーンフルーツであるパパイヤから抽出されたスルフィドリルプロテアーゼで、古くから MHC クラス I 重鎖の細胞外ドメインを切断する事が知られている。Galati らは *in vitro* でパパインがマウスリンパ球上に発現している MHC クラス I を濃度依存性に除去する事を示した。さらに Mera らはヒトリンパ球においてもパパインが濃度依存性に MHC クラス I を除去する事により、リンパ球混合反応(MLR)を抑制する事を報告した。このような背景から我々はマウスにおいてドナー脾臓を移植前にパパイン処理する事で、脾臓表面の MHC クラス I が除去され、免疫原性が減弱する事により同種異系グラフトサバイバルの延長に寄与するという仮説を立てた。

【材料と方法】

・実験動物

オスの BALB/c (H-2d)マウスをチャールズリバー社から、オスの C57BL/6J (H-2b)マウスをクレアジャパンからそれぞれ購入した。全てのマウスは病原体のいない環境で飼育された。レシピエント C57BL/6J マウスは 10~11 週齢のものが用いられた。糖尿病マウス作成のため、ストレプトゾトシン(180mg/kg)の静脈投与を行った。ストレプトゾトシン投与後 2 日目と 3 日目に血糖値 400mg/dL 以上のマウスを糖尿病マウスとして移植レシピエントに用いた。実験は自施設の動物実験委員会の承認のもとに行われた。

・脾臓単離

BALB/c マウスのドナー脾臓は Type V コラゲナーゼを用いた消化と遠心比重法によって集められた。長径 150~250 μ m の脾臓が顕微鏡下にパスツールピペットを用いて選択的に集められた。単離された脾臓は DMEM 培地(10%FBS と Antibiotic-Antimycotic (A/A)添加)で移植前に一晚培養された。

・パパインの準備

パパインの活性を引き出すためには、パパイン活性物質である L-システインと EDTA が必要である。このため 0.05M の L-システインと 0.02M の EDTA を加えた低濃度グルコース溶液(1g/L)を、5M NaOH を用いて pH8.0 に調整した。パパインは溶解性に優れており、高濃度溶液の作成が可能であるため、パパイン 0(コントロール)、0.1、1、10mg/mL 溶液を作成し、ドナー脾臓処理に用いた。

・パパイン前処理と脾臓移植

レシピエントマウスはパパイン 0、0.1、1、10mg/mL の 4 グループに分けられた。移植直前に、200 個ずつの脾臓がそれぞれのパパイン濃度で 37°C、15 分で処理され、レシピエントマウスの左腎被膜下に移植された。

全てのレシピエントで随時血糖と体重が週3回測定された。血糖は GlucoCard DIAMeter を用いて測定された。

移植後連続2回、血糖値 200mg/dL 以下を移植後正常血糖化と定義した。グラフト拒絶の定義は連続2回、血糖値 400mg/dL 以上の高血糖とした。高血糖になった最初の日を拒絶日とした。120 日以上グラフト生着を認めたレシピエントについては、グラフト生着により正常血糖が維持されている事を確かめるために左腎摘を行った。

・免疫組織化学検査

腎臓と一緒に膵島グラフトは 10%ホルマリン固定され、パラフィンブロックにされた。

その後、3 μ m の切片にされ、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色またはインスリン染色が行われた。インスリン染色には一次抗体としてブタ抗マウスインスリン抗体を、2次抗体として Warp Red™ Chromogen Kit が結合したラビット抗ブタ抗体を用い、組織学的なインスリンの局在を同定した。

Foxp3 染色は抗マウス/ラット Foxp3 抗体を用いた DAB 染色にて行った。

・リンパ球増殖試験

in vitro で宿主リンパ球のドナー膵島細胞に対する活性を分析するために、パパイン処理された BALB/c マウス膵島細胞と C57BL/6J マウス由来リンパ球が共培養された(リンパ球増殖試験)。

レシピエント C57BL/6J マウスの免疫感作のために、BALB/c マウス膵島を腎被膜下に移植し、10 日後に脾臓摘出を行った。摘出した脾臓をすり潰して細胞を抽出し、反応リンパ球として使用した。ドナー膵島は BALB/c マウスから単離され、24°C、24 時間培養後に膵島細胞にされた。そして 37°C、24 時間培養後に膵島細胞はパパイン 0、1、10mg/mL 溶液で 37°C、15 分間処理され、刺激細胞として用いられた。すなわち 1×10^4 個の刺激細胞と 1×10^5 個の反応リンパ球が 96 ウェル V ボトムプレートを用いて 37°C、RPMI1640 培地(10% FBS、55 μ M メルカプトエタノール、100U/mL ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン添加)により共培養された。細胞増殖は MTT アッセイキットを用いて測定された。

・フローサイトメトリー(FACS)解析

単離膵島は 24°C で一晚培養後、0.04% EDTA とディスパーゼ I により 37°C、15 分間反応させ、膵島細胞にされた。膵島細胞は 37°C で一晚培養後、PE 染色(phycoerythrin)され、FACS 解析された。

・MLR

免疫感作誘導後に、ナイロンウールカラムを使用してレシピエント C57BL/6J マウス脾臓から T 細胞を分離し、37°C、15 分間 carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) 取り込みを行い、反応細胞として使用した。ナイーブ BALB/c マウスから摘出した脾細胞は

25 μ g/mL マイトマイシン C で 37°C 1 時間処理された。そして BALB/c 由来の脾細胞はパパイン 0、1、10mg/mL で 37°C、15 分処理され、刺激細胞として用いられた。反応細胞 (C57BL/6J マウス脾臓由来の 1×10^5 個の T 細胞) は刺激細胞 (BALB/c マウス脾臓由来の 1×10^5 個の脾細胞) と RPMI 培地で共培養され、24、48、72、96 時間培養後に反応細胞のみそれぞれ回収した。マウス CD3 抗体 (PerCP/Cy5.5 結合) を用いて CD3 陽性 T 細胞を FACS 解析でゲーティングし、ゲーティングされた CD3 陽性 T 細胞の 24、48、72、96 時間時点での CFSE 蛍光強度の測定が行われた。MTT アッセイが増殖の定量評価のために 72 時間後に行われた。

・ 膵島バイアビリティアッセイ

単離膵島は 24 時間の培養後に、パパイン 0、1、0.1、1、10mg/mL 溶液で 37°C、15 分処理された。そして DAPI 染色 (核染色のため) 併用で アネキシン V と PI (propidium iodide) 共染色を行い、アポトーシスまたはネクローシス細胞数を評価した。また単離膵島をパパイン 0、1、0.1、1、10mg/mL 溶液で処理後に、ヘキスト 33342 と PI 共染色を行い、生存膵島細胞の割合 (バイアビリティ) を 10 個の膵島の平均で計算した。バイアビリティ (%) は 100 から PI 陽性細胞の割合を引いて計算された。

・ 統計

グラフ生存データ解析は GraphPad Prism6 統計ソフトを用いて行い、カプランマイヤー法で示した。実験グループ間の膵島グラフト生存は Log-rank テストを使って比較した。全てのデータは one-way ANOVA (一元配置分散分析) によって評価され、2 群間の比較は Tukey-Kramer テストを使って行われた。P 値 0.05 以下を統計学的な有意差とした。

【結果】

ドナー膵島のパパイン処理により同種異系膵島移植のグラフト生着が延長する

はじめに我々はドナー膵島を移植前にパパイン処理する事でグラフト生着が延長するかどうかを調べるため、ドナーを BALB/c マウス、レシピエントを C57BL/6J マウスとする同種異系急性拒絶反応マウスモデルを作成した。パパイン 1mg/mL グループは 4 グループの中で有意差を持って最も長いグラフト生着を示した ($p < 0.001$)。パパイン 0、0.1、1、10mg/mL グループの中央値はそれぞれ 19 日、19 日、26 日、12 日であり、パパイン 0 と 1mg/mL グループ間で中央値に有意差を認めた ($p = 0.0088$)。さらにパパイン 0 と 1mg/mL グループの平均値はそれぞれ 20.4 ± 2.0 日と 54.2 ± 13.4 日で有意差を認めた ($p < 0.05$)。

パパイン 0.1mg/mL グループの 10 匹中 2 匹が、パパイン 1mg/mL グループの 11 匹中 3 匹が移植後 120 日の時点で正常血糖を維持していた。パパイン 0.1mg/mL は 0mg/mL より長いグラフト生存傾向にあったが、中央値は変わらなかった。移植後 120 日目で左腎摘を行い、腎摘された全てのマウスで高血糖を認め、グラフトによって正常血糖が維持されて

いた事が示された。組織学的検査によりパパイン 1mg/mL において移植 120 日目時点での正常な膵島グラフトである事が示された。対照的にパパイン 0mg/mL において移植 14 日目の移植グラフト内に高度な単核球浸潤と変性した移植膵島がみられた。Foxp3 陽性 T 細胞 (制御性 T 細胞:以下 Treg)はパパイン 0mg/mL と 1mg/L のいずれのグラフト中にもほとんど存在しなかった。

膵島細胞に対するパパイン治療は *in vitro* において同種異系リンパ球増殖を抑制する

BALB/c 膵島をパパイン前処理する事で、BALB/c 膵島に対する C57BL/6J マウス由来リンパ球増殖を抑制できるかどうかを *in vitro* で調べるために、リンパ球増殖を MTT アッセイを用いて評価した。BALB/c マウス由来の膵島細胞をパパイン処理し刺激因子として用いた。

C57BL/6J マウス由来リンパ球の BALB/c 膵島細胞に対する増殖は、24~120 時間の間でパパイン 0mg/mL と比較してパパイン 10mg/mL で有意に抑制された。しかしパパイン 0 と 1mg/mL の間でリンパ球増殖に有意差を認めなかった。これらの結果から *in vitro* においてはパパイン 10mg/mL が同種異系膵島細胞に対するリンパ球活性を抑制する事が示された。

パパイン治療は膵島細胞上に発現している MHC クラス I を除去する

以前に Mera らは *in vitro* においてヒトリンパ球をパパイン処理する事により、リンパ球表面に発現している MHC クラス I が用量依存性に除去される事を報告している。そこで我々は *in vitro* において BALB/c マウス由来の膵島細胞上に発現している MHC クラス I をパパインが除去するか調べるために、FACS を用いて MHC クラス I 発現を分析した。パパイン 0、1、10mg/mL で処理された MHC クラス I 陽性膵島細胞の割合はそれぞれ 53.0、43.5、39.9%だった。これらの結果によりパパインは用量依存性に膵島細胞上の MHC クラス I を除去する事が示された。

パパイン治療は *in vitro* においてリンパ球混合反応を抑制する

同種異系膵島に対するリンパ球増殖反応を確かめるために、我々はリンパ球混合反応試験(以下 MLR)を行った。刺激細胞として BALB/c マウス由来リンパ球を用い、MHC クラス I を除去するためにパパインで処理した後に、C57BL/6J マウス由来リンパ球(反応リンパ球)と共培養を行った。CD3 陽性 T 細胞(反応リンパ球)の増殖は FACS による CFSE の蛍光強度の経時的変化を測定した。簡単には第一世代リンパ球は FACS-CFSE で単純なピークを作り、第一世代リンパ球が増殖するにつれ、最初のピークが低くなり、2 峰性のピークを形成していく。パパイン 0 mg/mL グループは MLR において正常な増殖反応を示した。対照的にパパイン 10mg/mL による刺激細胞の前処理によって 24~96 時間の共培養で MLR は著明に抑制された。MLR の定量的評価のために MTT アッセイも行った。結果としてパパイン 0mg/mL 群と比較してパパイン 10mg/mL 処理によって T 細胞の増殖は有意に

抑制され、FACSの結果と一致していた。これらの結果によりパパイン 10mg/mL 治療が T 細胞増殖を抑制する事が示された。

パパイン前治療は膵島バイアビリティに影響を与えない

最後に我々はパパインが膵島のバイアビリティに与える影響を分析した。パパインのどの濃度においても膵島内にアネキシン V 陽性細胞はほとんど認めなかった。さらにパパイン 0、0.1、1、10mg/mL で処理された膵島で PI 陽性割合はそれぞれ 98±1.95, 99±0.47, 99±0.27, and 98±0.7%だった。これらの結果によりパパイン前処理は膵島のバイアビリティに悪影響を与えない事が示された。

【考察】

パパインは MHC クラス I 重鎖を切断するというよく知られた作用のため、MHC クラス I 構造や抗原性を調べるための有用な分析方法として用いられてきた長い歴史を持つ。しかし現在まで、動物モデルにおいてパパインを用いた同種異系細胞移植や臓器移植の報告はない。それゆえパパインによるドナー膵島表面の MHC クラス I 除去が、同種異系膵島移植成績に免疫原性の観点(特に同種異系反応)からどのような影響を与えるかは明らかではない。この研究で、我々は初めてパパイン治療がマウス同種異系膵島移植成績を改善し、MHC クラス I-T 細胞によって引き起こされる同種異系反応が関与する *direct pathway* の抑制メカニズムを明らかにした。

本研究の結果によりマウスにおいてパパイン 1mg/mL によるドナー膵島処理が同種異系グラフト生着を有意に延長する事が明快に示された。またパパイン 1mg/mL グループにおいて 35%以上が 60 日以上グラフト生着を示した。さらにパパイン 1mg/mL グループにおいて 11 匹中 3 匹が免疫抑制剤投与なしに 120 日以上という長期のグラフト生着を示した。我々は 3 匹のレシピエントマウスに移植後のどこかの時点で免疫寛容が生じていると推測した。一般的に抑制性 T 細胞(以下 Treg)は同種異系免疫寛容のコントロールに重要な役割を果たしており、いくつかの Treg 誘導戦略は膵島移植において成功を収めている。ゆえに我々は移植後 120 日目のグラフトに浸潤しているリンパ球中の Treg の割合を Foxp3 染色 (Treg マーカー)によって調べ、移植後 14 日目のパパイン 1mg/mL 群のグラフトと比較をした。しかし予想外に術後 120 日目と 14 日目のグラフトで Treg 割合に差はみられなかった。結果我々はパパイン治療に Treg 誘導効果はないと結論づけた。しかしながら、我々の *in vivo* の結果はレシピエントマウスが BALB/c マウスという違いはあるものの、遺伝子操作による MHC クラス I 欠損膵島を用いた Markmann らの成績とかなり似ており、パパインを使用した方法は遺伝子ターゲティング戦略と同等かもしれない。

In vitro において、我々はパパイン 1 と 10mg/mL の両濃度でパパイ処理により膵島細胞表面上の MHC クラス I が減弱する事を FACS で示した。53%の膵島細胞が MHC クラス I 陽性であり、パパイン 1 または 10mg/mL 処理によりコントロール群と比較してそれぞれ

9.5%、13.1%MHC クラス I 発現が減少した。これらの結果からパパイン処理による膵島細胞上の MHC クラス I の除去は部分的であり、MHC クラス I はおそらく再発現するのでその効果は一時的なものである事が示された。ゆえに全身免疫抑制を併用したパパイン前治療は全身免疫抑制剤の使用を減らすのに魅力的な治療であると考えられる。

同種異系反応に対するパパインの効果を知るためのリンパ球増殖試験により、宿主リンパ球の同種異系膵島細胞に対する活性はパパイン 10mg/mL により有意に抑制される事が示された。さらに MLR における CD3 陽性 T 細胞増殖はパパイン 10mg/mL 治療により著明に抑制された。これらの結果はマウスにおいてパパイン治療による MHC クラス I 減少が T 細胞が関与する同種異系反応の抑制に導くことが示された。

興味深い事に、*in vitro* においてはパパイン 10mg/mL によるドナー膵島細胞治療のみが、宿主 T 細胞活性を抑制した。しかしながらパパイン 10mg/mL グループは *in vivo* においては最も短いグラフト生着を示しており、これにはいくつかの理由が考えられる。

まず、膵島そのものより膵島細胞にした方がパパイン効果の分析を進めやすいため、我々は膵島そのものではなく、膵島細胞を用いて *in vitro* の実験を行った。一方で *in vivo* 実験においては膵島そのものを用いた。膵島細胞と膵島の形態の違いが *in vivo* と *in vitro* におけるパパインの有効濃度の違いに影響を与えたかもしれない。ゆえに *in vivo* と *in vitro* の結果の違いは起こりうる事である。2 番目にパパイン 10mg/mL 処理は *in vitro* において膵島バイアビリティに影響を与えなかったが、パパイン 10mg/mL 処理後にかなりたくさんの断片化した膵島を認めた。以前に Williams らはパパイン処理したラット膵島が断片化し、同種同系モデルにおいて膵島移植成績を改善しなかったと報告しており、我々の結果を支持するものである。そのような断片化した膵島構造は時間を経るにつれてダメージが蓄積し、最終的に *in vivo* において膵島バイアビリティや機能に悪影響を及ぼし、長期生着を妨げる原因になるのかもしれない。3 番目にパパインは肺気腫の動物モデル作成に用いられてきた。というのもパパイン投与により肺胞腔の破壊と肺組織の菲薄化が起こり、炎症が惹起されるからである。さらに Itoh らは移植膵島から分泌されるサイトカインが自然免疫反応の引き金となる局所の炎症の原因となり、しいてはグラフト喪失の原因となることを報告している。我々は *in vitro* においてパパイン処理を行った直後の膵島がバイアビリティを維持している事を確かめているが、より高濃度のパパイン処理が高濃度のサイトカイン放出によって、より強い炎症を引き起こし、早期のグラフト喪失の原因になった可能性がある。これらの可能性を考慮し、我々は膵島移植においてパパイン 1mg/mL がパパインのプラスとマイナスの作用のバランスをとる最適な濃度と考える。

今日まで細胞移植の分野でいくつかのドナー MHC クラス I を除去する戦略が成功を収めてきた。たとえばマウスや霊長類でのインスリン分泌膵島移植などである。Markmann らは MHC クラス I 欠損膵島はマウスにおいて同種異系グラフト生着を改善したと報告している。さらに CD8 陽性 T 細胞欠損レシピエントでは MHC クラス I と CD8 陽性 T 細胞による同種異系拒絶反応が起こらない事でグラフト生着が延長する事が示されている。加えて Coffman らは腎移植において遺伝子操作による MHC クラス I 発現の減少は MHC 不

適合症例に有効な可能性がある」と結論づけている。これらのデータは我々の結果を強く支持するものであり、MHC クラス I システムが細胞移植と臓器移植の両方で同種異系拒絶反応において根本的な要素を担っている事を示している。ヒトを含む動物は共通の MHC システムを持っている事は周知の事実であり、この研究の究極のゴールは臨床応用である。MHC 抗原発現の遺伝子操作による排除は技術的にも倫理的な観点からも膵島移植においてまだ実践的ではない。しかしながらパパインによる効果は限定的ではあるが、より実践的で臨床にチャレンジする価値がある。Mera らはパパインの酵素活性を 4℃で保つ事は可能であり、この事はパパインによる酵素的な MHC クラス I 除去は組織移植だけでなく全ての臓器移植に応用できる可能性を示している。我々は同種異系グラフトをパパイン処理する事で、免疫抑制剤投与量の減量効果も期待している。この点から我々はパパイン前治療と低用量免疫抑制剤による併用療法を提案している。最近 Brooks らは抗体が関与する同種異系拒絶反応が重要である事を報告しており、これはドナーHLA-A2 (MHC クラス I)のミスマッチによってレシピエント内で産生される抗 HLA-A2 抗体が原因としている。彼らは細胞拒絶だけでなく、液性拒絶においても MHC クラス I が重要な役割を果たしている事を明らかにしている。ゆえに免疫抗原としての MHC クラス I は将来より深い意味をもつかもしれない。

【結論】

マウスドナー膵島のパパインによる前治療は MHC クラス I を介する同種異系グラフト拒絶を抑制し、全身免疫抑制の投与なしに膵島グラフト生着の延長に寄与する。これらの結果はヒトにおいても、パパイン処理によりドナー膵島の抗原性を減弱させ、実臨床において必要な免疫抑制剤の量を最小限にできる可能性を示している。