

however, the precise mechanism remains unknown. Thus, it is possible that the unknown mechanisms underlying hyporesponsiveness toward T cells with indirect allospecificity induced by the portal injection of allogeneic cells simultaneously inhibits T cell responses via the direct alloantigen presentation pathway. For example, if the release of immunosuppressive cytokines mediated by the LSECs is also involved in the mechanisms of their tolerance toward T cells with indirect allospecificity, this may prevent T cell responses via the direct alloantigen presentation pathway. Further studies are required to clarify this concept.

## Acknowledgments

We thank Drs. H. Tashiro, M. Ochi, and S. Kishida for their advice and encouragement.

## Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

## References

- Kniece, Z. 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 161: 1–151.
- Crispe, I. N. 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 51–62.
- Margenthaler, J. A., K. Landeros, M. Kataoka, and M. W. Flye. 2003. Mechanism of portal venous tolerant long-term MHC class I L<sup>d</sup>-specific skin graft survival in transgenic 2CF1 mice. *Transplant Immunol.* 11: 23–29.
- Wong, W., P. J. Morris, and K. J. Wood. 1997. Pretransplant administration of a single donor class I major histocompatibility complex molecule is sufficient for the indefinite survival of fully allogeneic cardiac allografts: evidence for linked epitope suppression. *Transplantation* 63: 1490–1494.
- Limmer, A., J. Ohi, C. Kurts, H. G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold, and P. A. Knolle. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8<sup>+</sup> T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat. Med.* 6: 1348–1354.
- Knolle, P. A., E. Schmitt, S. Jin, T. Germann, R. Duchmann, S. Hegenbarth, G. Gerken, and A. W. Lohse. 1999. Induction of cytokine production in naive CD4<sup>+</sup> T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116: 1428–1440.
- Sugiura, K., S. Lee, T. Nagahama, Y. Adachi, J. Ishikawa, and S. Ikehara. 2001. Tolerance induction across MIs and minor histocompatibility complex by inhibiting activation of T helper type 1 in early period. *Immunol. Lett.* 77: 25–30.
- Jin, T., K. Sugiura, J. Ishikawa, S. Lee, H. Morita, T. Nagahama, and S. Ikehara. 1999. Persistent tolerance induced after portal venous injection of allogeneic cells plus cyclophosphamide treatment. *Immunobiology* 200: 215–226.
- Kokudo, S., S. Sato, J. H. Qian, K. Wada, R. Ikegami, T. Hamaoka, and H. Fujiwara. 1988. Tolerance induction of alloreactivity by portal venous inoculation with allogeneic cells followed by the injection of cyclophosphamide. II. Cellular and molecular mechanisms underlying tolerance. *Microbiol. Immunol.* 32: 283–292.
- Chueh, S. C., L. Tian, M. Wang, M. E. Wang, S. M. Stepkowski, and B. D. Kahan. 1997. Induction of tolerance toward rat cardiac allografts by treatment with allochimeric class I MHC antigen and FTY720. *Transplantation* 64: 1407–1414.
- Li, W., L. Lu, Z. Wang, L. Wang, J. J. Fung, A. W. Thomson, and S. Qian. 2001. Costimulation blockade promotes the apoptotic death of graft-infiltrating T cells and prolongs survival of hepatic allografts from FLT3L-treated donors. *Transplantation* 72: 1423–1432.
- Callery, M. P., T. Kamei, and M. W. Flye. 1989. Kupffer cell blockade inhibits induction of tolerance by the portal venous route. *Transplantation* 47: 1092–1094.
- Kamei, T., M. P. Callery, and M. W. Flye. 1990. Kupffer cell blockade prevents induction of portal venous tolerance in rat cardiac allograft transplantation. *J. Surg. Res.* 48: 393–396.
- Thomson, A. W., and L. Lu. 1999. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol. Today* 20: 27–32.
- Morelli, A. E., P. J. O'Connell, A. Khanna, A. J. Logar, L. Lu, and A. W. Thomson. 2000. Preferential induction of Th1 responses by functionally mature hepatic (CD8 $\alpha^+$  and CD8 $\alpha^+$ ) dendritic cells: association with conversion from liver transplant tolerance to acute rejection. *Transplantation* 69: 2647–2657.
- Lohse, A. W., P. A. Knolle, K. Bilo, A. Uhrig, C. Waldmann, M. Ibe, E. Schmitt, G. Gerken, and K. H. Meyer Zum Buschenfelde. 1996. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 110: 1175–1181.
- Knolle, P. A., and A. Limmer. 2001. Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol.* 22: 432–437.
- Limmer, A., and P. A. Knolle. 2001. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 49: S7–S11.
- Ohdan, H., Y. G. Yang, A. Shimizu, K. G. Swenson, and M. Sykes. 1999. Mixed chimerism induced without lethal conditioning prevents T cell- and anti-Gal $\alpha$ 1,3Gal-mediated graft rejection. *J. Clin. Invest.* 104: 281–290.
- Burrows, F. J., E. J. Derbyshire, P. L. Tazzari, P. Amlot, A. F. Gazdar, S. W. King, M. Letarte, E. S. Vitetta, and P. E. Thorpe. 1995. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin. Cancer Res.* 1: 1623–1634.
- Miller, D. W., W. Graulich, B. Karges, S. Stahl, M. Ernst, A. Ramaswamy, H. H. Sedlacek, R. Muller, and J. Adamkiewicz. 1999. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF- $\beta$ -receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int. J. Cancer* 81: 568–572.
- Li, D. Y., L. K. Sorensen, B. S. Brooke, L. D. Urness, E. C. Davis, D. G. Taylor, B. B. Boak, and D. P. Wendel. 1999. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284: 1534–1537.
- Theuerkauf, I., H. Zhou, and H. P. Fischer. 2001. Immunohistochemical patterns of human liver sinusoids under different conditions of pathologic perfusion. *Virchows Arch.* 438: 498–504.
- Tateno, C., K. Takai-Kajihara, C. Yamasaki, H. Sato, and K. Yoshizato. 2000. Heterogeneity of growth potential of adult rat hepatocytes in vitro. *Hepatology* 31: 65–74.
- Seglen, P. O. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13: 29–83.
- Onoe, T., H. Ohdan, M. Ochi, Y. Tanaka, D. Tokita, H. Hara, K. Mizunuma, W. Zhou, H. Tashiro, and T. Asahara. 2003. Multiparameter flow cytometric mixed lymphocyte reaction assay using fluorescent cytoplasmic dye for assessing phenotypic property of T cells responding to allogeneic stimulation. *Transplant. Proc.* 35: 557–558.
- Wells, A. D., H. Gudmundsdottir, and L. A. Turka. 1997. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion: signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J. Clin. Invest.* 100: 3173–3183.
- Tanaka, Y., H. Ohdan, T. Onoe, and T. Asahara. 2004. Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. *Immunol. Invest.* 33: 309–324.
- Openshaw, P., E. E. Murphy, N. A. Hosken, V. Maino, K. Davis, K. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J. Exp. Med.* 182: 1357–1367.
- Baran, J., D. Kowalczyk, M. Ozog, and M. Zembala. 2001. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 303–313.
- Pala, P., T. Hussell, and P. J. Openshaw. 2000. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J. Immunol. Methods* 243: 107–124.
- Rostaing, L., J. Tkaczuk, M. Durand, C. Peres, D. Durand, C. de Preval, E. Ohayon, and M. Abbal. 1999. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry* 35: 318–328.
- Courtoy, P. J., N. Moguilevsky, L. A. Retegui, C. E. Castracane, and P. L. Masson. 1984. Uptake of lactoferrin by the liver. II. *Endocytosis by sinusoidal cells. Lab. Invest.* 50: 329–334.
- Owensby, D. A., P. A. Morton, and A. L. Schwartz. 1989. Interactions between tissue-type plasminogen activator and extracellular matrix-associated plasminogen activator inhibitor type 1 in the human hepatoma cell line HepG2. *J. Biol. Chem.* 264: 18180–18187.
- van der Laan-Klamer, S. M., J. E. Atmosoerodjo-Briggs, G. Harms, P. J. Hoedemaeker, and M. J. Hardon. 1985. A histochemical study about the involvement of rat liver cells in the uptake of heterologous immune complexes from the circulation. *Histochemistry* 82: 477–482.
- Omoto, E., J. J. Minguell, and M. Tavassoli. 1992. Endothelial transcytosis of iron-transferrin in the liver does not involve endosomal traffic. *Pathobiology* 60: 284–288.
- Omoto, E., and M. Tavassoli. 1989. The role of endosomal traffic in the trans-endothelial transport of ceruloplasmin in the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 1346–1350.
- Wisse, E., R. B. De Zanger, K. Charels, P. Van Der Smissem, and R. S. McCuskey. 1985. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 5: 683–692.
- Liu, Z., Y. K. Sun, Y. P. Xi, A. Maffei, E. Reed, P. Harris, and N. Suci-Foca. 1993. Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J. Exp. Med.* 177: 1643–1650.
- Tambur, A. R. 2003. Monitoring indirect presentation of alloantigens by utilizing the autologous processing machinery of dendritic cells in-vitro. *J. Immunol. Methods* 283: 215–223.
- Refaeli, Y., L. Van Parijs, C. A. London, J. Tschopp, and A. K. Abbas. 1998. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8: 615–623.
- Desbarats, J., R. C. Duke, and M. K. Newell. 1998. Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Med.* 4: 1377–1382.
- Miller, A. T., and L. J. Berg. 2002. Defective Fas ligand expression and activation-induced cell death in the absence of IL-2-inducible T cell kinase. *J. Immunol.* 168: 2163–2172.
- Calne, R. Y., R. A. Sells, J. R. Pena, D. R. Davis, P. R. Millard, B. M. Herbertson, R. M. Binns, and D. A. Davies. 1969. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223: 472–476.

45. Zimmermann, F. A., H. S. Davies, P. P. Knoll, J. M. Gokel, and T. Schmidt. 1984. Orthotopic liver allografts in the rat: the influence of strain combination on the fate of the graft. *Transplantation* 37: 406-410.
46. Qian, S., A. J. Demetris, N. Murase, A. S. Rao, J. J. Fung, and T. E. Starzl. 1994. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 19: 916-924.
47. Kamada, N., H. S. Davies, and B. Roser. 1981. Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* 292: 840-842.
48. Kamada, N. 1985. The immunology of experimental liver transplantation in the rat. *Immunology* 55: 369-389.
49. Onoe, T., H. Ohdan, D. Tokita, M. Shishida, Y. Tanaka, H. Hara, W. Zhou, K. Ishiyama, H. Mitsuta, K. Ide, and T. Asahara. 2005. Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice. *J. Immunol.* 175: 139-146.
50. Knolle, P. A., A. Uhrig, S. Hegenbarth, E. Loser, E. Schmitt, G. Gerken, and A. W. Lohse. 1998. IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin. Exp. Immunol.* 114: 427-433.
51. Knolle, P. A., and G. Gerken. 2000. Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* 174: 21-34.
52. Yamada, A., A. Chandraker, T. M. Laufer, A. J. Gerth, M. H. Sayegh, and H. Auchincloss, Jr. 2001. Recipient MHC class II expression is required to achieve long-term survival of murine cardiac allografts after costimulatory blockade. *J. Immunol.* 167: 5522-5526.
53. Rulifson, I. C., G. L. Szot, E. Palmer, and J. A. Bluestone. 2002. Inability to induce tolerance through direct antigen presentation. *Am. J. Transplant.* 2: 510-519.
54. Denton, M. D., C. S. Geehan, S. J. Alexander, M. H. Sayegh, and D. M. Briscoe. 1999. Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4<sup>+</sup> T cell alloactivation. *J. Exp. Med.* 190: 555-566.
55. Manavalan, J. S., S. Kim-Schulze, L. Scotto, A. J. Naiyer, G. Vlad, P. C. Colombo, C. Marboe, D. Mancini, R. Cortesini, and N. Suci-Foca. 2004. Alloantigen specific CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> T suppressor cells induce ILT3<sup>+</sup>ILT4<sup>+</sup> tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int. Immunol.* 16: 1055-1068.
56. Colonna, M., H. Nakajima, F. Navarro, and M. Lopez-Botet. 1999. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J. Leukocyte Biol.* 66: 375-381.
57. Cella, M., C. Dohring, J. Samaridis, M. Dessing, M. Brockhaus, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. 1997. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J. Exp. Med.* 185: 1743-1751.
58. Colonna, M., H. Nakajima, and M. Cella. 2000. A family of inhibitory and activating Ig-like receptors that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *Semin. Immunol.* 12: 121-127.
59. Sayegh, M. H., N. Perico, O. Imberti, W. W. Hancock, C. B. Carpenter, and G. Remuzzi. 1993. Thymic recognition of class II major histocompatibility complex allopeptides induces donor-specific unresponsiveness to renal allografts. *Transplantation* 56: 461-465.
60. Sayegh, M. H., N. Perico, L. Gallon, O. Imberti, W. W. Hancock, G. Remuzzi, and C. B. Carpenter. 1994. Mechanisms of acquired thymic unresponsiveness to renal allografts: thymic recognition of immunodominant allo-MHC peptides induces peripheral T cell anergy. *Transplantation* 58: 125-132.

# 1. 肝の Kupffer 細胞の特徴と役割

*The peculiarity and role of liver Kupffer cells in surgery-associated pathogenesis*

広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学

大段 秀樹・浅原 利正

Hideki Ohdan

Toshimasa Asahara

(講師)

(教授)

## Summary

Kupffer 細胞は、肝虚血再灌流や侵襲後肝再生における生体反応を制御するサイトカインネットワークの中心的な役割を果たす。メディエーターの産生のみならず、Kupffer 細胞は貪食能と抗原提示能をもち自然免疫と獲得免疫応答の仲介的役割を果たす肝構築細胞である。貪食による異物除去を果たした後は(自然免疫応答)、異物由来の抗原を未感作 T 細胞に提示する(獲得免疫応答)。この機構は、末梢性免疫寛容の維持に深く関連している。また、同種異系肝移植における複雑な免疫応答にも重要な役割を担う。本稿では、有事における Kupffer 細胞を中心とした細胞間コミュニケーションやサイトカインネットワークについて最新の文献を紹介しつつ解説した。

## Key Words

Kupffer 細胞, 免疫寛容, 虚血再灌流障害, 肝再生

## はじめに

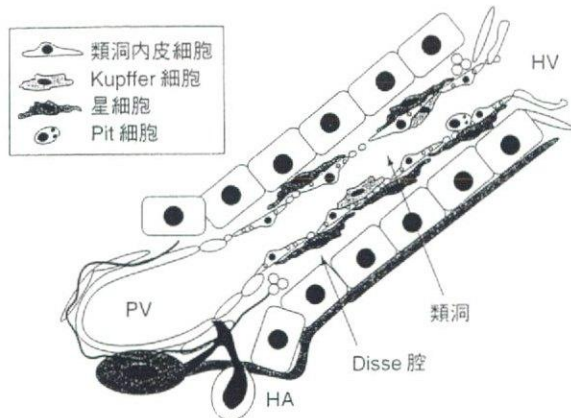
肝類洞の構成細胞には、類洞内皮細胞, Kupffer 細胞, NK (natural killer) 細胞 (Pit 細胞), NKT (natural killer T) 細胞, extrathymic T 細胞などの肝

リンパ球, 脂肪摂取細胞(星細胞, 伊東細胞), 樹状細胞がある(図 1)。これらの細胞はそれぞれ独自の機能をもつが, 細胞相互間に構造的にも機能的にも密接な関係を維持している。Kupffer 細胞は全身のマクロファージ

## ◆メモランダム◆

### 類洞構築における Kupffer 細胞の位置付け

類洞は肝の毛細血管に相当するが、一般の毛細血管に比較して複雑な構造をとる。類洞壁構成細胞は肝体積の 2% を占めるにすぎないが、肝総細胞数では 36% を占める。類洞内皮細胞は小孔をもち、血流と Disse 腔の間の液性交換に積極的にかかわる。Kupffer 細胞と内皮細胞は血液中の種々の物質を速やかに除去するスカベンジャーの役割を演じ、さらに分泌細胞としても生理代謝や生体防御機構に活発に参画する。脂肪摂取細胞はビタミン A を貯蔵し、筋線維芽細胞に変態して肝の線維化に関与する。同時に収縮、弛緩によって類洞の血流を調節し、低圧系のもとにあっても心拍出量の 1/4 という多量の血流を維持している。種々の病態において肝の微小循環は障害され、門脈圧の亢進を招く。Kupffer 細胞は全身のマクロファージの半数以上を占める最大のマクロファージ集団である。Kupffer 細胞の内皮への付着には ICAM-1 などの接着因子が関与する。Kupffer 細胞は、スカベンジャー受容体、マンノース受容体、Fc 受容体などを発現し、これらの受容体を介して活発に物質の取り込みを行い有毒物質が循環しないようにしている。広い類洞表面積も手伝ってこのシステムは強力かつ効率的で、流血中の異物の 8~9 割は肝臓で捕捉され、しかも 1 回の通過で大半が除去されると考えられている。



PV : Portal vein, HV : Hepatic vein, HA : Hepatic artery

の半数以上をしめる最大のマクロファージ集団である。Kupffer 細胞は、単球と異なり、活発に物質の取り込みを行う (phagocytosis, pinocytosis)。この機構によって Kupffer 細胞は肝臓で血中物質の代謝、解毒器官としてフィルターの役割を果たす。Kupffer 細胞はスカベンジャーとして抗原を非特異的に貪食・処理するだけでなく、特徴的な獲得免疫応答を誘導する役割をなすことも示唆されている。また、肝虚血再灌流やエンドトキシンショックなどの侵襲時には生体反応を制御するサイトカインネットワークの中心的な役割を果たす。さらに、Kupffer 細胞から産生される IL-6 や TNF- $\alpha$  が肝再生に関連すると報告されている。本稿では、外科領域に関連する病態において Kupffer 細胞を中心とした細胞間コミュニケーションについて最近の知見を含めてレビューする。

### 免疫応答における Kupffer 細胞の役割

肝臓を構築する細胞群のうち、貪食能と抗原提示能をもち自然免疫と獲得免疫応答の仲介的役割を果たしうる細胞は、樹状細胞と Kupffer 細胞および類洞内皮細胞といわれている。Kupffer 細胞は、スカベンジャー受容体、マンノース受容体、Fc 受容体などを発現し、これらの受容体を介して異物を活発に貪食する。貪食した Kupffer 細胞は異物由来の抗原を未感作 T 細胞に提示しうるが、強い抗原提示能をもつ樹状細胞とは異なる特徴的な機能が報告されている。末梢性免疫寛容の維持機構に重要な役割を果たす可能性や、同種異系臓器移植における免疫寛容の誘導にかかわる可能性などがあげられ、以下に解説する。このように肝内抗原提示細胞と T 細胞応答への複

雑な細胞間コミュニケーションの解析が進む一方で、Kupffer 細胞の自己・非自己認識機構の解明にも進展が認められている。ここでは、Kupffer 細胞の異種細胞貪食機構に関するわれわれの研究を紹介し、これを通じて Kupffer 細胞の自己・非自己認識機構を考察する。

#### 1 末梢性免疫寛容における Kupffer 細胞の役割

健常者の末梢血には、胸腺での寛容化 (deletion) を免れた自己反応性 T 細胞が存在する。肝臓は、これらの自己反応性 T 細胞を制御する末梢性免疫寛容誘導機構に関連する可能性が指摘されている<sup>1)-3)</sup>。

肝内には消化管常在細菌由来のエンドトキシン/LPS が存在するが、これが Kupffer 細胞や類洞内皮細胞の抗原提示能を抑制することが報告されている。LPS により活性化した Kupffer 細胞や類洞内皮細胞は、抑制性サイトカイン (IL-10, TGF- $\beta$ ) や免疫抑制物質 (PGE 2) を産生する。また、LPS は Kupffer 細胞や類洞内皮細胞内での抗原プロセッシングや補助分子発現を抑制する。これらの機序により、Kupffer 細胞や類洞内皮細胞から自己抗原の提示を受けた T 細胞は寛容化する可能性が考えられている<sup>2)</sup>。

CD 4<sup>+</sup>CD 25<sup>+</sup> 制御性 T 細胞 (Treg 細胞) は、末梢性免疫寛容誘導機構において重要な役割を演じる。最近、マウスの肝臓から分離した Kupffer 細胞、類洞内皮細胞および肝細胞の存在下で、CD 4<sup>+</sup>CD 25<sup>+</sup> 制御性 T 細胞が CD 4<sup>+</sup>

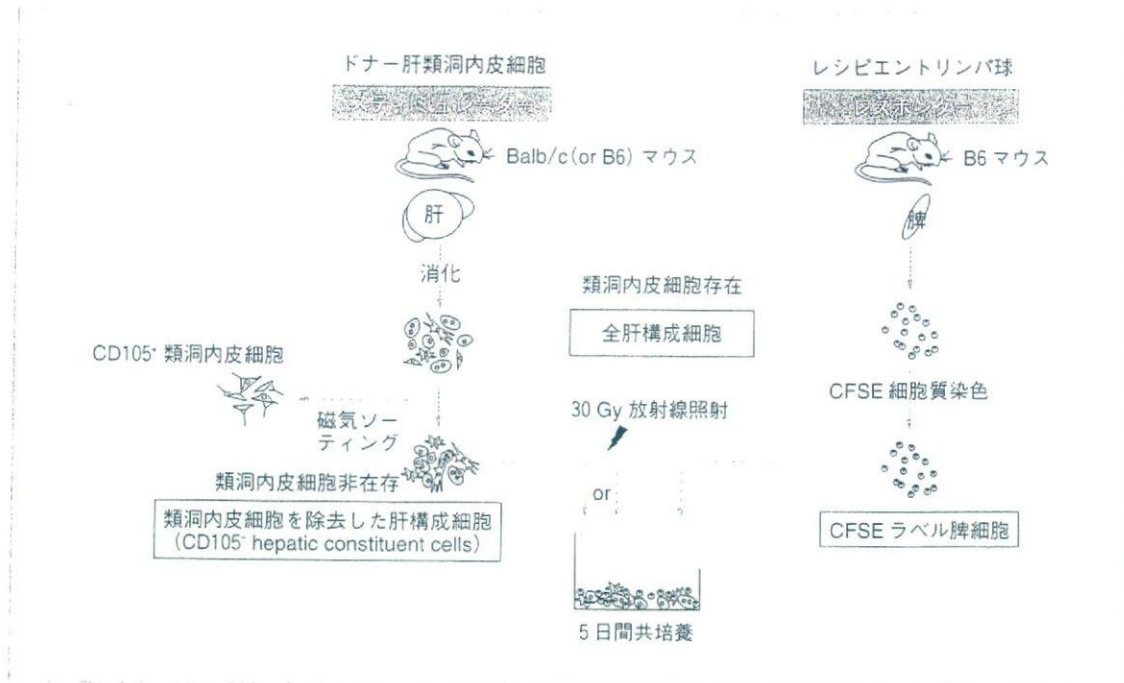


図1 肝構成細胞の同種異系免疫応答の解析系

Balb/c マウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流で消化し肝臓構成細胞に分離した。肝内では類洞内皮細胞のみに CD 105 の表出を認めるため、この分子をマーカーにしてマグネティックソーティング法で類洞内皮細胞を分離した。調整した肝構成細胞を放射線照射 (30 Gy) し、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) で蛍光染色した B6 の脾リンパ球と混合培養した。この解析系を用い、アロ肝構成細胞に対する反応性 CD 4<sup>+</sup> および CD 8<sup>+</sup>T 細胞の増殖指数と存在比率および分裂後細胞死の有無が定量的に評価できる。

(文献 12 より引用)

CD 25<sup>+</sup>T 細胞の増殖を抑制することが報告された<sup>4)</sup>。しかし、微生物による肝内炎症を模倣して非生理量の LPS の存在下で同様の実験を行うと、toll-like receptor-4 (TLR-4) 依存性に CD 4<sup>+</sup>CD 25<sup>+</sup>制御性 T 細胞の免疫抑制効果は消失している。すなわち、Kupffer 細胞、類洞内皮細胞および肝細胞は CD 4<sup>+</sup>CD 25<sup>+</sup>制御性 T 細胞の抑制活性を肝内で制御している可能性が考えられる。また、Kupffer 細胞は CD 4<sup>+</sup>CD 25<sup>+</sup>制御性 T 細胞そのものの増殖を誘導するが、類洞内皮細胞および肝細胞には同様の効果は認められて

いないことも確認されている。これは、Kupffer 細胞の寛容特性を考察する上で非常に興味深い現象である。

## 2 同種異系免疫応答における Kupffer 細胞の役割

さまざまな動物種において、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) が異なる同種異系肝移植を施行した際に、移植後の免疫抑制剤を使用しなくても移植肝に対する拒絶反応が起こらず容易に生着する現象は以前より観察されている<sup>5)6)</sup>。また、ドナーからの移植肝が生着しているレシビエントに、ドナー

と同系の他臓器を移植しても拒絶反応は生じないことから、肝移植が成立したドナーに対しては免疫学的寛容が誘導されるものと考えられている。このような肝移植後に誘導される免疫寛容には、肝臓が産生する免疫抑制因子 (可溶性 MHC クラス I 分子など) の作用や、移植肝内に存在する樹状細胞、Kupffer 細胞や類洞内皮細胞などの抗原提示細胞とレシビエントの T 細胞との相互作用が関与する可能性が指摘されている<sup>7)</sup>。

同種異系肝移植後の免疫応答における Kupffer 細胞の役割に関しては、相

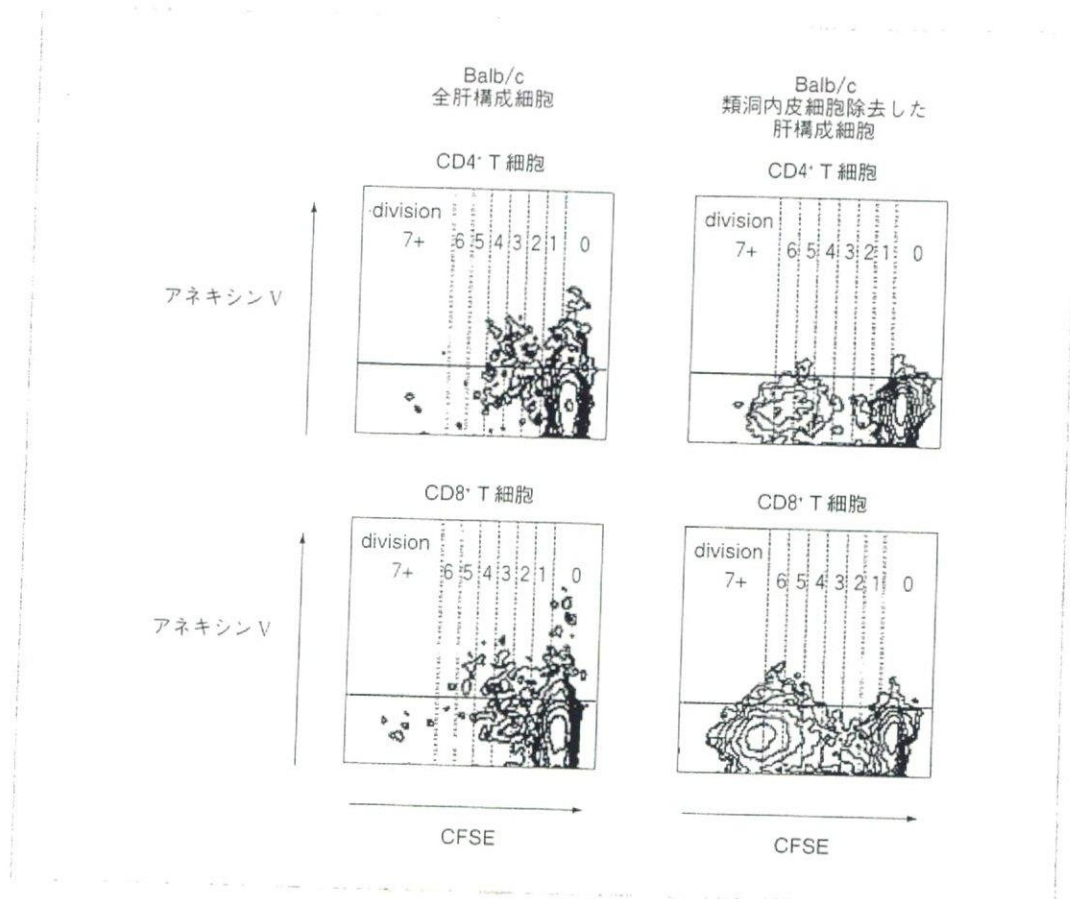


図1 肝臓内皮細胞を除去した肝臓細胞を用いたCFSE-MLR実験結果

Balb/cマウスの肝臓構築細胞をスティミュレーターに、B6の脾リンパ球をレスポンドーに用い、CFSE-MLRアッセイによってアロ反応性のCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖指数と存在比率を解析した。肝構築細胞のすべてをスティミュレーターとしてCFSE-MLRをした場合、すなわち類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系T細胞はわずかながら分裂を認めたが、その分裂T細胞はすべてアネキシンV陽性で、分裂初期にアポトーシスに陥ることがわかった。類洞内皮細胞を反応系から除去すると激しいT細胞の分裂・増殖を認めた。

(文献13より引用)

反する報告がなされている。異系ラット間の肝移植モデルを用いた検討では、移植前にドナーをKupffer細胞阻害剤(gadolinium chloride)で処理すると、自然生着する組み合わせでは生着率に影響を認めなかったが、拒絶反応が生じる組み合わせでは生着延長効果が認められたことから、Kupffer細胞は移

植後の寛容誘導ではなくむしろ拒絶誘導に関連すると考察されている<sup>9)</sup>。一方、同じく異系ラット間肝移植モデルで、長期生着した肝臓から分離したKupffer細胞にはFasリガンドが発現しドナー反応性T細胞にアポトーシスを誘導すること、さらに抗ドナーリンパ球混合試験(MLRアッセイ)に添

加するとTh2サイトカインを産生することから、Kupffer細胞は肝移植後のドナー特異的免疫寛容に重要な役割を果たすとの見解もある<sup>9)</sup>。

異系ドナー細胞の門脈内投与によってT細胞のドナー特異的低反応性が誘導される現象も、肝臓が免疫寛容にかかわる臓器であると考えられる根拠

のひとつである。この、門脈内投与によって誘導される免疫抑制効果は、gadolinium chloride の前投与によって消失することから、Kupffer 細胞が重要な役割を果たす可能性が指摘されている<sup>10)</sup>。また、門脈内投与後には、Kupffer 細胞からの PGE 2 産生が亢進することも報告されている<sup>11)</sup>。

われわれはマウスを用い、肝臓の構築細胞を分離精製してそれぞれの免疫原性を解析した結果、非実質細胞群から抽出した類洞内皮細胞が寛容誘導特性を有することが明らかとなった<sup>12)</sup>。類洞内皮細胞のフェノタイプを解析すると、MHC クラス II、共刺激分子 (CD 80 と CD 86)、細胞死誘導分子 (Fas リガンド) を発現していた。ドナーマウス (Balb/c) の肝臓構築細胞をステミュレーターに、レシピエントマウス (B 6) の脾リンパ球をレスポonder に用い、carboxyfluorescein diacetate succimidyl ester (CFSE)-細胞質染色法を用いたリンパ球混合試験によって、アロ反応性の CD 4<sup>+</sup> および CD 8<sup>+</sup> T 細胞の増殖指数と存在比率を解析した (図 2)。肝構築細胞のすべてをステミュレーターとして MLR をした場合、同種異系の組み合わせでも T 細胞の分裂を認めなかった。ところが、類洞内皮細胞を反応系から除去すると激しい T 細胞の分裂/増殖を認め、類洞内皮細胞が T 細胞性アロ応答を抑制していることが判明した。また、類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系 T 細胞はわずかながら分裂を認めたが、その分裂 T 細胞はすべてアネキシン V 陽性で、分裂初期にアポ

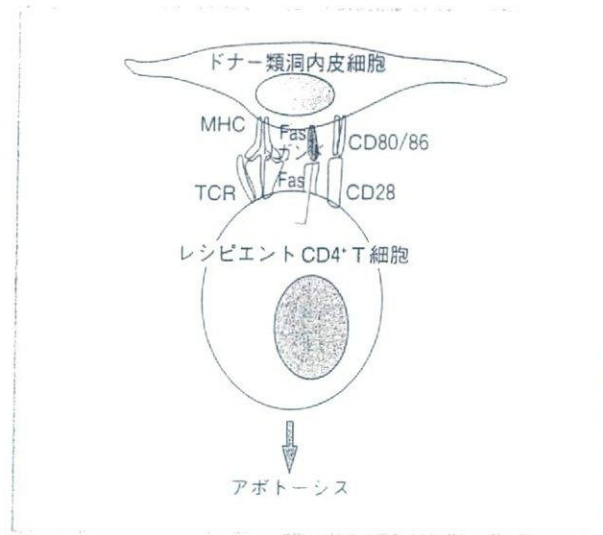


図 4 肝類洞内皮細胞からアロ抗原を認識した CD4<sup>+</sup> T 細胞は Fas/Fas リガンド経路を介してアポトーシスを来す

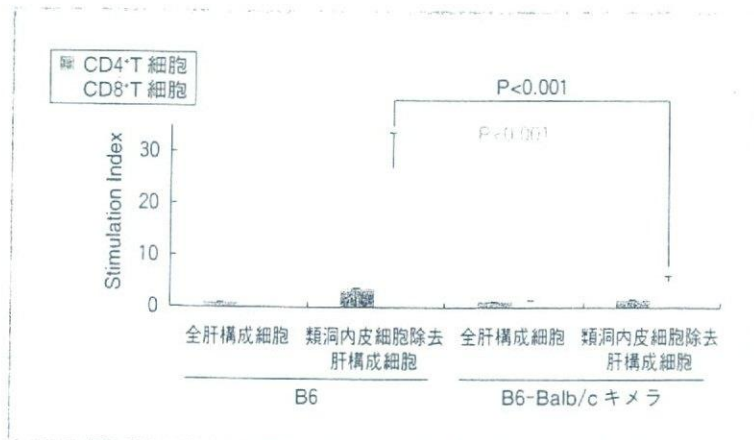


図 5 放射線照射後 B6 マウスの骨髄を置換した Balb/c マウスに肝臓内 Kupffer 細胞を樹状細胞の B6 由来成分を移植させた

この B6 → Balb/c キメラの肝構築細胞をステミュレーターに、B6 リンパ球をレスポonder に用い MLR アッセイを行った。類洞内皮細胞の非存在下であっても CD 4<sup>+</sup> および CD 8<sup>+</sup> T 細胞の増殖は認められず、Kupffer 細胞や樹状細胞は、寛容誘導よりもむしろ免疫応答の惹起に作用する。

(文献 13 より引用)

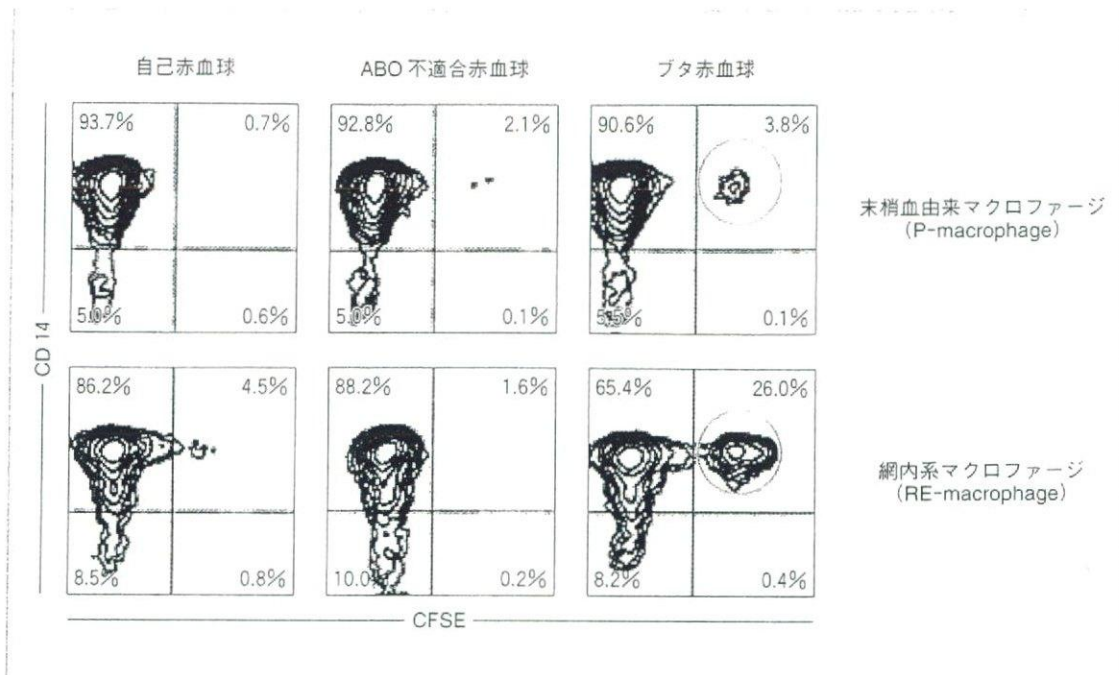


図5. 末梢血由来マクロファージと網内系マクロファージの貪食能を測定した。

細胞質染色蛍光色素 CFSE でブタ細胞をラベル後に PMA 刺激マクロファージと共培養。CD 14 陽性細胞(ヒトマクロファージ)の CFSE 蛍光強度により貪食能が定量しうる。同種同系赤血球、同種異系(血液型不適合)赤血球、異種(ブタ)赤血球に対する末梢循環血液中のマクロファージと網内系マクロファージ(Kupffer 細胞)の貪食作用をフローサイトメーターで判定した。

(文献 15 より引用)

トーシスに陥ることがわかった(図4)。 Fas リガンド-ノックアウトマウス(Balb/c)類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系 T 細胞には激しい分裂/増殖を認め、類洞内皮細胞上に表出する Fas リガンドの寛容誘導への関与が証明された(図4)<sup>14)</sup>。また、放射線照射後 B 6 マウスの骨髄で置換した Balb/c マウスの肝臓内 Kupffer 細胞や樹状細胞は、B 6 由来に完全置換されるが、この B 6 → Balb/c キメラ肝臓の構築細胞をスティミュレーターに、B 6 リンパ球をレスポナーに用い MLR アッセイを行った。その結果、類洞内皮細胞の非存在下であっても

CD 4<sup>+</sup> および CD 8<sup>+</sup> T 細胞の増殖は認められず、Kupffer 細胞や樹状細胞は、寛容誘導よりもむしろ拒絶応答の惹起に作用する可能性が支持された(図5)。しかし、類洞内皮細胞の寛容特性に Kupffer 細胞や樹状細胞からのメディエーターが何らかの役割を果たす可能性は残る。

### 3 異種移植における Kupffer 細胞の役割

異種臓器および細胞が長期間生着しない理由のひとつに、マクロファージの細胞傷害性が関与することが指摘されているが、詳細な機序は解明されて

いない<sup>14)</sup>。マクロファージによる異種細胞傷害機構は、抗体依存性と非依存性に分けられる。抗体依存性傷害機構にはブタ移植細胞・臓器は細胞上の表出する Galα1, 3 Gal (Gal) 抗原に対するヒト血清中の自然抗体(抗 Gal 抗体)が主要な働きを担う。ブタ細胞に抗体が結合し、Fc 受容体を介したマクロファージの直接傷害機構が作動する。また古典経路からの補体活性化がマクロファージを動員する。これらの抗 Gal 抗体依存性応答は、最近開発された Gal ノックアウトブタの使用によって回避される可能性がある。しかし、ヒト Kupffer 細胞は、抗体・補



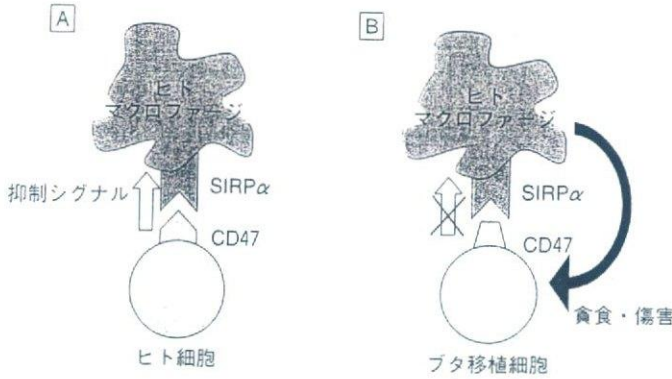


図1 CD47-SIRP $\alpha$ シグナル伝達機構

マクロファージの阻害受容体シグナル制御蛋白 $\alpha$  (SIRP $\alpha$ )が赤血球上のCD47(インテグリン関連蛋白)を認識し非特異的活性化を抑制する。ブタCD47はヒトCD47と比較して遺伝子塩基配列相同性が低い(73%)。異種間ではCD47-SIRP $\alpha$ によるシグナル伝達が作動せず、非特異的傷害活性が抑制されず、マクロファージによる貪食を免れない可能性がある。

体非依存性にブタ細胞を貪食・傷害することをわれわれは確認した(図1)<sup>15)</sup>。さらにKupffer細胞は、Gal抗原を欠損したブタ細胞も強く貪食したことから、Galノックアウトブタを用いた移植でもヒトマクロファージ性の拒絶機構は免れない可能性が懸念される。

マクロファージの自己寛容機構として、赤脾髄マクロファージの阻害受容体シグナル制御蛋白 $\alpha$  (SIRP $\alpha$ )が赤血球上のCD47(インテグリン関連蛋白)を認識し非特異的活性化を抑制することが報告されている<sup>16)17)</sup>。CD47分子はほとんどの生体組織に表出されており、ブタの細胞も表出する。しかしヒトCD47と遺伝子塩基配列を比較したところ、相同性が低く(73%)、異種間ではCD47-SIRP $\alpha$ によるシグ

ナル伝達が作動せず、非特異的傷害活性が抑制されず、マクロファージによる貪食を免れない可能性があるのではないかとわれわれは考えている(図1)。

### 肝虚血再灌流障害における Kupffer 細胞の役割

類洞内皮細胞はエンドセリンや一酸化窒素を産生し、星細胞(伊東細胞)の収縮、弛緩運動を介して血流を調節している。肝虚血再灌流を被ると、Kupffer細胞や好中球からのメディエーターが作用して類洞内皮細胞のエンドセリン産生を亢進し、星細胞が収縮し肝微小循環障害が惹起されることをわれわれは明らかにした<sup>18)19)</sup>。Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase (ROCK)は星

細胞の運動性を調整する重要な因子であるが、p160 ROCKの特異的抑制剤(Y-27632)の投与は、ラット肝移植モデルで温阻血を被ったグラフトの生着を著明に改善した。Kupffer細胞を介する温阻血再灌流障害機構には、TLR-4を介した自然免疫系の活性化による炎症応答が関連することも最近報告された<sup>20)</sup>。

肝血流の短時間遮断/再灌流を繰り返す肝阻血プレコンディショニングは、肝移植における冷保存再灌流傷害後の肝類洞内皮細胞の障害やKupffer細胞の活性化を抑制し、移植肝生着率を改善することが報告されている。さらにこの手法は、温阻血再灌流傷害において、肝細胞の保護効果を有することが知られている。ラットでは肝温阻血再灌流傷害前に、gadolinium chlorideでKupffer細胞の活性を抑制すると、肝類洞内皮細胞の障害は軽減されないが、肝細胞傷害は軽減する。この肝細胞保護効果は、Kupffer細胞から産生されるreactive oxygen species (ROS)を介すると報告された<sup>21)</sup>。このように、Kupffer細胞は類洞内皮細胞障害と肝細胞保護という相反する機構を司る可能性がある。

### 肝再生における Kupffer 細胞の役割

肝再生は肝障害や肝切除を原因とした肝容積の減少によって誘導され、肝容積の回復によって終了する。肝再生の一連のプロセスは、種々のサイトカインや増殖因子によって厳密に制御されている。肝臓はTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、

IL-6 といった炎症性サイトカインの標的臓器であるが、これらのサイトカインは肝切除後、速やかに肝非実質細胞から放出される<sup>22)23)</sup>。IL-6 は障害臓器局所に誘導される多機能なサイトカインで、肝再生においては転写を促進させ肝細胞を静止期(G0期)から前増殖期(G1期)に移行させる。G1期となった肝細胞は増殖因子刺激によってS期に移行してDNA合成が誘導される。IL-6で誘導されるG0期の肝細胞がG1期に移行するプライミングステップは、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor : HGF)やトランスフォーミング増殖因子(transforming growth factor : TGF)- $\alpha$  といった増殖因子刺激によってS期に移行するために必須である<sup>22)24)</sup>。

有事におけるKupffer細胞からのIL-6とTNF- $\alpha$ の産生亢進と核内因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)の活性化に起因する肝再生には、ICAM-1の接着がトリガーになること<sup>25)</sup>、そしてTLRs/Myeloid differentiation factor 88シグナルが必須であることなどが最近報告された<sup>26)</sup>。

このような研究成果から、肝細胞増殖のプライミングに関連したIL-6やTNF- $\alpha$ などのサイトカインを肝再生治療薬として応用しうるか否かが注目を集め、今後の研究の進展が待たれる。

#### 参考文献

- 1) Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, et al : The liver as a site of T-cell apoptosis : graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 174 : 47-62, 2000
- 2) Kmiec Z : Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 161 : 1-151, 2001
- 3) Crispe IN : Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3 : 51-62, 2003
- 4) Wiegand C, Frenzel C, Herkel J, et al : Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Hepatology* 42 : 193-199, 2005
- 5) Calne RY, Sells RA, Pena JR, et al : Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223 : 472-476, 1969
- 6) Zimmermann FA, Davies HS, Knoll PP, et al : Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft. *Transplantation* 37 : 406-410, 1984
- 7) Zavazava N, Kronke M : Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 2 : 1005-1010, 1996
- 8) Savier E, Lemasters JJ, Thurman RG : Kupffer cells participate in rejection following liver transplantation in the rat. *Transpl Int* 7 (Suppl 1) : S183-186, 1994
- 9) Sun Z, Wada T, Maemura K, et al : Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl* 9 : 489-497, 2003
- 10) Yu S, Nakafusa Y, Flye MW : *In vitro* analysis of gadolinium chloride abrogation of the systemic tolerance induced by portal venous administration of ultraviolet B-irradiated donor cells. *Transplantation* 64 : 1684-1688, 1997
- 11) Perez RV, Swanson C, Morgan M, et al : Portal venous transfusion up-regulates Kupffer cell cyclooxygenase activity : a mechanism of immunosuppression in organ transplantation. *Transplantation* 64 : 135-139, 1997
- 12) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, et al : Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers. *Transpl Int* 18 : 206-214, 2005
- 13) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, et al : Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol* 175 : 139-146, 2005
- 14) Basker M, Alwayn IP, Buhler L, et al : Clearance of mobilized porcine peripheral blood progenitor cells is delayed by depletion of the phagocytic reticuloendothelial system in baboons. *Transplantation* 72 : 1278-1285, 2001
- 15) Ide K, Ohdan H, Kobayashi T, et al : Antibody- and complement-independent phagocytotic and cytolytic activities of human macrophages toward porcine cells. *Xenotransplantation* 12 : 181-188, 2005
- 16) Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, et al : Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288 : 2051-2054, 2000
- 17) Oldenburg PA, Gresham HD, Lindberg FP : CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med* 193 : 855-862, 2001
- 18) Mizunuma K, Ohdan H, Tashiro H, et al : ROCK inhibitor Y-27632 prevents primary graft non-function caused by warm ischemia/reperfusion in rat liver transplantation. *Transpl Int* 15 : 623-629, 2002
- 19) Mizunuma K, Ohdan H, Tashiro H, et al : Prevention of ischemia-

- reperfusion-induced hepatic micro-circulatory disruption by inhibiting stellate cell contraction using rock inhibitor. *Transplantation* 75 : 579-586, 2003
- 20) Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, et al : Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR 4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol* 175 : 7661-7668, 2005
- 21) Tejima K, Arai M, Ikeda H, et al : Ischemic preconditioning protects hepatocytes via reactive oxygen species derived from Kupffer cells in rats. *Gastroenterology* 127 : 1488-1496, 2004
- 22) Takeishi T, Hirano K, Kobayashi T, et al : The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 62 : 413-422, 1999
- 23) Akita K, Okuno M, Enya M, et al : Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF-alpha/kallikrein-mediated activation of latent TGF-beta. *Gastroenterology* 123 : 352-364, 2002
- 24) Aldeguer X, Debonera F, Shaked A, et al : Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* 35 : 40-48, 2002
- 25) Selzner N, Selzner M, Odermatt B, et al : ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology* 124 : 692-700, 2003
- 26) Seki E, Tsutsui H, Iimuro Y, et al : Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology* 41 : 443-450, 2005

# 肝類洞内皮細胞の 免疫寛容誘導への関わり

大段秀樹, 尾上隆司, 時田大輔, 志々田将幸, 田中友加, 浅原利正  
広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学

## はじめに

肝臓は免疫寛容獲得に関わる臓器として知られるが、なぜ同種異系移植肝が拒絶されにくいのか、説得力のある検証はいまだなされていない。さまざまな動物種において主要組織適合性抗原 (MHC) が異なる同種異系肝移植を施行した際に、移植後の免疫抑制剤を使用しなくても移植肝に対する拒絶反応が起こらず、容易に生着する現象は以前より観察されている<sup>1,2)</sup>。また、ドナーからの移植肝が生着しているレシピエントに、ドナーと同系の他臓器を移植しても拒絶反応は生じないことから、肝移植が成立したドナーに対しては免疫学的寛容が誘導されるものと考えられている<sup>3,4)</sup>。

このような肝移植後に誘導される免疫寛容には、肝臓が産生する免疫抑制因子 (可溶性 MHC クラス I 分子など) の作用<sup>5)</sup>や、移植肝内に存在する樹状細胞、Kupffer 細胞や類洞内皮細胞などの抗原提示細胞とレシピエントの T 細胞との相互作用が関与する可能性が指摘されている<sup>6,7)</sup>。

肝内樹状細胞は、共刺激分子の表出が弱く、Th2 優位の T 細胞応答を誘導することが報告されていることから、同種異系肝移植後の免疫寛容に深く関連する可能性が示唆されている<sup>8,10)</sup>。一方、肝移植後の免疫応答における Kupffer 細胞の役割に関しては、相反する報告がなされている。異系ラット間の肝移植モデルを用いた検討では、移植前にドナーを Kupffer 細胞阻害剤 (gadolinium chloride) で処理すると、自然生着する組み合わせでは生着率に影響を認めなかったが、拒絶反応が生じる組み合わせでは生着延長効果が

認められたことから、Kupffer 細胞は移植後の寛容誘導ではなく、むしろ拒絶誘導に関連すると考察している<sup>11)</sup>。また、同じく異系ラット間肝移植モデルで長期生着した肝臓から分離した Kupffer 細胞には、Fas リガンドが発現しドナー反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導すること、さらに抗ドナーリンパ球混合試験 (MLR assay) に添加すると Th2 サイトカインを産生することから、Kupffer 細胞は肝移植後のドナー特異的寛容に重要な役割を果たすとの見解もある<sup>12)</sup>。

類洞内皮細胞については、同種異系肝移植後の免疫応答に関わる役割を直接解析した報告はなく、一定の見解が得られていなかった。われわれは、マウスの肝臓構築細胞を分離してそれぞれの免疫原性を解析した結果、非実質細胞群から抽出した類洞内皮細胞が寛容誘導特性を有することを確認した<sup>13,14)</sup>。

## 肝構成細胞の

### 同種異系免疫原性の解析系

コラゲナーゼ灌流法で分離した肝構築細胞と同種異系リンパ球の混合培養試験を確立した。リンパ球は carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 色素で細胞質染色した。ドナーマウス (Balb/c) の肝臓構築細胞を stimulator に、レシピエントマウス (B6) の脾リンパ球を responder に用い MLR assay<sup>15,16)</sup>によって、アロ反応性の CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖指数と存在比率を解析した (図 1)。

肝構築細胞のすべてを stimulator として MLR をした場合、同種異系の組み合わせでも T 細胞の分裂を認めなかった。ところが、類洞内皮細胞 (肝内では、類洞内皮細胞のみに CD105 の表出を認めた) を反応

系から除去すると、激しいT細胞の分裂/増殖を認め、類洞内皮細胞がT細胞性アロ応答を抑制していることが判明した<sup>13)</sup>。また、類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系T細胞は僅かながら分裂を認めたが、その分裂T細胞は全てアネキシンV陽性で、分裂初期にアポトーシスに陥ることが判った(図2)。

**肝内の骨髄由来細胞は細胞応答を促進する**

放射線照射後B6マウスの骨髄で置換したBalb/cマウスの肝臓内Kupffer細胞や樹状細胞は、B6由来に完全置換されるが、このB6→Balb/cキメラの肝臓構築細胞をstimulatorに、B6リンパ球をresponderに用いMLR assayを行った(図3)。その結果、類洞内皮細胞の非存在下であってもCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖は認められず、Kupffer細胞や樹状細胞は、寛容誘導よりもむしろ拒絶応答の惹起に作用する可能性が支持された<sup>14)</sup>。しかし、類洞内皮細胞の寛容特性

にKupffer細胞や樹状細胞からのメディエーターが何らかの役割を果たす可能性は残る。

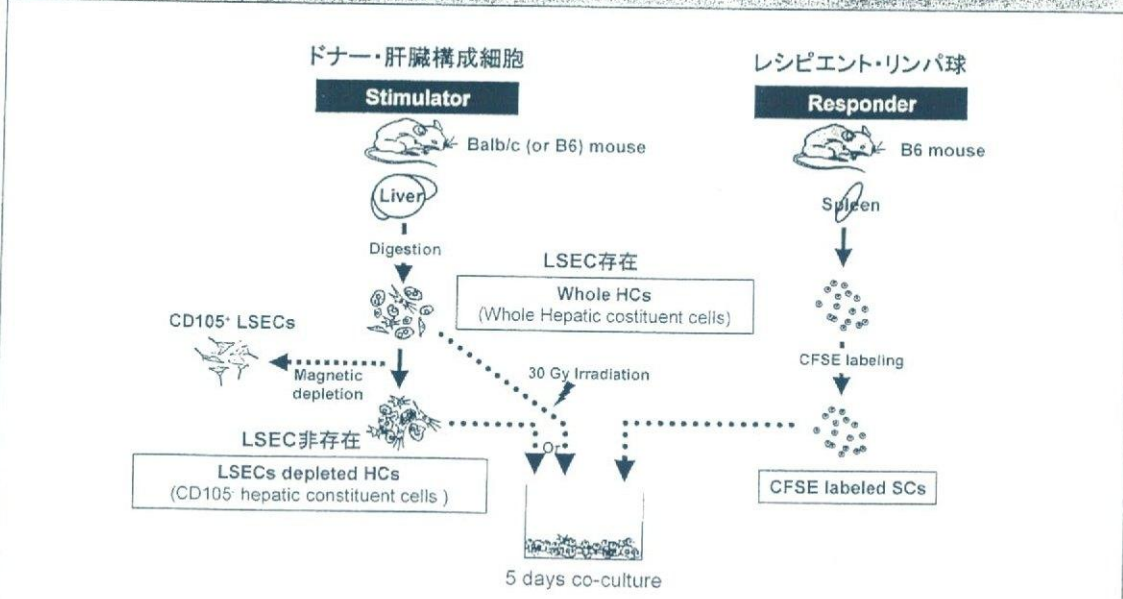
**類洞内皮細胞はナイーブな状態で Fas ligand を表出する**

類洞内皮細胞のフェノタイプを解析すると、MHCクラスII, 共刺激分子(CD40, CB80, CD86), 細胞死誘導分子(Fas ligand)を発現していた(図4)。

**ドナータイプの類洞内皮細胞と接触したT細胞は、ドナータイプの抗原提示に対して不応答化する**

フィブロネクチンでコートしたpore membraneにB6, Balb/c, Balb/c-gld(Fas ligand-deficient)あるいはSJL/Jマウス由来の類洞内皮細胞を接着培養し、肝類洞内皮の解剖構築を模倣した*in vitro*解析系を確立した(図5A)。CFSE色素でラベルしたB6マウスのT細胞を重層培養しトランスマイグレートさせた後(trans-

図3 肝臓内皮細胞の存在下でのT細胞の増殖抑制の解析系



Hcs:hepatic constituent cells, LSECs:liver sinusoidal endothelial cells

Balb/cマウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流で消化し肝臓構成細胞に分離した。肝内では類洞内皮細胞(liver sinusoidal endothelial cells:LSEC)のみにCD105の表出を認めるため、この分子をマーカーにしてマグネティックソーティング法で類洞内皮細胞を分離した。調整した肝構成細胞を放射線照射(30 Gy)し、carboxyfluorescein diacetate succimidyl ester(CFSE)で蛍光染色したB6の脾リンパ球と混合培養した。この解析系を用い、アロ肝構成細胞に対する反応性CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖指数と存在比率および分裂後細胞死の有無が定量的に評価できる。

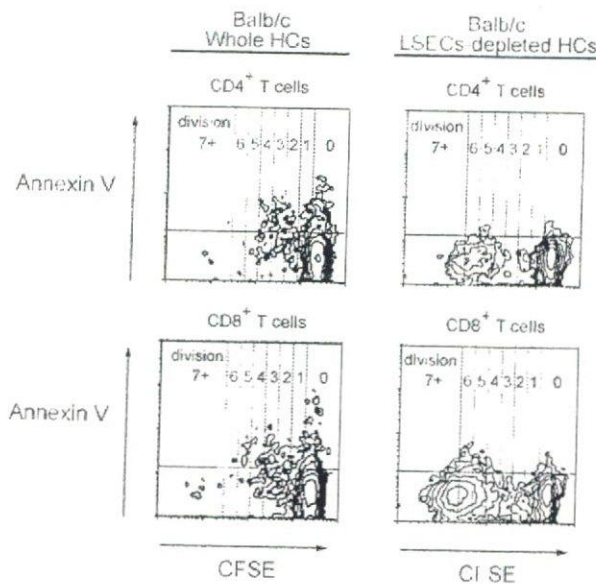
migration assay), 放射線照射した Balb/c マウスの脾細胞と混合培養し MLR assay を行った。

Balb/c の類洞内皮細胞層を接触通過した T 細胞は, Balb/c 脾細胞抗原の刺激に対して不応答化した<sup>9</sup>, B6 および SJL/j の類洞内皮細胞層を接触通過した T 細胞は, Balb/c 脾細胞抗原の刺激に対して正常の応答を示した。また, Balb/c-gld の類洞内皮細胞層を接触通過した T 細胞は, Balb/c 脾細胞抗原の刺激に対して部分的な応答を示した (図 5B)<sup>14</sup>。類洞内皮細胞上に表出する Fas ligand が特に CD4<sup>+</sup>T 細胞の寛容誘導へ重要な役割を果たすことが証明された。Balb/c-gld の類洞内皮細胞層を接触通過した CD8<sup>+</sup>T 細胞は, Balb/c 脾細胞抗原の刺激に対して有意な応答抑制を示し, CD8<sup>+</sup>T 細胞の寛容誘導には Fas ligand 経路以外の機序も関与する可能性が考えられた (図 6)。

### 類洞内皮細胞における間接認識経路による同種異系抗原認識と T 細胞寛容の可能性

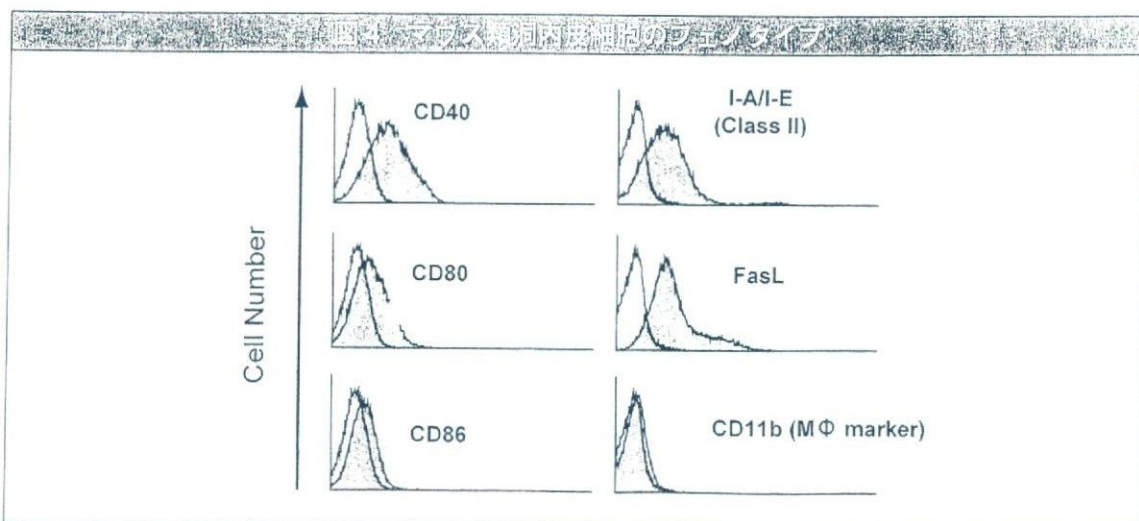
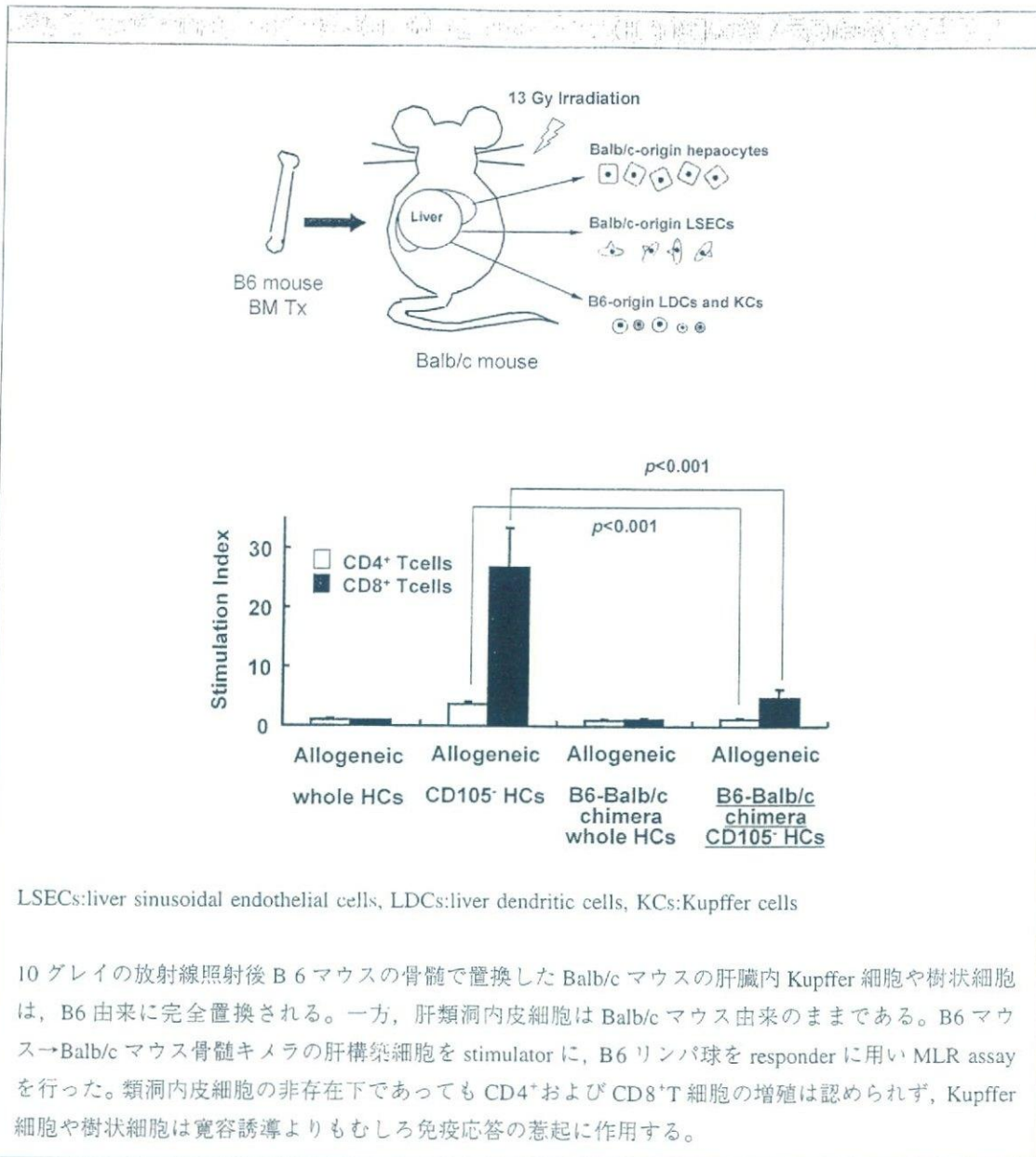
肝臓あるいは肝細胞移植後の拒絶機構には, レシピエントの T 細胞が移植肝臓内のドナー由来抗原提示細胞から主要組織適合性抗原 (MHC) を直接認識する経路と, レシピエント自身の APC から移植肝臓内由来のドナー抗原を間接認識する経路がある。

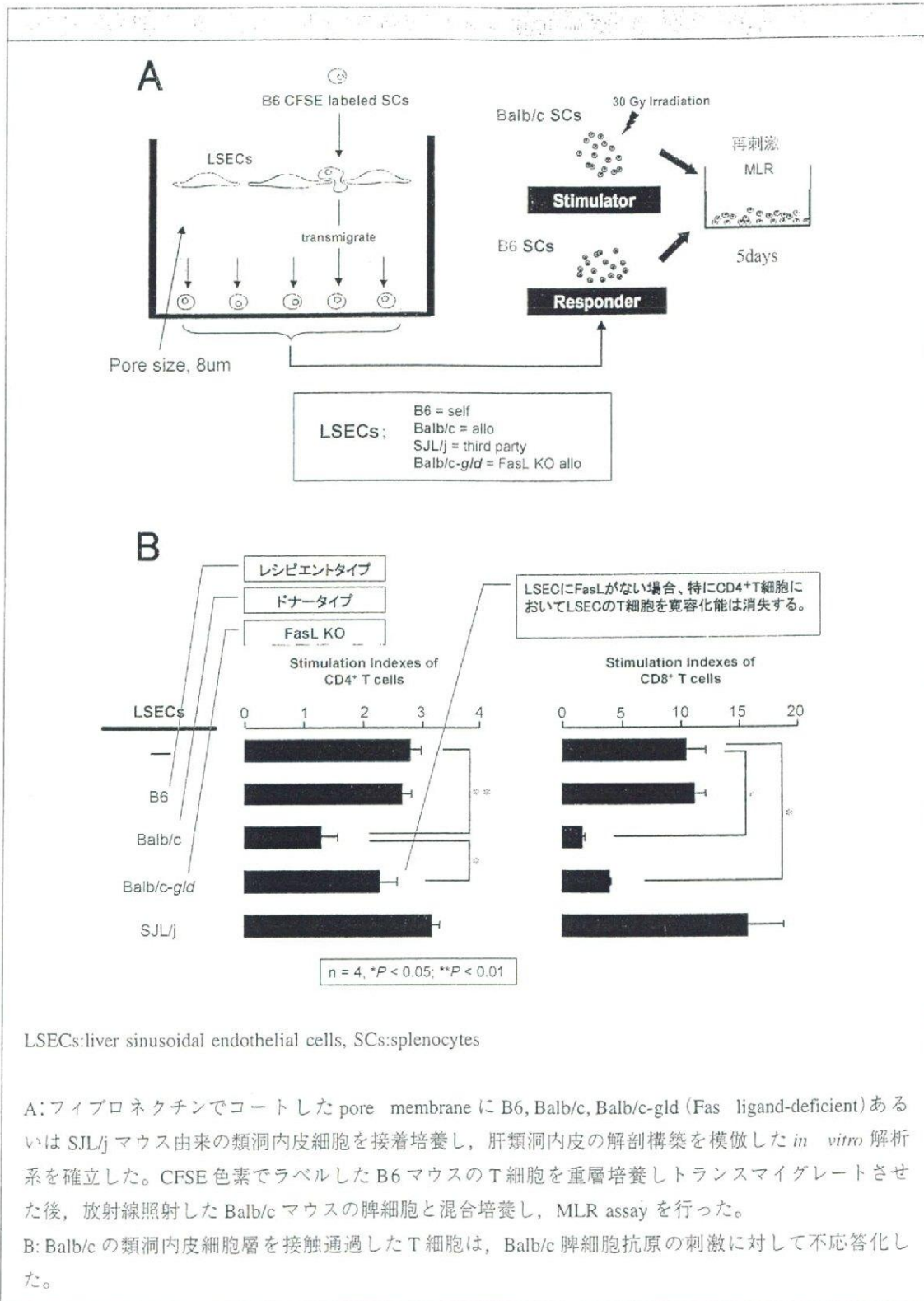
移植抗原に対する免疫寛容の誘導には, それぞれの経路で抗原提示される T 細胞を制御しなければならない。本稿では, マウス肝類洞内皮細胞によって抗原提示された異系 T 細胞 (直接認識) は免疫寛容が誘導されることを報告した。また最近, マウス肝類洞内皮細胞が外来アロ抗原を提示し, 反応性 T 細胞を寛容化することが報告されている<sup>17-20</sup>。われわれも, アロ抗原を貪食したマウス肝類洞内皮細胞によって抗原提示された同系 T 細胞 (間接認識) にも, 免疫寛容が誘導されることを確認した<sup>21</sup>。



Hcs:hepatic constituent cells, LSECs:liver sinusoidal endothelial cells

Balb/c マウスの肝臓構築細胞を stimulator に, B6 の脾リンパ球を responder に用い, CFSE-MLR assay によってアロ反応性の CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖指数と存在比率を解析した。肝構築細胞のすべてを stimulator として CFSE-MLR をした場合, すなわち類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系 T 細胞はわずかながら分裂を認めたが, その分裂 T 細胞はすべてアネキシン V 陽性で, 分裂初期にアポトーシスに陥ることが分かった。類洞内皮細胞 (LSEC) を反応系から除去すると激しい T 細胞の分裂/増殖を認めた。



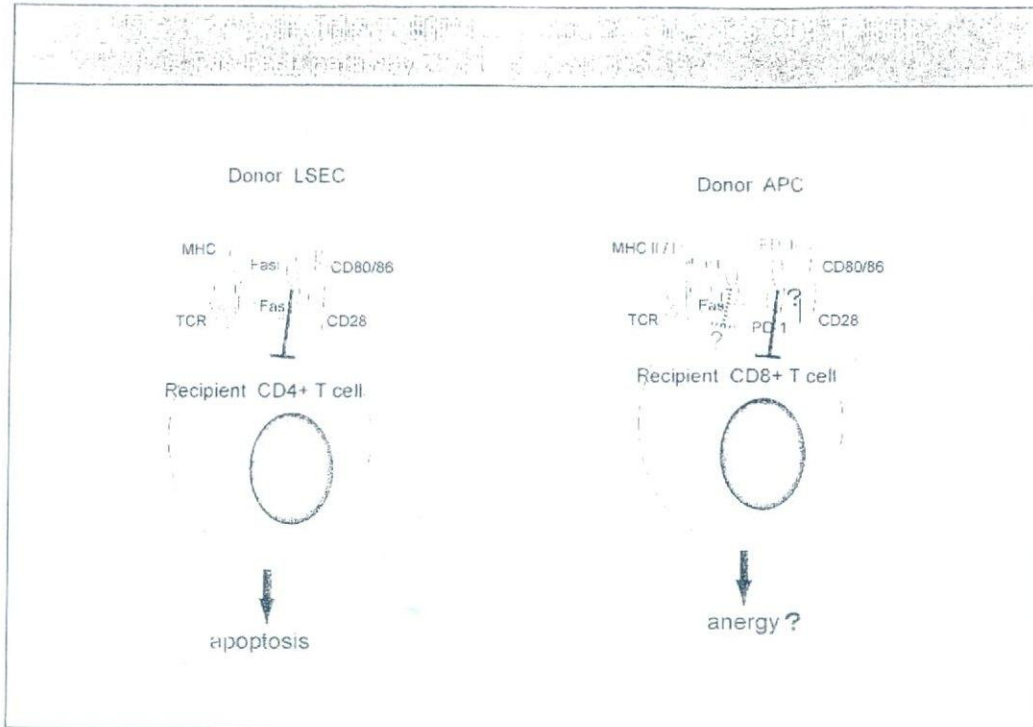


以上の知見は、肝類洞内皮細胞は、門脈内アロ抗原/細胞移入後に観察されるドナー特異的寛容にも重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

### ヒト類洞内皮細胞の免疫調節機構は？

ヒト肝類洞内皮細胞のフェノタイプを解析すると、マウスの肝類洞内皮細胞に認められたような MHC ク





ラスII, CD80, CD86, Fas ligand分子は正常状態では発現しておらず、マウスで確認された上述のようなアロT細胞の寛容化機構はヒト肝移植では発動しにくいのではないかと推察される。マウスではアロ移植肝の永久生着に免疫抑制剤を必要としないのに対し、ヒトでは免疫抑制剤の使用が必須である所以のひとつではないかとわれわれは考えている。

ヒト肝類洞内皮細胞に人為的にMHCクラスII, CD80, CD86, Fas ligand分子を発現させる安全な方法が確立できれば、マウスにおいて観察されるような肝移植後のドナー特異的免疫寛容が、臨床肝移植においても誘導できるのではないかと考え、研究を継続している。

謝辞：寄稿の機会をいただいた小林英司教授に深謝する。

文 献

- 1) Calne RY, Sells RA, Pena JR, *et al.* Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 1969; 223: 472-476.
- 2) Zimmermann FA, Davies HS, Knoll PP, *et al.* Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft. *Transplantation* 1984; 37: 406-410.
- 3) Qian S, Demetris AJ, Murase N, *et al.* Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 1994; 19: 916-924.
- 4) Kamada N, Davies HS, Roser B. Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* 1981; 292: 840-842.
- 5) Kamada N. The immunology of experimental liver transplantation in the rat. *Immunology* 1985; 55: 369-389.
- 6) Zavazava N, Kronke M. Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 1996; 2: 1005-1010.
- 7) Starzl TE, Murase N, Ildstad S, *et al.* Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992; 339: 1579-1582.
- 8) Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, *et al.* The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 2000; 174: 47-62.
- 9) Khanna A, Morelli AE, Zhong C, *et al.* Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 164: 1346-1354.
- 10) Morelli AE, O'Connell PJ, Khanna A, *et al.* Preferential induction of Th1 responses by functionally mature hepatic (CD8 alpha-and CD8 alpha+) dendritic

- cells: association with conversion from liver transplant tolerance to acute rejection. *Transplantation* 2000; 69: 2647-2657.
- 11) Savier E, Lemasters JJ, Thurman RG. Kupffer cells participate in rejection following liver transplantation in the rat. *Transpl Int* 1994; 7 (Suppl 1): S183-S186.
  - 12) Sun Z, Wada T, Maemura K, *et al.* Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl* 2003; 9: 489-497.
  - 13) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers. *Transpl Int* 2005; 18: 206-214.
  - 14) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol* 2005; 175: 139-146.
  - 15) Onoe T, Ohdan H, Ochi M, *et al.* Multiparameter flow cytometric mixed lymphocyte reaction assay using fluorescent cytoplasmic dye for assessing phenotypic property of T cells responding to allogeneic stimulation. *Transplant Proc* 2003; 35: 557-558.
  - 16) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, *et al.* Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. *Immunol Invest* 2004; 33: 309-324.
  - 17) Limmer A, Ohl J, Kurts C, *et al.* Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000; 6: 1348-1354.
  - 18) Knolle PA, Limmer A. Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol* 2001; 22: 432-437.
  - 19) Knolle PA, Germann T, Treichel U, *et al.* Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 1999; 162: 1401-1407.
  - 20) Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 51-62.
  - 21) Tokita D, Ohdan H, Onoe T, *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int* 2005; 18: 237-245.

## 特集「ウイルス肝炎の肝移植」

肝移植後の C 型肝炎ウイルス  
再感染の現状と課題

市田隆文, 森 広樹, 菊池 哲, 阿部哲史,  
石川雅邦, 村上ロミ, 成田諭隆, 小川 薫  
順天堂大学医学部附属静岡病院消化器内科

## はじめに

最近, 欧米を中心に C 型肝炎ウイルス (HCV) 陽性レシピエントが肝移植後, 比較的早期に肝硬変に進展し, 短期間のうちに非代償性肝硬変に進行し, その長期予後に深刻な影響を与えることが報告されている<sup>1,2)</sup>。

同じことが生体肝移植を主とするわが国の肝移植医療でも言えるのであろうか, 極めて興味深い。そこで, 本稿では HCV 陽性肝移植レシピエントの肝移植後の再感染に関して, 欧米とわが国の成績をまとめ, その課題に関して述べることにする。

## HCV の再感染と肝炎発症

肝移植手術の数時間後から, 遅くとも数日後には HCV のダイナミックな複製が開始することが知られている<sup>3)</sup>。そして, 極めて短期間で血中 HCV RNA は増加し, 時に高力価を呈することが知られている。しかしながら, HCV の再感染といわゆる肝炎発症とは必ずしも明確に区別されず, 事実, 移植後の多くの因子が複雑に絡み合っている状況で, 純粋な急性 C 型肝炎を確診することは少ない。現実的には, 肝生検で慢性肝炎の診断が下されることのほうが多いと認識されている。

## HCV レシピエントの肝移植後の臨床経過

肝移植後の HCV 陽性レシピエントは以下の 4 群に分けられる。①再感染後, トランスアミナーゼ値の動

揺は軽微で, 通常見られる C 型慢性肝炎と同様の臨床経過をたどる例と, ②短期間に肝硬変に進展し, 早期に非代償性肝硬変まで進行する例<sup>4,6)</sup>が存在し, 平均的には 5 年間で 8-25% は肝硬変へ進展する<sup>7)</sup>とされている。さらに, ③肝移植後, 早期に HCV の顕著な増殖とともに胆汁うっ滞と進行性の線維症をみる fibrosing cholestatic hepatitis (FCH) や重症型肝炎の像を呈する例などにその臨床経過は分けられる。そして, ④数パーセントの症例であるが, なんら対処しなくても感染から免れる例もわずかながら存在する<sup>8,9)</sup>。

欧米の報告をまとめると, 最近では, 肝移植後, 肝硬変へ進展する頻度は 5 年間で 20-30%<sup>10)</sup>と極めて高率である。特に, ドナーの年齢 40 歳以下と 50 歳以上で線維化の進展は異なり, 平均 7.7 年で肝硬変へ進展したレシピエントは高齢者の場合はさらに早く 2.2 年の進行度であったとされている<sup>11)</sup>。すなわち, 肝移植後, HCV 再感染を生じたレシピエントは肝硬変への進展が極めて早いことが認識され出した。このことは 1990 年以降, HCV レシピエントの再移植例が増加している事実<sup>2)</sup>と合わせると, その事態の深刻さが理解されるであろう。

このように, いったん HCV に再感染し慢性肝炎に陥ったレシピエントが, 通常の慢性肝炎と異なり肝硬変への進展が極めて早いことは驚くべき事実である (図 1)<sup>1,6,12)</sup>。

## わが国における生体肝移植の HCV レシピエントの成績

信州大学外科の中澤<sup>13)</sup>が日本肝臓学会 Single Topic Conference でまとめたわが国の生体肝移植 HCV レシ

図1 移植後におけるHCV再感染と肝硬変の進展

	No. patients	Follow-up (months)	Histological recurrence (%)	Cirrhosis (%)
Prieto et al 1999(12)	81	32 (mean)	97	15
Feray et al 1999(6)	652	42 (mean)	80	10
Sanchez-Fueyos et al 2002(1)	122	43 (median)	95	23

(文献 1, 6, 12 参照)

組織学的再発と肝硬変への進展

ピエントの成績からみると、200例のレシピエントの生存率は1年78.8% 2年71.8% 4年68.2%であった<sup>13)</sup>。

一方、最新の日本肝移植研究会の報告では、HCVレシピエント167例の生存率は1年生存75.1%、3年生存70.1%、5年生存66.8%であり、18歳以上成人1,790例の生存率、1年生存78.0%、3年生存72.8%、5年生存69.8%、10年生存64.0%に比べると、その生存率が約3%劣っていることが判明した(図2)<sup>14)</sup>。統計学的にはなんら有意差はないとの判断である。

この報告をまとめると、わが国におけるHCV陽性レシピエントの生存率は約5年間で約5%劣る程度であると思われるが、欧米での検討では10年生存をうたっている以上、早急な結論を下すことはできない<sup>15)</sup>。しかしながら、欧米のそれほど、術後早期の肝硬変への進展はないようである。

## 線維化進展，硬変化の要因

### 1. ドナーとレシピエントの年齢

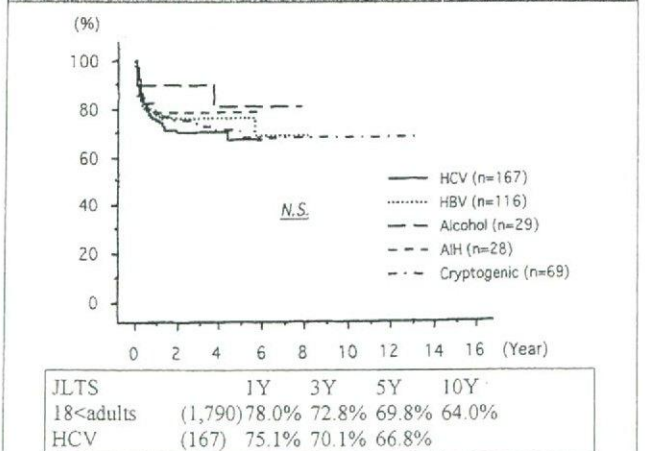
これらの原因の一つとして、ドナーの年齢の高齢化が挙げられている。Berenguerらの報告<sup>9)</sup>から、ここ数年間のドナーの高齢化が示唆されている。このことはELTR(ヨーロッパ肝移植登録)の脳死肝移植やアメリカの生体肝移植からの報告でも明らかである。

生体肝移植が中心のわが国ではドナーの年齢はいかなる関与があるのであろうか。一般的には、ドナーの年齢が高齢化すると、その肝移植成績、生存率は低下する。このことは日本肝移植研究会の報告でも、有意

な差を持って高齢者ドナーの生存率の低下をみる事ができる。

欧米の脳死、もしくは生体肝移植におけるドナー高齢化による肝移植後の成績の悪化の一つの可能性として、以下のことが考えられる。通常のHCV感染では、若年者の罹患後の状況と高齢者の罹患後の状況では、明らかに高齢者のほうが線維化や肝硬変への進展は急速で、また肝細胞癌の移行も早急であるとされている。この事実を鑑みると、高齢のドナー肝臓への大量のHCV感染が、線維化の進展に大いに関連があるこ

図2 生体肝移植における肝細胞癌発生の生存率



(日本肝移植研究会登録症例：文献 14 参照)

HCV：C型肝炎ウイルス陽性肝硬変，HBV：B型肝炎ウイルス陽性肝硬変，AIH：自己免疫性肝硬変，Alcohol：アルコール性肝硬変，Cryptogenic：原因不明肝硬変