

患者プロフィール

肝移植 (京都)

●免疫寛容群(免疫抑制剤完全中止)

15名(男3,女12) 年齢:10±4才 移植後:8±3年

現疾患 胆道閉鎖症13名、その他2名

●コントロール群(非移植正常肝)

12名

ドナー年齢 33±7才

小腸移植 (ルーベン)

●免疫寛容群 (prope tolerance)

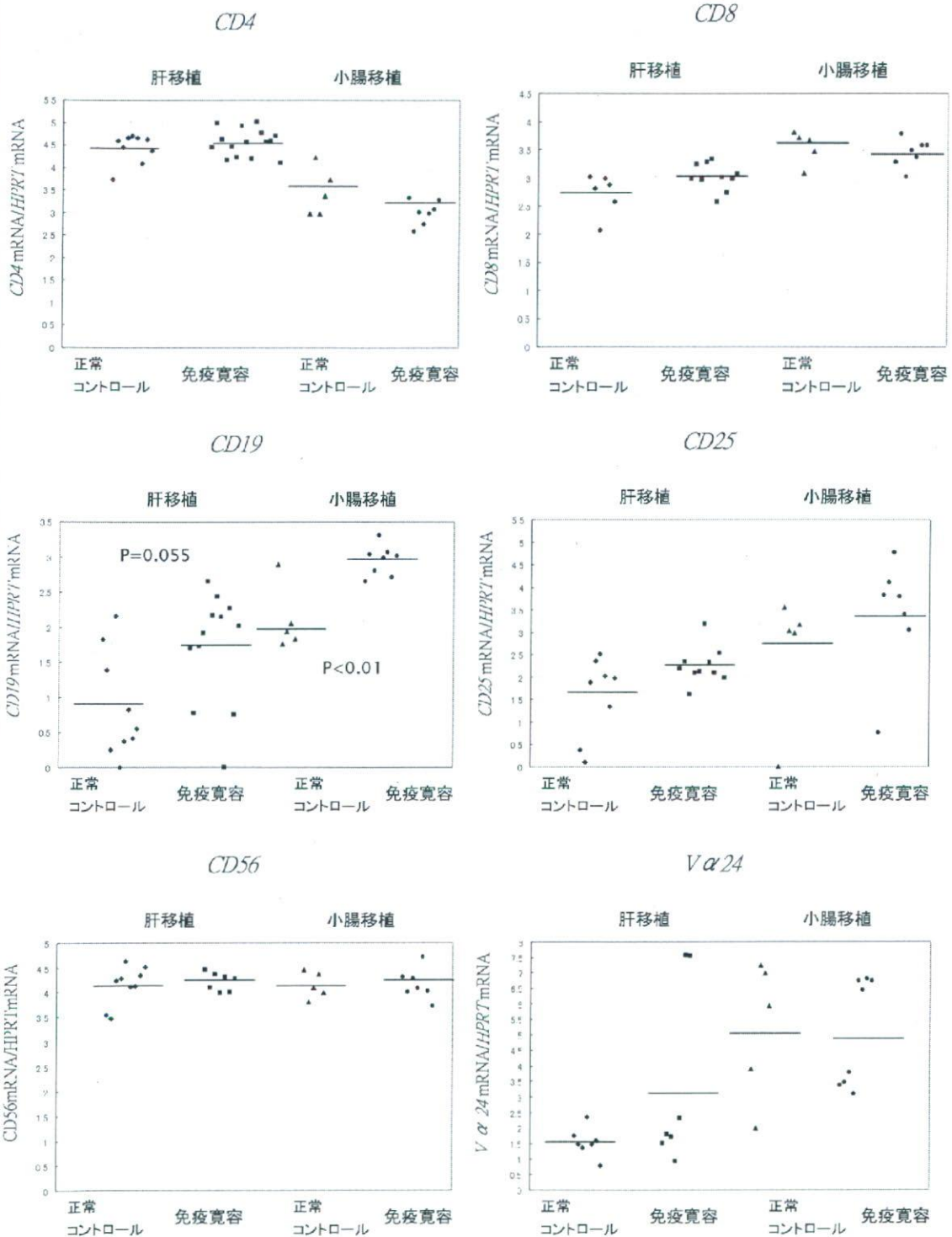
4名(男1,女3) 年齢:55,57,2,26才 移植後:6, 5, 2, 2 年

現疾患 上腸間膜動脈血栓、回旋異常、慢性偽腸閉塞

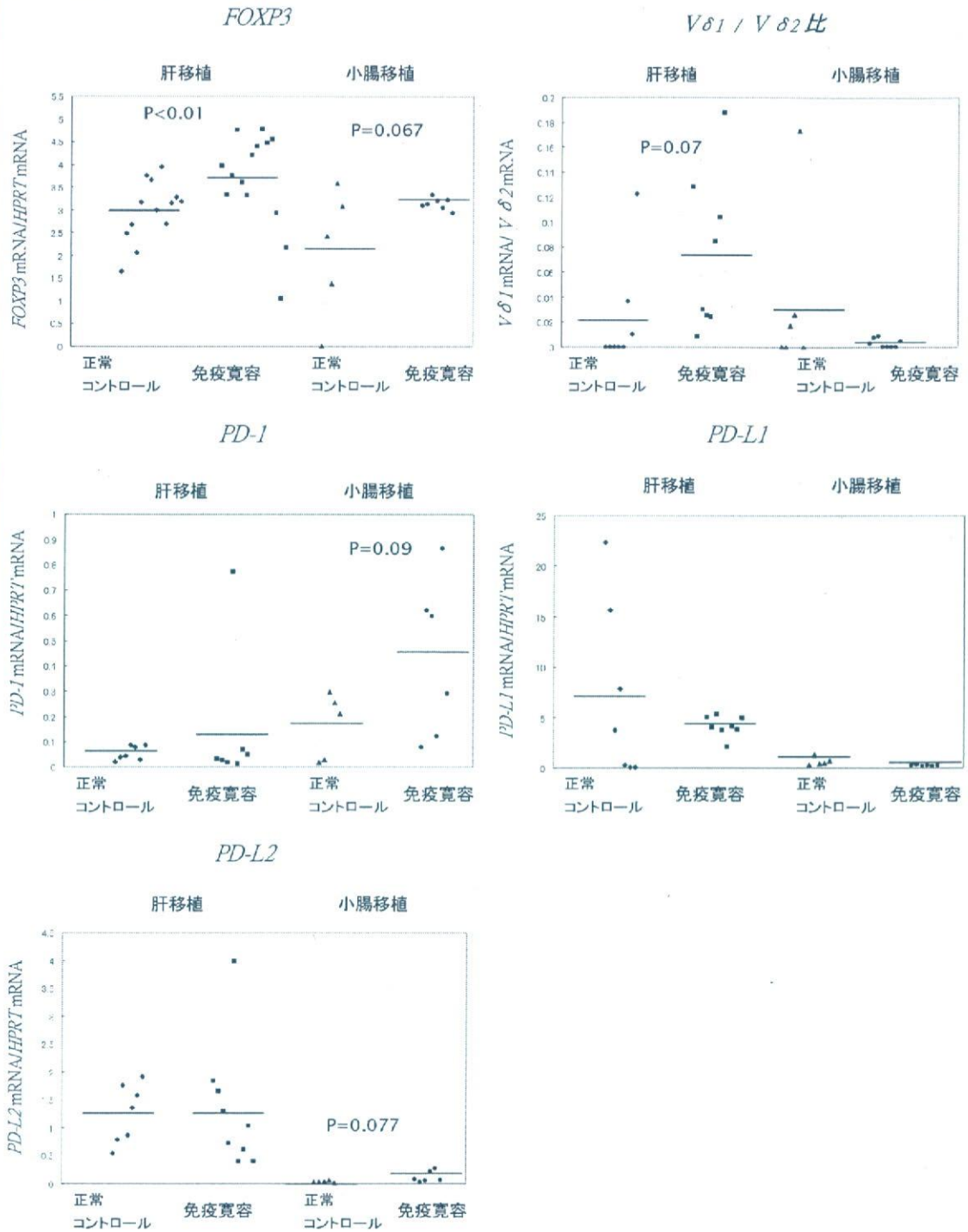
●コントロール群(非移植正常小腸)

3名

参考資料2



参考資料2



厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

肺移植直血再灌流障害に関する研究

研究分担者 庄司 剛 京都大学大学院医学研究科器官外科学講座呼吸器外科・助教

研究要旨

臓器の虚血後、血流が再開することにより生ずる機能不全を虚血再灌流傷害といい、再灌流時に大量に生じる活性酸素は、この虚血再灌流傷害において中心的な役割を演じていると考えられている。肺移植は、肺高血圧症、気管支拡張症、肺気腫、肺線維症、嚢胞性線維症など種々の終末期肺疾患に対する治療として欧米を中心に諸外国では定着しており、本邦でも1998年に臨床肺移植が開始された。肺移植において、摘出されたドナー肺は虚血状態で冷保存された後、レシピエントに移植され、その血流を再開する。つまり虚血再灌流は、肺移植においては不可避の過程である。生体内において、superoxide dismutase (SOD), catalase などが活性酸素を消去するラジカルスカベンジャーとして働くが、再灌流時の再酸化により大量の活性酸素が発生すると、活性酸素とラジカルスカベンジャーの間のバランスが崩れ、その結果血管内皮細胞が傷害されると、肺血管透過性の亢進、肺血管抵抗の上昇、肺水腫、ガス交換能の低下などをきたす。このような酸化ストレスによる肺移植術後早期のグラフト機能不全を克服することは、術後成績の向上をもたらすと考えられる。虚血再灌流傷害を軽減するラジカルスカベンジャーとして、SOD 1), catalase 2) 以外にも、ビタミンC 3), アロプリノール4), N-アセチルシステイン(NAC) 5) などの保護効果が動物実験において示されている。我々はこれまで、グラフト肺の保存時間延長と虚血再灌流傷害からの肺保護をテーマに、新しい臓器保存液の開発6-9) とラジカルスカベンジャーによる保護効果の検討10-13) を行ってきた。今回肺移植における酸化ストレスとその制御について、当科での研究成果を紹介する。

A. 研究目的

1. human thioredoxin による酸化ストレスの軽減われわれはヒトチオレドキシン(human thioredoxin, hTRX)による肺虚血再灌流傷害抑制効果を種々の動物モデルを用いて明らかにしてきたが10-13)、今回さらに虚血再灌流に伴い発生する活性酸素に対する効果を検討した14)。

hTRX は、成人T細胞白血病由来の細胞株が産生するIL-2 α 鎖誘導因子として発見された104のアミノ酸から成る分子量約12,000のポリペプチドである。生体内に広く分布しており、放射線、紫外線やウイルス感染などのストレスにより誘導される。hTRX は -Cys-Gly-Pro-Cys- というアミノ酸配列を有し、2個のCys残基がdithiol から disulfide に変化することにより生体内の酸化還元反応に関与している。hTRX は多様な活性を示すが、その一つとして、xanthine oxidase により発生する活性酸素の除去、

hydrogen peroxide に対するスカベンジャー効果が示されている15)。

2. ニトログリセリン(NTG)の酸化ストレス抑制効果

生体内において血管内皮細胞由来のNOは、血管平滑筋の弛緩、血管内皮への好中球の接着・遊走の阻止、血小板凝集抑制、血管透過性の抑制等の作用を有する16-19)。一方、肺や心臓の虚血再灌流は内因性NOの急激な枯渇と、それに続くグラフト機能不全を招く。そこで保存中や再灌流時NOやNO供与体を投与することによりグラフトの肺機能を維持する多くの試みが報告されている20-22)。NOの再灌流傷害に対する効果にはさまざまな機序が関与するが、特に抗酸化効果としては2種類の作用が考えられている。すなわち血管内皮細胞より発生するO₂-を直接スカベ

ンジする作用と、血管内皮細胞での xanthine oxidase 活性の抑制、好中球と血管内皮の接着抑制、好中球中の NADPH オキシダーゼ不活化などにより活性酸素の発生そのものを防止する作用である。今回、われわれは臓器保存液に添加された、NO ドナーであるニトログリセリン(NTG)が酸化ストレスを抑制し、グラフト肺を虚血再灌流傷害から保護し得るか否かを検討した(23)。方法2 ラットの ex-vivo 肺虚血再灌流モデルを用いて検討を行った。このモデルでは、1つのラット心肺ブロック(左片肺)を別のラット心肺ブロック(両肺)と直列につなぎ、前者を試験肺、後者を灌流液を静脈血化する脱酸素化肺として用い、パリン加血で灌流する。Lewis ラットの肺血管床を当科にて開発した臓器保存液(ET-Kyoto 液)でフラッシュした後、心肺ブロックを摘出、同液に浸漬し、4°C、15時間の冷保存を行った。冷保存の有無と灌流液への NTG(0.44 mM)添加の有無によりラットを Fresh 群(虚血(-), NTG(-), n=7), NTG(-)群(n=10), NTG(+群(n=10)の3群に分けた。ex vivo 肺灌流モデルを用いて60分間の再灌流を行い、実験肺の酸素化能、肺動脈圧、最高気道内圧を測定し、再灌流終了直後に採取した肺組織の湿乾重量比を測定した。併せて再灌流後の肺組織の一部を 8-ヒドロキシデオキシングアノシン(8-OHdG) (サイドメモ参照) に対するモノクローナル抗体 N45.1 を用いて免疫染色し、その標本画像を NIH image で解析することにより、酸化ストレスによる DNA 損傷の定量化(8-OHdG Index)を行った。

B. 研究方法

ウサギの in vivo 肺虚血再灌流モデルを用いて、hTRX の活性酸素に対する効果を既知のラジカルスカベンジャーである N-アセチルシステイン(NAC)と比較検討した。ウサギの左肺動脈と左主気管支を肺門で110分間遮断(虚血)、その後90分間の再灌流を行った。再灌流開始後10, 30, 60, 90分右肺門を遮断し、左肺のみの肺動脈圧、動脈血ガス分析、最高気道内圧を測定し、再灌流終了直後に採取した左肺組織

の肺湿乾重量比を測定した。実験群は hTRX 群: hTRX 60 mg/kg 投与, NAC 群: N-アセチルシステイン 150 mg/kg 投与, コントロール群: 生理食塩水投与の3群で、各々の薬剤を再灌流5分前から60分間静脈内投与した。

C. 研究結果

1. hTRX 群の PaO₂ は再灌流開始30, 60, 90分でコントロール群に比べ有意に良好であった(p<0.05)。肺湿乾重量比は hTRX 群においてコントロール群よりも小さい傾向が見られ(p=0.056)、肺水腫の軽減が示唆された。肺動脈圧と最高気道内圧は hTRX 群とコントロール群との間に有意差を示さなかった。再灌流後肺の組織学的検討ではコントロール群で肺胞内に浸出液がみられ、間質が肥厚し、細胞浸潤も多く認められたが(再灌流傷害)、hTRX 群では肺胞構造は正常肺とほぼ同等に保たれ、肺胞内への浸出液は少量で、傷害の軽減が確認された。さらに虚血再灌流中に発生する活性酸素を測定するために O₂-と一重項酸素に非常に鋭敏かつ特異的に反応し発光する 2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one (MCLA) の検出を用いて行い、NAC の代わりにスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を投与した3群で検討した。MCLA を投与開始後、左肺門を遮断し虚血を開始した時点で実験肺の血流が減少するため虚血2分前の発光量を基準値として算出する化学発光比(photon ratio)は低下したが、3群とも再灌流直後から急激に photon ratio が増加した。中でも再灌流後のコントロール群での photon ratio は2.5以上であったが、hTRX 群と SOD 群で photon ratio は2以下であり、コントロール群に比して活性酸素の減少が示された(図1)。本実験において hTRX はラジカルスカベンジャー効果が現に認められている NAC と同等にグラフト肺の生理機能を改善した。また、hTRX は同じく強力なラジカルスカベンジャーである SOD と同等の活性酸素抑制効果を示した。強い抗酸化能をもつ新しいラジカルスカベンジャーとして hTRX による

肺虚血再灌流傷害の抑制が期待される。

2. NTG(+群)のPaO₂はNTG(-群)に対し再灌流開始20分以降有意に良好であり(p < 0.05), 最高気道内圧は再灌流開始20分以降, NTG(+群)はNTG(-)に比べ有意に低値であった(p < 0.05). 肺湿乾重量比もNTG(+群)はNTG(-)に比べ有意に低値であった(p < 0.05). またN45.1による免疫染色では再灌流中の酸素化能が最も低下したNTG(-)群で細胞の核が強く染色され, 一方, NTG(+群)はFresh群と同様に核が淡染された(図2). DNA損傷の程度を示す8-OHdG IndexはNTG(-)群で最高値を示し, NTG(+群)はFresh群と同等に低値であった. これらのことから, NTGは冷保存後の虚血再灌流肺における肺機能を保つとともに, 酸化ストレスを軽減することが示された.

E. 結論

移植後のグラフト肺を虚血再灌流傷害から保護するためには, 酸化ストレスの抑制が重要である. われわれの研究において, 酸化ストレスの抑制作用が示されたhTRXおよびNTGを本稿にて紹介した.

G. 研究発表

1. 論文発表

Shoji T, Sahara H, Muniappan A, Guenther DA, Wain JC, Houser SL, Bravard MA, Pujara AC, Hasse RS, Sachs DH, Madsen JC, Allan JS. Operational tolerance to class I disparate lungs can be induced despite pretransplant immunization with class I alloptides. *Transplantation*, 84: 1467-1473, 2007.

Shoji T, Sahara H, Muniappan A, Guenther DA, Houser SL, Pujara AC, Bravard MA, Wain JC, Sachs DH, Madsen JC, Allan JS. An MHC Class II Disparity Raises the Threshold for Tolerance Induction in Pulmonary Allografts in Miniature Swine. Abstract, 27th Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation, San Francisco, USA. Apr. 28, 2007, published in *J Heart Lung Transplant* 26(S): S, 2007.

2. 学会発表

庄司 剛, 里田直樹, 大政貢, 陳豊史, 藤永卓司, 佐藤登, 園部誠, 阪井宏彰, 宮原 亮, 板東 徹, 大久保憲一, 平田敏樹, 和田洋巳. 浸潤型胸腺腫に対する集学的治療の検討. 第32回日本外科系連合学会学術集会(要望議題). 2007.6.22, 東京都

庄司 剛, 里田 直樹, 吳 艶玲, 藤永 卓司, 陳 豊史, 青山 晃博, 張 吉天, 高橋 鮎子, 岡本 俊宏, 阪井 宏彰, 和田 洋巳, 板東 徹, 小柴 貴明. ミニプタ肺移植における末梢血中FOXP3発現は急性拒絶の早期マーカーとなりうる. 第60回日本胸膈外科学会定期学術集会 プレナリーセッション 最優秀演題受賞. 2007.10.18, 仙台市.

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

肝局在免疫担当細胞の特殊性に基づいた免疫学的治療戦略に関する研究

研究分担者 大段 秀樹 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 先端医療開発科学講座・外科学

研究要旨

肝臓は免疫機能制御器官であり、腸管由来の微生物やトキシンなどに対する自然免疫機構を司り、また、過剰な免疫機構を制御する寛容機構も有する。肝臓に内在する免疫担当細胞の機能を掌握することは、肝臓外科領域の周術管理において、肝障害を予防/軽減する戦略を確立する上で非常に有益な情報となる。

本稿では、肝局在免疫担当細胞のうち、類洞内皮細胞と natural killer (NK)細胞の我々の研究成果を紹介し、肝臓外科における臨床治療戦略の可能性について考察する。

A. 研究目的

肝臓は腸管由来の微生物、エンドトキシン、腫瘍細胞など外来抗原を含有した門脈血が流入する臓器で、類洞内皮細胞、natural killer (NK)細胞、NKT細胞、Kupffer細胞など様々な免疫担当細胞を含有する。最前線の免疫学的防御器官として肝臓が担う機能を掌握し、戦略的に制御することは、肝臓外科領域の周術管理において極めて重要である。本研究の目的は、肝局在免疫担当細胞のうち類洞内皮細胞とNK細胞の機能特性を明らかにし、臨床治療戦略の可能性を探索することである。

B. 研究方法

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未だなされていない。様々な動物種において主要組織適合性抗原 (MHC) が異なる同種異系移植肝を施行した際に、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らず容易に生着する現象が以前より観察されている(1,2)。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(3)。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(4)、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(5)。しかし、類洞内皮細胞の同種異系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。我々は、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(6,7)。

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(MLR assay)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 によって、アロ反応性の CD4+および CD8+ T細胞の増殖指数と存在比率を解析した(8,9)。

C. 研究結果

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、類洞内皮細胞のみで 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細胞性アロ反応を抑制していることが判明した(6)。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1)。

D. 考察

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。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2A)。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(transmigration 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が、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2B) 7)。類洞内皮細胞上に表出する Fas ligand が特に CD4+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+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+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3)。

肝臓あるいは肝細胞移植後の拒絶機序には、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ぬ。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上述した。最近我々は、アロ抗原を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(10,11)。この知見は、肝類洞内皮細胞は、門脈内アロ抗原/細胞移入後の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、CB80、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我々は考えている。ヒト肝類洞内皮細胞に人為的に MHC クラスII、CB80、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。

肝内NK細胞を用いた抗肝癌療法

肝癌は非代償性肝硬変に合併する 경우가多く、肝予備能の低下した症例では制癌治療が肝不全を誘発する危険を伴う。この場合、肝臓移植が唯一の根治治療となり得るが、進行肝癌の場合では移植後再発の可能性が懸念される。国際的に認知された移植後肝癌再発を回避しえる適応基準のもと付き(通称ミラノ基準:腫瘍系5cm以内且つ単発もしくは多重系3cm以内且つ3個以内、尿管浸潤、遠隔転移を認めない)、本邦でも2004年より非代償性肝硬変合併肝癌に対する肝臓移植が一般保険診療として行われている。しかし、ミラノ基準を逸脱しても移植後再発を認めない症例も少なからず経験されることや、逆にミラノ基準を満たした症例でも再発が認められることもあることから、移植適応基準の再検討と

移植後再発を積極的に予防し得る補助制癌療法
の確立が急務であると考えられている。
肝移植後の肝癌再発機構としては、術前画像診
断では評価し得ない肝内微小脈管浸潤や肝外
微量播種、さらには手術操作で起因する腫瘍細
胞の物理的播種などが関連すると考えられる。
肝臓移植後には拒絶反応の回避を目的として
免疫抑制剤の使用が不可欠であるが、これに伴
う非特異的な生体防御機構の減弱ゆえ、遺残す
る微量な腫瘍細胞は排除されにくくなる。生体
防御機構は自然免疫応答と獲得免疫応答から
なるが、拒絶反応や免疫抑制療法が大きく影響
を受けるのは獲得免疫応答である。そこで我々
は肝臓移植後に自然免疫応答を選択的に増強
する制癌免疫療法の可能性について研究を重
ねてきた。自然免疫応答を司るNK細胞は、腫
瘍形成の初期段階で腫瘍細胞を自己正常
細胞から識別し、選択的に殺傷する能力を有す
るリンパ球である。自己の正常細胞に表出する
MHC class I を認識すると抑制性シグナル伝達
により細胞傷害は生じないが、癌細胞上に表出
する変異MHC class I はNK細胞に抑制性シグナ
ルを伝達できず傷害を受けると考えられてい
る (missing-self theory)。最近我々は、ヒト肝臓
内には大量のNK細胞が含有され、末梢血由来
のNK細胞と異なり、IL-2による刺激で強力な
抗腫瘍分子 (TRAIL: tumor necrosis factor-related
apoptosis-inducing ligand、健全な細胞には影響せ
ず腫瘍細胞のみを選択的に標的にする分子) が
誘導し得ることを確認した (図4) 12)。さらに、
術後再発率が高い中～低分化肝細胞癌は
TRAIL受容体 (death receptors) を高発現し TRAIL
を介した細胞死が誘導されやすいことも確認
した。肝移植の際には、ドナーから摘出した肝
臓をレシピエントに移植する前に臓器保存液
で肝臓内血液を置換するために灌流を行うが、
この際に回収される灌流液から無菌操作でNK
細胞を効率よく回収するシステムを開発した。
さらに、肝NK細胞は、末梢血NK細胞と異
なり自己MHC認識抑制性受容体の表出を保持し
つつ肝癌細胞に対し強い抗腫瘍活性を誘導し
うることを確認できた。

以上の結果から、肝移植後にドナー肝由来の
NK細胞を in vitro で刺激し、TRAILの発現を
誘導した後に、レシピエントに移入すること
で、肝細胞癌の再発予防効果が期待できると
考えた。マウスでは、肝部分切除後に肝NK
細胞のTRAIL表出が有意に低下し、移入した
肝癌細胞の肝内生着が促進されることが確認
されたが、TRAIL表出NK細胞を外来的に移入
することで肝内生着を抑制することが可能であ
った (図5) 13,14)。この減少を臨床応用して、
広島大学病院倫理委員会の承認のもと (第414
号)、肝癌症例に対する肝移植後の癌再発予防
を目的とした肝NK細胞移入療法を2006年1
月より臨床導入した (図6)。現在まで、Stage
II以上の肝癌合併肝硬変の12症例に対し肝移
植後の肝由来NK細胞移入療法を施行し、本治
療の安全性が確認された。今後、長期経過観
察が必要であるが、現在までのところ、全例
で経過良好で再発を認めず社会復帰されてい
る。

E. 結論

肝臓外科領域の周術管理において、免疫学的
防御器官として肝臓が示す機能を掌握し戦略
的に制御する可能性について、類同内皮細胞
とNK細胞の重要性が示唆された。

G. 研究発表

K.Ide H.Wang, H.Tahara, J.Liu, X.Wang,
T.Asahara, M.Sykes, YG.Yang, H.Ohdan (2007)
Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft
rejection by macrophages Proc Natl Acad Sci USA
104(12):5062-5066

K.Ide H.Ohdan, H.Tahara, K.Ishiyama,
M.Shishida, T.Irei, M.Ohira, H.Tashiro, T.Itamoto,
T.Asahara (2007) Possible therapeutic effect of lipid
supplementation on neurological complications in
liver transplant recipients Transpl Int
20(7):632-635

T.Irei H.Ohdan, W.Zhou, K.Ishiyama, Y.Tanaka, K.Ide, T.Asahara (2007) The persistent elimination of B cells responding to blood group A carbohydrates by synthetic group A carbohydrates and B-1 cell differentiation blockade: novel concept in preventing antibody-mediated rejection in ABO-incompatible transplantation *Blood* 110: 4567-4575

伊禮俊充 大段秀樹、五十嵐友香、石山宏平、番匠谷将孝、田中友加、井手健太郎、志々田将幸、大平真裕、田原裕之、高田 昇、浅原利正 (2007) B細胞分化制御により脾臓温存が可能となった血液型不適合腎移植の1例 *広島医学* 60(10):581-585

H.Ohdan W.Zhou, Y.Tanaka, T.Irei, Y.Fuchimoto, H.Egawa, T.Asahara (2007) Evidence of Immune Tolerance to Blood Group Antigens in a Case of ABO-Incompatible Pediatric Liver Transplantation *Am J Transplant* 7(9):2190-2194

H.Ohdan H.Tashiro, K.Ishiyama, K.Ide, M.Shishida, T.Irei, M.Ohira, H.Tahara, T.Itamoto, T.Asahara (2007) Microsurgical hepatic artery reconstruction during living-donor liver transplantation by using head-mounted surgical binocular system *Transpl Int* 20(11):970-973

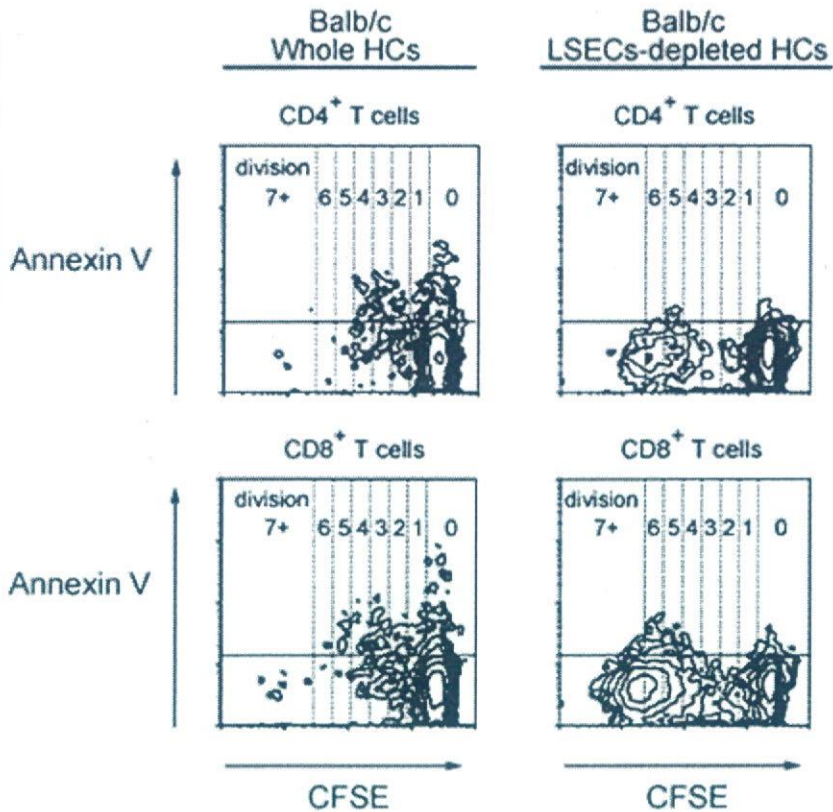
大段秀樹 (2007) 拒絶反応のメカニズム Antibody-mediated rejection 腎移植・血管外科 19(2):113-119

H.Tashiro T.Itamoto, H.Ohdan, Y.Fudaba, T.Kohashi, H.Amano, K.Ishiyama, S.Takahashi, H.Aikata, K.Chayama, K.Arihiro, T.Asahara (2007) Should splenectomy be performed for hepatitis C patients undergoing living-donor liver transplantation *J Gastroenterol Hepatol* 22(6):959-960

H.Tashiro T.Itamoto, T.Sasaki, H.Ohdan, Y.Fudaba, H.Amano, S.Fukuda, H.Nakahara, K.Ishiyama, A.Ohshita, H.Mitsuta, K.Chayama, T.Asahara (2007) Biliary Complications after Duct-to-duct Biliary Reconstruction in Living-donor Liver Transplantation : Causes and Treatment *World Journal of Surgery* 31(11):2222-2229

参考資料1

図1 :

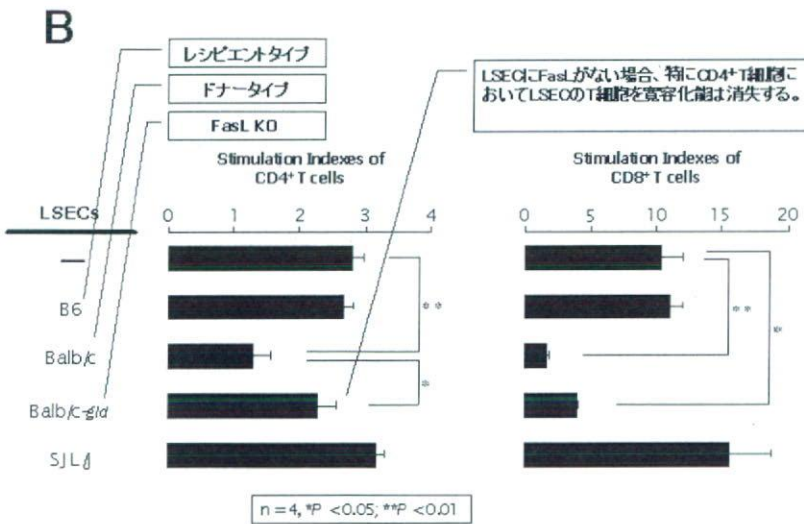
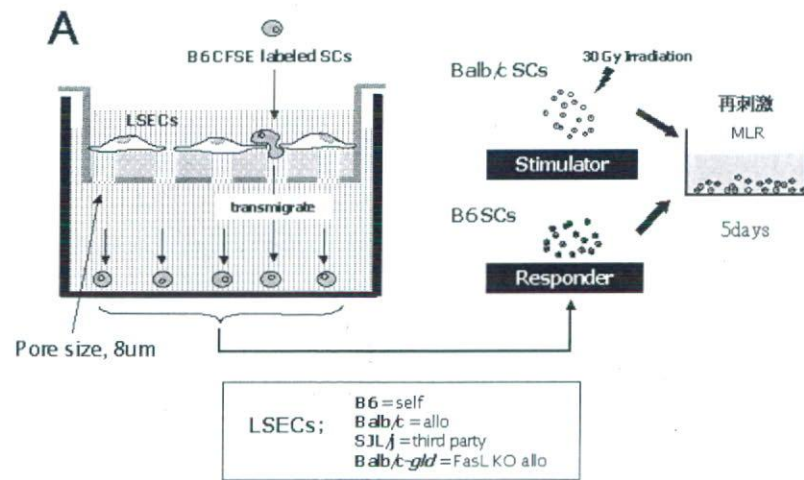


肝類洞内皮細胞はアロ反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導する。Balb/c マウスの肝臓構築細胞を stimulator に、B6 の脾リンパ球を responder に用い、CFSE-MLR assay によってアロ反応性の CD4⁺および CD8⁺ T 細胞の増殖指数と存在比率を解析した。肝構築細胞のすべてを stimulator として CFSE-MLR をした場合、すなわち類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系 T 細胞は僅かながら分裂を認めたが、その分裂 T 細胞は全てアネキシン V 陽性で、分裂初期にアポトーシスに陥ることが判った。類洞内皮細胞(LSEC)を反応系から除去すると激し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

HCs: hepatic constituent cells, LSECs: liver sinusoidal endothelial cells.

参考資料2

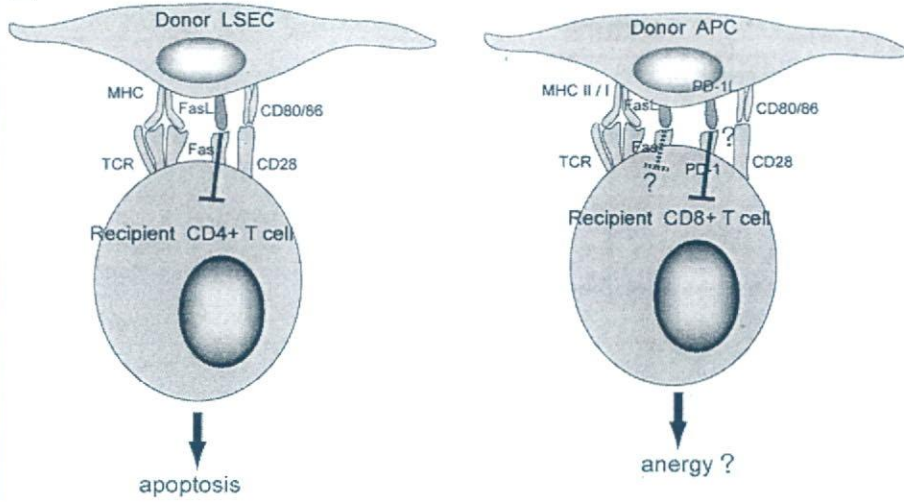
図2:



類洞内皮 transmigration assay. A) 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した *in vitro* 解析系を確立した。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、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。B) 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。LSECs: liver sinusoidal endothelial cells, SCs: splenocytes.

参考資料3

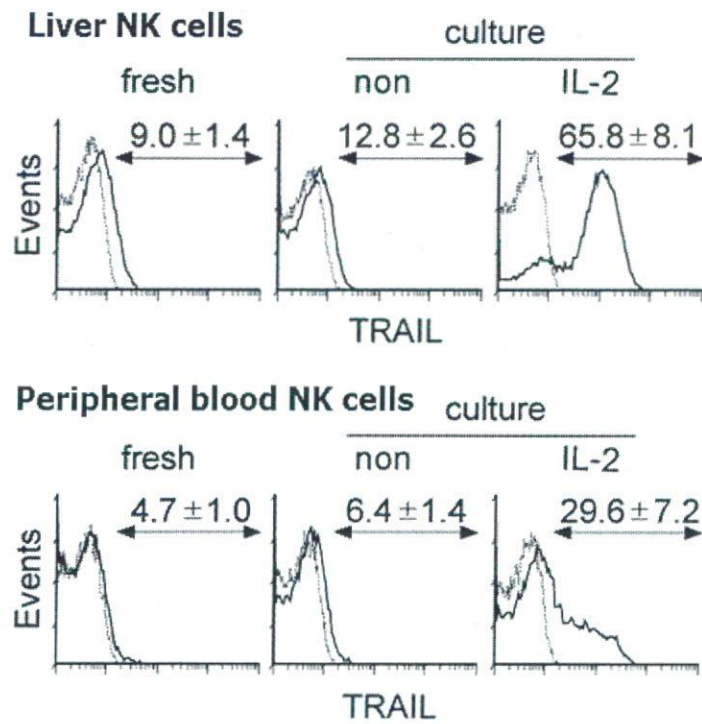
図3 :



マウス肝類同内皮細胞は直接認識経路で応答するCD4+T細胞をFas-FasL pathwayを介して寛容化する。

参考資料4

図4 :

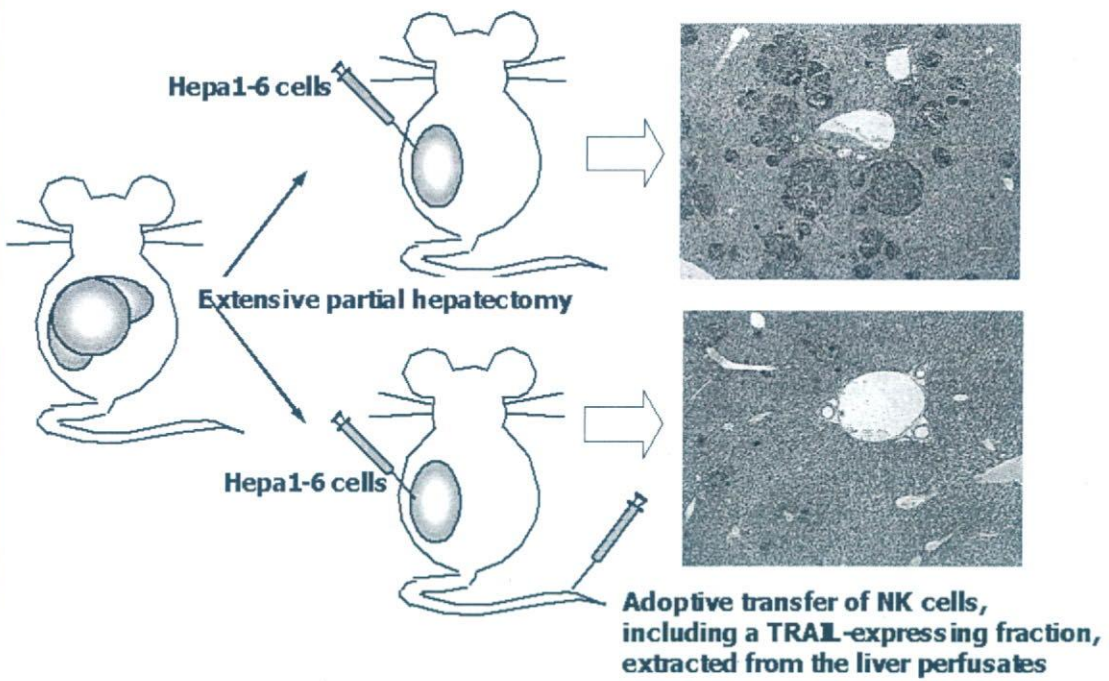


肝NK細胞はIL-2刺激によりTRAIL分子を強く発現する。

ヒト末梢血および肝内のCD56+CD3-NK細胞上のTRAIL分子の表出をフローサイトメトリーで解析した。

参考資料5

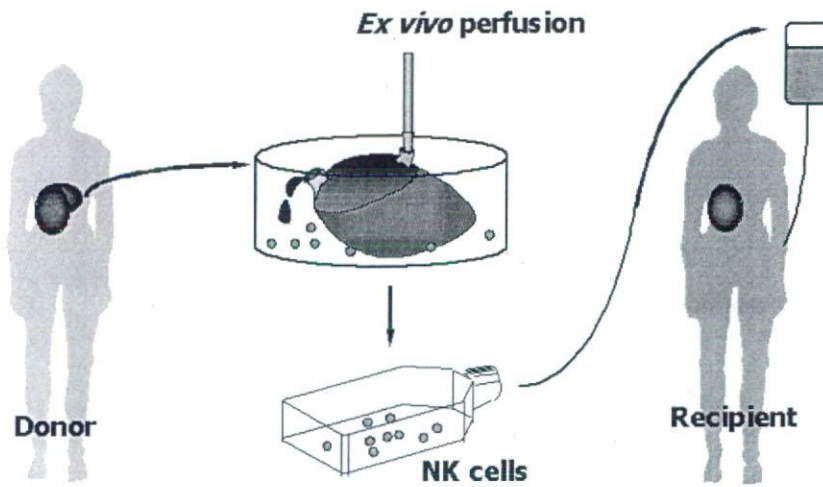
図5 :



TRAIL 表出肝NK 細胞の移入によって肝癌増勢を抑制できる (マウスモデル)。B6 マウスの肝臓を70% 切除し Hepa1-6 ヘルパー細胞株を門脈内移入すると、肝内に肝癌の転移巣を確認できる (1週間後)。しかし、TRAIL を表出した同系の肝NK 細胞を静脈内移入すると (ヘルパー細胞移入3日後)、肝癌の転移巣は消失する。

参考資料6

図6：



癌再発防止を目的とした肝臓癌合併肝移植直後におけるドナー肝臓内NK細胞を用いた術後補助免疫療法の
臨床応用 (広島大学倫理委員会 通知番号414号)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koshiha T	Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation.	Transpl Immunol	17	94-97	2007
Sakaguchi S	Emerging challenges in regulatory T cell function and biology.	Science	317	627-629,	2007
Hung, KC	A surgical model of fulminant hepatic in rabbits.	Liver Int	27(10)	1333-1341	2007
Tanaka K	Cytotoxic T-cell-mediated defense against infections in human liver transplant recipients.	Liver Transplant	13	287-293	2007
Ashihara E	Anti-donor antibody in patients receiving ABO-identical and HLA-mismatched living donor liver transplants: effect on survival.	Transplantation	83(4)	506-509	2007
Masuda K	T cell lineage determination precedes the initiation of TCR α gene rearrangement.	J.Immunol	179	3699-3706	2007
Shoji T	Operational tolerance to class I disparate lungs can be induced despite pretransplant immunization with class I allopeptides.	Transplantation	84	1467-1473	2007
Irei T	The persistent elimination of B cells responding to blood group A carbohydrates by synthetic group A carbohydrates and B-1 cell differentiation blockade: novel concept in preventing antibody-mediated rejection in ABO-incompatible transplantation	Blood	110	4567-4575	2007

Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation

Takaaki Koshiba^{a,*}, Ying Li^a, Mami Takemura^b, Yanling Wu^a, Shimon Sakaguchi^c, Nagahiro Minato^d, Kathryn J. Wood^e, Hironori Haga^f, Mikiko Ueda^b, Shinji Uemoto^b

^a Department of Transplantation and Immunology, Horizontal Medical Research Organization, Faculty of Medicine, Kyoto University, 54 Kawaramachi-Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8507, Japan

^b Division of Hepatobiliary Pancreatic Surgery and Transplantation, Kyoto University Hospital, 54 Kawaramachi-Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8507, Japan

^c Department of Experimental Pathology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawaramachi-Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8507, Japan

^d Department of Immunology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe machi, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8501, Japan

^e Nuffield Department of Surgery, University of Oxford, The John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford, OX3 9DU, UK

^f Department of Diagnostic Pathology, Kyoto University Hospital, 54 Kawaramachi-Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8507, Japan

Received 25 October 2006; accepted 25 October 2006

Abstract

In the setting of our pediatric living-donor liver transplantation (LDLT), 87 patients (15.0% of all the patients: significantly higher proportion, compared with those of other transplant centers) achieved complete withdrawal of immunosuppression, which is referred to as “operational tolerance”. Immunosuppressants were completely discontinued for 54 patients as scheduled, and for 33 because of EBV infection or other complications.

Immunological analyses of the peripheral blood derived from operationally tolerant patients demonstrated that non-deletional tolerance takes place in which potentially reactive T cells to donor-antigens remain physically in the immune repertoire, but specifically suppressed by certain mechanisms. Not only CD4⁺CD25^{high+} T cells were increased in the proportion in the tolerant patients' peripheral lymphocytes and suppressed MLR specifically to the donor antigen, but also *FOXP3* expressing cells were present within the tolerant liver. Thus, among several mechanisms accounting for non-deletional tolerance, Tregs are likely to involve at least in part in our tolerant patients. Vδ1γδT cells, a subset of γδT cells, which otherwise reside mainly in the intestine, emerge into the peripheral blood during successful pregnancy but not abortive pregnancy. Since Vδ1γδT cells produce massive IL-10, it is proposed that Vδ1γδT cells induce fetomaternal tolerance by promoting Th2 immune deviation. Consistent with pregnancy, IL-10 producing Vδ1γδT cells emerge into the blood of our tolerant patients. This may reflect a common feature between fetomaternal tolerance and transplant tolerance.

We began protocol biopsy in post-LDLT patients who exhibit normal liver function from January 2003. Operationally tolerant patients, albeit showing normal liver function, exhibited decrease in size and increase in number of the bile duct and the fibrosis to a greater extent, compared with patients on maintenance immunosuppression. This warrants serial protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression even in the presence of normal liver function.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Operational tolerance; Liver transplantation; Regulatory T cells; Protocol biopsy; γδT cells

1. Clinical aspects

1.1. The development of elective protocols has enabled a substantial number of patients to be weaned off immunosuppressants, but yielded no penalty in terms of immune graft loss

From June 15th, 1990 to May 20th, 2005, 659 cases of LDLT (living-donor liver transplantation) were performed for 581 pediatric patients who were younger than 18 years old at Kyoto

Abbreviations: APCs, Antigen presenting cells; EBV, Epstein–Baur virus; *FOXP3*, Forkhead box P 3; IEL, Intra-epithelial lymphocyte; IL, Interleukin; LDLT, Living-donor liver transplantation; MLR, Mixed Lymphocyte Reaction; TGF-β, Transforming Growth Factor-beta; Tregs, Regulatory T cells.

* Corresponding author. Tel.: +81 75 751 4328; fax: +81 75 751 4328.

E-mail address: tkoshiba@kuhp.kyoto-u.ac.jp (T. Koshiba).

0966-3274/\$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.trim.2006.10.004

University Hospital. Out of them, 87 patients (15.0% of all the patients) had been completely weaned off immunosuppressants. This is significantly higher proportion, compared with those of other transplant centers. Immunosuppressants were completely discontinued as scheduled for 54 patients. All those patients fulfilled the following criteria when they began being weaned off FK506; 1) pediatric patients 2) normal liver function 3) survived for more than 2 years 4) no single episode of rejection during the preceding 12 months 5) the presence of parental permission [1]. The other 33 patients had to stop immunosuppressants non-electively mainly due to EBV infection and other complications. Eight patients had biopsy-proven acute rejection during the weaning process, which was counteracted by increasing in the dosage of the FK506 and/or corticosteroid pulse therapy. Three of these patients are again being weaned off immunosuppressants; the other 5 are being treated with FK506 monotherapy and show normal liver function. In 4 patients, immunosuppression returned to the previous steps of weaning without histology due to a slight increase in transaminases. One patient experienced early chronic rejection during the cessation of immunosuppressants for EBV infection, which was successfully treated with 3-drug immunosuppression therapy. Thus, of note, any immunological penalty such as graft loss has never been encountered during weaning process [2].

2. Immunological aspects

2.1. Regulatory T cells (Tregs) appear to operate in a subset of operationally tolerant patients

Recently suppressor/regulatory T cells have regained much interest in non-deletional type of tolerance [3,4]. Naturally occurring and induced alloantigen-specific Tregs have been shown to protect from autoimmunity and from rejection [3,4]. Similar to rodent models, it has been proposed that CD4⁺

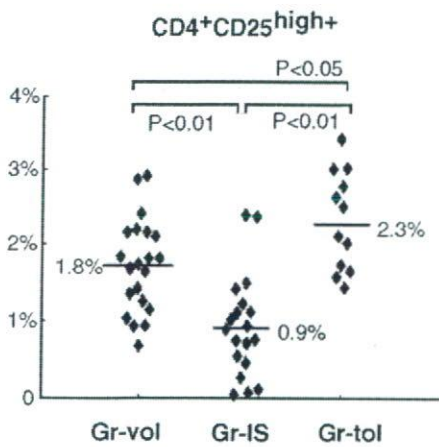


Fig. 1. Analyses for CD4⁺CD25^{high+} cells in age-matched volunteers (Gr-vol), LDLT patients on IS (Gr-IS) and operationally tolerant patients (Gr-tol). Using FACS analysis, the percentage of CD4⁺CD25^{high+} cells in the peripheral lymphocyte was determined. Gr-tol demonstrated an increase in the percentage of CD4⁺CD25^{high+} cells (Gr-Tol, Gr-IS and Gr-vol; 2.3±0.6%, 0.9±0.7% and 1.8±0.6%: Gr-tol vs. Gr-IS; p<0.01; Gr-tol vs. Gr-vol; p<0.05).

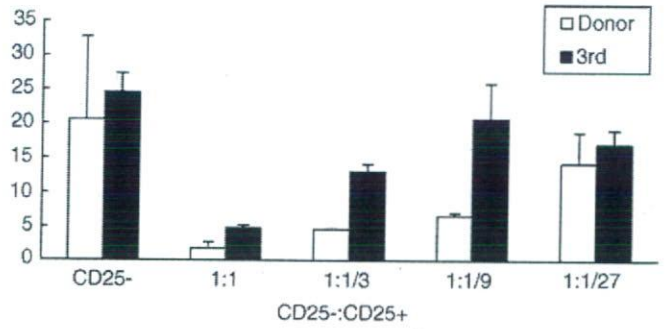


Fig. 2. Functional analysis for CD4⁺CD25⁺ T cells in operationally tolerant patients. CD4⁺CD25⁺ (CD25⁺) T cells and CD4⁺CD25⁻ (CD25⁻) T cells were isolated with a cell sorter. CD25⁻ T cells alone or serially diluted number of CD25⁺ T cells with an equal number of CD25⁻ T cells were incubated at an indicated ratio in the presence of irradiated donor APCs and 3rd party APCs to perform MLR. The suppressive property of CD25⁺ T cells was proven to be donor-antigen specific. Similar results were obtained in four tolerant patients.

CD25^{high+} cells represent Tregs in human [5]. Consistent with the findings of Salama and Louis in the settings of human renal transplantation [6,7], we demonstrated that operationally

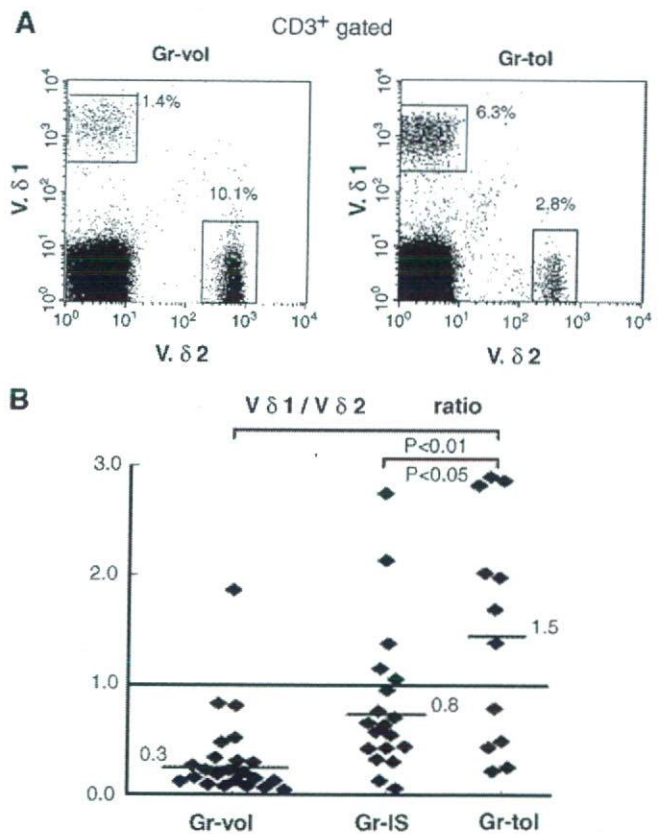


Fig. 3. Analyses for Vδ1 and Vδ2 γδ T cells in age-matched volunteers (Gr-vol), LDLT patients on IS (Gr-IS) and operationally tolerant patients (Gr-tol). Using FACS analysis, the percentage of Vδ1 and Vδ2 γδ T cells was determined within the peripheral T lymphocyte. (A) In Gr-vol, Vδ2 γδ T cells predominated while Vδ1 γδ T cells were rare. In quite a contrast, however, Vδ1 rather than Vδ2 predominated in Gr-tol. (B) Thus, the conversed ratio of Vδ1/ Vδ2γδ T cells was observed in mostly Gr-tol patients. However, this was less frequently found in Gr-IS than in Gr-tol (Gr-tol, Gr-IS and Gr-vol; Vδ1/Vδ2γδ T cells ratio, 1.5, 0.8 and 0.3: Gr-tol vs. Gr-vol; p<0.01; Gr-tol vs. Gr-IS, p<0.05).

tolerant LDLT patients exhibited significantly higher proportion of CD4⁺CD25^{high+} cells within peripheral blood lymphocytes, compared with patients on immunosuppressants and age-matched healthy volunteers (Fig. 1) [8]. In addition, peripheral lymphocytes derived from operationally tolerant patients were divided into CD4⁺CD25⁺ (CD25⁺) fraction and CD4⁺CD25⁻ (CD25⁻) fraction, and serially diluted doses of CD25⁺ cells were added to a CD25⁻ fraction to examine MLR to both of donor and third party alloantigens. As shown in Fig. 2, decrease of the proportion of CD25⁺ cells to CD25⁻ cells resulted in increase of MLR to both of the donor and the 3rd party. In a subset of tolerant patients, this tendency was more remarkable to the donor than to the 3rd party [9]. These data imply that potentially reactive T cells to donor-antigens are physically present in the tolerant recipient immune repertoire – a phenomenon referred to as “non-deletional” tolerance – but specifically suppressed by Tregs at least in a subset of tolerant patients. Recently, we demonstrated high expression of *FOXP3* in liver grafts derived from tolerant patients, implying the presence of Tregs within tolerant grafts [10]. To further address the question as to where and how Tregs exert their suppressive activity, we are currently determining balance between *FOXP3* and innate/adaptive immunities, and linkage between *FOXP3* and cytokines/co-stimulatory factors in tolerant graft.

2.2. A common feature exists between transplant tolerance and fetomaternal tolerance

The fetus has paternal antigens which can evoke strong allogeneic T cell responses. However, in general, unlike any other mismatched organ and tissue transplantations, the semi-allogeneic fetus is not usually rejected, which indicates the existence of active tolerance mechanisms that prevent rejection. $\gamma\delta$ T cells express one of the three different V δ gene segments, V δ 1, V δ 2 or V δ 3, representing distinctive functional subsets [11]. It has been reported that V δ 1 $\gamma\delta$ T cells, a subset, sharing a similar phenotype with intra-epithelial lymphocyte (IEL), which are otherwise rare, become a dominating population in the peripheral blood lymphocytes during successful, but not abortive pregnancy [12]. We confirmed that V δ 2 $\gamma\delta$ T cells predominated, and that V δ 1 $\gamma\delta$ T cells were rare in the peripheral blood of normal individuals (Fig. 3). Thus, V δ 1/V δ 2 $\gamma\delta$ T cells ratio was less than 1.0 in most normal individuals. However, similar to successful pregnancy, V δ 1 $\gamma\delta$ T cells rather than V δ 2 $\gamma\delta$ T cells, predominated in the peripheral blood of tolerant patients. This made V δ 1/V δ 2 $\gamma\delta$ T cells ratio of tolerant patient more than 1.0, in contrast to normal individuals. The V δ 1/V δ 2 $\gamma\delta$ T cells ratio in patients on immunosuppressant was in the middle of normal individuals and tolerant patients (Fig. 3) [8]. As far as function of V δ 1 $\gamma\delta$ T cells is concerned, V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in the deciduas during early pregnancy were reported to produce IL-10 and TGF- β , which suggests a direct role of V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in maintenance of fetomaternal tolerance by promoting Th2 immune-deviation [13]. Consistent with V δ 1 $\gamma\delta$ T cells during successful pregnancy, we demonstrated that V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in the peripheral blood of tolerant patients produced massive IL-10 (data not shown).

3. Pathological aspects

3.1. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression

It is generally assumed that operational tolerance with normal graft function is accompanied by normal graft morphology, but this has not been studied in detail. From January 2003, we began protocol biopsy in long-term post-LDLT patients exhibiting normal liver function. Despite normal liver function, protocol biopsy revealed decrease in size and increase in the number of the bile duct, and the presence of fibrosis in patients in whom immunosuppressant had been completely withdrawn, compared to patients on maintenance immunosuppression (data not shown). This warrants protocol biopsies during the weaning process (even in the presence of normal liver test). Operational tolerance may not be necessarily protected from morphological changes of the graft [14].

Acknowledgements

We thank Ms. Narumoto, Ms. Eguchi and Dr. Yoshizawa for their technical assistance and Ms. Shiomi and Ms. Nagamizo for their preparation of the manuscript.

A part of this work was presented at World Transplant Congress (WTC) 2006, June 22–27, 2006, Boston, USA. Mami Takemura is a winner of a WTC International Young Investigator Award under the title: Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following living-donor liver transplantation [14].

This work was supported by grants-in-aids from the Ministry of Education, Science, and Culture, and grants-in-aids from the Uehara Memorial Foundation.

Kathryn J. Wood holds Royal Society Wolfson Merit Award.

References

- [1] Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, et al. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 2001;72(3):449–54.
- [2] Ueda M, Oike F, Ogura Y, et al. Long-term outcomes of 600 living donor liver transplants for pediatric patients at a single center. *Liver Transplant* 2006;12(9):1326–36.
- [3] Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3(3):199–210.
- [4] Waldmann H, Graca L, Cobbold S, et al. Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin Immunol* 2004;16(2):119–26.
- [5] Wing K, Ekmark A, Karlsson H, et al. Characterization of human CD25⁺CD4⁺T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 2002;106(2):190–9.
- [6] Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, et al. Regulatory CD25⁺T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(6):1643–51.
- [7] Louis S, Brouard S, Giral M, et al. The blood of “operationally tolerant” recipients of kidney allografts is characterized by an increase in CD4⁺CD25⁺T cell. *Am J Transplant* 2003;3:328.
- [8] Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;12(4):2118–25.
- [9] Yoshizawa A, Ito A, Li Y, et al. The roles of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2005;37(1):37–9.