

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

肺移植虚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、再灌流時の再酸素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に 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、ヘ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(EP 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分ご右肺門を遮断し、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分間肺内に投与した。

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、間質肥厚、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でかつ特異的に反応し発光する 2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-7-dihydro imidazo[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既に認められている 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中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, 酸化ストレスの制御が重要である. 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.

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、肝胆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) が異なる同種異系肝移植を施行した際、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肝移植直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細胞性アロ応答を抑制していることが半明した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)。類洞内皮細胞上に出す 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ぬ。マウス肝類洞内皮細胞によって抗原提示された異移植後再発を積極的に予防し得る

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
肝臓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うる適応基準も付き(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、脈管浸潤、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

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、さらには手術操作に起因する腫瘍細胞の物理的播種などが関与すると考えられる。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に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、腫瘍芽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 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細胞が含まれ、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とする分子) 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、肝部分切除後には肝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、類洞内皮細胞とNK細胞の重要性が示唆された。

G. 研究発表

H.Tashiro T.Itamoto H.Amano H.Ohdan A.Oshita K.Ishiyama T.Asahara Biliary complications after living donor liver transplantation cause and treatment recipient's own middle hepatic vein 8th World Congress of the International Hepato Pancreato Biliary Association
H.Amano H.Tashiro T.Itamoto A.Oshita H.Ohdan N.Toyota T.Asahara Treatment of portal vein stenosis after living donor liver transplantation using interventional radiography 8th World Congress of the International Hepato Pancreato Biliary Association

H.Niitsu H.Tashiro T.Itamoto H.Amano
H.Ohdan T.Asahara Portal vein
reconstruction using recipient own right
hepatic vein as a interposition graft in living
donor liver transplantation 8th World
Congress of the International Hepato
Pancreato Biliary Association

大平真裕 大段秀樹 石山宏平 志々田将幸 伊禮
俊充 番匠谷将孝 梶谷桂子 田代裕尊 板本敏行
坂本直哉 平賀伸彦 今村道雄 茶山一彰 浅原利
正 ドナー肝由来活性化リンパ球移入による肝
移植後C型肝炎ウイルス増殖抑制 第
108回日本外科学会定期学術集会

大段秀樹 石山宏平 田代裕尊 板本敏行 浅原利
正 肝免疫担当細胞の特性を応用した免疫細胞
療法の可能性 第108回日本外科学会定
期学術集会

田原裕之 大段秀樹 石山宏平 井手健太郎 志々
田将幸 伊禮俊充 良雄一郎 大平真裕 番匠谷将
孝 田代裕尊 板本敏行 茶山一彰 浅原利正 B
型肝炎関連疾患に対する生体肝移植の長期成
績とB型肝炎再発予防における沈降B型肝炎
ワクチン療法の有用性 第108回日本
外科学会定期学術集会

伊禮俊充 大段秀樹 五十嵐友香 石山宏平 田中
友加 志々田将幸 大平真裕 田原裕之 番匠谷将
孝 田代裕尊 板本敏行 札幌保宏 新宅究典 石
川哲大 福田康彦 浅原利正 血液型不適合肝、腎
移植に対する治療戦略:抗血液型抗体産生B細
胞の分化様式に即した共通した免疫抑制法の
応用 第108回日本外科学会定期学術集会

志々田将幸 大段秀樹 田中友加 五十嵐友香 番
匠谷将孝 浅原利正 肝臓同内皮細胞誘導性抗原
特異的免疫応答におけるNatural Killer T細
胞の役割 第108回日本外科学会定期学術集会

H.Ohdan M.Ohira Y.Tanaka K.Ishiyama
N.Hiraga M.Imamura K.Chayama
T.Asahara Heterologous Immunity Via
Alloimmune Responses to Hepatitis C Virus
Replication after Liver Transplantation
American Transplant Congress 2008

M.Ohira H.Ohdan K.Ishiyama
K.Chayama T.Asahara Inoculation with
IL-2/OKT3-Treated Lymphocytes Extracted
from Liver Allograft Perfusate Elicits an
Anti-HCV Response after Liver
Transplantation American Transplant
Congress 2008

H.Tahara H.Ohdan K.Ide T.Asahara Role
for CD47-SIRP α Signaling in Human T Cell
Proliferation in Response to Stimulation
with Porcine Antigen Presenting Cells
American Transplant Congress
2008

T.Irei H.Ohdan T.Asahara Differential Role
of Invariant NKT Cells in the Production of
Antibodies Against Blood Group
Carbohydrates and Histocompatibility
Complex Alloptides American Transplant
Congress 2008

Y.Igarashi T.Irei M.Shishida Y.Tanaka
T.Asahara H.Ohdan Mechanisms of B cell
Tolerance in ABO-Incompatible Pediatric
Liver Transplantation American Transplant
Congress 2008

M.Shishida H.Ohdan Y.Tanaka
M.Banshodani Y.Igarashi T.Asahara Role of
Invariant NKT Cells in Liver Sinusoidal
Endothelial Cell-Induced
Immunosuppression of T Cells with Indirect
Allopecificity American Transplant
Congress 2008

K.Ishiyama H.Ohdan M.Ohira D.Marlen
Y.Tanaka M.Shishida T.Irei H.Tahara
M.Banshodani Y.Igarashi N.Basnet
T.Asahara Clinical Efficacy of Adoptive
Antitumor Immunotherapy with Activated
NK Cells Extracted from Donor Liver Graft
Perfusate in Liver Transplant Recipients
with HCC American Transplant Congress
2008

Y.Tanaka H.Ohdan T.Asahara Algorithm
Based on Multiparameter Mixed
Lymphocyte Reaction Assay for Tailoring
Maintenance Immunosuppressants after
Living Donor Liver Transplantation
American Transplant Congress 2008

T.Irei H.Ohdan Y.Igarashi K.Ishiyama
H.Tashiro T.Itamoto T.Asahara Novel
Immunosuppressive Regimen Based on the
Simultaneous Administration of Rituximab
and B-1 Cell Differentiation Blockade for
Adult Liver Transplantation across ABO
Barrier : A Series of 5 Consecutive Cases
American Transplant Congress 2008

H.Tahara H.Ohdan K.Ide H.Takematsu
Y.Kozutsumi T.Asahara In Vitro and In Vivo
Evidence of Cytotoxicity of Antibodies
Against N-Glycolylneuraminic Acid(NeuGc)
in Xenotransplantation American
Transplant Congress 2008

M.Banshodani H.Ohdan M.Shishida
Y.Tanaka Y.Igarashi T.Asahara
Immunomodulatory Effects of liver
Sinusoidal Endothelial Cells in Allogeneic
Liver Transplantation American Transplant
Congress 2008

大段秀樹 臓器移植におけるMLRについて 第
26回日本肝移植研究会

番匠谷将孝 井手健太郎 伊禮俊充 大平真裕
田原裕之 田代裕尊 板本敏行 浅原利正 大段
秀樹 平松 憲 高橋洋一 茶山一彰 劇症肝不
全症に対する肝移植適応を判定するガイドラ
インの妥当性 第26回日本肝移植研究会

天野尋暢 田代裕尊 板本敏行 小林 剛 大下彰
彦 井手健太郎 大段秀樹 浅原利正 生体肝移
植における胆道再建の工夫と術後胆管狭窄の
現状 第26回日本肝移植研究会

大平真裕 大段秀樹 石山宏平 井手健太郎 伊
禮俊充 田原裕之 番匠谷将孝 大下彰彦 天野
尋暢 田代裕尊 板本 敏行 浅原利正 生体肝移
植における術前抗真菌剤(Itraconazole)予防投
与の意義 第26回日本肝移植研究会

伊禮俊充 大段秀樹 五十嵐友香 石山宏平 田
中友加 井手健太郎 志々田将幸 大平真裕 田
原裕之 番匠谷将孝 楠部潤子 田代裕尊 板本
敏行 浅原利正 血液型不適合肝移植に対する
血液型抗原認識B細胞の分化様式に即した免
疫抑制法の標準化 第26回日本肝移植研究会

田代裕尊 大段秀樹 板本敏行 天野尋暢 大下
彰彦 井手健太郎 石山宏平 伊禮俊充 良雄一
郎 大平真裕 田原裕之 谷本新学 番匠谷将孝
浅原利正 右葉グラフトにおける中肝膽臓枝再
建の工夫 第26回日本肝移植研究会

大平真裕 大段秀樹 Marlen Doskari 石山宏
平 田中友加 田代裕尊 板本敏行 坂本直哉 平
賀伸彦 今村道雄 茶山一彰 浅原利正
IL-2/OKT3 刺激によるドナー肝由来活性化リ
ンパ球移入療法 of C型肝炎ウイルス増殖抑制
第26回日本肝移植研究会

大下彰彦 板本敏行 天野尋暢 黒田慎太郎 田
澤宏文 谷本新学 良雄一郎 小林 剛 田代裕
尊 大段秀樹 浅原利正 当科における
生体肝移植ドナー手術の工夫と術後成績 第
26回日本肝移植研究会

田中友加 田代裕尊 浅原利正 大段秀樹 MLR
モニタリングによるアルゴリズムに基づく肝
臓移植後継続時期免疫抑制の最小化の実施 第26
回日本肝移植研究会

田原裕之 田中友加 石山宏平 井手健太郎 志々
田将幸 伊禮俊充 大平真裕 番匠谷将孝 田代裕
尊 板本敏行 浅原利正 今村道雄 高橋洋一 茶
山一彰 大段秀樹 生体肝移植後のB型肝炎ワク
チン療法奏功に關与する因子の検討 第
26回日本肝移植研究会

M.Doskali M.Ohira K.Ishiyama Y.Tanaka
T.Asahara H.Ohdan Possibility of
Immunotherapy with IL-2/OKT3-Activated
PBMC to Prevent Recurrence of HCC after
Liver Transplantation 第26回日本肝移植研
究会

河岡友和 高橋洋一 田代裕尊 大段秀樹 茶山一
彰 肝移植後C型慢性肝炎に対する治療成績と
溶血性貧血に対する対策 第26回日本肝移植研
究会

高橋洋一 河岡友和 茶山一彰 新津宏明 天野尋
暢 田代裕尊 大段秀樹 肝移植後C型肝炎に対
するペグインターフェロン/リバビリン療法
10ヶ月でSVRが得られるも、肝不全を来とし
死亡した症例 第10回肝移植病理学会

五十嵐友香 志々田将幸 伊禮俊充 田中友加 番
匠谷将孝 浅原利正 大段秀樹 血液型不適合肝
移植後のB細胞免疫寛容メカニズム 第15回肝
細胞研究会

田代裕尊 板本敏行 大段秀樹 天野尋暢 大下彰
彦 石山宏平 浅原利正 生体部分肝移植後の血
流不全に対する予防と対策 第63回日本消化器
外科学会総会

大平真裕 大段秀樹 石山宏平 伊禮俊充 田原
裕之 番匠谷将孝 田代裕尊 板本敏行 茶山一
彰 浅原利正 肝細胞癌肝移植術後補助免疫療
法としての活性化ドナー肝臓内NK細胞療法
の臨床評価 第63回日本消化器外科学会総会

伊禮俊充 大段秀樹 五十嵐友香 石山宏平 田
中友加 志々田将幸 大平真裕 田代裕尊 板本
敏行 浅原利正 B-1 細胞分化抑制に基づいた
減感作免疫抑制法の血液型不適合生体肝移植
5例への応用 第63回日本消化器外科
学会総会

田原裕之 大段秀樹 田中友加 田代裕尊 板本
敏行 浅原利正 今村道雄 高橋洋一 茶山一彰
必要最小限の免疫抑制が生体肝移植後のB型
肝炎ワクチン療法奏功に關与する 第63回日
本消化器外科学会総会

大下彰彦 板本敏行 天野尋暢 谷本新学 良雄
一郎 大段秀樹 田代裕尊 浅原利正 当科にお
ける肝細胞癌に対する腹腔鏡(補助)下肝切除
の現況 第63回日本消化器外科学会総会

番匠谷将孝 大段秀樹 志々田将幸 田中友加
五十嵐友香 石山宏平 伊禮俊充 大平真裕 田
原裕之 浅原利正 肝臓内皮細胞の抗原特異
的免疫寛容誘導における役割 第63回日本消
化器外科学会総会

H.Ohdan T.Irei T.Asahara The persistent
elimination of B cells responding to blood
group carbohydrates by temporal depletion
of B cells and B-1 cell differentiation
blockade: Novel concept in
ABO-incompatible transplantation X X II
International Congress of The
Transplantation Society

H.Tashiro H.Ohdan T.Itamoto H.Amano
A.Oshita K.Ide T.Asahara Preservation of
recipient's middle hepatic vein(MHV) is
useful for reconstructing MHV tributaries in
living donor right liver transplantation X X
II International Congress of The
Transplantation Society

H.Tahara H.Ohdan Y.Tanaka H.Tashiro
T.Itamoto T.Asahara M.Imamura
S.Takahashi K.Chayama Anti-Donor
specific hyporesponsiveness induced by
minimizing immunosuppression can lead to
successful hepatitis B vaccination in liver
transplant recipients X X II International
Congress of The Transplantation Society

K.Ide H.Ohdan H.Tahara T.Asahara
Human CD47 on porcine antigen presenting
cells have possibility of preventing T
cell-mediated xenograft rejection through
inhibitory signaling to SIRP α X X II
International Congress of The
Transplantation Society

Y.Tanaka H.Tashiro K.Ishiyama T.Asahara
H.Ohdan Strategy for tailoring minimal
immunosuppression after living donor liver
transplantation: predictive algorithm based
on multiparameter mixed lymphocyte
reaction assay using cfse-labeling technique
X X II International Congress of
The Transplantation Society

M.Banshodani M.Shishida Y.Igarashi
Y.Tanaka H.Tashiro T.Asahara H.Ohdan
Liver sinusoidal endothelial cells
suppress alloimmune responses via MHC
class II recognition in liver transplantation
X X II International Congress of The
Transplantation Society

番匠谷将孝 志々田将幸 五十嵐友香 田中友加
田代裕尊 浅原利正 大段秀樹 肝類洞内皮細胞
の抗原特異的免疫寛容誘導能 ~in vivo モデル
の確立~ 第44回日本移植学会総会

五十嵐友香 志々田将幸 伊禮俊充 田中友加
番匠谷将孝 浅原利正 大段秀樹 血液型不適合
肝移植後のB細胞寛容メカニズム 第44回日
本移植学会総会

大平真裕 マーレン・ドスカリ 田中友加 平賀
伸彦 今村道雄 茶山一彰 浅原利正 大段秀樹
肝移植後肝癌・C型肝炎再発予防を目的とし
た活性化ドナー肝由来活性化リンパ球移入療
法の臨床評価 第44回日本移植学会総会

田原裕之 井手健太郎 Nabin Basnet 浅原利
正 大段秀樹 CD47-SIRP システムを介した
異種T細胞生排絶反応制御の可能性 第44回
日本移植学会総会

田代裕尊 大段秀樹 板本敏行 天野尋暢 大下
彰彦 小林 剛 井手健太郎 伊禮俊充 良雄一
郎 大平真裕 田原裕之 浅原利正 右葉グラフ
トにおける自己静脈を用いた中肝静脈枝再建
第44回日本移植学会総会

小林 剛 田代裕尊 川口康夫 大下彰彦 天野
尋暢 板本敏行 大段秀樹 浅原利正
Budd-Chiari 症候群に対して血液
型不適合生体肝移植を行った一例 第44回日
本移植学会総会

伊禮俊充 田中友加 井手健太郎 大平真裕 五
十嵐友香 田原裕之 番匠谷将孝 Nabin
Basnet 浅原利正 大段秀樹 移植関連抗糖
鎖、MHC 抗体産生B細胞の分化様式の解明
と抗体生排絶反応抑制への応用 第44回日
本移植学会総会

田中友加 田代裕尊 井手健太郎 天野尋暢 板本敏行 浅原利正 大段秀樹 CFS 色素染色法を用いたリンパ球混合試験に基づくアルゴリズムによる免疫抑制剤調剤の試み 第44回日本移植学会総会

M. Doakali 大平真裕 田中友加 平賀伸彦 今村道雄 茶山一彰 浅原利正 大段秀樹 CD3+CD56+ CELLS INDECEDED BY INDECEDED BY ACTIVATION OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS WITH IL2/OKT3 REMARKABLY INHIBIT HCV REPLICATION 第44回日本移植学会総会

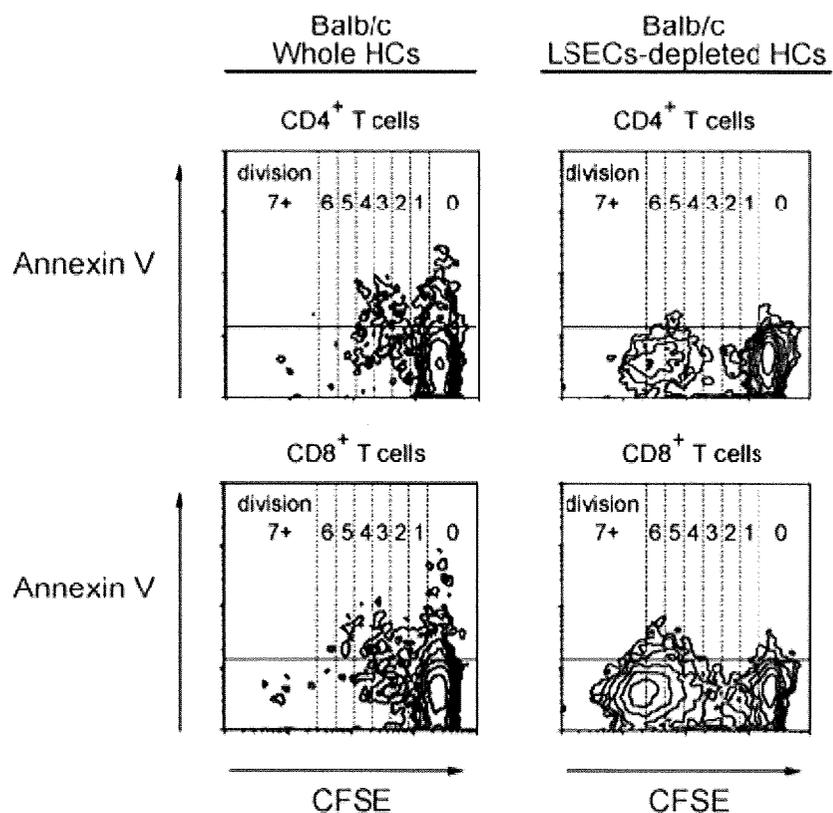
N.Basnet 田原裕之 井手健太郎 竹松 弘 小堤保則 浅原利正 大段秀樹 Comparative detecton of cytotoxic natural antibody against α -Gal and NeuGc epitopes in healthy human sera 第44回日本移植学会総会

伊禮俊充 五十嵐友香 井手健太郎 田中友加 大平真裕 田原裕之 番匠谷将孝 田代裕尊 板本敏行 浅原利正 大段秀樹 抗血液型抗体産生B細胞の分化様式に即した免疫抑制法の血液型不適合肝移植6例への応用 第44回日本移植学会総会

大段秀樹 肝臓同内皮細胞のT細胞抑制機構による移植免疫制御 第36回日本臨床免疫学会総会

参考資料1

図1 :

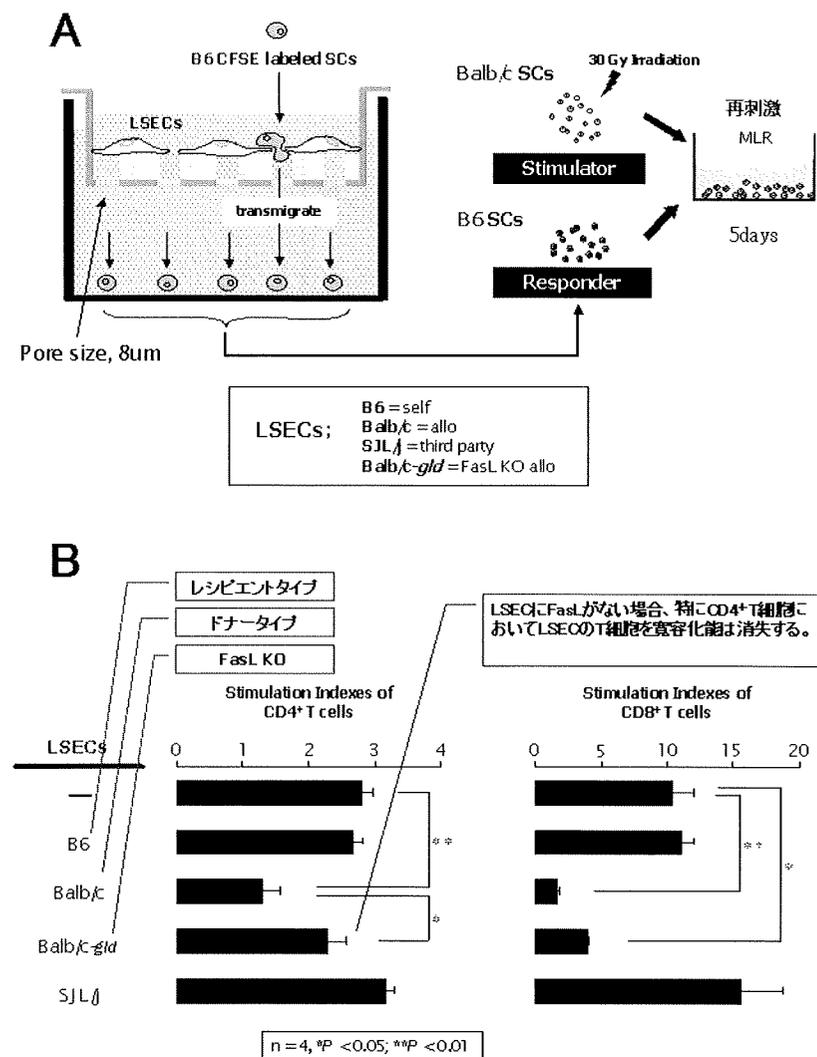


肝類洞内皮細胞はアロ反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導する。Balb/c マウスの肝臓構築細胞を stimulator に、B6 の脾リンパ球を responder に用い、CFSE-MLR assay によってアロ反応性の CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞の増殖指数と存在比率を解析した。肝構築細胞のすべてを stimulator として CFSE-MLR をした場合、すなわち類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系 T 細胞は僅かながら分裂を認めたが、その分裂 T 細胞は全てアネキシン V 陽性で、分裂初期にアポトーシスに陥ることが判った。類洞内皮細胞(LSEC)を反応系から除去すると激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

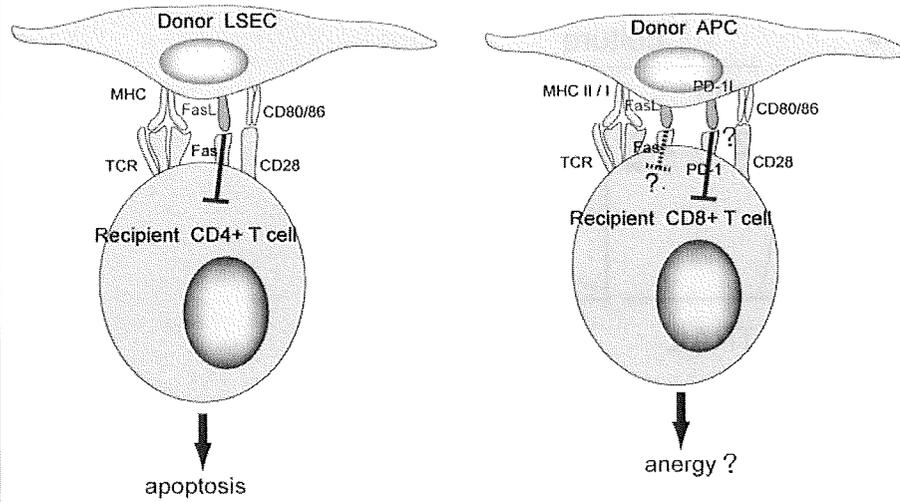


類洞内皮 transmigration assay。A) フィブロネクチンでコートした pore membrane に B6、Balb/c、Balb/c-gld (Fas ligand-deficient) あるいは SJL/j マウス由来の類洞内皮細胞を接着培養し、肝類洞内皮の角層構築を模倣した in vitro 角層系を確立した。CFSE 色素でラベルした B6 マウスの T 細胞を重層培養しトランスマイグレートさせた後、放射線照射した Balb/c マウスの脾細胞と混合培養し MLR assay を行った。B) Balb/c の類洞内皮細胞層を接触通過した T 細胞は、Balb/c 脾細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

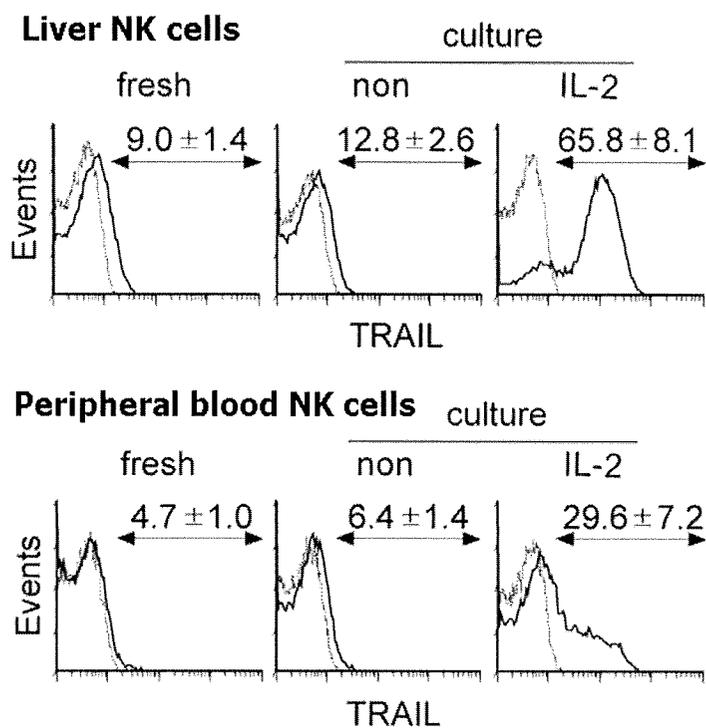
図3 :



マウス肝類洞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 :

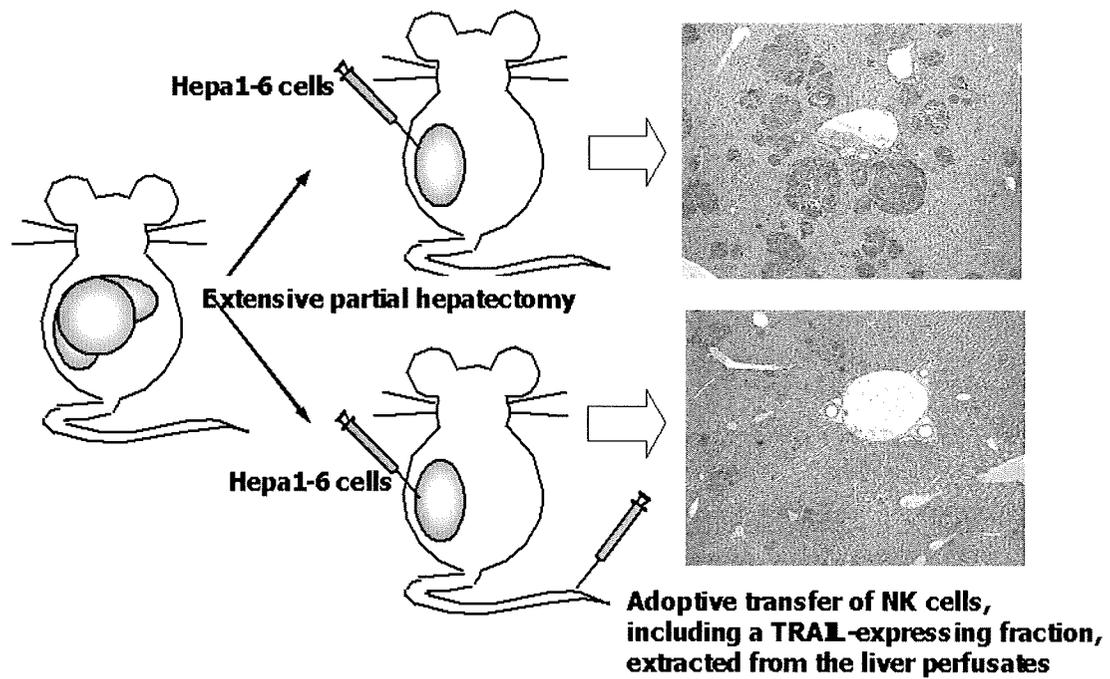


肝NK細胞はIL-2刺激によりTRAIL分子を強く発現する。

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

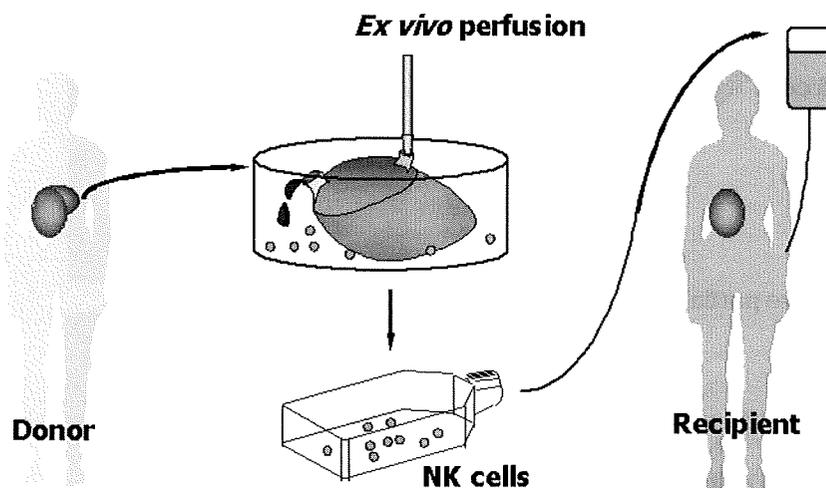
図5 :



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ヘパトーマ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 (ヘパトーマ移入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	書 籍 名	出版社 名	出版地	出版年	ページ
小柴 貴明	臨床臓器移植、免疫寛容のメカニズムに迫る—制御性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、PD-1—：免疫寛容による拒絶反応の克服		再生医療へ進む最先端の幹細胞研究	羊土社		2008	199

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
李 穎	臓器移植免疫寛容における制御性T細胞,	アレルギー・免疫	16(5)	84	2009
Yoshitomi M	Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following liver transplantation.	Transplantation	87(4)	606	2009
Satoda N	Value of FOXP3 Expression in Peripheral Blood as Rejection Marker after Miniature Swine lung transplantation	J Heart Lung Transplant	27(12)	1293	2008
Li Y	The presence of FOXP3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients.	Transplantation	86(12)	1837	2008

13. 臨床臓器移植，免疫寛容のメカニズムに迫る

—制御性T細胞， $\gamma\delta$ T細胞，PD-1

小柴貴明，李 穎，吳 艶玲，湊 長博，坂口志文，上本伸二，ジャック・ピレンネ

免疫抑制剤の弊害により患者が死亡したり，患者の quality of life (QOL) が低下することが多い臓器移植の現状で免疫寛容が成立することは，患者にとって大変に好ましい．筆者らは，肝移植や小腸移植の後に自然に免疫寛容となった症例に免疫学的アプローチを行い，制御性T細胞・ $\gamma\delta$ T細胞・PD-1が免疫寛容の成立に重要な働きをしている可能性が高いことを見出した．免疫寛容のメカニズムを明確にすることは，自然に免疫寛容の成立しない患者を免疫寛容へと導くための次世代の治療法を開発する重要な手がかりになると期待される．

はじめに

1980年代のシクロスポリン，'90年代のタクロリムスなどの優れた免疫抑制剤の登場により，臨床臓器移植の急性拒絶反応は著しく減少し，その成績は向上した¹⁾．しかし，免疫抑制剤の弊害（感染症，移植後リンパ腫/PTLD，薬剤毒性）により患者の quality of life (QOL) が低下する場合が多い．また，現在使用

されている免疫抑制剤は慢性拒絶には無効である場合が多い．事実，各種臓器移植の短期死亡例は感染症によるものが最も多い^{2)~5)}．一方，長期的には，慢性拒絶における移植臓器の喪失が最大の問題である．したがって，免疫寛容 = tolerance^{※1)}（免疫抑制剤を中止しても移植臓器が十分に機能する状態⁶⁾）が成立することは患者にとって大変に好ましい．これまで，臨床の臓器移植で免疫寛容が成立することはきわめて例外的であるとの考えが一般的であった．臨床での免疫

[キーワード&略語]

免疫寛容，臨床臓器移植，制御性T細胞， $\gamma\delta$ T細胞，PD-1

PTLD：post-transplant lymphoproliferative disease

QOL：quality of life

※1 免疫寛容 (= tolerance)

1953年 Billingham は，マウスにドナーの骨髄を投与すると免疫抑制剤非投与下に異系の皮膚は拒絶されるが骨髄ドナーと同系の皮膚は拒絶されないことを見出し，免疫寛容 (= tolerance) という概念を提唱した¹⁹⁾．

Mechanisms of tolerance after human transplantation — regulatory T cell, $\gamma\delta$ T cell, PD-1

Takaaki Koshiba¹⁾/Ying Li¹⁾/Yanling Wu¹⁾/Nagahiro Minato²⁾/Shimon Sakaguchi³⁾/Shinji Uemoto⁴⁾/Jacques Pirenne⁵⁾ : Innovation Center for Immunoregulation Technologies and Drugs, Graduate School of Medicine, Kyoto University¹⁾/Department of Immunology and Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University²⁾/Department of Experimental Pathology, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University³⁾/Division of Hepatobiliary Pancreatic Surgery and Transplantation, Graduate School of Medicine, Kyoto University⁴⁾/Abdominal Transplant Surgery Department, Leuven University Hospital, Belgium⁵⁾ (京都大学大学院医学研究科 次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点¹⁾/京都大学大学院医学研究科 感染免疫医学講座²⁾/京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学分野³⁾/京都大学大学院医学研究科 肝胆膵・移植外科⁴⁾/ルーベン大学病院 腹部移植外科⁵⁾)

寛容は“holy grail”とまで言われることもあった。しかし、京都大学では既存の概念をくつがえし、小児生体肝移植を受けた患者のうち15%の症例で自然に免疫寛容の成立を認めた⁷⁾。また、小腸はかつて“forbidden organ to transplant”と呼ばれたほど拒絶の起きやすい臓器である⁸⁾。国際小腸移植レジストリーは、小腸移植後1年以内に80~90%の症例で拒絶が起ると報告している⁹⁾。ところが、共同研究を行ってきたベルギー国ルーベンカトリック大学では4例の小腸移植が行われ、長期間、拒絶が全く起きなかった¹⁰⁾。これらの小腸移植の患者では、現在QOLの障害されない程度のきわめてわずかの免疫抑制剤の内服で移植臓器が機能しており、prope (almost) tolerance^{※2)}の状態である。筆者らは、これらのきわめて貴重な症例に対し免疫学的なアプローチを行い、免疫寛容およびprope toleranceのメカニズムを追求してきた。免疫寛容およびprope toleranceのメカニズムを明確にすることは、自然に免疫寛容の成立しない患者を免疫寛容へと導くための次世代の治療法を開発する重要な手がかりになると期待される。

1 制御性T細胞, $\gamma\delta$ T細胞, PD-1

筆者らは、制御性T細胞, $\gamma\delta$ T細胞, PD-1の3つに着目して免疫寛容のメカニズムへのアプローチを行ってきた。

制御性T細胞は、動物実験のレベルでは移植後の免疫寛容に重要な役割を果たしているとの知見が累積されつつある。筆者らは、京都大学で生体肝移植を受けた患者のうち免疫寛容の成立を認めた患者の末梢血で、制御性T細胞の本体とされるCD4陽性CD25強陽性細胞の割合が増加していることを見出した¹¹⁾。また、同細胞は、ドナーに対するリンパ球の増殖を特異的に抑制していることもわかった¹²⁾。

$\gamma\delta$ T細胞は、その受容体のタイプによりいくつかのサブクラスに分類される。サブクラスの1つであるV δ 1 $\gamma\delta$ T細胞は、母児間の免疫寛容の成立に重要

な働きをしているとされてきた^{13) 14)}。V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞は末梢血には少なく、小腸などの上皮組織に多い。一方、エフェクター機能をもつV δ 2 $\gamma\delta$ T細胞は末梢血に多い。したがって、V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞/V δ 2 $\gamma\delta$ T細胞比(V δ 1/V δ 2比)は、健常人の末梢血では低い(<1)。ところが、肝移植・免疫寛容の患者の末梢血ではV δ 1/V δ 2比は逆転していることがわかった(>1)¹¹⁾。

PD-1は活性化リンパ球の表面に出現している副刺激因子である。そのリガンド(PD-L1, PD-L2)と結合した場合、抑制性のシグナルをリンパ球の細胞内に送り、免疫を制御している¹⁵⁾。

2 肝移植・小腸移植後の免疫寛容における移植臓器内の免疫細胞遺伝子発現

1) 方法

京都大学で生体肝移植を受けた後に免疫寛容となった患者にエコーガイド下に生検を行い、移植肝を採取した。一方、ルーベンカトリック大学で脳死小腸移植を受けた患者でprope toleranceの患者の移植小腸を内視鏡下に採取した。肝移植のコントロールは移植時のドナー肝(非移植正常肝)を使用した。小腸移植のコントロールは移植小腸の患者自身の残存小腸を使用した。表に各群のプロフィールを示す。小腸移植に関しては症例が少ないため、4例中3例の患者について1年の期間をあけて2回の内視鏡を施行して、移植小腸・自己の残存小腸を採取した。生検材料からtotal RNAを抽出してcDNAを合成した。リアルタイムPCRにて、FOXP3^{※3)}(制御性T細胞特異的遺伝子)、V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞、V δ 2 $\gamma\delta$ T細胞、PD-1、PD-L1、PD-L2、CD4、CD8、CD25(活性化マーカー)、CD19(B細胞マーカー)、CD56(NK細胞マーカー)、V α 24(NKT細胞マーカー)の発現レベルを定量した。内因性コントロールにHPRTを用いた。データは各パラメータとHPRTの比率に10⁶をかけlogで表した。2群間の比較はスチューデントのt testを用いた。

※2 prope tolerance

ラテン語のpropeは英語のalmostである。免疫抑制剤をその副作用がない程度に少ない量投与して、拒絶が起きない場合にprope toleranceという場合がある。Calneにより使用された用語である²⁰⁾。

※3 FOXP3

制御性T細胞の特異的な遺伝子で、同細胞の分化と機能に関わるマスターコントロール遺伝子である。現在、最も信頼性の高い制御性T細胞のマーカーと考えられている²¹⁾。