

図2 B-1a細胞とB-1b細胞のフェノタイプ  
 血液型 A 抗原応答 B 細胞は CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B-1a 細胞に、Gal 抗原応答 B 細胞は CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>B-1a 細胞に分類される。

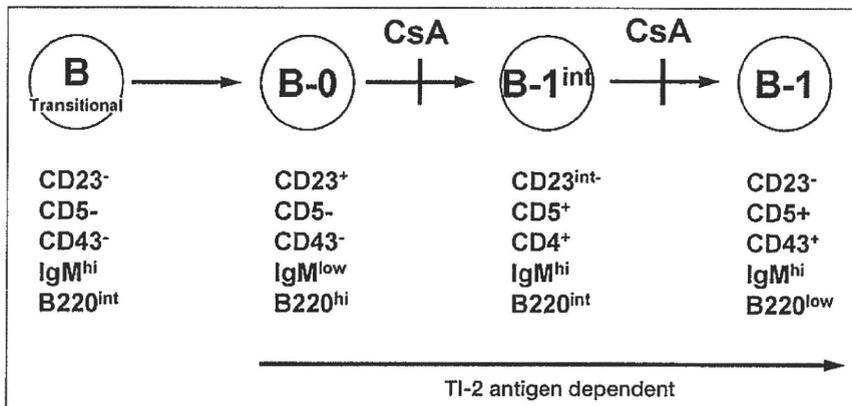


図3 未成熟 B 細胞から B-1a 細胞への分化をカルシニューリン阻害剤 (シクロスポリン) が抑制する  
 イムノグロブリントランスジェニックマウスにおいて、phosphatidyl choline に応答する B 細胞は、CsA の投与によって B-2 フェノタイプのまま止まり、B-1a 細胞への分化が阻害される。  
 (Arnold LW et al. : J Immunol 164 : 2924-2930, 2000<sup>9)</sup>より)

筆者らの検討では、CsA は T 細胞非依存性 B-1a 細胞への分化を用量依存性に抑制したが、T 細胞依存性 B-2 細胞の分裂を抑制しなかった(図 4, 5)<sup>1)</sup>。したがって、CsA は血液型抗原反応性 B 細胞への分化を抑制する可能性がある。In vivo でもマウス

に CsA を 2 週間投与すると、B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> B-1a 細胞が有意に減少した(図 6)。そして、同様な効果はタクロリムス(Tac)にも認められた<sup>10)</sup>。

一方で、すでに成熟した血液型抗原反応性 B 細胞と抗体産生細胞は CsA や Tac に抵抗性を示し

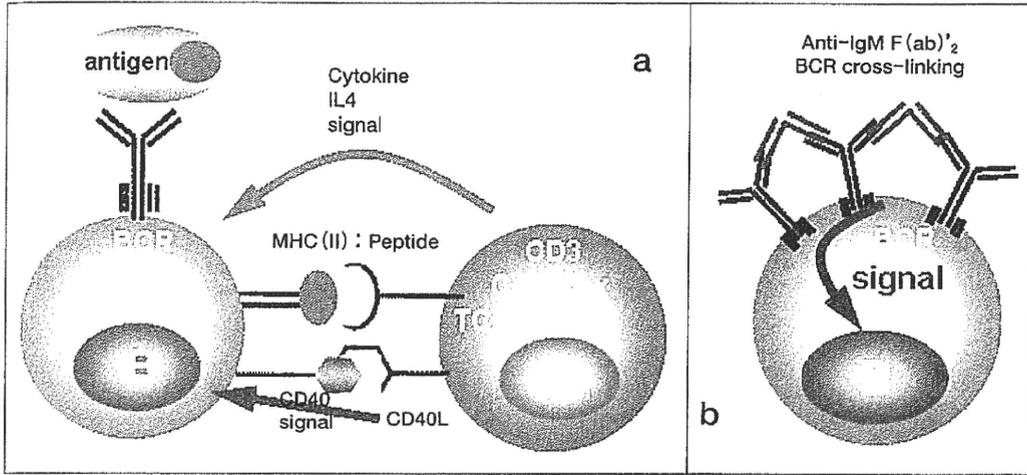


図4 T細胞依存性/非依存性B細胞活性化 *in vitro* モデル

a : B cells activation by  $T_H$  dependent peptide Ag. b : B cell activation by  $T_H$  Ags  
 マウス脾リンパ球を, CD40L と IL-4 あるいは抗 IgM 抗体  $F(ab)'_2$  の存在下で培養すると, B 細胞の分化増殖を CFSE-ラベル法によってフローサイトメーターで解析できる.

(Irei T et al. : Blood 110 : 4567-4575, 2007<sup>1)</sup>より)

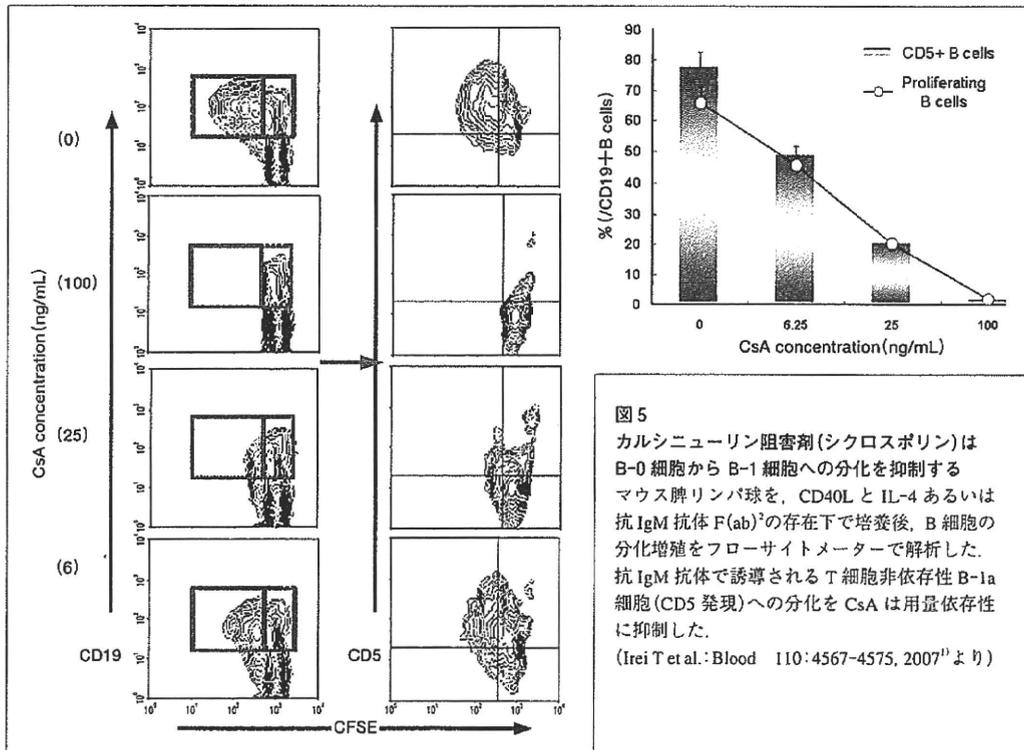


図5  
 カルシニューリン阻害剤(シクロスポリン)は B-0 細胞から B-1 細胞への分化を抑制する マウス脾リンパ球を, CD40L と IL-4 あるいは抗 IgM 抗体  $F(ab)'_2$  の存在下で培養後, B 細胞の分化増殖をフローサイトメーターで解析した. 抗 IgM 抗体で誘導される T 細胞非依存性 B-1a 細胞 (CD5 発現) への分化を CsA は用量依存性に抑制した.  
 (Irei T et al. : Blood 110 : 4567-4575, 2007<sup>1)</sup>より)

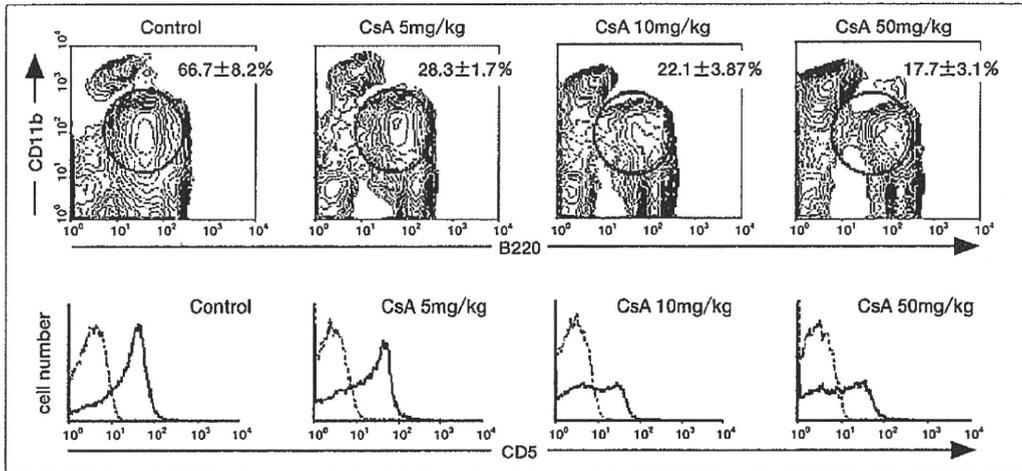


図6 カルシニューリン阻害剤(シクロスポリン)投与後(2週間)のB細胞フェノタイプ解析  
 腹腔内リンパ球中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B-1a細胞が有意に減少した。  
 (Irei T et al. : Blood 110 : 4567-4575, 2007<sup>1)</sup>より)

た。すなわち、成熟B-1a細胞と抗体産生細胞を一時的に排除できれば、以後はカルシニューリン阻害剤の投与によって血液型不適合移植における抗体関連拒絶反応を制御しようと考えられる。

B-1a細胞もB-2細胞もともにCD20分子を発現する。一方、IgG抗体を産生するプラズマ細胞はCD20分子の表出を欠く。したがって、抗CD20抗体(リツキシマブ)は、成熟B-1a細胞を一時的に除去するが、抗体産生細胞には無効であると考えられる。さらに、抗体産生はミコフェノール酸モフェテル(MMF)の投与で抑制されることが知られている。

新たなB-1a細胞への分化をカルシニューリン阻害剤が抑制することと合わせて考えると、リツキシマブ、MMF、カルシニューリン阻害剤の併用によって好成績をあげているABO血液型不適合腎移植の臨床病態を説明しうる。

文 献

1) Irei T, Ohdan H, Zhou W, Ishiyama K, Tanaka Y, Ide K et al. : 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 (13) : 4567-4575, 2007.  
 2) Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K : New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol* 27(9) : 428-433, 2006.  
 3) Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E : Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol* 7(3) : 213-219, 2007.  
 4) Kantor, AB, Merrill CE, Herzenberg LA, Himeno K : An unbiased analysis of VH-D-JH sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol* 158(3) : 1175-1186, 1997.  
 5) Ohdan H, Sykes M : B cell tolerance to xenoantigens. *Xenotransplantation* 10(2) : 98-106, 2003.  
 6) Zhou W, Ohdan H, Tanaka Y, Hara H, Tokita D, Onoe T et al. : NOD/SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes can be a model for investigating B cells responding to blood group A carbohydrate determinant. *Transpl Immunol* 12(1) : 9-18, 2003.  
 7) Ohdan H, Swenson KG, Kruger Gray HS, Yang YG, Xu Y, Thall AD et al. : Mac-1-negative B-1b phenotype of natural antibody-producing cells, including those responding to Gal alpha 1,3Gal epitopes in alpha 1,3-galactosyl-transferase-deficient mice. *J Immunol* 165(10) : 5518-5529, 2000.  
 8) Arnold LW, McCray SK, Tatu C, Clarke SH : Identification of a precursor to phosphatidyl choline-specific B-1 cells suggesting that B-1 cells differentiate from splenic conventional B cells *in vivo*: cyclosporin A blocks differentiation to B-1. *J Immunol* 164(6) : 2924-2930, 2000.  
 9) Berland R, Wortis HH : Normal B-1a cell development

requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. Proc Natl Acad Sci USA 100(23) : 13459-13464, 2003.  
10) Zhou W, Ohdan H, Asahara T : Calcineurin inhibitors block

B-1 cell differentiation : the relevance to immunosuppressive treatment in ABO-incompatible transplantation. Transplant Proc 37(4) : 1808-1811, 2005.



高橋 大段先生のご講演に対して質問はございませんか。

杉谷 B-1a細胞への分化を抑制するCsAのマウス実験では、2週間という観察期間をとっていましたが、やはり効果をみるには2週間という期間が必要だとお考えでしょうか。

大段 成熟B細胞のライフスパンは約1カ月前後ですので、その半分の2週間は薬剤効果の観察期間として設定しました。しかし、B細胞受容体がリアレンジされたB-1細胞のほうがB-2細胞よりも長寿命を獲得している可能性も指摘されていますので、もう少し長い期間で実験するほうがよいのかもしれない。

杉谷 ABO血液型不適合移植での術前脱感作療法は各施設ばらばらで、使用する薬剤の種類も違いますし、大段先生の施設や私たちの施設ではカルシニューリン阻害剤を術前14日から投与しますが、術前2日からの施設もあります。

これはカルシニューリン阻害剤を脱感作と称してABO不適合移植に使用する場合は術前14日から投与しておいたほうが良いということの基礎的な理由としてよいのでしょうか。

大段 CsAはB-1細胞の分化を抑制しますが、成熟B-1細胞には抑制効果を持たないものと思われれます。したがって、成熟B細胞をリツキシマブで除去後にB-1細胞の再出現を防止するには、CsAの投薬が必要です。14日間という期間は、むしろMMFの前投与期間として重要です。既存抗体を産生する抗体産生形質細胞のライフスパンは

1カ月ぐらいですので、少なくともハーフライフスパンの14日間の投与期間が要されると考えます。

杉谷 もし最初に成熟したB細胞を殺してしまうと考えるのであれば、数日前にリツキシマブを投与するよりも、肝移植で行われているように術前2週間あるいは3週間に一度リツキシマブを投与しておいたほうが良いのではないかと理論的な根拠に基づいていますか。

大段 リツキシマブの投与後に、B細胞除去が確実にできるかどうかを観察する期間として2週間が適切かどうかは、私たち自身はデータを持ち合わせていません。しかし、B-1細胞分化抑制という観点では、カルシニューリン阻害剤はリツキシマブの投与とあまり離れない時期に投薬を開始するべきだと考えます。

岩崎 今回の発表においてB-1細胞に分化するために必要なサイトカインのようなものはあるのでしょうか。それはNFATc1のターゲット分子などでしょうか。

大段 *In vitro*では、抗IgM抗体FabフラグメントだけでB-1a細胞の分化を誘導することができます。IL-2が存在すると分化誘導は助長されますが、特徴的なサイトカインの存在が必須ではありません。B細胞受容体が架橋されればB-1細胞への分化は誘導できますが、抗体産生細胞へのさらなる分化にはいくつかのサイトカインカクテルが必要になります。したがって、B-1a細胞への初期分化の抑制には、サイトカインをターゲットとするよりもCsAのほうが有効であるかもしれません。

岩崎 そうであるならば、細胞の増殖と成長と分化においてNFATc1の役割は主にどこにあると思われませんか。

大段 一番の役割はB細胞受容体のリアレンジメントではないでしょうか。特異性の低いB細胞

発言者

- 高橋 公太 (新潟大学大学院医歯学総合研究科腎泌尿器病態学分野)(司会)
- 杉谷 篤 (藤田保健衛生大学臓器移植再生医学)
- 大段 秀樹 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科)
- 岩崎 研太 (名古屋大学医学部免疫機能制御学)
- 中川 健 (慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室)
- 加藤 真梨奈 (名古屋第二赤十字病院薬剤部)

胞受容体が、糖鎖を認識してより高い特異性を獲得するためリアレンジメントが誘導され、B-1a細胞へと分化する際、NFATc1の活性化を要するのだと思います。

中川 CsAは臨床的濃度でB細胞の分化・誘導を抑えられるという発表でしたが、これはT細胞と同濃度で同じように効くと考えていいのでしょうか。

大段 前のセッションで発表された加藤さん

は、T細胞の存在している実験系を用いて私たちと類似の*in vitro* B細胞活性化実験をされています。そのデータを拝見する限り、CsAはT細胞を抑制するよりもむしろ低い濃度でB細胞を抑制していたと思います。加藤さん、そうですね。

加藤 はい、そうです。

大段 T細胞を抑制するよりも低い臨床的濃度でCsAはB細胞を抑制できるのかもしれませんが、

高橋 それでは、ありがとうございました。

特集「抗体関連型拒絶反応の病理と臨床」

## B細胞 lineage と 抗体性拒絶反応の制御

大段秀樹

広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学

### はじめに

B細胞の分化や成熟、活性化機構の解明に基づき、臓器移植におけるB細胞性免疫応答が理解されその制御法が開発されてきた。臓器移植におけるB細胞性免疫応答にはT細胞依存性と非依存性に分類される。アロペプチド抗原（組織適合性抗原）に反応するB細胞は、T細胞依存性に抗体産生細胞に成熟する。T細胞と接触しながら、サイトカインの刺激を受け、増殖を繰り返してリンパ節に濾胞を形成し、イムノグロブリンのクラス変換を経て有効な抗体産生が誘導される（図1A, B）。したがって、T細胞応答の適切な抑制が、ペプチド抗原を標的としたB細胞性拒絶反応の回避には重要となる。いったんクラス変換が進行し、抗体産生細胞に分化すると、もはやB細胞受容体の表出が欠落するため抗原特異的な抑制シグナルが誘導されにくく、難治性となる。

一方、血液型抗原などの糖鎖に反応するB細胞はT細胞非依存性に活性化する。連続する糖鎖抗原がB細胞受容体を架橋すると、T細胞からの刺激を要せず、活発な抗体産生が誘導されと考えられる（図1C）。ペプチド抗原の応答するB細胞（B-2細胞）とは異なる起源、特異性、組織局在をもつユニークな細胞集団であるB-1細胞にこのような応答が由来する。本稿では、臓器移植におけるB-2細胞およびB-1細胞 lineage の応答機構とその制御法について概説する。

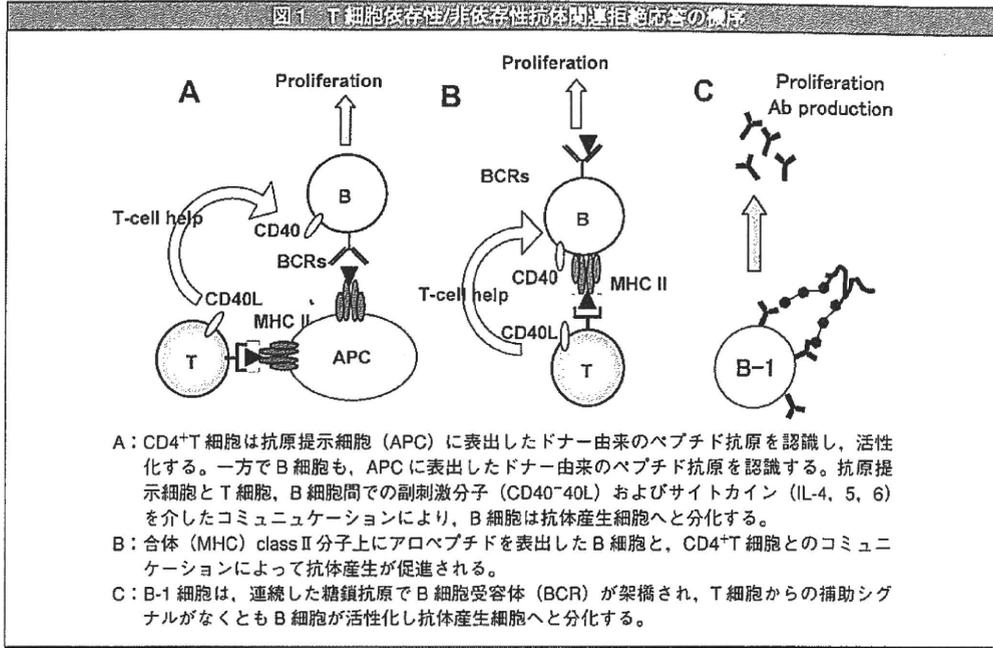
### B-1細胞とB-2細胞 lineage

抗体性免疫応答を担うB細胞は、B-1細胞とB-2細胞の

2亜群が存在し、それぞれの分化も機能も異なる。一般に、B-1細胞は自然免疫応答の一部としての抗体産生を、B-2細胞は獲得免疫応答としての抗体産生を司ると考えられている。

B-2細胞は、骨髄の血液前駆細胞（hematopoietic precursor cells: HPC）から分化し、成熟した末梢中のB-2細胞は抗原と暴露し、ヘルパーT細胞からのシグナルを受けて follicular B細胞へと分化し、Igクラススイッチング、ソマティックハイパーミューテーション、プラズマ細胞への分化をきたす。臓器移植における、アロペプチド抗体関連拒絶反応を担うのが、このタイプのB細胞応答である。

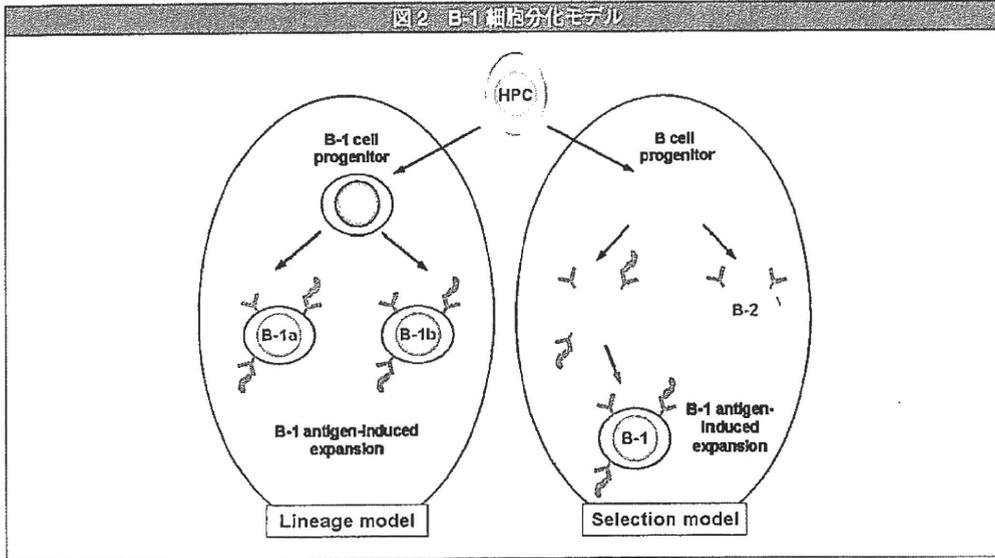
このようなB-2細胞の分化は出生後に発生するが、B-1細胞の分化は胎生期より起こる。出生後のB-1細胞の分化機構には、2つのモデルが提唱されている（図2）<sup>1,2)</sup>。1つは lineage モデルでは、B-1細胞の前駆細胞はB-2細胞の前駆細胞とは異なり、胎生期より存在する前駆細胞から生後も分化し続けるというものである。もう1つは selection モデルで、共通の骨髄由来前駆細胞から、暴露する抗原種の違いによってB-1細胞かB-2細胞に分化するというものである。どちらのモデルにせよ、B-1細胞は、自然免疫様に迅速な応答を示し、T細胞非依存性の抗原応答を司ると考えられている。B-1細胞は、B-1a細胞（IgM<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>）とB-1b細胞（IgM<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>）に細分されるが、両者のB細胞受容体のレパートリーの違いが報告されている<sup>3)</sup>。



■ アロ抗原に対する B-2 細胞応答

ドナーの組織適合性抗原に由来するペプチドが標的となる抗体関連拒絶反応は、T細胞依存性抗体産生による。ペプチド抗原を認識するB細胞は、同じペプチド抗原を認識したCD4<sup>+</sup>T細胞から産生されるIL-4, 5, 6などのサイトカイン刺激により、抗体産生細胞へ分化する。また、CD8<sup>+</sup>T細胞から産生されるIFN-γもB細胞の抗体産生を促進する。CD4<sup>+</sup>T細胞もCD8<sup>+</sup>T細胞も樹状細胞などの抗原提示細胞に表出したドナー由来のペプチド抗原を認識し、活性化する。一方でB細胞も、抗原提示細胞に表出したドナー由来のペプチド抗原を認識する。抗原提示細胞とT細胞、B細胞間での副刺激分子およびサイトカインを介したコミュニケーションにより、B細胞は抗体産生細胞へと分化する (図1A)。あるいは、ドナー抗原がB細胞受容体を介して取り込まれ、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC/HLA) class II 分子上にアロペプチドを表出したB細胞 (抗原提示B細胞) とCD4<sup>+</sup>T細胞とのコミュニケーションによっても、抗体産生が促進される (図1B)。このように、T細胞と接触しながらサイトカインの刺激を受け、B細胞が増殖を繰り返しリン

パ節に濾胞を形成してイムノグロブリンのクラス変換を経て抗体産生が誘導される。抗体関連拒絶反応のうち、最も注目を集めている要素が抗HLA抗体であるが、移植腎6カ月以降の抗HLA抗体の陽性率が20%で、抗体陽性患者のグラフトロスが6.6%、陰性患者では3.3%であり、HLA抗体陽性がグラフトロスのリスクファクターであると報告されている<sup>4</sup>。また、抗HLA class I抗体は女性、出産、輸血に関連し、class II抗体が移植腎機能の悪化に関連し、class I/class II抗体ともに陽性である場合に最もグラフトロスに陥る確率が高いとの報告もある<sup>5</sup>。理論的には、T細胞のアロ応答を完全に抑制できれば抗HLA抗体は産生されない。したがって、カルシニューリン阻害薬やステロイドの予防的投与が肝要であることは周知の事実であるが、ひとたび抗HLA抗体の産生応答が進行すれば、もはやカルシニューリン阻害薬やステロイドを用いた治療に対して抵抗性を示すことが少なくない。この場合、抗体除去目的の血漿交換やガンマグロブリン大量療法を併用することが有効であることが知られている。想定されるガンマグロブリンの作用機構としては、①マクロファージFcγレセプターのブロックによる抗体依存性細胞障害の抑制、②補体依存性細胞障害の改



弱, 免疫複合体介在性炎症の抑制や IL-1 産生の抑制といった抗炎症作用, ③抗イディオタイプ作用や B 細胞の Fcγ R B を介した抗体産生抑制作用など挙げられる。

ガンマグロブリンは, 移植後の抗体関連拒絶の制御のみならず, パネルテスト陽性/クロスマッチ陽性症例に対しても使用されている。最近, HLA 抗原に対する高感作症例に対し, リツキシマブとガンマグロブリンの併用による減感作を図り, 腎移植を行った報告がなされた<sup>9)</sup>。リツキシマブによる一過性の B 細胞除去と, ガンマグロブリン Fc 部と新たに分化した B 細胞の Fcγ レセプターを介した抗体産生抑制効果を期待したレジメと考えられる。一定の成果が得られているが, 特異性の問題と効果が期待できる期間の問題が残る。

■ ABO 血液型抗原に対する B-1a 細胞応答

臓器移植ドナー不足の究極的解決策としてブタを用いた異種移植に期待がかかる。一方で, ドナー不足の可及的緩和のために ABO 血液型不適合生体ドナーからの移植によるドナーソースの拡大が試みられている。これらの試みに共通する最大の障壁が T 細胞非依存性抗体性拒絶である。ABO 血液型不適合移植では臓器血管内皮に存在する, A, B 血液型抗原が, ま

たブタ-ヒト間の異種移植では Galα1, 3Gal (Gal) 抗原が標的となり抗原抗体反応により移植臓器が廃絶される<sup>10)</sup>。A, B 血液型抗原あるいは Gal 抗原はいずれも糖鎖抗原であるが, これらに反応する B 細胞を特異的に制御しうるプロトコルの確立が求められている。

われわれは A, B 血液型抗原と Gal 抗原に反応性を示す B 細胞の特性を解析してきた。その結果, 血液型抗原反応性 B 細胞は B-1a 細胞に (図 3)<sup>8)</sup>, Gal 反応性 B 細胞は B-1b 細胞にそれぞれ分類された (ともに, 主に腹腔や胸腔内に存在し, 脾臓に移行して抗体産生細胞となる)<sup>9)</sup> (表 1)。いずれも, 連続した糖鎖抗原で B 細胞受容体が架橋され, T 細胞からの補助シグナルがなくとも B 細胞が活性化し抗体産生細胞へと分化する。

■ カルシニューリン阻害薬による B-1a 細胞への分化抑制

Selection モデルでは, B-1a 細胞は, 未成熟 B 細胞が thymus-independent type-2 抗原の認識によってイムノグロブリン遺伝子のアレンジメントを通して分化すると考えられている。このような未成熟 B 細胞から B-1a 細胞への分化を, カルシニューリン阻害薬 (cyclosporin : CsA) が抑制する可能性が報告されている。マウスでは, phosphatidyl choline (PC) に応答する B

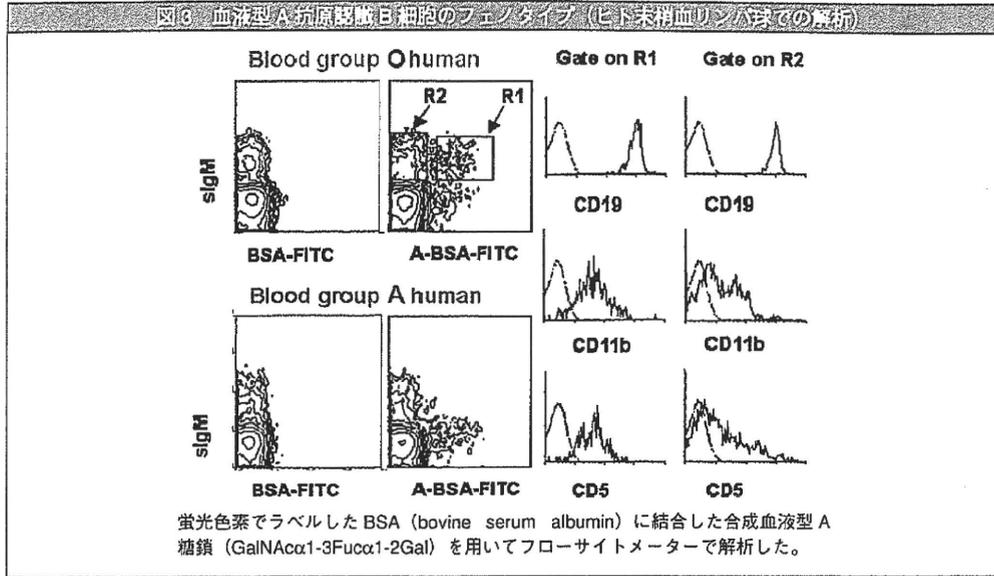


表1 抗血液型A抗原反応B細胞と抗Gal抗原反応B細胞のフェノタイプ

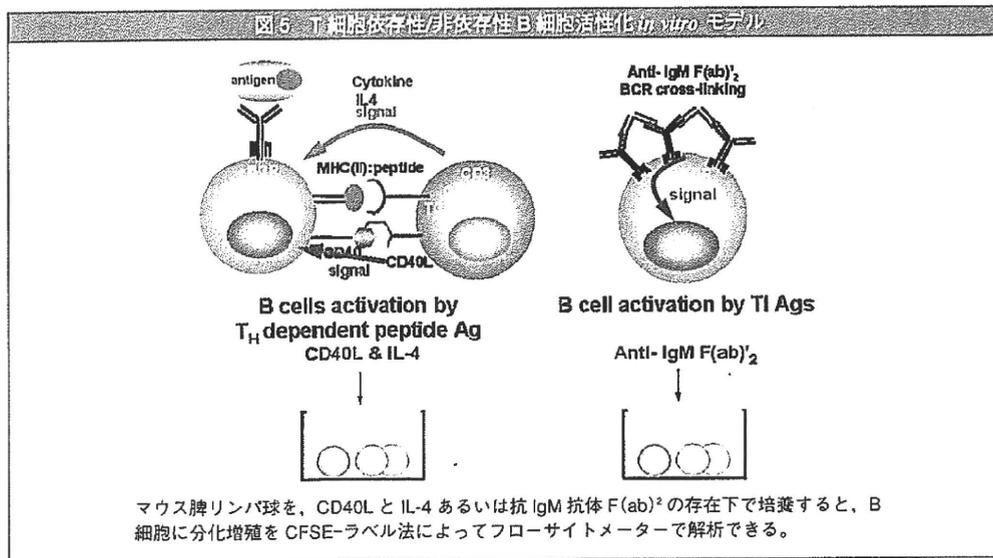
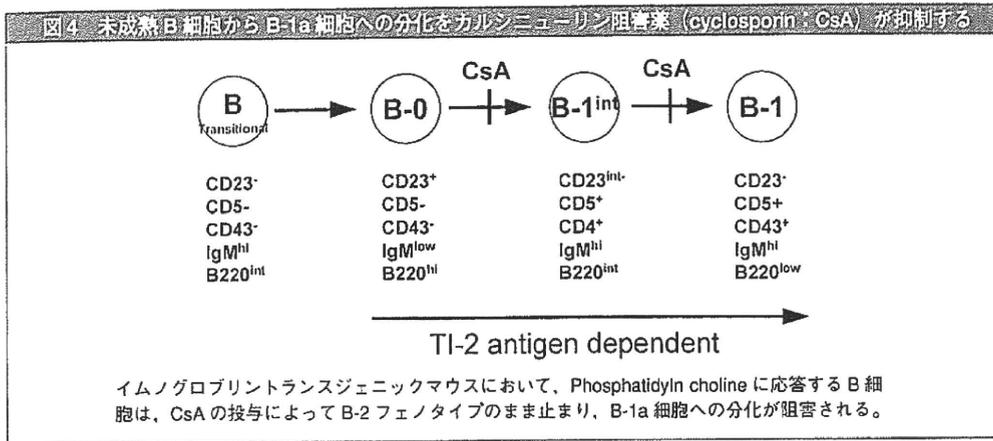
	Cell size	sigM	CD21	CD23	CD5	CD11b
B-2 cells	small	+	+/-	+	-	-
B-1a cells	large	++	-	-	+	+
B-1b cells	large	++	-	-	-	+
anti-Gal B cells	large	++	-	-	-	+
anti-A B cells	large	++	-	-	+	+

(マウス腹腔内B細胞の解析結果)

細胞は B-1a 細胞に分化することが知られている。抗 PtC-B 細胞が多く存在するイムノグロプリントランスジェニックマウスにおいて、CsA の投与によって抗 PtC-B 細胞は、B-2 フェノタイプのまま止まり、B-1a 細胞への分化が阻害されることが証明された (図 4)<sup>10)</sup>。

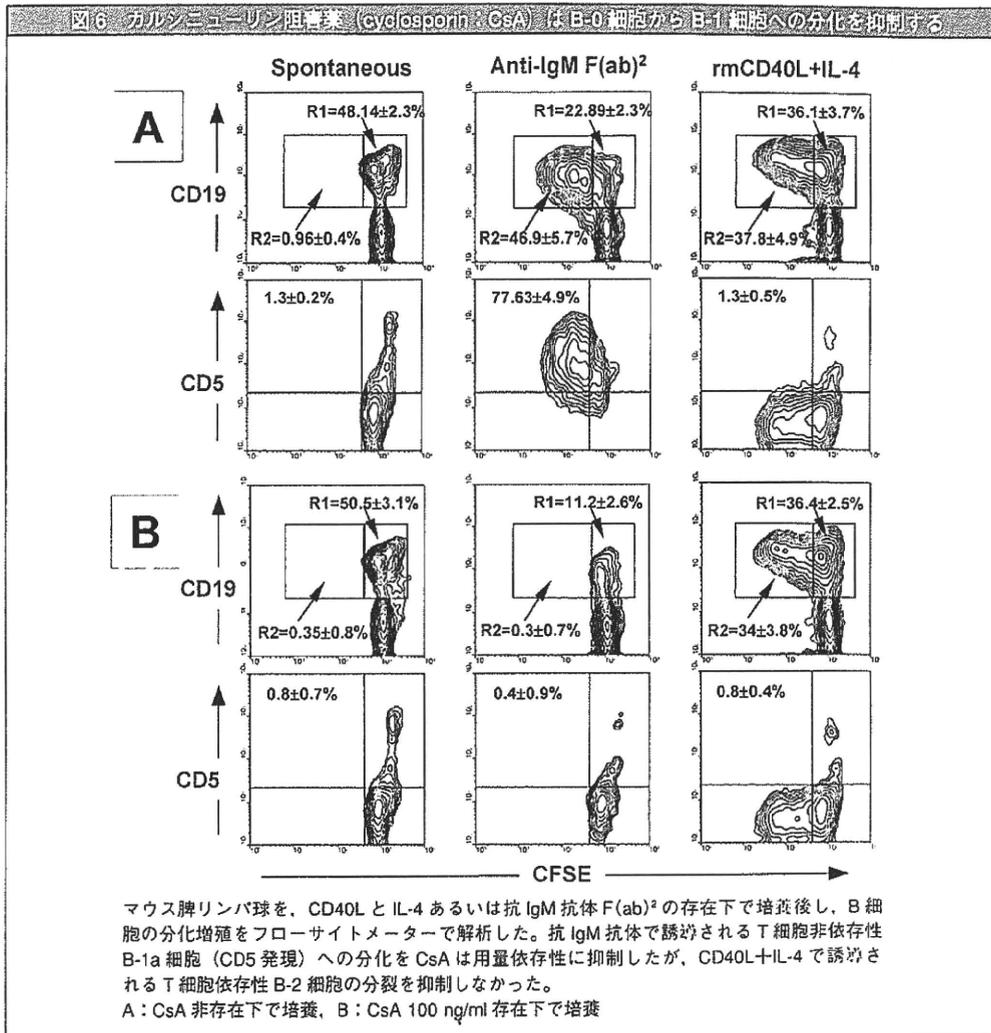
われわれの *in vitro* の検討でも、CsA は T 細胞非依存性 B-1a 細胞への分化を用量依存性に抑制したが、T 細胞依存性 B-2 細胞の分裂を抑制しなかった<sup>11)</sup> (図 5, 6)。したがって、CsA は血液型抗原反応性 B 細胞への分化を抑制する可能性があるが、tacrolimus (Tac) にも同様な効果を認めた<sup>12)</sup>。しかし、既に成熟した血液型抗原反応性 B 細胞と抗体産生細胞は CsA や Tac に抵抗性を示した。すなわち、成熟 B-1a 細胞と抗体

産生細胞を一時的に排除できれば、以後はカルシニューリン阻害薬の投与によって血液型不適合移植における抗体性拒絶反応を制御しうると考えられる。B-1a 細胞も B-2 細胞とともに CD20 分子を発現する。一方、IgG 抗体を産生するプラズマ細胞は CD20 分子の表出を欠く。したがって、抗 CD20 抗体 (rituximab) は、成熟 B-1a 細胞を一時的に除去するが、抗体産生細胞には無効であると考えられる。さらに、抗体産生は mycophenolate mofetil (MMF) の投与で抑制されることが知られている。新たな B-1a 細胞への分化をカルシニューリン阻害薬が抑制することと合わせて考えると、rituximab, MMF, カルシニューリン阻害薬の併用によって好成績を上げている ABO 血液型不適合腎移植の臨床病態を説明しうる。



文 献

- 1) Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol* 2006; 27: 428-433.
- 2) Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 213-219.
- 3) Kantor AB, Merrill CE, Herzenberg LA, *et al.* An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol* 1997; 158: 1175-1186.
- 4) Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004; 4: 438-443.
- 5) Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, *et al.* Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant* 2006; 6: 2316-2320.
- 6) Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, *et al.* Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization



during renal transplantation. *N Engl J Med* 2008; 359: 242-251.

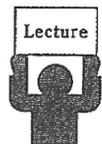
7) Ohdan H, Sykes M. B cell tolerance to xenoantigens. *Xenotransplantation* 2003; 10: 98-106.

8) Zhou W, Ohdan H, Tanaka Y, *et al.* NOD/SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes can be a model for investigating B cells responding to blood group A carbohydrate determinant. *Transpl Immunol* 2003; 12: 9-18.

9) Ohdan H, Swenson KG, Kruger Gray HS, *et al.*

Mac-1-negative B-1b phenotype of natural antibody-producing cells, including those responding to Gal  $\alpha$  1,3Gal epitopes in  $\alpha$  1,3-galactosyltransferase-deficient mice. *J Immunol* 2000; 165: 5518-5529.

10) Arnold LW, McCray SK, Tatu C, *et al.* Identification of a precursor to phosphatidyl choline-specific B-1 cells suggesting that B-1 cells differentiate from splenic conventional B cells in vivo: cyclosporin A blocks differentiation to B-1. *J Immunol* 2000; 164: 2924-2930.



## 解説

# T細胞の経口トレランス誘導と肝類洞内皮細胞\*

尾上隆司\*\* 大段秀樹\*\*

Key Words : oral tolerance, liver sinusoidal endothelial cells, T cells, antigen presenting cells

### はじめに

動物にとって“食べること”(経口摂取)は生命を維持していく上で欠くことのできない最も基本的な行為である。しかし、摂取される食物は基本的に非自己由来であり、いったん体の中に入れば免疫学的にはこれを排除するような免疫応答が起こりうる。つまり、経口摂取された食物抗原は、消化管において蛋白質レベルあるいはペプチドレベルまで分解されるが、その一部は抗原性を残したまま吸収され、これらの吸収された食物抗原は免疫系の抗原提示細胞によってT細胞に提示され、食物抗原に対する免疫系の感作が成立しうる。しかしながら正常な状態では、経口摂取された蛋白質に対して免疫系は反応せず、寛容の状態となる。実際、食物を経口摂取した場合、健常人でも血液中に食物抗原が検出されるが、健常人ではアレルギーなどの免疫反応を呈しない<sup>1)</sup>。また、動物実験においても、抗原物質を経口投与した場合、あとでこの抗原物質を皮下などに非経口的に投与しても、それに対する強力な抗原特異的免疫反応抑制が観察される<sup>2)</sup>。これらのことから、経口摂取された抗原にはなんらかの免疫寛容機構が働いていると考えられる。この現象は、“経口トレランス”として古くから知られており、日常食物として摂取しているさまざまな異種蛋白質およびペプチドに対して多くのヒトが食物アレルギーを起こさ

ない理由はこの“経口トレランス”が重要な役割を果たしているからと考えられている。

経口トレランスの機序については現在、腸管粘膜における樹状細胞と制御性T細胞(regulatory T cell)誘導<sup>3)</sup>、 $\gamma\delta$  TCR陽性IEL細胞の関与<sup>4)</sup>、高用量抗原の場合のT細胞アナジー(anergy)、T細胞クローン除去(clonal deletion)などが考えられている<sup>5)</sup>。これら粘膜免疫は経口トレランスの機序に深くかかわっていると思われるが、一方で粘膜免疫の主要な場であるパイエル板がないマウスでも経口トレランスが誘導されるとの報告があり、全身性免疫学的寛容を誘導するような他の機序の存在が示唆される。

肝臓は全身性の免疫寛容を誘導しやすい臓器として知られている。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>6)</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>7)</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1分子など)の作用<sup>8)</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

\* Oral tolerance of T cells via liver sinusoidal endothelial cells (LSEC).

\*\* Takashi ONO, M.D., Ph.D. & Hideki OHDAN, M.D., Ph.D.: 広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科学[☎734-8553 広島市南区霞1-2-3]; Department of Surgery, Division of Frontier Medical Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima 734-8553, JAPAN

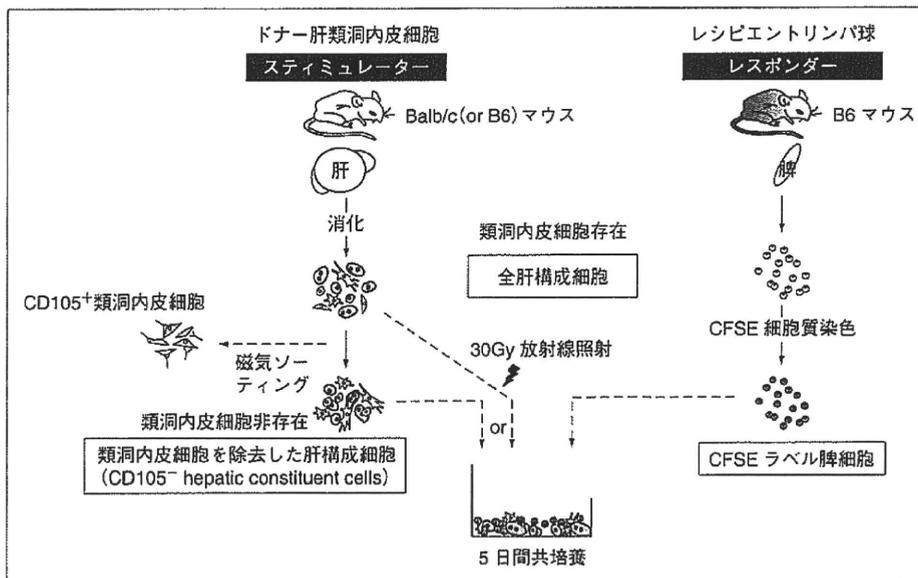


図1 肝構成細胞の免疫原性の解析系

Balb/cマウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流で消化し、肝構成細胞に分離した。肝内では類洞内皮細胞のみがCD105分子を表現するため、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(30Gy)し、CFSEで蛍光染色したB6の脾リンパ球と混合培養した後、フローサイトメトリーでCFSE輝度を測定することで細胞の増殖を定量した。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。

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>9)</sup>。

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抗原特異的寛容誘導特性を有することを確認した<sup>10)~13)</sup>。本稿では、移植での肝臓の免疫寛容性における肝類洞内皮細胞の役割に関するわれわれの研究成果を紹介し、経口トランス誘導とのかかわりについてアプローチする。

### 類洞内皮細胞は免疫寛容誘導特性を有する

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。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, レシピエントマウス(B6)の脾リンパ球をresponderに用いMLR assay<sup>14)15)</sup>によって、アロ反応性のCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖指数を解析した(図1)。肝構築細胞のすべてをstimulatorとしてMLRを行った場合、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。また、類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系T細胞はわずかに分裂するものの分裂初期にアネキシンV陽性となりアポトーシスに陥ることが判明した(図2)。これらの結果より、類洞内皮細胞は免疫寛容誘導特性を有し、反応性T細胞をアポトーシスに陥らせていることが明らかとなった。

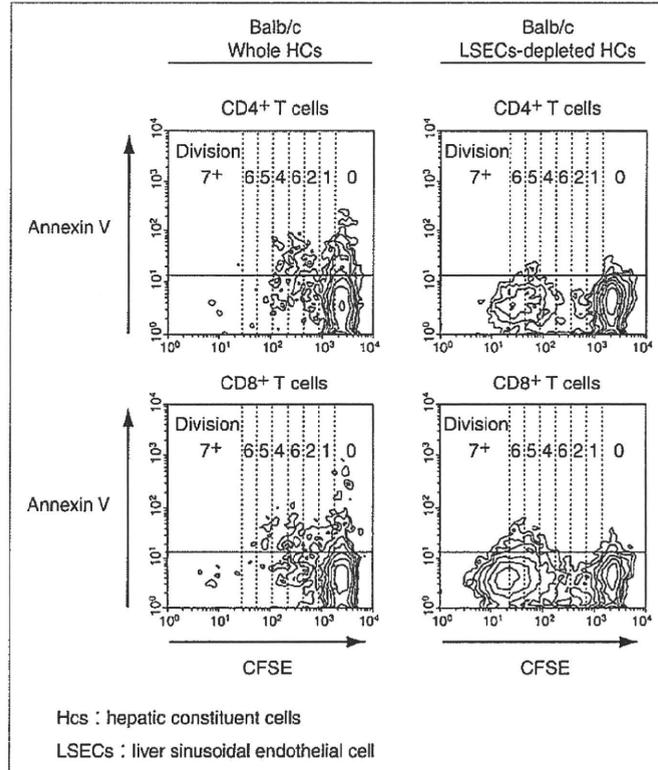


図2 肝類洞内皮細胞はアロ反応性T細胞にアポトーシスを誘導する。Balb/cマウスの肝臓構築細胞をstimulatorに、B6の脾リンパ球をresponderに用い、CFSE-MLR assayによってアロ反応性のCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖指数と存在比率を解析した。肝構築細胞(HCs)のすべてをstimulatorとしてCFSE-MLRをした場合、すなわち類洞内皮細胞(LSECs)の存在下で混合培養した異系T細胞はわずかながら分裂を認めたが、その分裂T細胞はすべてアネキシンV陽性で、分裂初期にアポトーシスに陥ることがわかった。類洞内皮細胞(LSECs)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。

### 外来抗原提示細胞としての 肝類洞内皮細胞

Balb/cマウスから分離した類洞内皮細胞のフェノタイプを解析すると、ナイーブな状態で恒常的にMHCクラス II、共刺激分子(CD40, CD80, CD86)、細胞死誘導分子(Fas ligand)を発現していた(図3)。このようなフェノタイプは抗原提示細胞としての性質を肝類洞内皮細胞が備えていることを示唆している<sup>16)</sup>。また、定常状態でのナイーブT細胞への抗原提示能は他臓器の内皮細胞では認められず、肝類洞内皮細胞に特徴的

な性質であることも報告されている<sup>17)</sup>。われわれは類洞内皮細胞が外来抗原提示能を有するかを検討するため、PKH-26色素でラベルしたB6クラス II KOマウスの脾細胞を放射線照射してBalb/cマウスに経門脈的投与を行った。12時間後、肝臓をコラゲナーゼ処理して非実質細胞から肝類洞内皮細胞を分離し解析した結果、肝類洞内皮細胞が投与した同種外来抗原を効率的にとり込んでいることが明らかとなった(図4-A)。さらに、同種外来抗原を貪食した類洞内皮細胞は抗原提示細胞能を有しつつFasLの表出を増強していた(図4-B)。

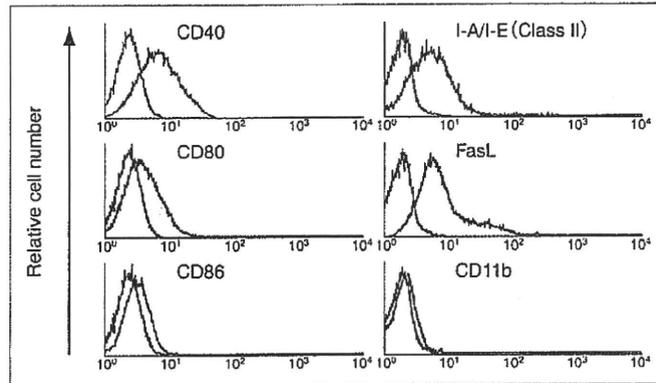


図3 マウス類洞内皮細胞のフェノタイプ(ナイーブ状態)  
Balb/cマウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流で消化し、肝構成細胞に分離した後、抗CD105抗体を用いマグネティック・ソーティング法で類洞内皮細胞を分離した。分離した類洞内皮細胞の表面分子をフローサイトメトリーで解析した。CD11c: Kupffer細胞マーカー

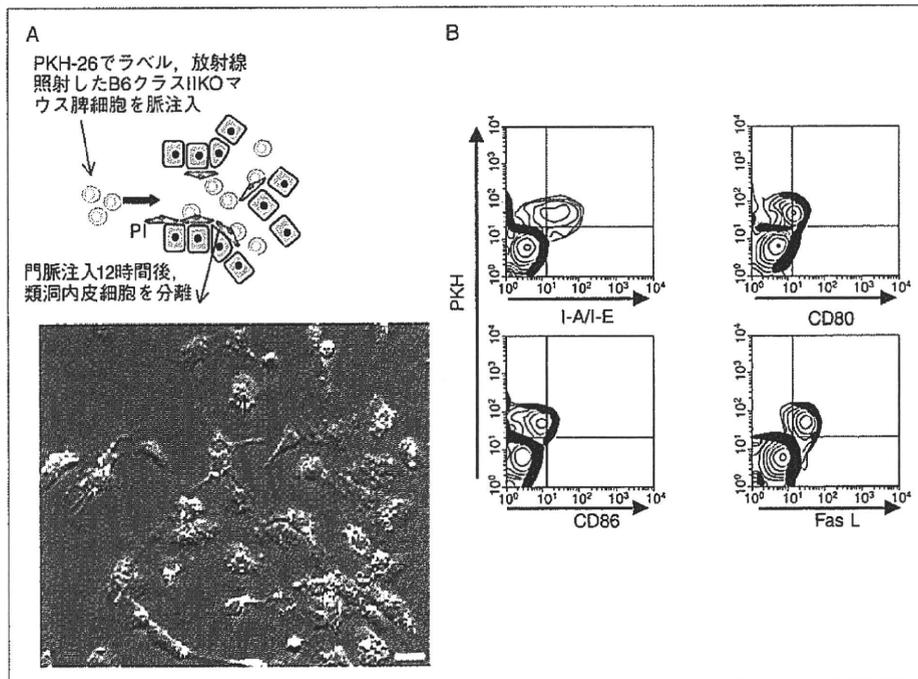


図4 ドナー抗原を貪食した類洞内皮細胞は抗原提示細胞能を有しつつFasLの表出を増強する  
Balb/cマウスにPKH-26色素(蛍光色素:赤)で染色後、放射線照射したB6クラスII KOマウスの脾細胞を経門脈的に投与した。12時間後、肝臓をコラゲナーゼ処理して肝類洞内皮細胞を分離した。A:共焦点顕微鏡での観察、B:フローサイトメトリーでのフェノタイプの解析。

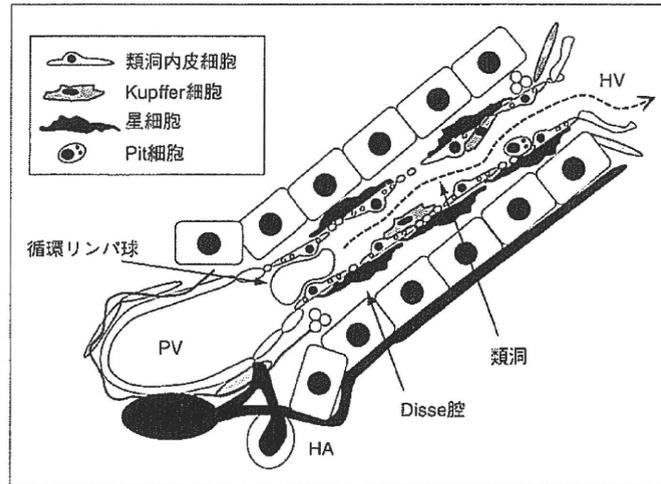


図5 肝類洞の解剖学的構築

循環リンパ球は狭い類洞腔を類洞内皮細胞に接しながら通過する。PV：門脈，HA：肝動脈，HV：肝静脈

#### 類洞の解剖学的特殊性

類洞は肝の毛細血管に相当するが、一般の毛細血管に比べて複雑な構造をとる。類洞壁を構成している細胞は肝体積全体の2%を占めているにすぎないが、細胞数では肝全体の36%を占める。類洞の直径は5~7 $\mu$ mであり、肝臓を通過するT細胞などの循環リンパ球は類洞を通過する際に類洞内皮細胞と密に接触し有効な抗原提示を受けていると推察される(図5)。

#### 外来抗原を貪食した 類洞内皮細胞と接触したT細胞は、 外来抗原提示に対して 抗原特異的に不応答化する

B6クラスII KOマウスの脾細胞を放射線照射してBalb/cマウスに経門脈的投与後、肝臓をコラゲナーゼ処理して非実質細胞から肝類洞内皮細胞を分離し、フィブロネクチンでコートしたpore membraneに接着培養し、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6-A)。CFSE色素でラベルしたBalb/cマウスのT細胞を重層培養しトランスマイグレート(transmigration assay)させた後、放射線照射したB6クラスII KO

マウスの脾細胞で感作したBALB/cマウス由来の脾細胞由来抗原提示細胞と混合培養しMLR assayを行った。B6クラスII KOマウスの脾細胞をとり込んだ同系類洞内皮細胞層を接触通過したCD4<sup>+</sup>T細胞はB6クラスII KOマウス脾細胞抗原で感作した同系抗原提示細胞の刺激に対して不応答化した(図6-B：中段右)、無処置の同系類洞内皮細胞層を接触通過したCD4<sup>+</sup>T細胞はB6脾細胞抗原で感作した同系抗原提示細胞の刺激に対して正常の応答を示した(図6-B：中段左)。また、B6クラスII KOマウス(H2<sup>b</sup>)の脾細胞をとり込んだ同系類洞内皮細胞層を接触通過したCD4<sup>+</sup>T細胞を、C3Hマウス(H2<sup>k</sup>)脾細胞抗原で感作した同系抗原提示細胞で刺激しても不応答化は認めなかった(図6-B：下段右)。これらの結果は、門脈注入された外来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CD4<sup>+</sup>T細胞に抗原特異的に免疫寛容が誘導されることを示している。さらに、Fas ligand deficientマウスであるBalb/c-*gld*マウスにB6クラスII KOマウスの脾細胞を門脈注入し同様の実験を行ったところ、B6クラスII KOマウス脾細胞をとり込んだBalb/c-*gld*類洞内皮細胞層を接触通過したCD4<sup>+</sup>T細胞はB6クラスII KOマウス脾細胞抗原で感作した同系抗

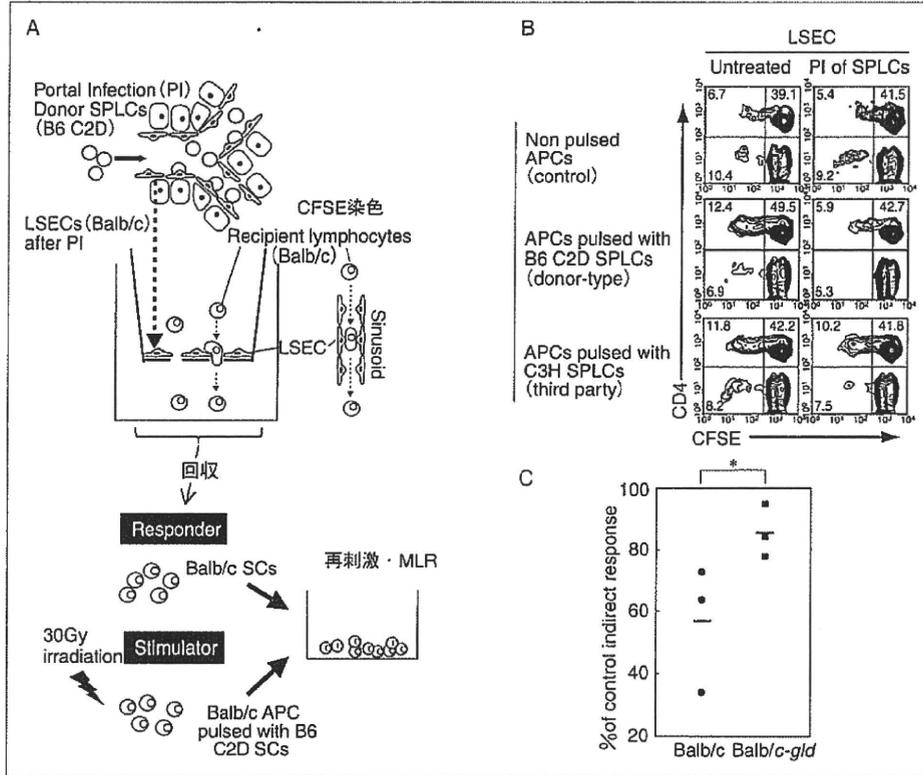


図6 肝類洞内皮の解剖構築を模倣した*in vitro*解析系

類洞内皮細胞と接触したT細胞は門脈注入した抗原特異的に不応答を示す。

- A : B6クラス II KO (C2D) マウスの脾細胞を放射線照射してBalb/cマウスに経門脈的投与後、肝臓をコラゲナーゼ処理して非実質細胞から肝類洞内皮細胞を分離し、フィブロネクチンでコートしたpore membraneに接着培養した。CFSE色素でラベルしたBalb/cマウスのT細胞を重層培養しトランスマイグレート(transmigration assay)させた後、放射線照射したB6クラス II KOマウスの脾細胞で感作したBALB/cマウス由来の脾細胞由来抗原提示細胞(APC)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、B6クラス II KOマウスの脾細胞で感作したBalb/c由来(自己)抗原提示細胞の刺激に対して不応答化した(中段右)が、C3Hマウスの脾細胞で感作したBalb/c由来(自己)抗原提示細胞の刺激に対しては応答を示した。
- C : Fas ligand deficientマウスであるBalb/c-gldマウスにB6クラス II KOマウスの脾細胞を門脈注入しtransmigration assayを行った。B6クラス II KOマウス脾細胞をとり込んだBalb/c-gld類洞内皮細胞層を接触通過したCD4<sup>+</sup>T細胞はその不応答が消失した。

原提示細胞の刺激に対して応答を示した(図6-C)。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示唆された。

肝類洞内皮細胞の貪食能にはNKT細胞が影響を及ぼす

肝類洞の構成細胞には、肝類洞内皮細胞、

Kupffer細胞, natural killer(NK)細胞, natural killer T(NKT)細胞などの肝リンパ球, 脂肪摂取細胞(星細胞), 樹状細胞がある。これらの細胞はそれぞれ独自の機能を持つが、構造的にも機能的にも相互に密接な関係を維持している。特に、いくつかの研究ではinvariant NKT細胞が経口トレランス誘導にかかわっていると報告している<sup>18,19</sup>。われわれは、B6クラス II KOマウスの

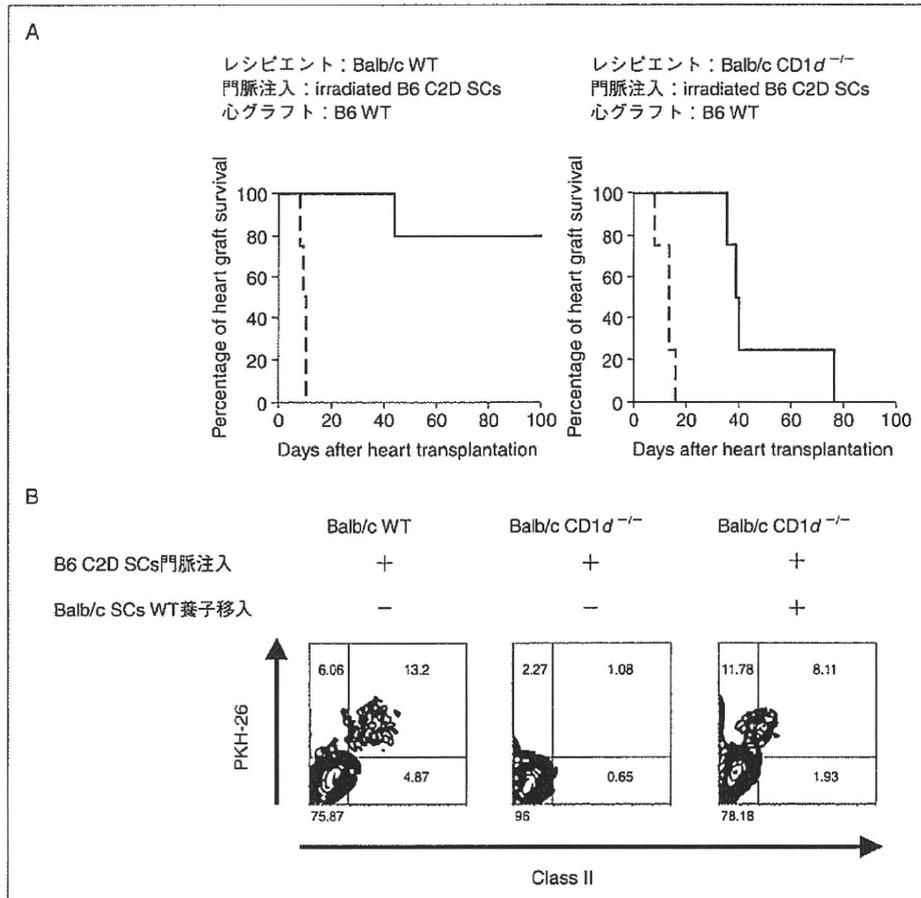


図7 肝類洞内皮細胞の貪食能にはNKT細胞が影響を及ぼす

A : B6クラス II KO (C2D)マウスの脾細胞を放射線照射してBalb/c WTマウスまたはBalb/c CD1d KOマウスに経門脈的投与1W後, B6クラス II KO (C2D)マウスの心臓を移植した。

B : B6クラス II KO (C2D)マウスの脾細胞を放射線照射してBalb/c CD1d KOマウスに門脈注入し分離した類洞内皮細胞のプロファイルをフローサイトメトリーで解析した。CD1d KOマウスから分離した類洞内皮細胞では抗原貪食が著明に低下しており, wild typeマウスからの肝由来細胞の養子移入で抗原貪食がリストアされた。

脾細胞を放射線照射してwild typeまたはCD1d KO Balb/cマウスに経門脈的投与後, B6クラス II KOマウスの心臓を移植した。wild typeマウスでは80%のマウスでグラフト心の長期生着が得られたのに対し, CD1d KOマウスでは80日以内に全例が拒絶された(図7-A)。CD1d KOマウスではinvariant NKT細胞が存在しないため, invariant NKT細胞が抗原門脈投与によるトレランス誘導

に必要と考えられた。さらに, 類洞内皮細胞のプロファイル解析において, CD1d KOマウスから分離した類洞内皮細胞では抗原貪食が著明に低下しており, wild typeマウスからの肝由来細胞の養子移入で抗原貪食がリストアされたことより, 肝類洞内皮細胞の貪食能にはNKT細胞の存在が必要であることが示唆された(図7-B)。

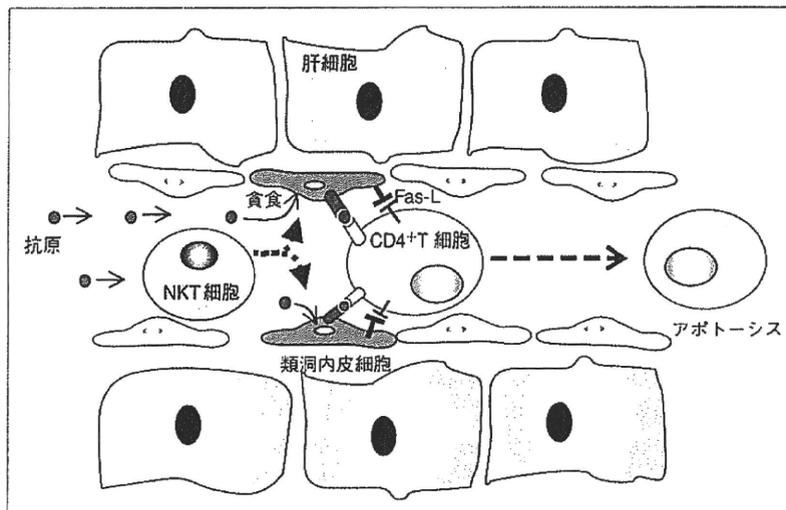


図8 類洞内皮細胞による循環CD4<sup>+</sup>T細胞寛容化メカニズムのシェーマ  
 吸収され門脈から類洞へ到達した外来抗原はNKT細胞の存在下、類洞内皮細胞に貪食される。類洞内皮細胞は貪食した抗原を循環CD4<sup>+</sup>T細胞に抗原提示し、反応性T細胞をFas ligandを介した抑制シグナルによってアポトーシスに陥らせることで抗原特異的に寛容誘導する。

#### 経口トレランス誘導における 類洞内皮細胞の役割

前述したように、経口トレランスにおける粘膜免疫の関与は疑いないものと考えられる。しかし、現実には蛋白質レベルでの粘膜の通過、吸収も行われている。実際、卵白アルブミン(OVA)を経口摂取したあと、血液中にOVA抗原が出現することは、ヒトでもマウスやラットの動物モデルにおいても実験的に証明されている<sup>20)</sup>。腸管から吸収された蛋白抗原は経門脈的に肝臓へと運ばれるため、経口摂取された蛋白抗原も同様に肝類洞内皮内にとり込まれていると考えられる。動物にとって食物抗原への免疫反応(食物アレルギー)は不都合なものであり、多重のセーフティネットがあると推察されるが、われわれは、類洞内皮細胞を中心とした肝臓免疫がその一部を担い、上述してきたような機序で経口トレランスを誘導していると考えている(図8)。最近、類洞内皮細胞が抑制分子であるB7-H1シグナルを介してCD8<sup>+</sup>T細胞増殖を抑制すること、この抑制効果は抗原濃度と類洞内皮細胞-T細胞間のシグナル強度によって調整されているこ

とが報告された<sup>21)22)</sup>。このような研究成果から、類洞内皮細胞上の免疫調節分子を標的にした治療薬がアレルギー治療や移植免疫寛容誘導に応用しうるか否かが興味深いところであり、今後の研究の進展が待たれる。

#### 文 献

- 1) Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 3.
- 2) Strobel S, Mowat AM. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 1998; 19: 173.
- 3) von BH. Oral tolerance: is it all retinoic acid? *J Exp Med* 2007; 204: 1737.
- 4) Kapp JA, Ke Y. The role of gammadelta TCR-bearing T cells in oral tolerance. *Res Immunol* 1997; 148: 561.
- 5) Burks AW, Laubach S, Jones SM. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1344.
- 6) Calne RY, Sells RA, Pena JR, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts.

- Nature 1969 ; 223 : 472.
- 7) Kamada N, Davies HS, Roser B. Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* 1981 ; 292 : 840.
  - 8) Zavazava N, Kronke M. Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 1996 ; 2 : 1005.
  - 9) 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.
  - 10) Onoe T, Ohdan H, Shishida M, et al. Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol* 2005 ; 175 : 139.
  - 11) Shishida M, Ohdan H, Onoe T, et al. Role of invariant natural killer T cells in liver sinusoidal endothelial cell-induced immunosuppression among T cells with indirect allospecificity. *Transplantation* 2008 ; 85 : 1060.
  - 12) Onoe T, Ohdan H, Tanaka Y, 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.
  - 13) Shishida M, Ohdan H, Onoe T, et al. Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity. *J Immunol* 2006 ; 177 : 3615.
  - 14) 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.
  - 15) Onoe T, Ohdan H, Tanaka Y, 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.
  - 16) Limmer A, Ohl J, Kurts C, et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8<sup>+</sup> T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000 ; 6 : 1348.
  - 17) Briscoe DM, Henault LE, Geehan C, et al. Human endothelial cell costimulation of T cell IFN-gamma production. *J Immunol* 1997 ; 159 : 3247.
  - 18) Margenthaler JA, Landeros K, Kataoka M, et al. CD1-dependent natural killer (NK1.1<sup>+</sup>) T cells are required for oral and portal venous tolerance induction. *J Surg Res* 2002 ; 104 : 29.
  - 19) Margalit M, Ilan Y. Induction of immune tolerance : a role for Natural killer T lymphocytes? *Liver Int* 2005 ; 25 : 501.
  - 20) Walker WA. Absorption of protein and protein fragments in the developing intestine : role in immunologic/allergic reactions. *Pediatrics* 1985 ; 75(1 Pt 2) : 167.
  - 21) Diehl L, Schurich A, Knolle PA, et al. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *Hepatology* 2008 ; 47 : 296.
  - 22) Schurich A, Berg M, Stabenow D, et al. Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 2010 ; 184 : 4107.

\* \* \*