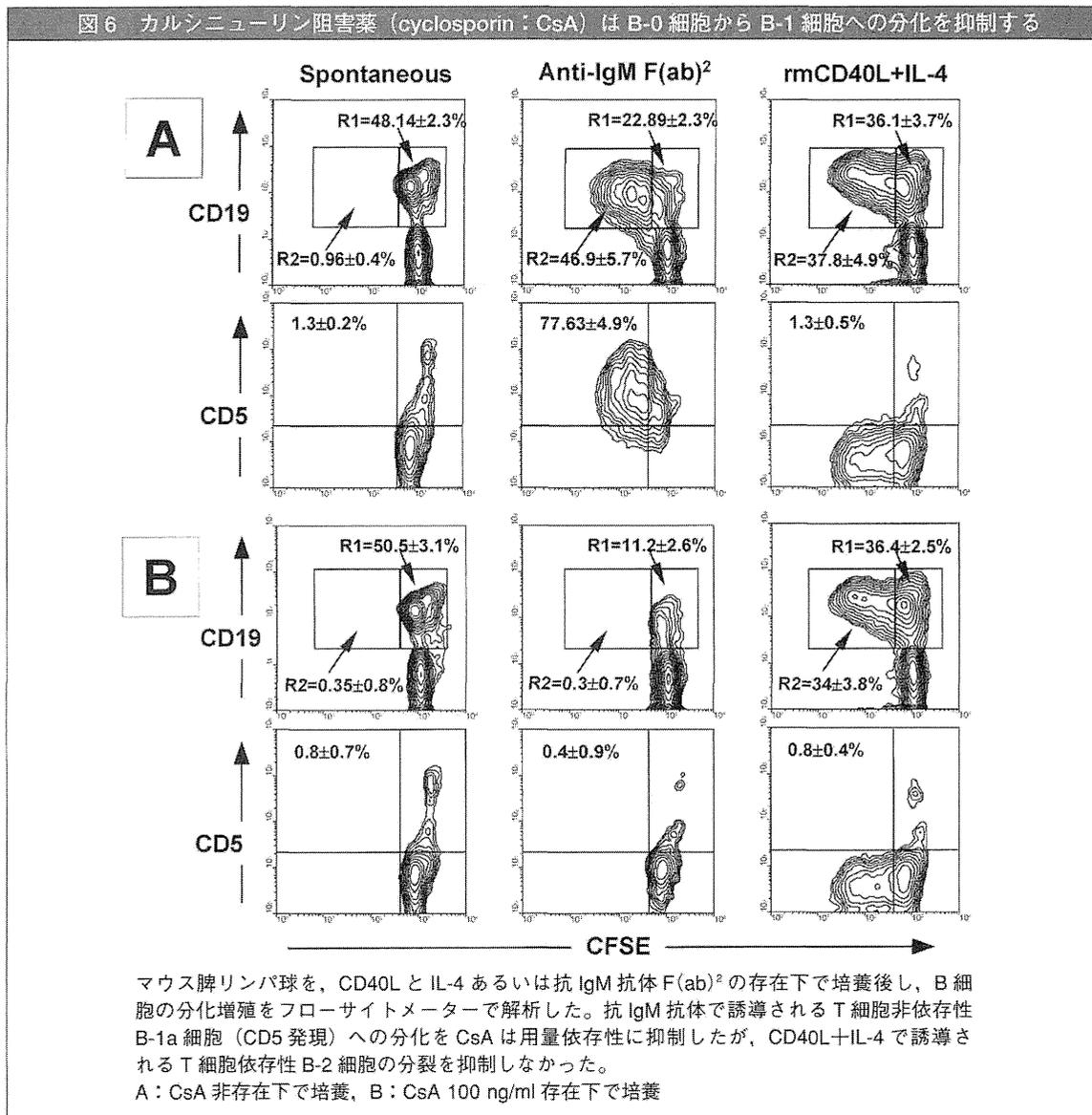


図6 カルシニューリン阻害薬 (cyclosporin : CsA) は B-0 細胞から B-1 細胞への分化を抑制する



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.

- 11) Irei T, Ohdan H, Zhou W, *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* 2007; 110: 4567-4575.
- 12) Zhou W, Ohdan H, Asahara T. Calcineurin inhibitors block B-1 cell differentiation: the relevance to immunosuppressive treatment in ABO-incompatible transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1808-1811.



## 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 ONOE, 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

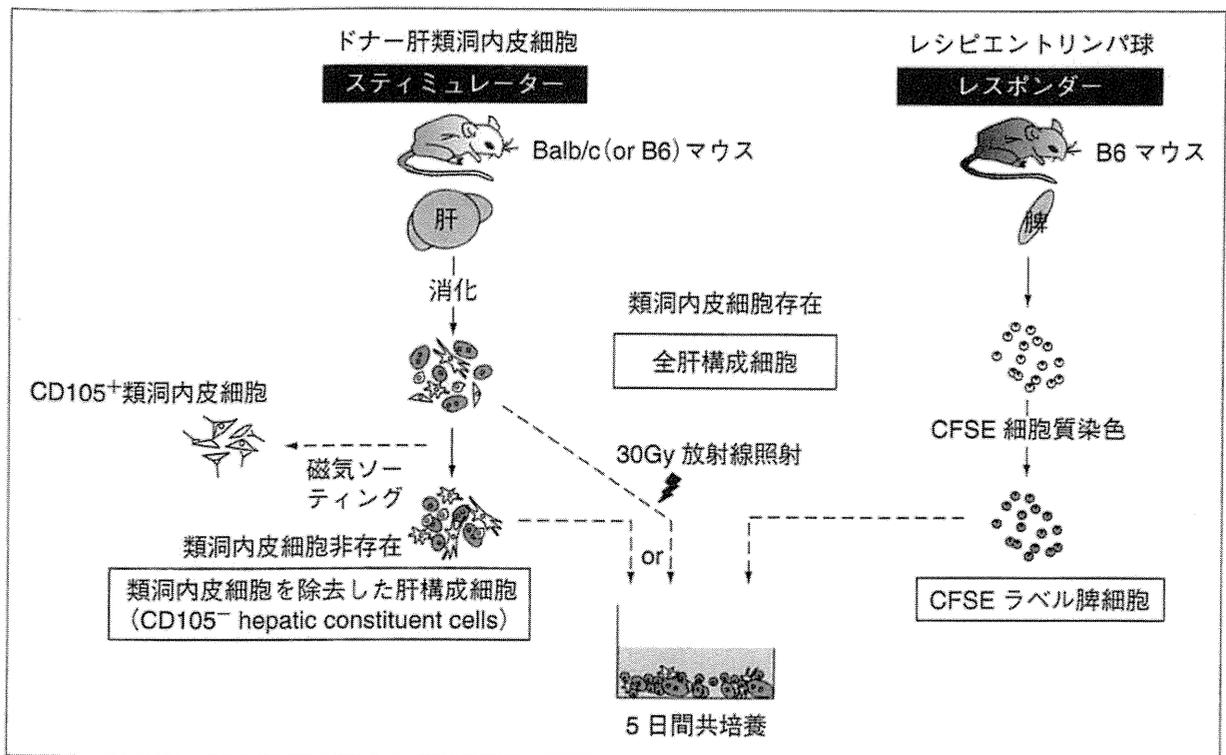


図1 肝構成細胞の免疫原性の解析系

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分子を表出するため、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、経口トレ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。

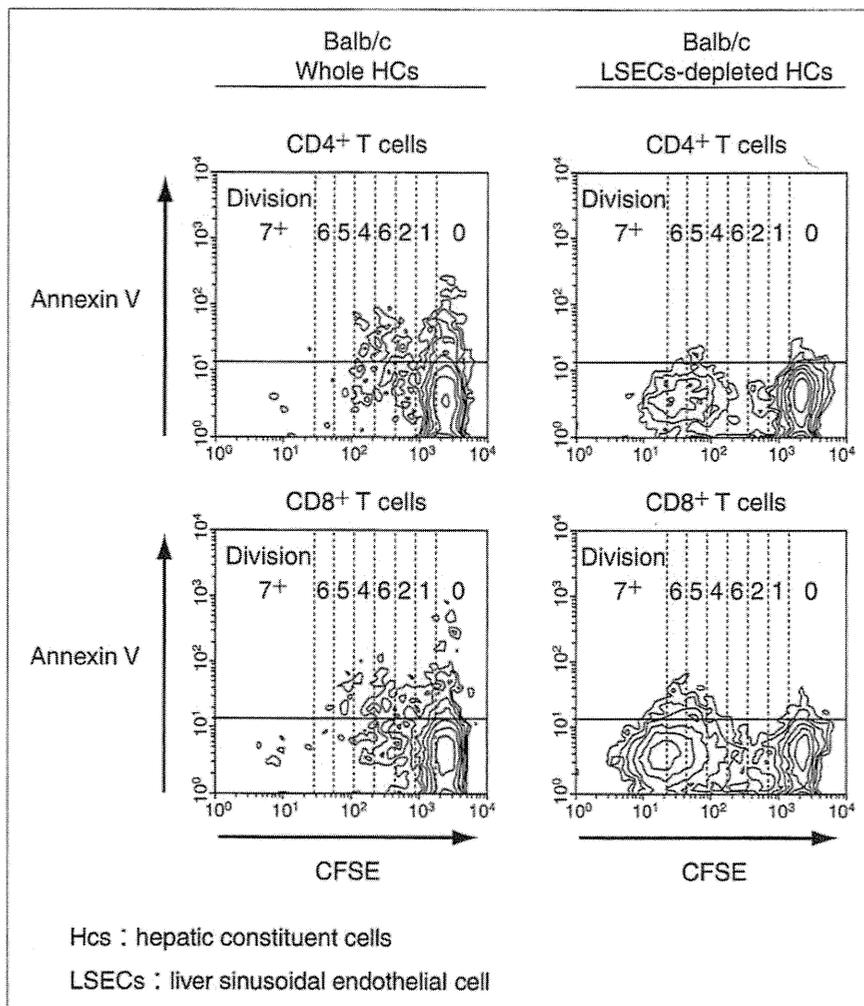


図2 肝類洞内皮細胞はアロ反応性T細胞にアポトーシスを誘導する  
Balb/cマウスの肝臓構築細胞をstimulatorに、B6の脾リンパ球をresponderに用い、CFSE-MLR assayによってアロ反応性のCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖指数と存在比率を解析した。肝構築細胞(HCs)のすべてをstimulatorとしてCFSE-MLRをした場合、すなわち類洞内皮細胞(LSECs)の存在下で混合培養した異系T細胞はわずかながら分裂を認めたが、その分裂T細胞はすべてアネキシンV陽性で、分裂初期にアポトーシスに陥ることがわかった。類洞内皮細胞(LSECs)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

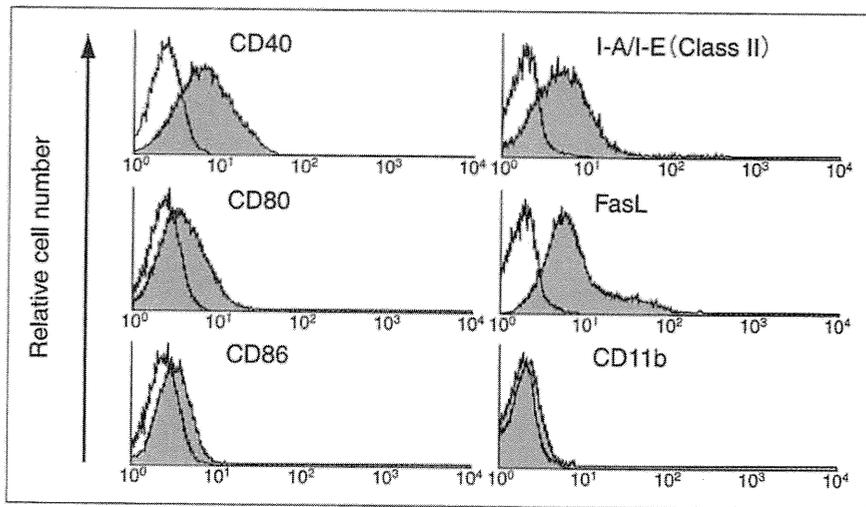


図3 マウス類洞内皮細胞のフェノタイプ(ナীব状態)  
Balb/cマウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流で消化し、肝構成細胞に分離した後、抗CD105抗体を用いマグネティック・ソーティング法で類洞内皮細胞を分離した。分離した類洞内皮細胞の表面分子をフローサイトメトリーで解析した。CD11c: Kupffer細胞マーカー

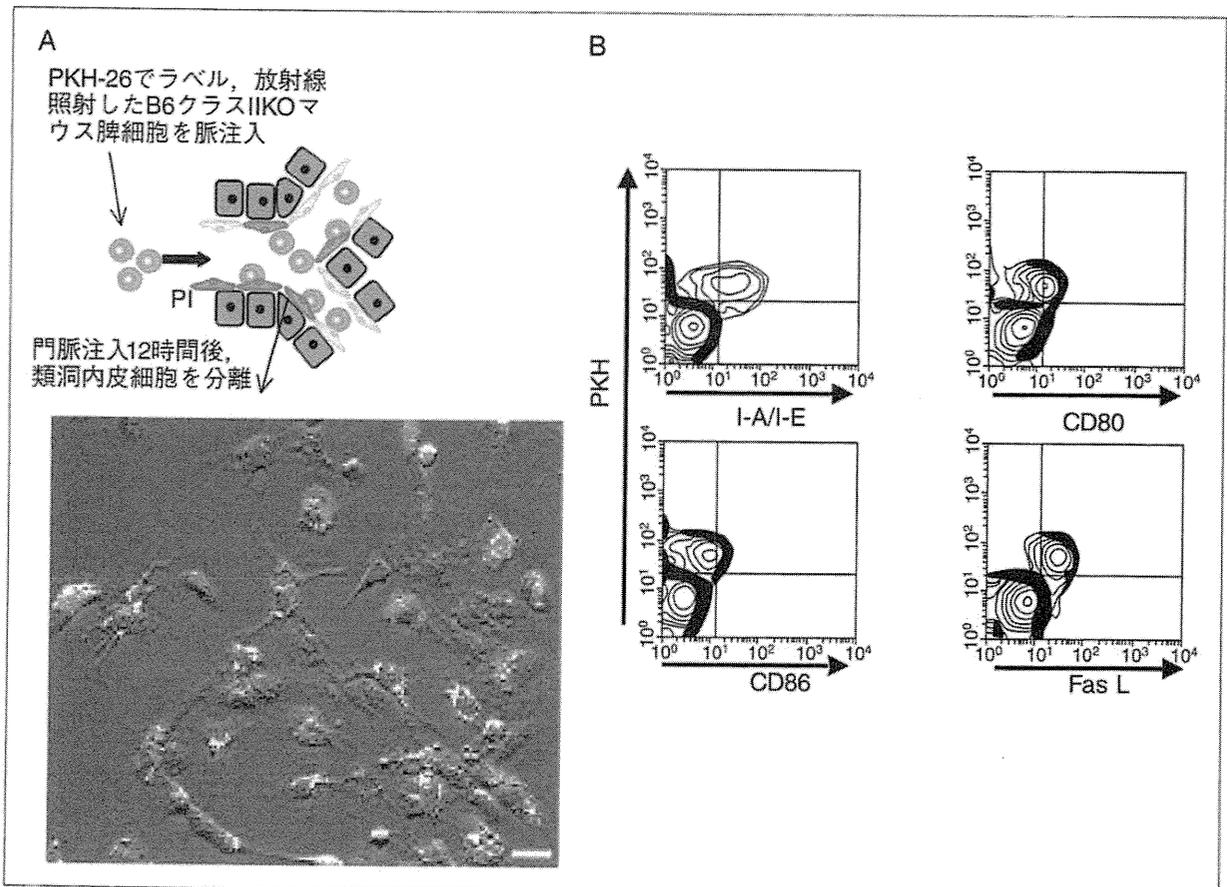


図4 ドナー抗原を貪食した類洞内皮細胞は抗原提示細胞能を有しつつFasLの表出を増強する  
Balb/cマウスにPKH-26色素(蛍光色素:赤)で染色後、放射線照射したB6クラス II KOマウスの脾細胞を経門脈的に投与した。12時間後、肝臓をコラゲナーゼ処理して肝類洞内皮細胞を分離した。A: 共焦点顕微鏡での観察, B: フローサイトメトリーでのフェノタイプの解析。

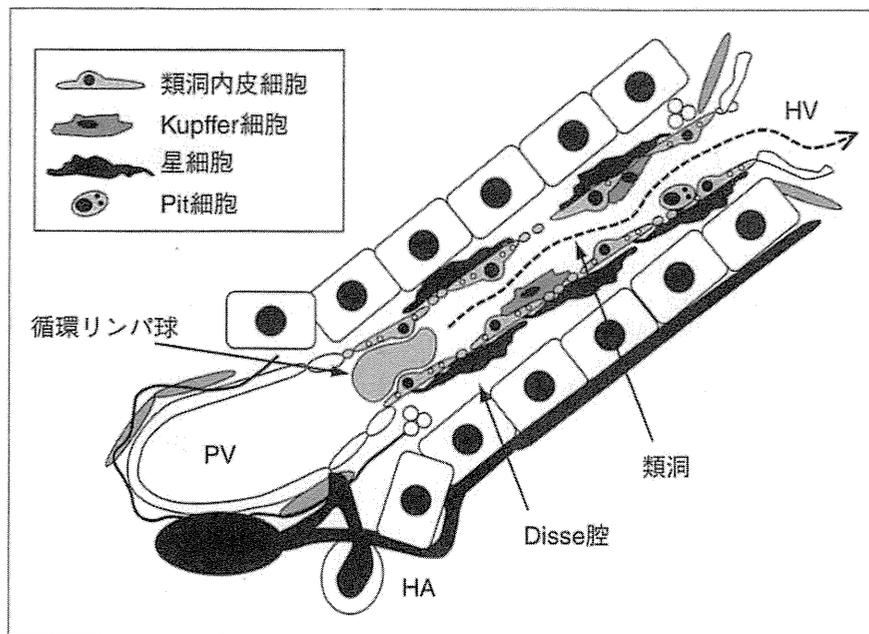


図5 肝類洞の解剖学的構築

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 $\mu\text{m}$ 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が(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

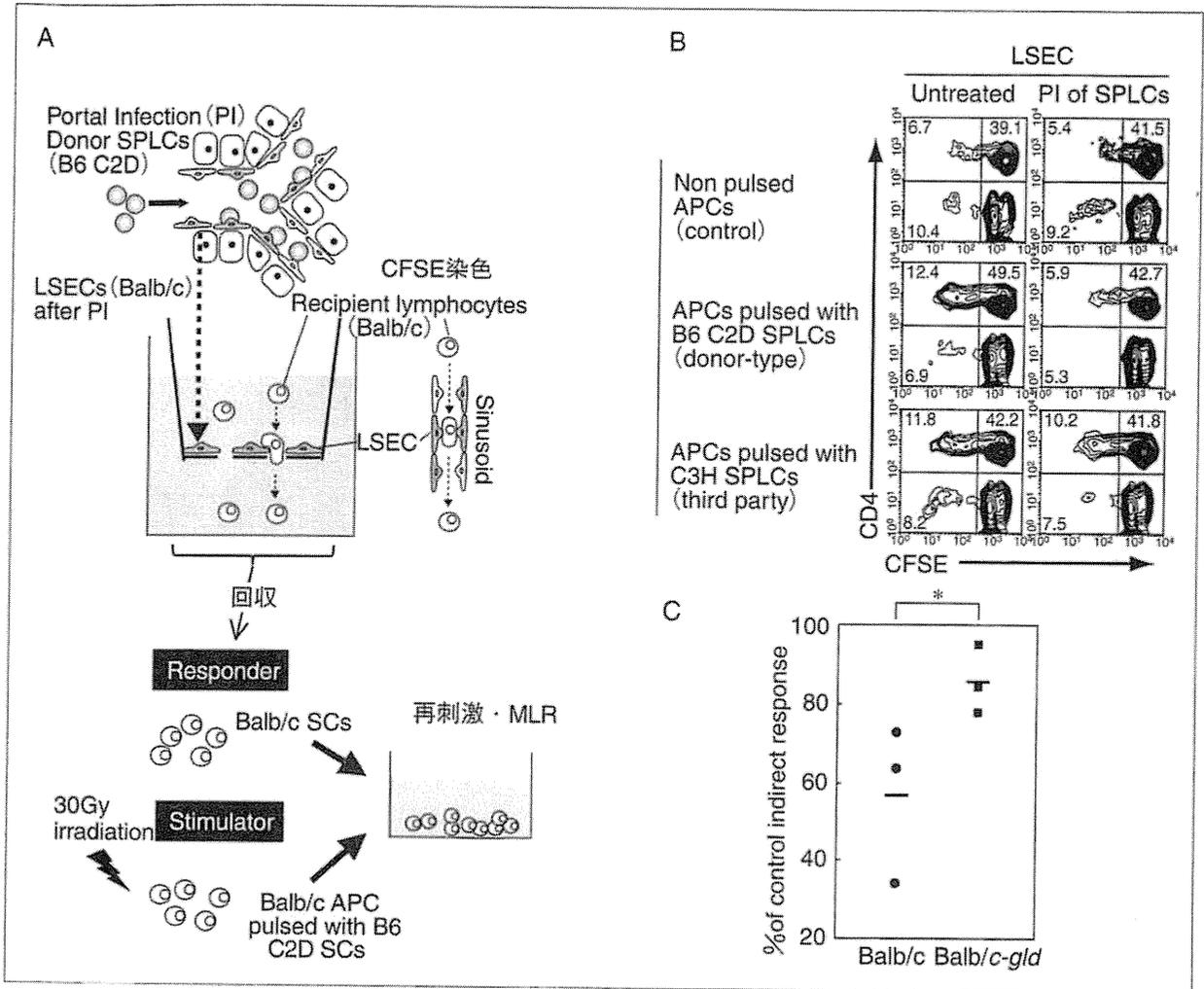


図 6 肝類洞内皮の解剖構築を模倣した *in vitro* 解析系  
 類洞内皮細胞と接触した T 細胞は門脈注入した抗原特異的に不応答を示す。  
 A : B6 クラス II KO (C2D) マウスの脾細胞を放射線照射して Balb/c マウスに経門脈的投与後、肝臓をコラゲナーゼ処理して非実質細胞から肝類洞内皮細胞を分離し、フィブロネクチンでコートした pore membrane に接着培養した。CFSE 色素でラベルした Balb/c マウスの T 細胞を重層培養しトランスマイグレート (transmigration assay) させた後、放射線照射した B6 クラス II KO 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

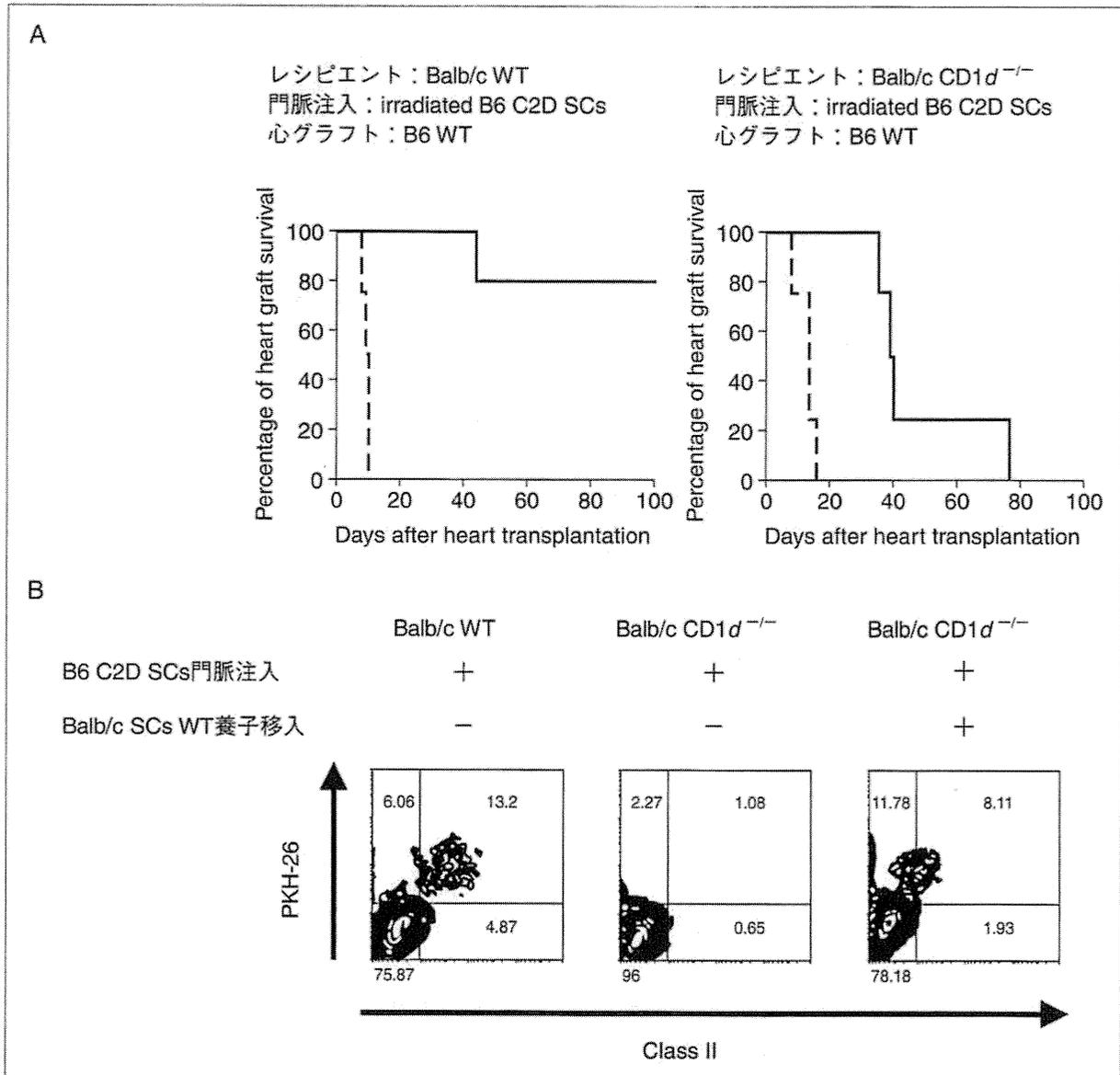


図7 肝類洞内皮細胞の貪食能にはNKT細胞が影響を及ぼす

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)。

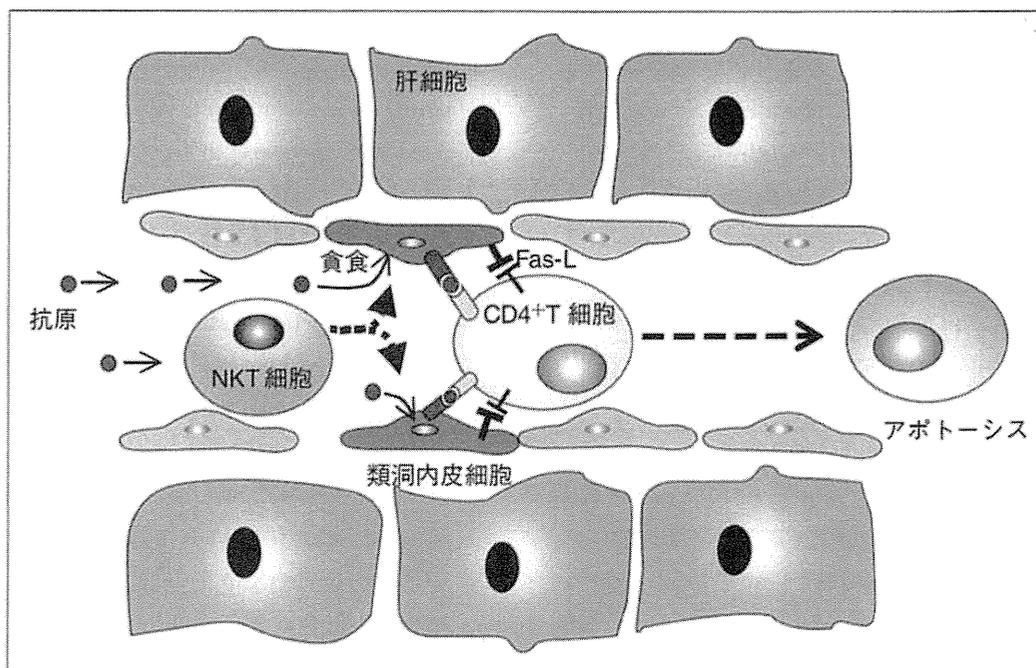


図8 類洞内皮細胞による循環CD4<sup>+</sup>T細胞寛容化メカニズムのシェーマ  
 吸収され門脈から類洞へ到達した外来抗原はNKT細胞の存在下、類洞内皮細胞に貪食される。類洞内皮細胞は貪食した抗原を循環CD4<sup>+</sup>T細胞に抗原提示し、反応性T細胞をFas ligandを介した抑制シグナルによってアポトーシスに陥らせることで抗原特異的に寛容誘導する。

### 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、多重のセーフティー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.

\* \* \*

## 肝臓外科と肝内在免疫制御細胞

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学

## Liver surgery and liver-resident immune-regulatory cells

Hideki Ohdan

Department of Surgery, Division of Frontier Medical Science,  
Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Science,  
Hiroshima University

## SUMMARY

Premises for the subspecialty of hepatoimmunology include the recognition that the liver is an immune-regulatory organ with unique immunological properties. These properties ensure efficient innate defense against intestinal microbes and toxins and confer a particular capacity for induction of tolerance. Elucidation of such characters of liver-resident immune-regulatory cells might lead to the establishment of novel strategies to prevent/alleviate liver damages during/after liver surgery. Our research efforts to understanding immunological properties of liver sinusoidal endothelial cells, natural killer (NK) cells and Kupffer cells have been reported in this review article.

- 1) We have demonstrated that sinusoidal endothelial cells are capable of regulating T cells with allo-specificity. Enhancing such a tolerogenicity might lead to be a novel mean to promote acceptance of transplant livers.
- 2) We have proposed a novel concept to prevent recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation, i.e. adoptive transfer of activated NK cells extracted from donor liver graft perfusate could mount an anti-tumor response.
- 3) We have demonstrated that the interspecies incompatibility of CD47 significantly contributes to the rejection of xenogeneic cells by Kupffer cells. Genetic induction of human CD47 on porcine cells provides inhibitory signaling to signal regulatory protein  $\alpha$  on human macrophages.

## はじめに

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。これらの細胞群は最前線の免疫学的防御機能を司る一方で, 過剰な免疫機構を制御

する寛容機構も有する。このような複雑な免疫調節機構を掌握することは, 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, NK 細胞と Kupffer 細胞の機能特性に関する我々の研究成果を紹介し, 臨床治療戦略への応用について考察する。

I. 肝類洞内皮細胞の免疫寛容誘導への関わり

1. 肝臓の免疫寛容誘導機構について

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。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)</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) の作用や<sup>4)</sup>、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>5)</sup>。しかし、類洞内皮細胞の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。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<sup>6,7)</sup>。

2. 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 (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 に使い、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<sup>8,9)</sup>。肝構築細胞のすべてを stimulator として MLR assay をした場合、同種異系の組み合わせでも T 細胞

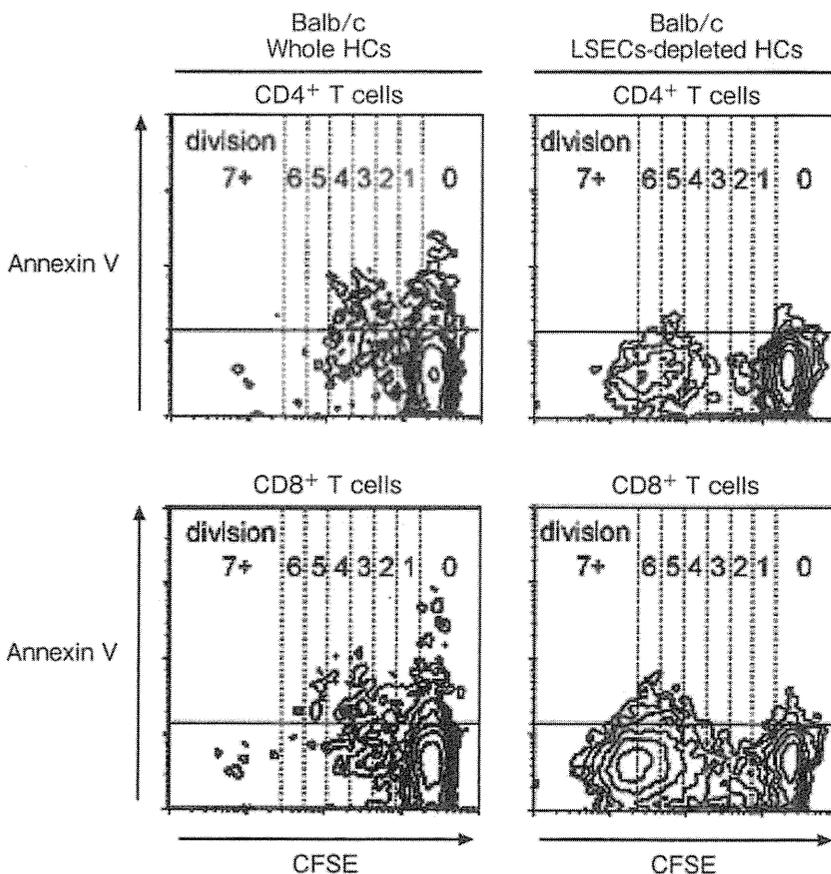


図 1 肝類洞内皮細胞はアロ反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導する。

Balb/c マウスの肝臓構築細胞を stimulator に、B6 の脾リンパ球を responder に使い、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。HCs: hepatic constituent cells, LSECs: liver sinusoidal endothelial cells.

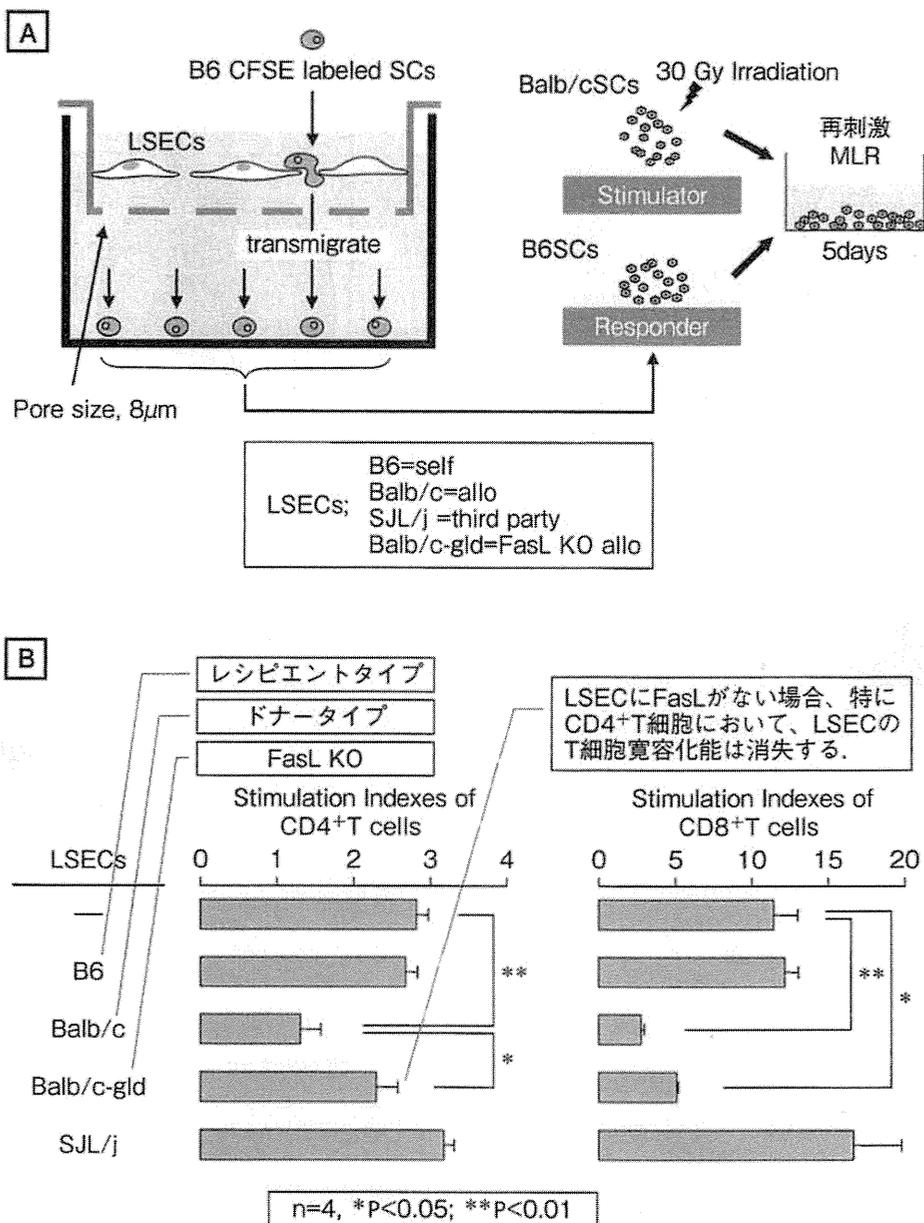


図2 類洞内皮 transmigration assay

【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倣した *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.

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>6)</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分かった(図 1)。

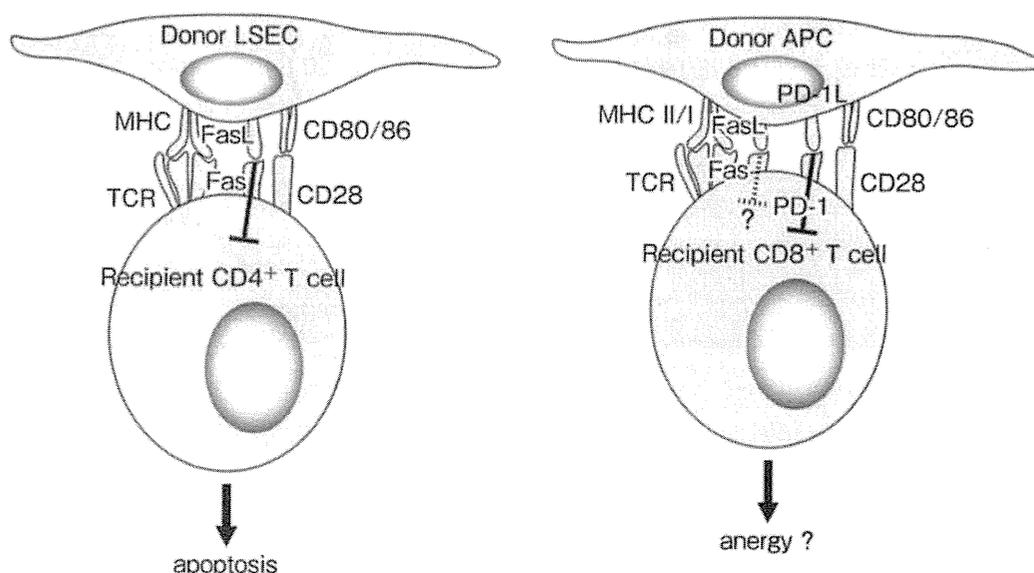


図3 マウス肝類洞内皮細胞は直接認識経路で応答するCD4<sup>+</sup>T細胞をFas-FasL pathwayを介して寛容化する。

### 3. 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

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, CD80, 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)<sup>7)</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3)。

### 4. 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。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>8,9)</sup>。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。

## 5. 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, 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。このことが、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。

## II. 肝内NK細胞を用いた免疫細胞療法

### 1. 肝細胞癌に対する肝移植の問題点

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得る適応基準に基づき(通称ミラノ基準: 腫瘍系5cm以内且つ単発もしくは腫瘍系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。

### 2. 肝細胞癌とNK細胞

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

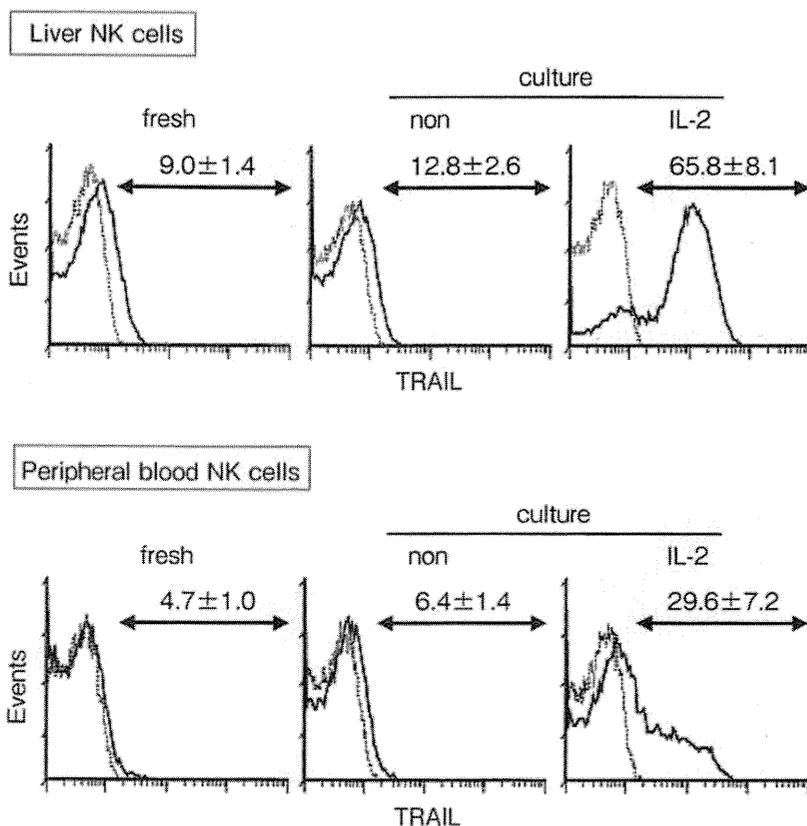


図4 肝NK細胞はIL-2刺激によりTRAIL分子を強く発現する。

ヒト末梢血および肝内のCD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>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。

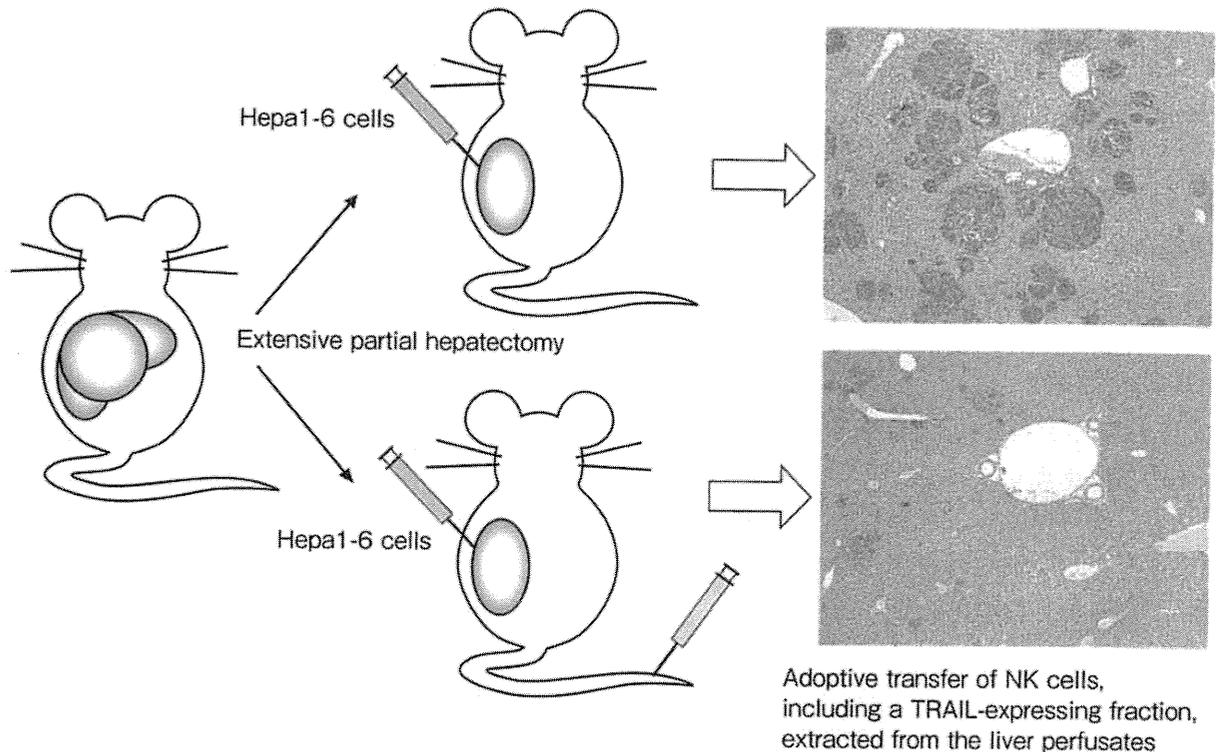


図5 TRAIL 表出肝 NK 細胞の移入によって肝癌増生を抑制できる (マウスモデル)

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。

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、腫瘍転移形成の初期段階に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) を誘導し得ることを確認した (図 4)<sup>10)</sup>。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得ることが確認できた。

### 3. 肝移植後肝癌再発抑制を目的とした肝由来 TRAIL 表出 NK 細胞移入療法

以上の結果から、肝移植後にドナー肝由来の

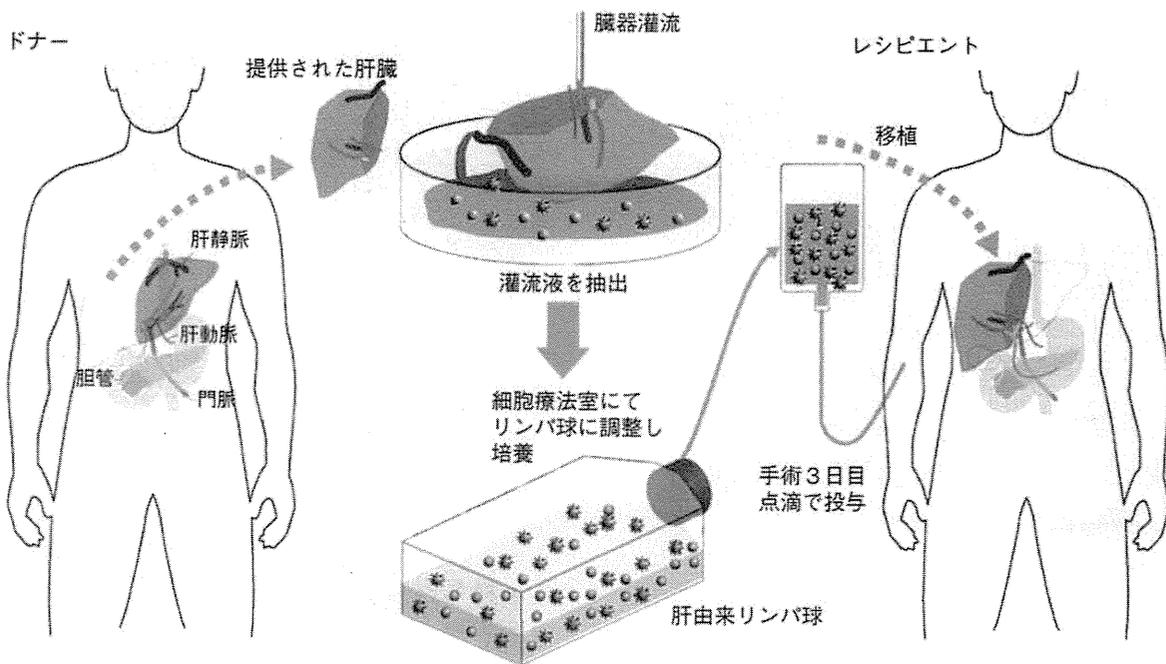


図6 癌再発防止を目的とした肝臓癌合併肝移植におけるドナー肝臓内NK細胞を用いた術後補助免疫療法の臨床応用

(広島大学病院倫理委員会 通知番号 414号)

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止することが可能であった(図5)<sup>11,12)</sup>。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症例に対し肝移植後の肝由来NK細胞移入療法を施行し、今後、長期経過観察が必要であるが、本治療の安全性と有意な無再発生存率の改善が確認された。

#### 4. 肝由来NK細胞移入療法のC型肝炎ウイルスに対する効果

C型肝炎ウイルス(HCV)性肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患のひとつであるが、移植後C型肝炎の再発が避けられず、肝炎の進行も移植患者以外と比較すると急速であることが分かっている。HCV陰性患者では術後急性拒絶反応は予後と関連しないのに対し、HCV陽性の移植患者における急性拒絶反応は予後不良因子とされている。HCV肝炎合併例では拒絶反応に対する免疫抑制療法がウイルスの増殖を助長するためと理解されている。したがって、急性拒絶反応とC型肝炎再発、あるいはその他の原因とを的確に鑑別し、必要最低限の免疫抑制療法を行うため、個々の患者の免疫状態を把握することが重要となる。信頼性のある免疫監視法の確立が求められる所以である。われわれは、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用したリンパ球混合

試験を臨床導入し、T細胞アロ応答の程度をモニターして必要最小限の免疫抑制療法を実践している<sup>13,14)</sup>。

HCV 肝炎の再発治療として、IFN 療法が適応となることには既にコンセンサスが得られているが、奏効率は決して満足のいくものではない。また、臨床的に肝炎が再発する以前に開始すべきか、あるいは再発後に施行すべきかなど、今後の検討課題も多く残されている。術前の血小板減少症と脾腫の程度が術後の血小板減少の予測因子となるため、肝移植後早期に IFN 療法を開始する場合には、移植時に脾摘を施行する場合もある<sup>15)</sup>。

最近我々は、前述の肝由来リンパ球移入療法を施行した HCV 肝炎感染症例では、肝移植後に血中 HCV ウイルス量が有意に減少することを確認した(図 7)<sup>16)</sup>。HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスへのヒト肝由来活性化リンパ球移入した実験でもこの現象は再現可能であった(図 8)。重度免疫不全マウスと u-PA Transgenic マウス(肝臓特異的に u-PA 遺伝子を発現し肝障害を生じる)を掛け合わせた u-PA/SCID マウスに、ヒトの肝細胞を経脾的に移植すると、90%以上ヒト肝細胞に置換される。ヒト肝細胞キメラマウスに HCV RNA 高値患者(genotype 1b)の血清を移入すると、ヒ

ト肝細胞における HCV の感染と複製が確認できる。HCV RNA 患者血清移入 2 週間後に肝由来活性化リンパ球を移入すると、HCV 感染は回避できた。しかし、抗 HCV 中和抗体によってこの効果は消失し、肝由来リンパ球中の NK 細胞/NKT 細胞から産生される IFN- $\gamma$  が、HCV の複製を抑制したためと考えられた。現在、この治療法を発展させた新規の HCV 肝炎再発治療法の確立を目指して研究を継続している。

### III. 免疫応答における Kupffer 細胞の関わり

#### 1. Kupffer 細胞の免疫学的特徴

肝臓を構築する細胞群の内、貪食能と抗原提示能を持ち自然免疫と獲得免疫応答の仲介的役割を果たし得る細胞は、樹状細胞と Kupffer 細胞および類洞内皮細胞と言われている。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 リンパ球に提示し得るが、強い抗原提示能を持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関わる可能性などが挙げられる。

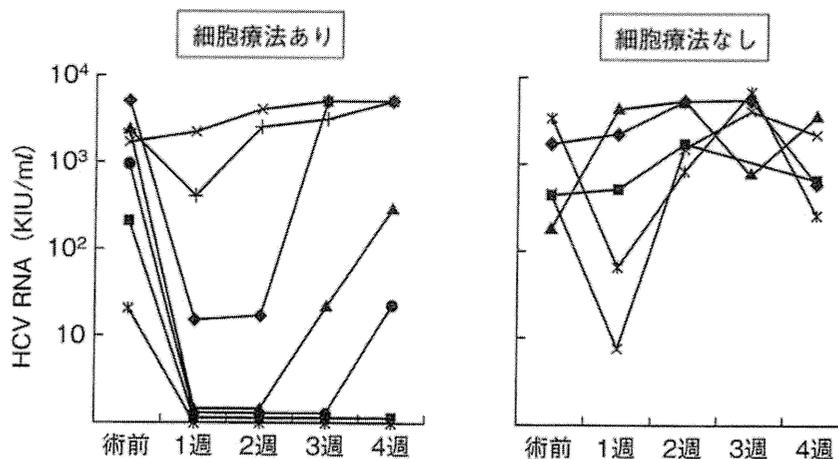


図 7 NK/NKT 細胞移入療法後には、血清中 HCV RNA 量が有意に低下する。

(n = 7 each group)

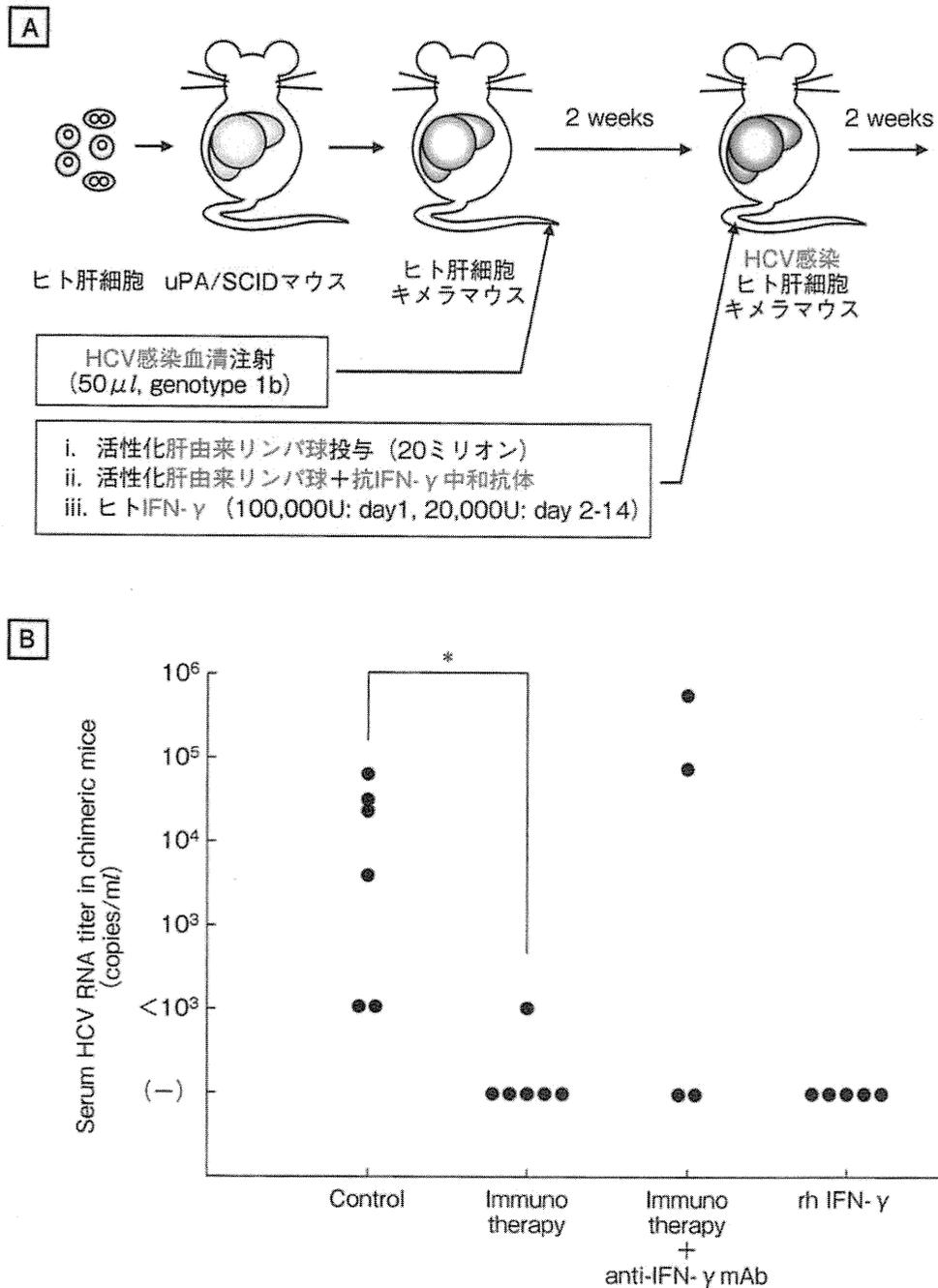


図8 HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスへのヒト肝由来活性化リンパ球移入実験

Ⓐ 重度免疫不全マウスと u-PA Transgenic マウス (肝臓特異的に u-PA 遺伝子を発現し肝障害を生じる) を掛け合わせた u-PA/SCID マウスに、ヒトの肝細胞を経腸的に移植すると、90%以上ヒト肝細胞に置換される。ヒト肝細胞キメラマウスに HCV RNA 高値患者 (genotype 1b) の血清を移入すると、ヒト肝細胞における HCV の感染と複製が確認できる。HCV RNA 患者血清移入 2 週間後に、肝由来活性化リンパ球 (± 抗 IFN- $\gamma$  中和抗体) あるいはリコンビナント IFN- $\gamma$  を移入した。

Ⓑ HCV RNA 患者血清移入 4 週間後の血清中 HCV RNA 量。

2. 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リンパ球が存在する。肝臓は、

これらの自己反応性リンパ球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>17-19)</sup>。