

FIGURE 3. A, Kaplan–Meier patient survival curves of patients with (PG group; n=5; solid line) or without PGE1 portal infusion after LDLT (non-PG group; n=8; dotted line). In the non-PG group, the 1- and 2-year survival rates were 62.5% and 37.5%, respectively. In the PG group, the 1- and 2-year survival rates were both 100%, a difference that was statistically significant. * $P < 0.05$. Dashed arrow represents a patient's death due to SFSS and rejection followed by infection, and solid arrows represent patients' death due to rejection-related reasons. B, Kaplan–Meier patient survival curves of non-SFSG patients in era 1 (from July 2003 to October 2007; n=62; solid line) or era 2 (from November 2007 to December 2009; n=35; dotted line). In the era 1 and era 2 groups, the 2-year survival rate was 77.4% and 77.1%, respectively, with no statistical difference ($P = 0.980$). ABO-incompatible cases and splenectomy cases were excluded from analysis. LDLT, living-donor liver transplantation; PGE1, prostaglandin E1; SFSS, small-for-size graft; SFSS, small-for-size syndrome.

a considerable risk of infection in splenectomy or splenic artery ligation (18). Moreover, significantly higher mortality was observed in patients who had splenectomy mainly due to septic complications in liver transplantation (19, 20). In fact, we experienced one SFSG case in which the patient died of sudden sepsis without any primary focus 4 years after transplantation with splenectomy. Therefore, another method to control portal pressure and preserve the spleen is likely more preferable.

We have reported that portal administration of PGE1, a vasodilator of vessels containing smooth muscle (21, 22), prevented congestion of residual liver tissues in a rat extended hepatectomy model. In this study, we tried various vasodilators; however, residual liver congestion after hepatectomy was improved only by continuous portal infusion of PGE1. We also tried systemic continuous venous infusion of PGE1 at the same dose, but this was not effective. This suggests the therapeutic potential of portal PGE1 injection to prevent portal hypertension after LDLT with SFSGs.

We translated this method to adult LDLT with SFSGs, and portal infusion of PGE1 successfully reduced PVP, resulting

in improved liver graft function in both early and late posttransplantation periods. This result was unexpected because the portal infusion of PGE1 was given for only the first week yet improved the long-term survival of recipients.

We used a CFSE-MLR assay to objectively evaluate the antidonor responses of the recipients (23, 24). The lack of CD8⁺ and CD25⁺ T-cell proliferation in antidonor MLR reflects the suppression of the antidonor response. In this immunologic investigation, all patients given the continuous portal infusion of PGE1 showed a well-suppressed response of the antidonor CD8⁺ T cells (Fig. 4). In contrast, surprisingly, patients without the PGE1 treatment showed

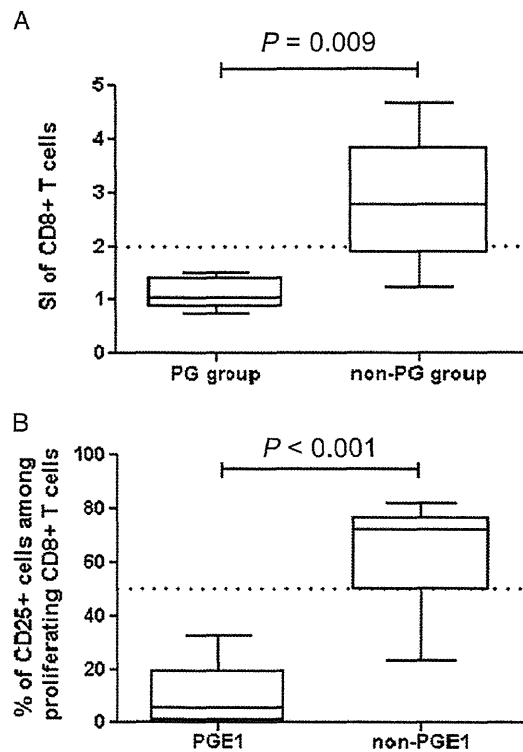


FIGURE 4. SIs of CD8⁺ T-cell subsets in the antidonor MLR assay of patients in the PG group (n=5) and the non-PG group (n=8) on the third to fourth weeks after transplantation (A) and percentage of CD25⁺ cells among proliferating CD8⁺ T cells in patients of the PG group and the non-PG group (B). CD8⁺ T-cell proliferation and their SIs were quantified as follows. The number of division precursors was extrapolated from the number of daughter cells of each division, and the number of mitotic events in each of the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets was calculated. Using these values, the mitotic index was calculated by dividing the total number of mitotic events by the total number of precursors. The SIs of the allogeneic combinations were calculated by dividing the mitotic index of a particular allogeneic (self to donor) combination by that of the self-control. An unpaired *t* test with Welch's correction was used to compare the SI and percentage of CD25⁺ cells between the PG group and the non-PG group. The box plot represents the 25th to 75th percentiles, the dark line is the median, and the extended bars represent the 10th to the 90th percentiles. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. MLR, mixed lymphocyte reaction; SI, stimulation index.

an accelerated response of antidonor CD8⁺ T cells despite the use of the same immunosuppressive protocol. Therefore, SFSG likely accelerated the antidonor response, enhanced rejection, and might result in a worse survival rate, although SFSS is multifactorial in nature. This finding is consistent with the results in an animal model (25) and our preliminary data using mouse model (data not shown). To our knowledge, this is the first clinical report to state that SFSG may accelerate antidonor immune responses in LDLT.

We previously reported that liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) of grafts induce allospecific immunotolerance by suppressing reactive T cells through Fas ligand and/or PD-L1 signaling (26–28). Based on this concept, one possible mechanism is that the sinusoidal structure and LSECs could be damaged by portal hypertension and lose their tolerogenicity, resulting in accelerated antidonor immunoreponse and rejection. This interpretation is consistent with that of previous reports stating that portal hypertension disrupts sinusoids and LSECs in the liver (8). Another possibility is antirejection and/or the anti-inflammatory effect of PGE1 itself. It has been reported that PGE1 could prevent ischemia-reperfusion injury by inducing heat shock protein (29) or by inhibition of neutrophil adherence (30). It has been also reported that administration of PGE1 could prevent and suppress the rejection process in heart transplantation (31) and in renal transplantation (32). Furthermore, it has been reported that PGE1 protects human LSECs from apoptosis, which is consistent with our findings (33).

The main limitation of our study is its retrospective nature. Another limitation is the relatively small number of patients in each subgroup analyzed, although the background characteristics of each group and the survival rates of non-SFSG patients were similar. A randomized study is ideal; however, performing a prospective randomized study for this approach is difficult because of the high mortality of SFSG patients without PGE1 perfusion, as shown in Results.

In conclusion, continuous infusion of PGE1 is suggested to be useful in improving SFSG function and survival after LDLT. Improved understanding of underlying mechanisms may have important implications for clinical managements such as antirejection therapy or preventing ischemia-reperfusion injury in liver transplantation with SFSGs.

MATERIALS AND METHODS

Patients

From July 2003 to December 2009, LDLT was performed on 122 adult patients with end-stage liver disease. We introduced continuous portal infusion of PGE1 to five patients with SFSGs that exhibited a GRWR less than 0.72% from November 2007 to December 2009 (era 2). These patients (PG group) were the subjects of this retrospective case-control study. We compared them with a historical group of eight relevant patients who received SFSG without PGE1 infusion (non-PG group) from July 2003 to October 2007 (era 1) to determine the safety and efficacy of continuous PGE1 portal infusion for SFSGs. Because we introduced the portal infusion of PGE1 in November 2007, all patients with SFSGs in era 2 received PGE1 infusion. One SFSG case with splenectomy in era 1 was excluded from this study. The study protocol was approved by the ethics committee of Hiroshima University, and all patients provided informed consent before surgery. None of the patients receiving PGE1 portal infusion showed clinical evidence of insertion site infection or bleeding after catheter removal throughout the follow-up period.

Operation, PVP Measurement, and Continuous Portal Infusion of PGE1

The graft-harvesting technique, recipient surgery, perioperative recipient management, and immunosuppression regimens were conducted as described previously with minor modifications (34, 35). In brief, the right lobe without the MHV or the left lobe with the MHV was harvested from the donor as follows. Before parenchymal transection, the right or left lobe was mobilized and the short hepatic veins were transected. For the right lobe, during parenchymal transection, the major right tributaries of the MHV were clamped using a vascular clip and then transected. After hepatectomy, ex vivo perfusion of the graft was performed through the portal vein. The initial perfusate was saline solution (500 mL); then, the University of Wisconsin solution (1000 mL) was used as the perfusate.

To measure the PVP in the recipient during the operation, an 18G catheter was inserted from the mesenteric vein to the portal vein after laparotomy (36). The implantation was performed after total hepatectomy. The graft vein was anastomosed to the equivalent vein of the recipient in an end-to-end fashion. Thereafter, the graft was reperused before microsurgical reconstruction of the hepatic artery (end-to-end anastomosis of the graft hepatic artery to the recipient hepatic artery). The bile duct of the graft liver was anastomosed in an end-to-end fashion to the recipient's common hepatic bile duct. In the non-PG group, the portal catheter was removed at the time of abdominal closure. In the PG group, PGE1 was administered through a portal catheter at the graft portal reflow. PGE1 was continuously administered for 1 week ($0.01 \text{ g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) and then the catheter was noninvasively removed. AST, ALT, serum bilirubin, serum ammonia, and AKBR levels were measured as liver function indices. The initial immunosuppressive regimen consisted of tacrolimus and steroids. Doppler ultrasonography and computed tomographic scans were routinely performed daily and biweekly, respectively.

Immunosuppression was initiated with a protocol based on tacrolimus (Prograf; Astellas Pharma, Tokyo, Japan) and methylprednisolone. Methylprednisolone was withdrawn gradually according to the protocol. The dose of tacrolimus was controlled according to blood concentration and adjusted daily. The target trough level was set at 15 ng/mL for 2 weeks and 10 ng/mL for another 2 weeks. Continuous venous infusion of heparin for therapeutic heparinization was routinely done to prevent thrombosis, which was monitored using coagulation tests. Rejection was diagnosed and proven by biopsy histologically and MLR assay. Patients were followed for 2 years after LDLT, and survival was defined as the period between LDLT and death.

Immune Monitoring by In Vitro CFSE-MLR Assay

CFSE-MLR was routinely performed to evaluate the recipient's antidonor immune response 2 to 4 weeks after surgery.

For CFSE-MLR, peripheral blood mononuclear cells prepared from the blood of the recipients (autologous control), donors, and healthy volunteers with the same blood type as the donors (third-party control) for use as the stimulator cells were irradiated with 30 Gy. Those obtained from the recipients for use as the responder cells were labeled with 5 mM CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR), as described previously (24). The stimulator and responder cells (2×10^6 each) were incubated in 24-well flat-bottomed plates in a total volume of 2 mL culture medium at 37°C under 5% CO₂ for 5 days. After culture for MLR, CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation, CD25 expression of proliferating T-cell subsets and SI were quantified by flow cytometry as described previously (37, 38) and described in the SDC Materials and Methods in detail (see <http://links.lww.com/TP/A807>).

Statistical Analysis

Statistical analysis and comparisons were performed using PRISM version 4.0 (GraphPad, San Diego, CA). Data are expressed as mean±SEM. An unpaired *t* test with Welch's correction was used to compare groups. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was carried out at the Analysis Center of Life Science, Natural Science Center for Basic. The authors thank Dr. Kouji Arihiro for critical suggestions of histological findings.

REFERENCES

- Gonzalez HD, Liu ZW, Cashman S, et al. Small for size syndrome following living donor and split liver transplantation. *World J Gastrointest Surg* 2010; 2: 389.
- Dahm F, Georgiev P, Clavien PA. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant* 2005; 5: 2605.
- Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Kondi A, et al. Hemodynamic interaction between portal vein and hepatic artery flow in small-for-size split liver transplantation. *Transpl Int* 2002; 15: 355.
- Yagi S, Iida T, Taniguchi K, et al. Impact of portal venous pressure on regeneration and graft damage after living-donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 68.
- Man K, Fan ST, Lo CM, et al. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intra-graft gene expression. *Ann Surg* 2003; 237: 256.
- Ogura Y, Hori T, El Moghazy WM, et al. Portal pressure <15 mm Hg is a key for successful adult living donor liver transplantation utilizing smaller grafts than before. *Liver Transpl* 2010; 16: 718.
- Botha JF, Langnas AN, Campos BD, et al. Left lobe adult-to-adult living donor liver transplantation: small grafts and hemiportocaval shunts in the prevention of small-for-size syndrome. *Liver Transpl* 2010; 16: 649.
- Asakura T, Ohkohchi N, Orii T, et al. Portal vein pressure is the key for successful liver transplantation of an extremely small graft in the pig model. *Transpl Int* 2003; 16: 376.
- Mitsuta H, Ohdan H, Fudaba Y, et al. Near-infrared spectroscopic analysis of hemodynamics and mitochondrial redox in right lobe grafts in living-donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 797.
- Tashiro H, Ohdan H, Itamoto T, et al. Using recipient's middle hepatic vein for drainage of the right paramedian sector in right liver graft. *Transplantation* 2008; 86: 1565.
- Chen Z, Yan L, Li B, et al. Prevent small-for-size syndrome using dual grafts in living donor liver transplantation. *J Surg Res* 2009; 155: 261.
- Song GW, Lee SG, Hwang S, et al. Dual living donor liver transplantation with ABO-incompatible and ABO-compatible grafts to overcome small-for-size graft and ABO blood group barrier. *Liver Transpl* 2010; 16: 491.
- Boillot O, Delafosse B, Mechet I, et al. Small-for-size partial liver graft in an adult recipient; a new transplant technique. *Lancet* 2002; 359: 406.
- Troisi R, Ricciardi S, Smeets P, et al. Effects of hemi-portocaval shunts for inflow modulation on the outcome of small-for-size grafts in living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 1397.
- Shimada M, Ijichi H, Yonemura Y, et al. The impact of splenectomy or splenic artery ligation on the outcome of a living donor adult liver transplantation using a left lobe graft. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 625.
- Umeda Y, Yagi T, Sadamori H, et al. Effects of prophylactic splenic artery modulation on portal overperfusion and liver regeneration in small-for-size graft. *Transplantation* 2008; 86: 673.
- Yoshizumi T, Taketomi A, Soejima Y, et al. The beneficial role of simultaneous splenectomy in living donor liver transplantation in patients with small-for-size graft. *Transpl Int* 2008; 21: 833.
- Balci D, Taner B, Dayangac M, et al. Splenic abscess after splenic artery ligation in living donor liver transplantation: a case report. *Transplant Proc* 2008; 40: 1786.
- Samimi F, Irish WD, Egtesad B, et al. Role of splenectomy in human liver transplantation under modern-day immunosuppression. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1931.
- Neumann UP, Langrehr JM, Kaisers U, et al. Simultaneous splenectomy increases risk for opportunistic pneumonia in patients after liver transplantation. *Transpl Int* 2002; 15: 226.
- Iwata K, Shimazu M, Wakabayashi G, et al. Intraportal perfusion of prostaglandin E1 attenuates hepatic postischaemic microcirculatory impairments in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 634.
- Asanuma Y, Sato T, Kato T, et al. Continuous arterial infusion of prostaglandin E(1) via the superior mesenteric artery in the treatment of postoperative liver failure. *Ther Apher* 2002; 6: 89.
- Paramore CG, Turner DA, Madison RD. Fluorescent labeling of dissociated fetal cells for tissue culture. *J Neurosci Methods* 1992; 44: 7.
- Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, et al. Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation: immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation* 2005; 79: 1262.
- Dirsch O, Li J, He Q, et al. Induction of rejection after small-for-size liver transplantation: size matters. *J Invest Surg* 2008; 21: 288.
- Onoe T, Ohdan H, Tokita D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers. *Transpl Int* 2005; 18: 206.
- Onoe T, Ohdan H, Tokita D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells tolerate T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol* 2005; 175: 139.
- Tokita D, Shishida M, Ohdan H, et al. Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity. *J Immunol* 2006; 177: 3615.
- Matsuo K, Togo S, Sekido H, et al. Pharmacologic preconditioning effects: prostaglandin E1 induces heat-shock proteins immediately after ischemia/reperfusion of the mouse liver. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 758.
- Natori S, Fujii Y, Kurosawa H, et al. Prostaglandin E1 protects against ischemia-reperfusion injury of the liver by inhibition of neutrophil adherence to endothelial cells. *Transplantation* 1997; 64: 1514.
- Assaad A. Posttransplantation management of the newborn and the immunosuppressive role of prostaglandin E1. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12: S191.
- Campbell D Jr, Wiggins R, Kunkel S, et al. Constant intrarenal infusion of PGE1 into a canine renal transplant using a totally implantable pump. *Transplantation* 1984; 38: 209.
- Yang H, Majno P, Morel P, et al. Prostaglandin E(1) protects human liver sinusoidal endothelial cell from apoptosis induced by hypoxia reoxygenation. *Microvasc Res* 2002; 64: 94.
- Ohdan H, Mizunuma K, Tashiro H, et al. Intraoperative near-infrared spectroscopy for evaluating hepatic venous outflow in living-donor right lobe liver. *Transplantation* 2003; 76: 791.
- Ohdan H, Tashiro H, Ishiyama K, et al. Microsurgical hepatic artery reconstruction during living-donor liver transplantation by using head-mounted surgical binocular system. *Transpl Int* 2007; 20: 970.
- Kawaguchi Y, Tashiro H, Amano H, et al. ABO-blood type incompatible living donor liver transplantation in a patient with Budd-Chiari syndrome secondary to essential thrombocythemia. *Hepatol Res* 2009; 39: 520.
- 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.
- Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* 1997; 100: 3173.

肝免疫と肝臓外科

— Liver Immunity and Surgery —



広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門消化器・移植外科学教授

大段 秀樹

(Ohdan, Hideki)



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(LSEC)、natural killer (NK)細胞、NKT細胞、Kupffer細胞などさまざまな免疫担当細胞が内在する。これらの細胞群は生体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。肝臓内の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生体防御能を損なわず癌再発や肝障害を予防/軽減する戦略を立てるうえで非常に有益な情報となる。本原稿では、肝局在免疫担当細胞のうちLSEC、NK細胞とNKT細胞の機能特性に関するわれわれ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。



肝 LSEC 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

肝移植では、ほかの臓器移植に比べ拒絶反応を引き起こす頻度は低い¹⁾。古くから肝臓は免疫寛容獲得に関わる臓器として知られるが、なぜ移植肝が拒絶されにくいのか説得力のある検証はいまだなされていない。

移植肝内で、循環リンパ球が最も高頻度かつ密接に接触するのは、解剖学構築からしてLSECである。そこでわれわれは、マウスの肝臓構築細胞の非実質細胞群からLSECを選択的に分離し、免疫原性を解析した結果、寛容誘導特性を有することを確認した²⁾³⁾。

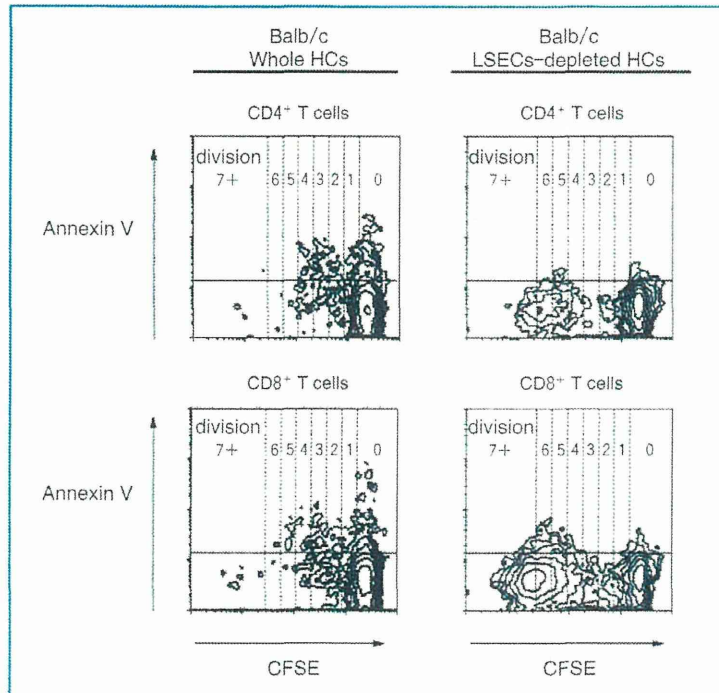


図1 肝LSECはアロ反応性T細胞にアポトーシスを誘導する

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、MLR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リンパ球は carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 色素で細胞質染色した (CFSE-MLR assay)。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 LSEC の存在下で混合培養した異系 T 細胞はわずかなから分裂を認め、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わかった。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。肝内では LSEC のみに CD105 の表出を認め、抗 CD105 抗体を用い単離した。

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

(文献2より引用)

2. LSEC と接触したアロ反応性 T 細胞は寛容化する/マウス肝構成細胞の同種異系免疫原性の解析

マウスを含むいくつかの動物種において、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拒絶反応が起こらず生着する現象は以前より観察されている^{41,5)}。そこでわれわれは、マウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流法により構築細胞に分離し、同種異系リンパ球の混合培養試験(MLR)を行い、免疫原性を解析した。すなわち、Balb/c (H-2d)の肝臓構築細胞を stimulator に、

C57BL/6 (B6) (H-2b)の脾リンパ球を responder に用い MLR 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^{21,6)}。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、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、LSEC が T 細胞性アロ応答を抑制していることが判明した²⁾。また、LSEC の存在下で混合培養した異系 T 細胞はわずかなから分裂を認め、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

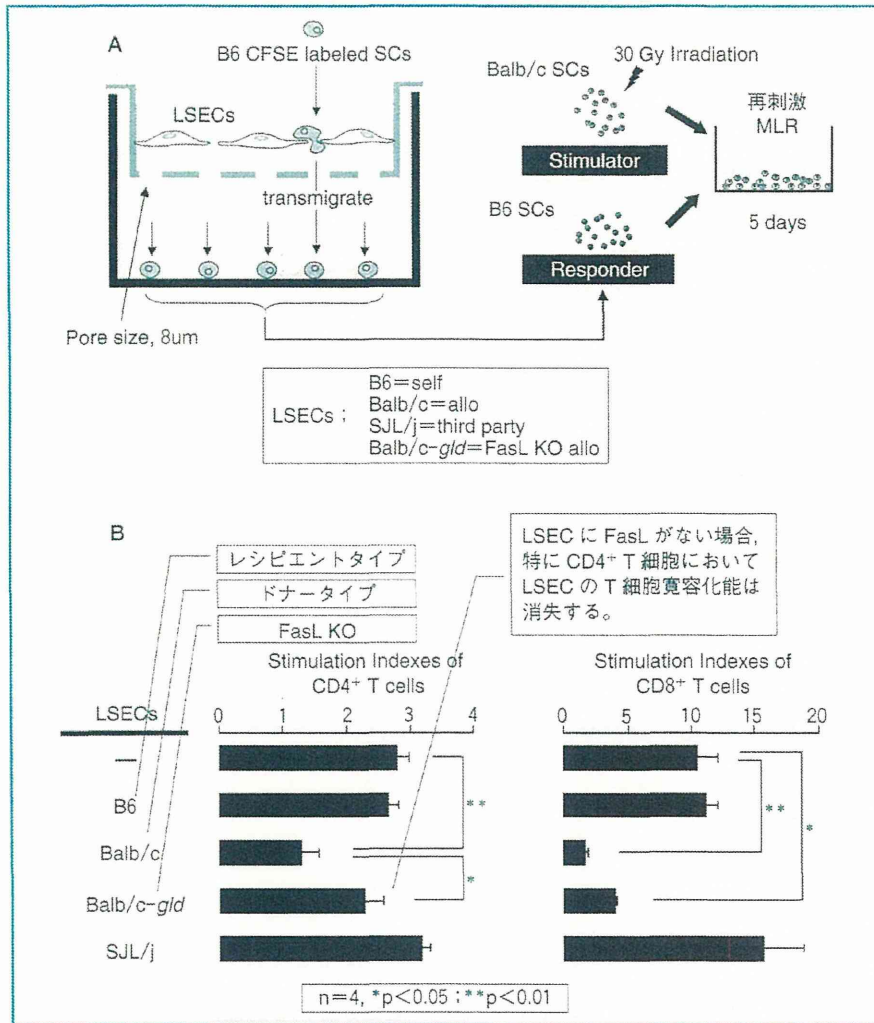


図2 類洞内皮 transmigration assay

A: フィブロネクチンでコートした pore membrane に B6, Balb/c, Balb/c-*gld* (FasL-deficient) あるいは SJL/j マウス由来の LSEC 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 LSEC 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.

(文献 2 より引用)

かった(図1)。

マウス LSEC のフェノタイプを解析すると、MHC class II, 共刺激分子(CD40, CB80, CD86), 細胞死誘導分子(Fas ligand : FasL)を発現していた。単層培養膜(pore membrane)に B6, Balb/c, Balb/c-*gld* (FasL-deficient) あるいは SJL/j マウス

由来の LSEC 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2-A)。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 LSEC 層を接触通過し

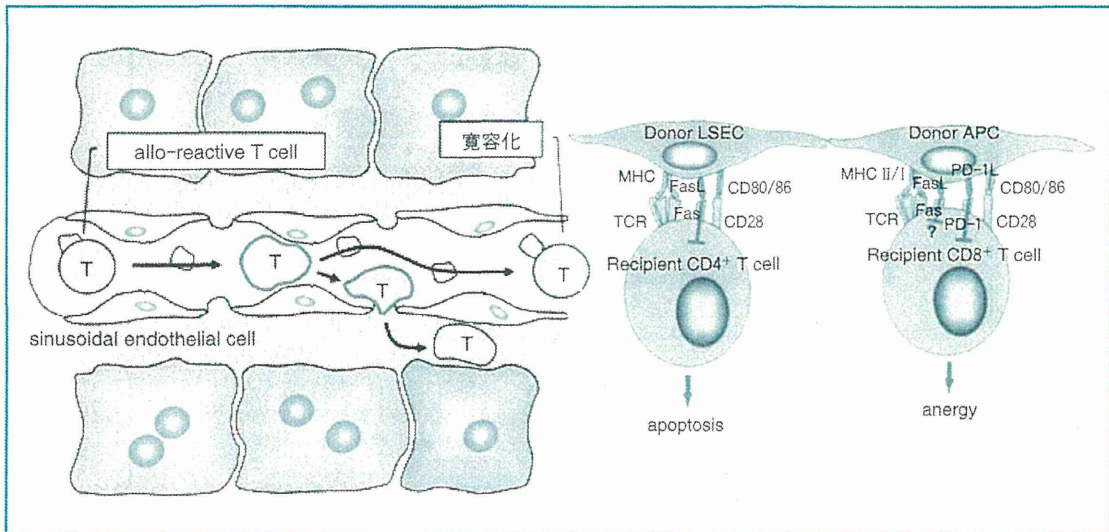


図3 マウス肝LSECは直接認識経路で応答するCD4⁺T細胞をFas-FasL pathwayを介して寛容化する

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LSEC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LSEC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2-B)²⁾。LSEC上に表出するFasL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LSEC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FasL経路以外の機序も関与する可能性が考えられた(図3)。

3. LSECによる間接認識経路を介したアロ抗原認識T細胞寛容化

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(APC)から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。上述機序は、マウス肝LSECによって抗原提示された異系T細胞が寛容誘導されることを証明したものである(直接認識経路)。これに加えて、アロ抗原を貪食したマウス肝LSECによって抗原提示された同系T細胞にも寛容が誘導されることを確認した(間接認識経路)³⁾⁷⁾。この知見は、門脈内アロ抗原/細胞移入後に観察されるドナー特異的寛容にも、肝LSECが重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

4. LSECが間接認識経路でアロ応答T細胞を寛容化する過程でNKT細胞が重要な関わりをもつ

ドナー脾細胞の門脈投与は、臓器移植における理想である特異的免疫寛容の誘導法の1つとして研究されてきた。しかしその機序の詳細はまだまだ不明で、臨床応用には至っていない。われわれは、BalbマウスにMHC class II-deficient *C2ta^{tm1Crum}*(C2D)-B6マウスの脾細胞を門脈内投与後、C2D-B6の心臓を移植すると永久生着することを確認した(C2D移植片は間接認識経路によって免



疫応答が惹起される)³¹。Balb マウスに C2D-B6 マウスの脾細胞を門脈内投与すると、脾細胞を貪食した LSEC は MHC class II, CD80 および FasL の発現を増強する。C2D-B6 の脾細胞を門脈投与した Balb マウスから単離した LSEC の pore membrane 上に naïve な Balb 由来 T 細胞を重層培養すると、トランスマイグレートした T 細胞はドナー特異的に増殖応答が抑制された。しかし、C2D-B6 の脾細胞を門脈投与した FasL-deficient Balb マウスの LSEC の pore membrane をトランスマイグレートした naïve な Balb 由来 T 細胞は、正常の抗ドナー増殖応答を示した。以上の結果から、LSEC がドナー抗原を間接認識経路で提示し、Fas-FasL 経路を介して CD4⁺ T 細胞を寛容化することが明らかとなった。また、NKT 細胞の存在しない Balb/c CD1d-deficient マウスをレシピエントにした場合、門脈内投与された C2D-B6 ドナー脾細胞の LSEC への貪食が有意に抑制され、寛容が誘導されないことも確認された³²。すなわち、LSEC がアロ抗原を貪食し、間接認識経路で抗原提示する T 細胞を寛容化する過程で、NKT 細胞が重要な関わりをもつ可能性が示された。NKT 細胞から産生される IL-4 が、LSEC 上の貪食を促進するマンノースレセプターの発現を促進している可能性が考えられる。

5. 類洞内皮キメラの誘導による他臓器移植の免疫制御

肝 LSEC の免疫制御効果は、*in vivo* モデルにおいても確認できた³³。

まず、Balb/c マウスの肝臓から LSEC を分離し、T, B, NK 細胞が存在しない免疫不全の recombination activating gene 2 gamma-chain double-knockout B6 (RAG2/gc-KO) マウスに門脈内投与し、肝類洞内皮に生着させた。細胞の門脈内投与に先立ち、マウスに血管内皮障害作用のあるモノクロータリンを腹腔内投与すると LSEC の生着が促進される。このレシピエントマウスに、同系の

B6 マウスの骨髄を移植し免疫再構築させた。MLR では、ドナー Balb/c LSEC 移入により、Balb/c マウスの脾細胞に対するレシピエントマウスの CD4⁺, CD8⁺ T 細胞の応答が、サードパーティー-SJL/jorllco (H-2s) マウスの脾細胞に対する応答に比べて有意に抑制された。この抑制効果は、PDL1 ブロッキング抗体投与により消失した。さらに、同様のレシピエント RAG2/gc-KO マウスの頸部にドナー Balb/c マウスの心臓を移植したが、Balb/c LSEC 移入によりドナー移植心の生着が有意に延長した。本結果は、アロ間で類洞内皮キメラが誘導できれば、ほかの臓器移植においても PD1-PDL1 経路を介した免疫制御が可能であることを証明したものである。

6. ヒト LSEC の免疫調節機構は？

ヒト肝 LSEC のフェノタイプを解析すると、MHC class II, CD80, CD86, FasL, PDL1 分子の発現は定常状態では、樹状細胞などプロフェッショナル APC に比べて低い。したがって、ヒト肝移植後では、ドナー由来の骨髄系 APC が時間の経過とともに肝内から消失するまでは、上述のような LSEC によるアロ T 細胞の寛容化機構は相殺される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少なくとも導入時期には必須である理由ではないかと考えている。

さらに、肝 LSEC が障害されるような病態では、その抗原提示能が減弱し、アロ免疫応答が亢進することが明らかとなった。生体部分肝移植では、肝移植レシピエントの体格に比しボリュームの小さい肝グラフトを移植することが余儀なくされる場合がある。一般に graft-versus-recipient weight ratio (GRWR) < 0.7 の場合、移植成績が悪化することが知られる³⁴。われわれの検討ではこの場合、拒絶反応の発症率が有意に亢進することが確認された。この病態の対応策として、プロスタグラン

ディン E1 を術後数日間門脈内注入して LSEC を庇護すると、アロ免疫応答は抑制され拒絶反応の発症率も低下し、さらには生存率の改善にもつながることを最近報告した¹⁰⁾。

今後、さまざまな病態において、ヒト肝 LSEC に MHC class II, CB80, CD86, FasL, PDL1 分子の発現を維持さらには亢進させる安全な方法が確立できれば、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安定して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 細胞を用いた免疫細胞療法

1. 肝細胞癌(HCC)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えるが、進行肝臓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臓癌再発を回避しえる適応基準に基づき(通称ミラノ基準:腫瘍系 5 cm 以内かつ単発もしくは腫瘍系 3 cm 以内かつ 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臓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え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. HCC と NK 細胞

肝移植後の肝臓癌再発機構としては、術前画像診断では評価しえ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。そこでわれわれ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)。最近われわれは、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)が誘導しえることを確認した(図 4)¹¹⁾。さらに、術後再発率が高い中～低分化 HCC 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臓癌細胞に対し強い抗腫瘍活性を誘導しうることが確認できた。

3. 肝移植後肝臓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 NK 細胞を *in vitro* で刺激し、TRAIL の発現を誘

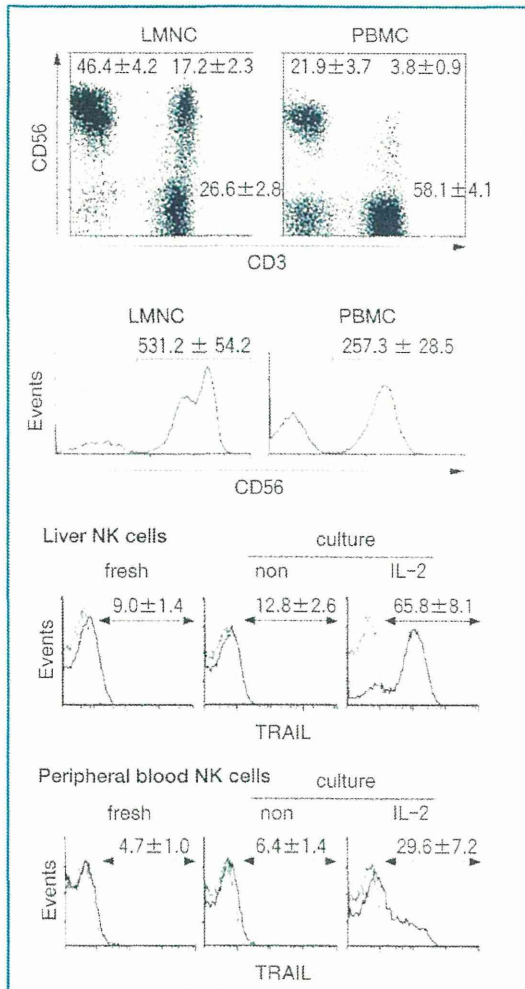


図4 肝NK細胞はIL-2刺激によりTRAIL分子を強く発現する

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。

LMNC: liver mononuclear cells, PBMC: peripheral mononuclear cells.

(文献11より引用)

導した後に、レシピエントに移入することで、HCC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)^{12,13)}。この現象を臨床応用して、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、安全性とミラノ基準外症例での有意な無再発生存率の改善が確認された(図7)。本制癌免疫療法は、アメリカ食品医薬品局の承認を得て、米国マイアミ大学と共同で脳死肝移植症例を対象に第I相臨床試験を現在施行中である¹⁴⁾。

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一つであるが、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わかっている。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勢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、あるいはそのほか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ゆえである。われわれは、CFSE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^{15,16)}。

HCV肝炎の再発治療として、IFN療法が適応となることにはすで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