

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10444

研究課題名(和文) 移植後慢性拒絶の分子機構とBAFF関連分子の役割

研究課題名(英文) The Role of B-cell Activating Factor Family on Post-transplant Chronic Rejection

研究代表者

辻 昭一郎 (TSUJI, Shoichiro)

東邦大学・医学部・非常勤研究生

研究者番号：70726736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類は細胞表面に個体独自のMHC分子を持っており、免疫細胞が出会った細胞表面のMHC分子を認識することにより、その細胞が自己か他者かを区別する。臓器移植の際には、移植臓器の表面に他者のMHCが認識され、他者である移植臓器に対する拒絶反応が起きる。しかしマウスの肝移植においては異なるMHCを持つマウス間での移植でも拒絶反応が起きず、免疫寛容の状態になる。従ってマウスの肝移植は免疫寛容の最適なモデルであるが、マウスが小さいため技術的には非常に困難であった。本研究ではマウスの肝移植の技術を確立し、また免疫に関係が深いBAFFファミリー分子を取り上げて、その免疫寛容における役割を研究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性胆道閉鎖症やC型肝炎などによる肝不全は致死的な病気であり、肝移植以外に治療法はない。しかし肝移植後の慢性拒絶反応による機能不全は3-4%に生じ、効果的な治療法がないため、約85%は移植後1年以内に再移植を必要とし、再移植ができなければ生存は不可能である。移植医療を安全に行うためには、移植後の免疫寛容成立の機構の解明が必要である。本研究では免疫寛容の最適なモデルであるマウスの肝移植の技術を確立すると共にBAFFファミリー分子の役割を調べ、免疫寛容機構の解明に大きく貢献するという学術的意義を有する。また同時に将来のより安全な移植医療を可能にするという大きな社会的意義をも有する。

研究成果の概要(英文)：Mammals have their specific Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules on the surface of their cells. The immune system recognizes the MHC molecules and judges if the cell it encounters is self or non-self. Upon organ transplantation, the immune system rejects the transplanted organ as non-self cells, checking the MHC molecules. However, mouse liver transplantation doesn't cause rejection to be in the status of "Immunotolerance", even if the MHC molecules are different between the mice. Therefore, mouse liver transplantation is an optimal model to study immunotolerance. But due to its size, mouse transplantation has been very difficult in the point of technique. In this study, we established the method of mouse transplantation. We also studied the role of B-cell Activating Factor (BAFF) family molecules, which are highly related to the immune system, on the immunotolerance induction.

研究分野：免疫寛容

キーワード：肝移植 拒絶反応 免疫寛容

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝不全は致死的な病気であり、現時点では肝移植以外に根治的な治療法はない。免疫抑制剤などの進歩により肝移植後早期に発生する急性拒絶反応の制御は飛躍的に改善したが、液性免疫が関与していると思われる遅発性の慢性拒絶反応は治療抵抗性で長期予後に影響する。肝移植後の慢性拒絶反応による機能不全は 3-4% に生じ、効果的な治療法がないため、肝機能が徐々に低下し、約 85% は移植後 1 年以内に再移植を必要とする。またどのような患者さんに将来慢性拒絶反応がおきるかが予想できないため、限られたドナー肝を安全で効率的に分配することができない。この様な背景の下、慢性拒絶反応の治療法を確立し、拒絶反応を引き起こす危険因子を同定するために、移植後の免疫寛容成立および慢性拒絶発生の機構の解明が喫緊の課題であった。

2. 研究の目的

TNF ファミリーの BAFF、APRIL やそのレセプターの BAFF-R、TACI、BCMA は B 細胞の分化、増殖に重要な役割を果たすが、これらの分子の機能不全は自己免疫疾患を発生させ、またこれらの投与、除去により症状が改善する。例えば BAFF トランスジェニックマウスでは成熟 B 細胞が異常増殖し、全身性エリテマトーデス(SLE)様の自己免疫疾患の表現形を示し、一方 TACI ノックアウトマウスではリンパ球の増殖、自己免疫疾患様病変という表現形を持つ。また SLE の患者さんでは血中 BAFF 濃度が高値であり、B 細胞での TACI の発現は低下している。臨床試験でも BAFF シグナルを阻害する抗 BAFF 抗体の投与にて SLE の患者さんの症状の改善を認める。

移植後の慢性拒絶は一旦成立した免疫寛容が破綻するという点で自己免疫疾患と共通点を持ち、BAFF 関連分子が免疫寛容の成立や破綻で大きな役割を果たしている可能性が高い。本研究ではマウスの肝移植モデルを使って、BAFF 関連分子の免疫寛容成立時、破綻時における役割を研究することを目的とする。

3. 研究の方法

肝臓が免疫学的に寛容な臓器である事は 1960 年代より知られており、ブタ、ラット、マウスなどの肝移植で免疫寛容が認められてきた。人間の肝移植においても他の臓器と異なり移植後しばらくして免疫抑制剤を中止しても、拒絶反応がおきない免疫寛容の状態になる症例も散見される。特にマウスにおいては MHC の異なる近交系系統間での肝移植で、免疫抑制剤を使用せず完全な免疫寛容が自然に成立するため、免疫寛容の格好のモデルと考えられる。

マウスの肝移植は体の大きさが小さいため、技術的に非常に困難であり、技術的に克服すべき課題が多い。特に免疫寛容の実験を行うには長期に生存する必要があるため、はじめにマウスの肝移植の技術を確立するために種々の条件での検討を行った。

次に Balb/c マウスの肝臓を C57BL/6 マウスに同所移植し、肝臓が拒絶されるまでの日数を観察するとともに、経時的に採血を行い、血清中の肝酵素、BAFF ファミリーや抗 MHC 抗体の濃度を測定し、同系移植したマウスと比較検討した。また適当なタイムポイントの肝臓、脾臓における BAFF ファミリーや MHC の発現を検討することにより、免疫寛容成立における BAFF ファミリーの役割を検討した。

4. 研究成果

マウスの肝移植技術を確立するために、初めにラット間で同所肝移植を行なった。ドナー、レシピエント共に Lewis ラットを用い、全身麻酔下で同所肝移植を行った。門脈はカフにより、胆管はステントにより吻合を行い、肝上大静脈と肝下大静脈は共に縫合にて吻合し、肝動脈も吻合した。

次にマウスの同所肝移植を全身麻酔下で行った。まずはドナー、レシピエント共に C57BL/6 マウスを用いた。肝上大静脈は連続縫合を行い、門脈、肝下大静脈はカフを用いて、また胆管はステントを用いて吻合した。マウスの肝移植に初めて成功した Qian らは肝動脈の吻合を行わなかったため、同様に肝動脈の吻合なしに実験を始め、マウス肝移植の技術を獲得した。

本実験ではドナーに Balb/c マウスを用いることになるが、白色系のマウスは組織が脆弱であるため、肝臓が非常に裂けやすい。ドナーに C57BL/6 を用いた時は肝移植に問題がなくても、同様の手技では、Balb/c をドナーに用いた移植は困難であった。組織の方向によって裂けやすい方向と裂けにくい方向があるため、肝臓の牽引方向を工夫することにより、Balb/c マウスにおいても同所肝移植が可能になった。

肝移植はマウスにとって非常に大きなストレスであるため、一旦移植が成功しても長期生存するのは非常に困難である。長期生存が困難である要因は種々認められるが、その最も大きな要素の 1 つが微小血栓であったため、灌流やカフテクニックの工夫を行い、肝移植において長期生

存を可能にする技術を習得した。

Qian らの肝移植の原法では動脈吻合を行っていない。しかし胆管は動脈支配であるため、動脈吻合が必要である可能性があった。そこで、動脈吻合の要否を調べるために、肝動脈を吻合して、吻合しない群と比較検討した。両群において、生存日数、状態等に差異を認めず、動脈吻合の影響は少ないことが分かった。肝静脈が非常に細いため、動脈を吻合するためには手技的に非常に煩雑であり、またマウスの個体間の動脈血流の量に著しい違いを認めたため、本実験では動脈吻合を行わない方がよいと考えられた。

Balb/c マウスの肝臓を C57BL/6 マウスに同所移植した後は少なくとも 100 日は生存し、拒絶を認めなかった。マウスの肝移植においては自然に免疫寛容が成立したと考えられたが、血中の BAFF ファミリーの濃度や肝臓、脾臓における BAFF ファミリーの発現はコントロールに比べて変化を認め、BAFF ファミリーが免疫寛容成立時において、なんらかの役割を果たしていることが示唆された。今後、この違いを解析し、免疫寛容成立における BAFF ファミリーの働きを明確にしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 杉岡篤、加藤悠太郎、棚橋義直、香川幹、小島正之、中嶋早苗、辻昭一郎	4. 巻 39(7)
2. 論文標題 肝切除術に必要な外科解剖	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 消化器外科	6. 最初と最後の頁 1035-1048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 杉岡篤、加藤悠太郎、棚橋義直、香川幹、木口剛造、小島正之、安田顕、中嶋早苗、辻昭一郎、宇山一朗	4. 巻 72(7)
2. 論文標題 肝臓手術における剥離層の選択	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床外科	6. 最初と最後の頁 827-836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1407211672	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yutaro Kato, Takamasa Tokoro, Yoshinao Tanahashi, Shoichiro Tsuji, Tadashi Kagawa, Atsushi Sugioka
2. 発表標題 The use of autologous hepatic vein graft for recipient hepatic vein reconstruction living donor liver transplantation
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shoichiro Tsuji, Yutaro Kato, Takamasa Tokoro, Tadashi Kagawa, Yoshinao Tanahashi, Atsushi Sugioka
2. 発表標題 Successful Liver Donor Liver Transplantation to the patient with an extremely high concentration of anti-HLA Class I Donor Specific Alloantibodies in serum
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Atsushi Sugioka, Yutaro Kato, Yoshinao Tanahashi, Tadashi Kagawa, Gozo Kiguchi, Masayuki Kojima, Sanae Nakajima, Shoichiro Tsuji
2. 発表標題 One Way Laparoscopic Anatomical Liver Resection Based on Laennec's Capsule for a High Degree of Difficult Procedure
3. 学会等名 IASGO 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yutaro Kato, Masayuki Kojima, Gozo Kiguchi, Yoshinao Tanahashi, Sanae Nakajima, Tadashi Yasuda, Shoichiro Tsuji, Atsushi Sugioka, Ichiro Uyama
2. 発表標題 Minimally Invasive Anatomic Liver Resection by Extrahepatic Glissonian Approach
3. 学会等名 第80回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michiko Inukai, Yoshinao Tanahashi, Yutaro Kato, Satoshi Mii, Gozo Kiguchi, Masayuki Kojima, Sanae Nakajima, Tadashi Yasuda, Shoichiro Tsuji, Koichi Hanai, Atsushi Sugioka, Ichiro Uyama
2. 発表標題 Preoperative Simulation for Laparoscopic Anatomic Liver Resection
3. 学会等名 Third Triangle Scientific Meeting of the Japan-Hungary-Poland Surgical Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉岡 篤 (SUGIOKA ATSUSHI) (20171150)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上本 伸二 (UEMOTO SHINJI) (40252449)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	吉澤 淳 (YOSHIZAWA ATSUSHI) (60457984)	名古屋大学・医学部付属病院・病院講師 (13901)	