

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591881

研究課題名(和文)ラット肝臓移植モデルにおける免疫寛容獲得の機序と抗炎症作用を用いた治療応用

研究課題名(英文)Inflammation in rat liver transplantation model

研究代表者

石井 永一(Ishii, Eiichi)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00193243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット肝臓移植モデルを用いて研究を進めた。移植の手技は、鎌田法(Cuff法)にsplint法で肝動脈再建法を行う方法が簡便であった。この肝動脈再建により虚血再灌流障害や拒絶反応を抑制し、長期に移植肝臓を生着させた。肝臓移植での急性抗体関連型拒絶反応は、微小血管の内皮細胞障害と血栓形成や細胆管上皮細胞や肝細胞の変性、壊死に特徴づけられ、慢性抗体関連型拒絶反応はIgGの沈着を伴う慢性拒絶反応の病理像を呈した。免疫寛容獲得の過程でリンパ管新生は急性拒絶反応の消退に関連していた。肝不全に伴う急性腎障害は傍尿細管毛細血管障害により進展することを示した。現在は、免疫寛容の免疫病理学的特徴を検討している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we studied experimental orthotopic liver transplantation (OLT) model. We recognized that the Kamada technique and a new splint technique for hepatic artery reconstruction was convenient technique for rat OLT. We demonstrated that hepatic artery reconstruction prevented ischemic graft injury, inhibited graft rejection, and mediated long-term graft acceptance in rat OLT. In rejection of OLT, acute antibody-mediated rejection (AMR) could develop in OLT and was characterized by endothelial cell injuries in microvasculature and by bile duct and hepatic cell degeneration and necrosis. In addition, chronic AMR could also involve in chronic rejection in OLT, and was characterized by typical late morphological changes with IgG deposition. In the development of tolerance in OLT, lymphangiogenesis may be involved in reduction of inflammation. Now we are studying the pathological characteristics of immune tolerance in rat OLT model.

研究分野：外科学一般

科研費の分科・細目：移植外科学

キーワード：移植 肝臓移植 ラット 拒絶反応 抗体依存性拒絶反応 細胞性拒絶反応 肝動脈再建 急性腎障害

1. 研究開始当初の背景

1963 年米国の Starzl らによって始められた臨床肝臓移植は、手術手技、臓器保存方法、免疫抑制療法、周術期管理の改善により飛躍的にその成績が向上している。日本においても、肝臓移植医療は、胆汁うっ滞性病変、肝硬変、劇症肝炎、代謝性疾患などによる末期肝不全や肝腫瘍性疾患の治療法として臨床的に定着している。

本研究は肝臓移植のラットモデルを用いて肝臓移植における免疫応答について解析を進める。研究代表者はラット肝臓移植の手技を、国立小児病院小児医療研究センターでの研究の間に、ラット肝臓移植モデルの手技を日本に普及させた鎌田直司博士から直接習得している(Transplantation 50: 893-895, 1990; Transplantation 54: 750-752, 1992)。

本研究は、肝臓移植後の移植肝臓内でみられる免疫応答の特徴を、安定したラット肝臓移植モデルを作成し解析を行う。組織学的な解析は、臨床で行われている移植肝生検を病理診断する上にとっても重要な情報を提供することができる。さらに臨床の移植医療の治療や診断の進歩につながり、臨床医療に重要な情報をもたらすと考えている。

2. 研究の目的

臨床肝臓移植の、移植肝臓内で起こっている免疫学的特徴を明らかにするためには、実験モデルを用いて解析をすることが有用である。実験モデルを用いた研究には、良い実験モデルが不可欠であり、誰でも安定して短時間で手術手技を修得し、また短時間の手術時間で、安定した結果をだすことができる実験モデルの確立が必要である。

本研究は、はじめに誰でも簡単に安定したラット肝臓移植モデルを作成することができる手技を確立し、このラットの肝臓移植モデルを用いて、移植肝臓内でみられる免疫応答

について検討する。特に、移植肝臓内での拒絶反応と免疫寛容の免疫組織学的特徴を明らかにする。Banff 分類でも規定が明らかにされていない肝臓移植の抗体関連型拒絶反応について免疫病理学的な特徴を示す。さらに、免疫寛容の獲得の機序や免疫応答の特異性を明らかにし、臨床での肝臓移植での免疫抑制薬の積極的な減量や中止の組織学的指標を明らかにする。臨床の肝臓移植医療の診断や治療の進歩に応用できる研究を進める。

3. 研究の方法

1) 肝臓移植モデルの確立: 安定して誰でもが行うことが可能な簡便なラット肝臓移植モデルの確立を行った。Lewis ラットを用いて、同系肝臓移植を鎌田法(Cuff 法)で行い、さらに肝動脈の再建法を cuff 法、stent 法、split 法を行い、手術方法の簡便さや手術結果について検討した。

2) 肝動脈再建の重要性の確認: Lewis-Lewis 間の鎌田法による肝臓移植に、肝動脈を再建した群としない群の移植肝臓を、免疫組織学的ならびに DNA アレイを用いて検討し、肝臓移植での肝動脈再建の重要性を確認した。さらに、BN-Lewis 間の肝臓移植モデルを用いて、拒絶反応や臓器廃絶への肝動脈再建の影響を検討した。

3) 急性抗体関連型拒絶反応: DA ラットを donor に、Lewis ラットを recipient に同種性ラット肝臓移植を行い、移植後 11 日前後の移植肝臓の機能廃絶に至るまでの免疫病理学的特徴を検討した。

4) 慢性抗体関連型拒絶反応: BN ラットを donor に、Lewis ラットを recipient に、肝動脈再建をせずにおこなった同種性ラット肝臓移植の移植肝臓は移植後 39 日目頃に機能廃絶に陥る。しかし、肝動脈再建を行った

肝臓移植では 20%程度の移植肝臓が 120 日以上生着する。移植肝臓の慢性細胞性ならびに抗体関連型拒絶反応の免疫病理学的特徴を検討した。

5) 肝不全に伴う急性腎障害: DA-Lewis 間ラット肝臓移植を行い、移植後 11 日前後に移植肝臓の機能廃絶に陥る過程で、急性腎臓障害が発症する。その急性腎臓障害の免疫病理学的特徴を検討した。

6) 肝臓移植後の免疫寛容獲得の過程:

DA ラットを donor に、PVG ラットを recipient に同種性ラット肝臓移植を行うと、移植肝臓は 120 日以上の臓器生着がみられる。移植後の免疫寛容の状態を皮膚移植で確認し、免疫寛容に至る移植臓器内の免疫応答の特徴を検討した。

4. 研究成果

1) 肝臓移植モデルの確立: 初めに安定して簡便なラット肝臓移植手技の確立を行った。Lewis ラットを用いて、同系肝臓移植の手技を検討した。鎌田法を用いて、門脈と肝下大静脈を Cuff 法で、肝上下大静脈を手縫いで、胆管を stent 法を用いて縫合した。さらに肝動脈の再建法を cuff 法、stent 法、split 法を行い、手術手技の難度と手術時間、術後の合併症を検討した。その結果、recipient の右腎動脈を、肝動脈につながる腹腔動脈に splint 法を用いて吻合する肝動脈再建法は、手術手技も容易で、手術時間も短く、かつ術後長期の血栓形成や閉塞などの合併症を認めないことから、新しい安定した肝動脈再建法であることを明らかにした (J Nippon Med Sch 80: 4-15, 2013)。Splint 法による新たな肝動脈再建術を組み合わせたラットの肝臓移植手技を確立し、簡便で確実なラット肝臓移植を可能にした。

2) 肝動脈再建の重要性の確認: Lewis の同系移植を行い肝動脈再建の移植肝臓への影響を確認した。肝動脈の再建の有無にかかわらず、移植肝臓は機能を保ったまま 120 日以上生着した。120 日目では、肝動脈の再建をしていない移植肝臓では門脈域の線維化を伴う拡大、CD3+T 細胞や CD68+マクロファージの浸潤、細胆管増生や細胆管上皮細胞死がみられた。肝動脈の再建によりこれらの変化は軽減した。DNA アレイでの検討では、肝動脈の再建がない移植肝臓では、細胞死関連蛋白、細胞分裂サイクル関連蛋白、炎症関連蛋白の発現の増強がみられた。さらに、Lewis から BN への同種肝臓移植では、本来ならば急性拒絶反応から持続性拒絶反応により移植後 39 日程度で移植肝臓は機能廃絶に陥るが、肝動脈を再建することにより 20%程度の症例で移植臓器は 120 日以上までの生着が得られた (Transplant Proc 45: 1748-1753, 2013)。肝臓移植における肝動脈の再建は、移植肝臓の虚血再灌流障害を軽減するばかりではなく、急性および慢性拒絶反応を抑制し、長期の移植臓器を生着させることを明らかにした。

3) 急性抗体関連型拒絶反応: DA ラットを donor に、Lewis ラットを recipient に免疫抑制剤を用いずに同種性ラット肝臓移植を行うと、進行性の T 細胞性拒絶反応と抗体関連型拒絶反応により移植後 11 ± 2 日目に移植肝臓は機能廃絶に陥った。5 日目には、IgG が門脈と肝動脈に、7-11 日目には、さらに胆管上皮細胞、類洞、肝細胞に沈着が拡大した。急性抗体関連型拒絶反応では、早期に好中球浸潤を伴う門脈域の浮腫がみられ、11 日前後で機能廃絶に陥った移植肝臓では門脈と肝動脈の好中球やフィブリンの析出を伴う血栓形成、細胆管周囲浮腫や細胆管上皮細胞の変性、肝小葉の浮腫、うっ血、出血、好中球浸潤やフィブリンの析出、肝細胞の変性や壊

死がみられた。肝臓移植でも急性抗体関連型拒絶反応が誘導され、その特徴は門脈、肝動脈、類洞の微小血管の内皮細胞障害と好中球浸潤やフィブリンの析出を伴う血栓形成、および細胆管上皮細胞や肝細胞の変性・壊死に特徴づけられることを明らかにした。急性抗体関連型拒絶反応の主な標的は、微小血管内皮細胞(門脈、肝動脈や肝小葉内の類洞)、細胆管上皮細胞や肝細胞であることを明らかにした (Transplant Proc 43: 2737-2740, 2011)。

4) 慢性抗体関連型拒絶反応: Lewis-BN 間の肝臓移植では、肝動脈を再建しなければ 39 日頃に拒絶される移植肝臓が、肝動脈再建により約 20%の肝臓が 120 日以上生着する。120 日生着する肝臓では、T 細胞浸潤とともに、IgG の沈着を門脈、肝動脈、細胆管上皮細胞、類洞、肝細胞に認めた。病理所見は IgG の沈着を伴い門脈や肝動脈の線維性内膜肥厚、類洞の線維化、細胆管消失など慢性拒絶反応の病理所見を呈した。肝動脈の再建をしない場合は、強い細胞性および抗体関連型拒絶反応が起こり、移植後 39 日頃には、IgG の沈着を伴う慢性拒絶反応の病理像で拒絶された。肝臓移植でも、慢性抗体関連型拒絶反応が誘導され、免疫グロブリンの沈着を伴う慢性拒絶反応の病理像を呈した。さらに、強い抗体関連型拒絶反応の場合には短時間で、典型的な慢性拒絶反応の病理所見を形成することを示した (Transplant Proc 45:1743-1747, 2013)。

5) 肝不全における急性腎障害: ラット肝臓移植後の拒絶反応による肝不全の際に急性腎障害 (acute kidney injury) がみられることがある。DA-Lewis 間肝臓移植モデルでは移植後 11 日前後で移植肝臓の機能が廃絶する。その際にみられる急性腎障害を検討した。DA-Lewis 間ラット肝臓移植では、進行性に高

ビリルビン血症を伴い肝不全が進行した。その間に、ビリルビンの蓄積やミトコンドリア障害を伴い尿細管上皮細胞の変性やアポトーシスが認められた。間質の傍尿細管毛細血管には内皮細胞のアポトーシスや eNOS の発現低下、周囲の周皮細胞や筋線維芽細胞の増加、管腔内や周囲の炎症細胞浸潤を認めた。尿細管上皮細胞からの VEGF, angiopoietin-1 や angiopoietin-2 の発現は低下していた。傍尿細管毛細血管の血流速度の低下を認めた。肝不全に誘導される急性腎障害は、黄疸を伴う尿細管上皮細胞障害とともに、傍尿細管毛細血管障害による間質微小血管の血流障害により腎機能障害が進展することを明らかにした (Am J Nephrol 37:378-388, 2013)。

6) 肝臓移植後の免疫寛容獲得の過程:

DA-PVG 間にラット肝臓移植を行うと、移植後 1-2 週間後に急性細胞性拒絶反応を認めるものの、その後に炎症細胞は自然に消退して、移植された DA ラット肝は 150 日以上長期の生着を認めた。DA の皮膚移植により PVG のラットには DA に対して免疫寛容が獲得された状態にあることを確認した。リンパ管は炎症の場で細胞性免疫に影響を与える。肝臓移植後のリンパ管の動態について検討した。正常の肝臓には門脈域で門脈周囲に少数のリンパ管が存在している。急性細胞性拒絶反応では、拡大して P-P bridging を形成する門脈域に T リンパ球の浸潤とともにリンパ管新生がみられた。新生リンパ管は PROX-1 陽性、Ki67 陽性の内皮細胞を持ち、周囲は不連続性の基底膜に覆われていた。細胞性拒絶反応は一過性で、浸潤リンパ球は減少するが、その際に新生リンパ管内に多数のリンパ球の集簇がみられた。一方、急性細胞性拒絶反応と抗体関連型拒絶反応がみられる DA-Lewis 間肝臓移植ではリンパ管は破壊され、門脈域には浮腫がみられた。炎症が消退する際にリンパ管内に多数のリンパ球がみられることが

ら、急性拒絶反応の消退に関連していると思われた。高度な急性拒絶反応の際には、リンパ管の破壊がみられ、急性拒絶反応の遷延に関連していると考えた (Transplant Proc 42: 4282-4285, 2010)。現在は、免疫寛容の免疫病理学的特徴を検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計8件)

1) Ishii E, Shimizu A, Kuwahara N, Kanzaki G, Higo S, Kajimoto Y, Arai T, Nagasaka S, Masuda Y, Fukuda Y: Hepatic artery reconstruction prevents ischemic graft injury, inhibits graft rejection, and mediates long-term graft acceptance in rat liver transplantation. Transplant Proc 45: 1748-1753, 2013.

2) Ishii E, Shimizu A, Takahashi M, Terasaki M, Kunugi S, Nagasaka S, Terasaki Y, Ohashi R, Masuda Y, Fukuda Y: Surgical technique of orthotopic liver transplantation in rats: Kamada technique and new splint technique for hepatic artery reconstruction. J Nippon Med Sch 80: 4-15, 2013.

3) Shimizu A, Ishii E, Masuda Y, Sato A, Piao A, Kunugi S, Takahashi M, Terasaki M, Nagasaka S, Terasaki Y, Ohashi R, Morioka T, Fukuda Y: Renal inflammatory changes in acute hepatic failure-associated acute kidney injury. Am J Nephrol 37: 378-388, 2013.

4) Shimizu A, Ishii E, Kuwahara N, Arai T, Kanzaki G, Higo S, Kajimoto Y, Nagasaka S, Masuda Y, Fukuda Y: Chronic

antibody-mediated rejection can be involved in chronic rejection in rat orthotopic liver transplantation. Transplant Proc 45:1743-1747, 2013.

5) Shimizu A, Yamada K, Robson SC, Sachs DH, Colvin RB: Pathologic characteristics of transplanted kidney xenografts. J Am Soc Nephrol 23: 225-235, 2012.

6) Kunugi S, Shimizu A, Ishii E, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, Masuda Y, Nagasaka S, Fukuda Y. The pathological characteristics of acute antibody-mediated rejection in DA-to-Lewis rat orthotopic liver transplantation. Transplant Proc 43: 2737-2740, 2011.

7) 神崎 剛, 清水 章: 拒絶反応の組織学的マーカー. 日腎会誌 55:125-32, 2014.

8) 鶴岡佳代, 清水章: 移植腎にみられる血管病変. 腎と透析 75:717-723, 2013.

〔学会発表〕(計10件)

1) Ishii E, Shimizu A, Kuwahara N, Arai T, Wakamatsu K, Ishikawa A, Masuda Y: Intra-graft events associated with graft acceptance "acceptance reaction" in DA to PVG rat liver transplantation. Congress of the 16th European Society for Organ Transplantation (Vienna), 2013.7.

2) Ishii E, Shimizu A, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, Masuda Y, Fukuda Y: microRNA in acute liver graft rejection in DA to Lewis rat orthotopic liver transplantation. Congress of the 16th European Society for Organ Transplantation (Vienna), 2013.7.

- 3) Shimizu A, Ishii E, Masuda Y, Sato A, Piao H, Kunugi S, Takahashi M, Terasaki M, Nagasaka S, Terasaki Y, Ohashi R, Morioka T, Fukuda Y: Impaired renal microcirculation in hepatic failure-associated acute kidney injury in rats. ASN Kidney Week 2013(Atlanta), 2013.11.
- 4) Shimizu A, Ishii E, Kanzaki G, Higo S, Kajimoto Y, Nagasaka S, Masuda Y, Fukuda Y: Chronic antibody-mediated rejection in rat orthotopic liver transplantation. 24th International congress of the transplantation society (Berlin), 2012.6.
- 5) Ishii E, Shimizu A, Kuwahara N, Kanzaki G, Higo S, Kajimoto Y, Nagasaka S, Masuda S, Fukuda Y: Hepatic artery reconstruction prevents ischemic graft injury, inhibits graft rejection, and mediates long-term graft acceptance in rat liver transplantation. 24th International congress of the transplantation society (Berlin), 2012.6.
- 6) Shimizu A, Ishii E, Masuda Y, Piao H1), Kuwahara N, Ishikawa A, Arai T, Morioka T1), Fukuda Y(1)Transplantation Biology Research Center, Massachusetts General Hospital, Boston, USA): Renal peritubular capillary injury with impaired renal microcirculation in hepatic acute kidney injury in rats. ASN Kidney Week 2012(San Diego), 2012.11.
- 7) Shimizu A, Ishii E, Masuda Y, Sato A, Piao H, Ishikawa A, Arai T, Morioka T, Fukuda Y: Renal tubular and peritubular

capillary injury in hepatic failure induced acute kidney injury in rats. ASN Kidney Week (Philadelphia), 2011. 11

8) 清水章, 石井永一, 益田幸成, 佐藤綾子, 朴紅蘭, 永坂真也, 大橋隆治, 森岡哲夫, 福田悠: 急性肝不全にともなう急性腎臓障害の微少血管障害. 第102回日本病理学会総会(札幌), 2013.6.

9) 清水章, 石井永一, 益田幸成, 永坂真也, 福田悠: 急性肝不全にともなう急性腎臓障害の進展機序. 第100回日本病理学会総会(横浜), 2011.4.

10) 清水章, 石井永一, 金子朋広, 三井亜希子, 藤田恵美子, 益田幸成, 永坂真也, 飯野靖彦, 片山泰朗, 福田悠: 急性肝不全にともなう急性腎臓障害(AKI)の特徴. 第54回日本腎臓学会学術総会(横浜), 2011.6.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井永一 (ISHII Eiichi)

日本医科大学・医学(系)研究科・特別研究生
研究者番号: 0 0 1 9 3 2 4 3

(2)研究分担者

清水章 (SHIMIZU Akira)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号: 0 0 2 5 6 9 4 2

(3)連携研究者

なし