

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461954

研究課題名(和文)2光子励起レーザー顕微鏡を用いた新たな肝移植後拒絶反応の時空間的メカニズム解析

研究課題名(英文) Novel spatiotemporal analysis of mechanism for rejection after liver transplantation using two-photon microscopy

研究代表者

武市 卒之 (takeichi, takayuki)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：00380999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、同所性肝移植モデル下で肝移植後拒絶肝組織での微小循環環境における血行動態と炎症細胞の動的変化を観察することで、拒絶反応の病態解明、臨床応用への足がかりとすることを目的とした。主に以下の2点について成果を得た。

小動物(マウス・ラット)を用いた同所性肝移植モデルの作製：マウスでのモデル作製の困難さからラットを用いてモデル作製を行った。2光子励起顕微鏡下でin vivoの移植肝の観察が可能であった。

マウス肝虚血再灌流障害時の好中球動態の解析：肝虚血再灌流障害時の好中球数、形態の変化、速度が経時的に観察でき、高倍率では鬱血、血栓形成の誘発、肝実質構造の破壊を経時的に捉えることができた。

研究成果の概要(英文)：We showed a novel method for examining neutrophil recruitment in liver transplant model and hepatic ischemia-reperfusion(I/R) injury model using two-photon microscopy.

In liver transplant model, we could observe the blood circulation in sinusoids and the behavior of neutrophils.

In I/R model, at low magnification, four to six hepatic lobules could be visualized. The number of adherent neutrophils continued to increase for 4 hr after reperfusion, whereas their crawling velocity reached a maximum of 2 hr after reperfusion and then decreased gradually. High-magnification images revealed the presence or absence of blood circulation in sinusoids. Adherent neutrophils in perfused areas in the I/R group had more elongated shapes and moved more quickly than those in nonperfused areas and in the control group.

研究分野：医歯薬学

キーワード：マウス同所性肝移植 ラット同所性肝移植 肝虚血再灌流障害 好中球動態 2光子励起顕微鏡 急性拒絶反応

## 1. 研究開始当初の背景

臓器移植法の改正などにより我が国においても肝移植症例が増加し、またその治療成績も上昇している一方で、肝臓移植後の様々な合併症、なかでも特に移植後の急性拒絶反応は、約 30-50%の発生頻度とされており、中には難治性の拒絶反応へ進展するものもあり、その早期診断と治療は非常に重要である。診断法としては、侵襲を伴う経皮的肝生検（針生検）が必要であるが出血の危険性も非常に高い。正確な診断を得ずにステロイドパルス療法を中心とした拒絶反応の治療を行うことは、感染のリスクもあり注意を要するため、非侵襲的で、簡便、確実な拒絶反応の診断方法の確立が模索されている。

これまでの急性拒絶反応に関する多くの研究は、*in vitro* あるいは免疫組織学的な検討が中心であり、拒絶反応肝組織での炎症細胞浸潤や、静脈内皮炎のリアルタイムな変化は、研究されていない。我々はこの点に着目し、肝移植後拒絶反応での肝組織における炎症細胞の経時的な変化を観察できないかと考えた。

生体内イメージング法は現在開発が進んでいる分野であり、生細胞や生体内で標的となる分子を動的に捉え、生命現象を解き明かす強力な手段として利用されてきている。特に 2 光子励起顕微鏡は、物質励起に 2 光子吸収過程を利用した顕微鏡で、従来の共焦点励起顕微鏡と比較し、高い空間解像度が得られる。励起する部位が限定されるので、生体に対する光毒性が抑えられる。深部組織の観察に適している。という利点がある。いずれも、「組織・臓器の生体活動をリアルタイムに観察」するために極めて有用である。

そこで、肝移植後の拒絶反応状態での肝組織を観察、解析することにより、非侵襲的に拒絶反応の動的な病態を解明することが可能になるのではないかと考えた。また、拒絶モ

デルに免疫抑制剤を投与し、観察することで、拒絶反応からの回復過程も観察することができ、新たな拒絶反応の病態を解明する可能性があると考えた。そして最終的には、肝移植後の拒絶反応の新たなメカニズムの解明へとつながることができればと考えた。

また、肝移植後の拒絶反応と相関が報告されている、肝虚血再灌流障害時の好中球動態についても 2 光子励起顕微鏡を用いて解析を行った。

## 2. 研究の目的

本研究は、小動物（マウス or ラット）を用いた同所性肝移植モデルにおいて、2 光子励起レーザー顕微鏡を用いて、生存状態の移植肝組織における微小環境下の炎症細胞と肝組織の関係をリアルタイムに映像化、分析することにより、肝組織における移植後の拒絶反応の病態解明を行い、最終的にそれらを臨床の場面での、早期かつ非侵襲的な拒絶反応の診断に生かしていくことを目的とする。すなわち静的検査では観察できなかった臓器移植後の拒絶反応の動的な病態をリアルタイムなイメージング技術を用いて解明し、急性拒絶に関する新たな知見を得ることを最終目的とした。

また同時に、マウス虚血再灌流傷害モデルを用いての好中球動態解析を行うことで拒絶反応の発症とも相関するとされている虚血再灌流障害のメカニズム解明に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) 同所性肝移植モデルの作製

研究当初はマウスでのモデル作製に取り組んできたが、非常に高度な技術と時間を要するため、初年度途中からラットでのモデル作製に取り組んだ。肝動脈の再建は行わない方法で、ドナー肝は UW 液（もしくはラクトリンゲル液）にて灌流、4 にて保存したのち同所性に移植した。肝上部大静

脈、下大静脈は直接吻合、門脈は Cuff technique にて吻合し、胆管は Over stent にて吻合した。

#### (2) マウス虚血再灌流傷害時の好中球動態の解析

腹腔内麻酔下で開腹後、全肝の70%に当たる Median lobe + Left lateral lobe への門脈・肝動脈血流を非侵襲的な血管クリップにて途絶させ、45分後に解放し再灌流させた。再灌流後0、1、2、3、4時間時点でそれぞれ20分の動画を撮影、好中球の速度、数、cell shape index 等計測し、解析した。

(3) 2光子励起顕微鏡による観察  
セットアップは BX61WI 倒立顕微鏡 + FV1000MPE (Olympus) および Mai Tai HP Deep See femtosecond-pulsed laser (Spectra Physics) を用いた。イメージングの前準備として肝移植ラットを吸入麻酔下に気管内挿管後、開腹し肝を体外に露出した。蛍光試薬 (TRITC-albumin) を静注し、2光子励起レーザー顕微鏡を用いて、生きた状態で移植肝を固定し観察した。蛍光試薬 (TRITC-albumin) により、肝血管は赤色に励起され、炎症細胞および血管系が *in vivo* で同時に観察できた。

#### 4. 研究成果

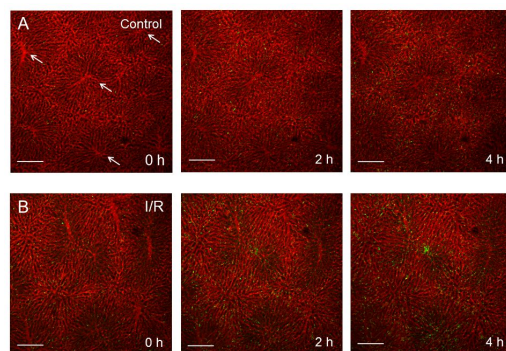
##### (1) 同所性肝移植モデルの作製と生体内イメージング

マウスでは、その手技の難易度からモデル作製に至らなかったものの、ラットでは、安定した肝移植手術手技や術後成績を残せるようになり、最終年度からようやく生体内イメージングを行えるようになった。マウスでの観察法を応用し、肝類洞内の血球の動きを捉える段階まで成果を挙げる事ができた。肝移植モデル下での移植後生体内イメージングは未だ他報告はなく、その実現に向けて実験を重ねていく予定である。

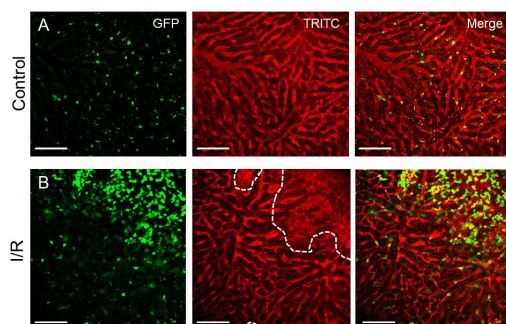
##### (2) マウス虚血再灌流傷害時の好中球動態

##### の解析と生体内イメージング

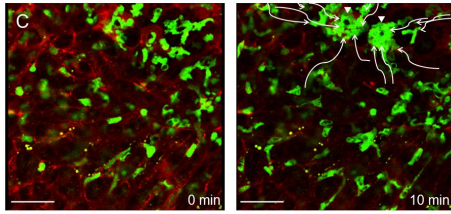
高倍率と低倍率で観察を行った。低倍率イメージングでは1視野当り4-6の肝小葉が描出された。I/R群における1視野当りの平均接着好中球数は、再灌流後0-4時間まで経時的に増加していた(図1)。また、接着好中球の平均移動速度 ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) は再灌流2時間後に最も速い傾向が認められた。血清中の CXCL1、CXCL2 は同様の濃度変化を呈し、共に再灌流2時間後に最高値に達した。一方、肝臓では再灌流3時間後に最高値に達した。高倍率イメージングでは類洞血流の有無が評価でき、I/R群では好中球浸潤を伴う血流途絶部位が散見された(図2)。好中球の平均移動速度 ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) は、I/R群の血流持続部位で最も速かった。I/R群では蛍光強度の上昇を示す肝細胞に向かって好中球が集簇していく様子が観察され、鬱血、血栓形成の誘発、肝実質構造の破壊を経時的に捉えることができた(図3)。Cyclosporin H 投与は特に血流途絶部位での好中球数、移動速度を抑制し、血清学・病理学的に肝 I/R 障害を軽減させた。



(図1)



(図2)



( 図 3 )

## 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 1 件 )

Masaki Honda、Takayuki Takeichi、  
Katsuhiko Asonuma、Koji Tanaka、  
Masato Kusunoki、Yukihiro Inomata  
Intravital Imaging of Neutrophil  
Recruitment in Hepatic  
Ischemia-Reperfusion Injury in Mice.  
Transplantation 査読有 2013;95(4):551-8.  
DOI:10.1097/TP.0b013e31827d62b5

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

Masaki Honda  
Intravital Two-Photon Imaging of  
Neutrophil Recruitment Reveals an  
Efficacy of FPR1 Blockade to Attenuate  
the Hepatic Ischemia-Reperfusion  
Injury.  
ATC(American Transplant Congress)、  
May 18-22、2013 in Seattle、  
Washington(USA)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

武市 卒之 ( TAKEICHI Takayuki )  
熊本大学医学部附属病院、非常勤診療医師  
研究者番号 : 00380999

(2) 研究分担者

猪股 裕紀洋 ( INOMATA Yukihiro )  
熊本大学大学院生命科学研究部 教授  
研究者番号 : 50193628

本田 正樹 ( HONDA Masaki )  
熊本大学大学院生命科学研究部 助教  
研究者番号 : 80573609