

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461931

研究課題名(和文) ラット肝臓移植モデルを用いた移植肝臓の免疫寛容獲得の機序とバイオマーカーの同定

研究課題名(英文) The pathological and immunological characteristics of grafts with long-term acceptance in rat liver transplantation

研究代表者

石井 永一 (Ishii, Eiichi)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：00193243

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)：DA-Lewラット間の肝臓移植では移植肝臓内に進行性の急性T細胞性拒絶反応と抗体関連型拒絶反応により移植臓器は11日程度で機能廃絶に陥った。DA-PVGラット間の移植では7日から14日目には拒絶反応と同様の炎症細胞浸潤を認めるがT細胞とマクロファージが少なく、多くのFoxp3+ Tregが含まれていた。21日目には炎症細胞の消退がみられ100日目には移植臓器の生着を認めた。長期生着臓器にはTh1 < Th2サイトカインの環境で、炎症に関わる miRNAsの増減も認められた。移植臓器の拒絶反応や長期臓器生着の免疫応答には炎症性サイトカインやmiRNAsの制御が関連していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In DA-to-Lewis rat liver transplantation, the progressive acute T cell- and antibody-mediated rejection developed by day 11 with irreversible graft failure. In DA-to-PVG rat liver transplantation, the transient acute T cell-mediated inflammation occurred between day 7 to day 14, but reduced on day 21 and subsided on day 100 with stable graft functions. The infiltrates in DA-PVG accepting grafts at day 7 to day 14 differed from that in DA-Lew rejecting grafts in certain features, including less infiltration by T cells and macrophages, many Foxp3+Tregs, less levels of Th1 (IL-12, IFN- γ , TNF- α) and high expression of Th2 (IL-4, IL-10) cytokines. In addition, 193 microRNAs were up-regulated or down-regulated in rejecting or accepting grafts when compared with those in normal DA liver. We concluded that the immunological reactions in grafts with rejection or long-term acceptance may be regulated by specific Th1 and Th2 cytokines and several inflammatory miRNAs.

研究分野：外科学一般

キーワード：移植 肝臓移植 ラット 免疫寛容 拒絶反応 病理 microRNA 制御性T細胞

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、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医療として定着している。臨床肝臓移植の解析には動物実験モデルを用いた解析が欠かせない。

研究代表者はラット肝臓移植の実験手技を、国立小児病院小児医療研究センターでの研究で、ラット肝臓移植の手技を日本に普及させた鎌田直司博士から直接指導を受け習得している (Transplantation 50: 893-895, 1990; Transplantation 54: 750-752, 1992)。現在までに肝臓移植のラットモデルを用いて、肝臓移植モデルについて (J Nippon Med Sch 80: 4-15, 2013)、肝動脈再建の重要性 (Transplant Proc 45: 1748-1753, 2013)、急性抗体関連型拒絶反応 (Transplant Proc 43: 2737-2740, 2011)、慢性抗体関連型拒絶反応 (Transplant Proc 45: 1743-1747, 2013)、肝不全における急性腎障害 (Am J Nephrol 37: 378-388, 2013)、急性拒絶反応におけるリンパ管障害 (Transplant Proc 42: 4282-4285, 2010) を明らかにしてきた。

臨床での肝臓移植では移植肝臓の生着後に免疫寛容の状態になっている場合も多く、肝臓は他の臓器移植よりも免疫寛容の状態を獲得しやすい臓器として知られている。長期間使用する免疫抑制薬の副作用を懸念して、肝臓移植では免疫抑制薬の積極的な減量や中止を考えるようになってきた。しかし、免疫抑制剤の中止後に、臨床的には subclinical な拒絶反応による肝線維化が問題になっている。肝臓移植のラットモデルを用いて長期生着や免疫寛容獲得過程の病理所見や特異的な免疫応答の特徴を明らかに

し、免疫寛容の免疫学的な機序、確実な免疫寛容の誘導、臨床病理学的な病態の把握や新規治療の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、ラットの肝臓移植モデルを用いて、移植臓器の拒絶反応や免疫寛容獲得に関わる病理所見の特徴や免疫応答の特異性を解明する。移植臓器の病態把握のための病理学的特徴や、拒絶反応や長期生着する移植臓器内での特徴的な免疫応答を、移植臓器内サイトカイン環境や免疫反応を制御している microRNAs (miRNAs) の動態を含め明らかにする。

3. 研究の方法

1) DA-PVG ラット肝臓移植モデルの免疫寛容状態の確認: DA ラットを donor に、PVG ラットを recipient に同所性ラット肝臓移植を行うと、移植肝臓は 100 日以上の臓器生着がみられる。長期の移植肝臓生着を獲得したラットは donor 特異的な免疫寛容状態を獲得しているかを、recipient と同系のラット、donor と同系のラットや 3rd party ラットからの皮膚移植を行い確認した。

2) 肝臓移植後の長期移植臓器生着の過程の検討: DA ラットを donor に、PVG ラットを recipient に同所性ラット肝臓移植を行うと、移植肝臓は 100 日以上の臓器生着がみられる。この移植臓器の長期生着に関わる移植臓器内の病理所見や免疫応答の特徴を検討した。肝臓移植後に拒絶反応により短期間で機能廃絶に陥る DA-Lewis ラット間の同所性ラット肝臓移植の移植臓器内にみられる拒絶反応の特徴と比較検討した。

3) 長期移植臓器生着に関連する移植臓器内

の炎症性蛋白の動態： DA-PVG ラット間の生着している移植臓器内に認められる免疫応答と DA-Lew ラット間の急性拒絶反応が進展している臓器内にみられる免疫応答の特徴を明らかにするために、DA-PVG ラット間移植と DA-Lew ラット間移植で経時的に得られた移植肝臓から mRNA を抽出してアレイを用いて網羅的に解析し、拒絶反応と長期移植臓器生着に関連する移植臓器内の mRNA の動態を比較検討した。

4) 長期移植臓器生着に関連する移植臓器内の microRNAs (miRNAs)の動態： DA-PVG ラット間の長期移植臓器が生着する臓器内に認められる免疫応答と DA-Lew ラット間の急性拒絶反応が進展している臓器内にみられる免疫応答の制御の特徴を明らかにする目的で、経時的に得られた移植肝臓から miRNA を抽出しアレイを用いて網羅的に解析し比較検討した。

4 . 研究成果

1) DA-PVG ラット肝臓移植モデルの免疫寛容状態の確認： DA-PVG ラット肝臓移植後 100 日目のラットに recipient と同系の PVG ラットの皮膚、donor と同系の DA ラットの皮膚、および 3rd party の Lew ラットの皮膚を用いて皮膚移植を行い、recipient と同系の PVG の皮膚と donor と同系の DA ラットの皮膚は皮膚移植後 10 日目に生着しているが、3rd party の Lew ラットの皮膚は拒絶により生着していないことを確認した。DA-PVG ラット肝臓移植後に長期移植肝臓が生着しているラットは donor 特異的な免疫寛容状態を獲得していることを確認した。DA-PVG ラット肝臓移植は donor 特異的な免疫寛容獲得モデルであることを明らかにした。

2) 肝臓移植後の長期移植臓器生着の過程の

検討： DA-PVG 間で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>100 日の長期生着を認めた。DA-Lew ラット間の急性拒絶反応により 11 日程度で臓器廃絶に陥る移植肝臓と比較した。PVG ラットに移植された DA の移植肝臓内でも、DA-Lew 間移植と同様に移植後 7 日目には門脈の血管内膜炎や細胆管炎を伴う急性 T 細胞性拒絶反応に類似した炎症細胞浸潤を認めた。しかし、移植後 21 日目にはわずかな炎症細胞を残して炎症細胞浸潤は消退、急性 T 細胞性拒絶反応の病理所見も消失し、移植肝臓は 100 日以上長期生着を認めた。DA-PVG ラット間移植では移植後 7 日目の急性 T 細胞性拒絶反応に類似していた炎症細胞浸潤は DA-Lew ラット間の移植肝臓内の急性拒絶反応の炎症細胞とは異なっていた。DA-Lew 間移植臓器に比較して DA-PVG ラット間の移植肝臓で認められる炎症細胞は、CD3 陽性の T 細胞と ED-1 陽性のマクロファージが少なく、T 細胞の PCNA 陽性の増生がわずかで、門脈や細胆管、肝小葉内の T 細胞性拒絶反応 (臓器組織障害)の病理所見も軽度であった。さらに、移植肝臓内の IL-12, IFN- γ , TNF- α の Th1 サイトカインの産生が少なく、IL-4 や IL-10 の Th2 サイトカインの産生増強が認められた。CD3 陽性 T 細胞や ED1 陽性マクロファージの炎症細胞内に多くの Foxp3 陽性の Treg が認められた。免疫寛容が進展している移植肝臓内では、一過性の炎症細胞浸潤が認められるが、進行性に減少する炎症細胞浸潤、移植臓器内の Th2 サイトカイン環境、多くの Treg が浸潤し免疫寛容の誘導に関連していることを明らかにした。

3) 長期移植臓器生着に関連する移植臓器内の炎症性蛋白の動態： DA-Lew 間の肝臓移植では移植後 11 日前後で移植肝臓は拒絶反応により機能廃絶に陥る。DA-PVG 間の肝臓移植

では、移植肝臓は長期生着し、donor 特異的に免疫寛容を獲得している。機能廃絶に陥る DA-Lew 間の 9 日から 11 日目の移植肝臓と、免疫寛容を獲得し長期生着する DA-PVG 間の移植肝臓で炎症細胞が急激に減少する 14 日目から 21 日目で変動している蛋白に注目してアレイを用いて網羅的に解析を行った。拒絶が進行する DA-Lew 間の移植肝臓と比較して、免疫寛容が獲得されている DA-PVG 間の 14 日から 21 日目の移植肝臓で 2 倍以上増加している蛋白として Axl receptor tyrosine kinase, IL25, murinoglobulin 1, toll-like receptor 10, chemokine (C-X-C motif) receptor 6, transient receptor potential cation channel など炎症に関連する蛋白を含め 100 種類以上の蛋白が同定された。逆に 2 倍以上減少している蛋白としては chemokine (C-C motif) receptor 1 や ligand 12, S100 calcium binding protein A8, atypical chemokine receptor 1, chemokine (C-X-C motif) ligand 2, NOS2 など炎症に関連する蛋白を含め 100 種類以上の蛋白が同定された。得られた蛋白に関し遺伝子ネットワーク/パスウェイ解析データベースを用いてそれらのネットワーク、機能解析や相互作用の解析を進めている。

4) 長期移植臓器生着に関連する移植臓器内の microRNAs (miRNAs) の動態: miRNA は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり遺伝子の転写後発現調節に関与している。ヒトゲノムには 1000 以上の miRNA がコードされていると考えられているが、miRNA はその標的 mRNA に対して不完全な相同性をもって結合し、標的 mRNA の翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制している。miRNA が介する転写抑制は、広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うと考えられ、炎症の制御にも重要な役割を持っていることが指摘されている。

DA-Lew ラット間の急性拒絶反応により機能廃絶に陥った移植肝臓内と DA-PVG ラット間の長期生着した移植肝臓内での免疫反応を制御していると考えられる miRNAs の特徴を網羅的に解析した。拒絶反応や臓器生着反応の過程で 193 個の miRNAs の増減を確認した。DA-Lew ラット間の急性拒絶反応には炎症制御に関連している miR-146b、miR-223、miR-181、miR-34a、miR-326、miR-21 の増加と、miR-150、miR-125b、miR-20a の減少が認められ、肝臓移植の拒絶反応には miRNAs の炎症制御が関与していると考えられた。DA-PVG ラット間の長期生着した移植肝臓内では拒絶反応で増加する miR-146b、miR-223、miR-181、miR-326、miR-21 の増加の抑制がみられた。長期生着の過程で miR-146a の増加を認めた。miR-125b は拒絶反応の過程では減少するが、その減少の抑制がみられた。miR-34a と miR-150 は拒絶反応と長期生着反応の間で大きな差は認められなかった。移植臓器の拒絶反応と免疫寛容獲得に関わる特異的な miRNAs の動態の特徴を明らかにし、miRNA を用いてこれらの病態の指標となるバイオマーカーの同定を進めている。

本研究は免疫寛容に関わる病理的な特徴や免疫応答の特異性を解明するために研究を進めてきた。今後も研究を継続し臨床肝臓移植に役立つ病理診断、免疫寛容獲得の機序、新規治療への応用や病理把握のためのバイオマーカーの同定を進めていく必要がある。

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 6 件)

1) Pathiraja V, Villani V, Tasaki M, Matar AJ, Duran-Struock R, Yamada R, Moran SG, Clayman ES, Hanekamp J, Shimizu A, Sachs DH, Huang CA, Yamada K. Tolerance of Vascularized Islet-Kidney Transplants in

Rhesus Monkeys. Am J Transplant 17: 91-102, 2017.

2) Villani V, Yamada K, Scalea JR, Gillon BC, Arn JS, Sekijima M, Tasaki M, Cormack TA, Moran SG, Torabi R, Shimizu A, Sachs DH: Adoptive Transfer of Renal Allograft Tolerance in a Large Animal Model. Am J Transplant 16: 317-324, 2016

3) Tasaki M, Wamala I, Tena A, Villani V, Sekijima M, Pathiraja V, Wilkinson RA, Pratts S, Cormack TA, Clayman E, Arn JS, Shimizu A, Fishman JA, Sachs DH, Yamada K: High incidence of xenogenic bone marrow engraftment in pig-to-baboon intra-bone bone marrow transplantation. Am J Transplant 15:974-983, 2015.

4) Saito H, Hamasaki Y, Tojo A, Shintani Y, Shimizu A, Nangaku M: Phospholipase A2 receptor positive membranous nephropathy long after living donor kidney transplantation between identical twins. Nephrology (Carlton) 20 Suppl: 101-104, 2015.

5) Kanzaki G, Shimizu A: Currently available useful immunohistochemical markers of renal pathology for the diagnosis of renal allograft rejection. Nephrology (Carlton) 20 Suppl:9-15, 2015.

6) 神崎 剛, 清水 章: 腎移植にかかわる医療従事者の役割と最新の知識, 医療従事者の役割, 病理医の役割. 腎と透析 78: 35-38, 2015.

〔学会発表〕(計 3 件)

1) Ishii E, Kuwahara N, Arai T, Masuda Y,

Shimizu A: microRNAs in acute graft rejection in rat orthotopic liver transplantation. 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (Brussels) 2015 9.

2) 永坂真也, 岩堀 徹, 肥後清一郎, 神崎剛, 梶本雄介, 益田幸成, 清水 章: 腎局在樹状細胞の表現型解析. 日本腎臓学会学術総会 (第 57 回), 2014.7.

3) Ishii E, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, Nagasaka S, Masuda Y, Shimizu A: microRNA in acute liver graft rejection in DA to Lewis rat orthotopic liver transplantation. 2014 World Transplant Congress (San Francisco) 2014.6.

〔図書〕(計 1 件)

Shimizu A, Kanzaki G: [分担] Xenotransplantation. Pathobiology of Human Disease (Linda M, McManus, Richard N. Mitchell), 2014; pp 665-675, Elsevier.

〔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