

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890155

研究課題名（和文）制御性肝類洞内皮細胞を用いた直接及び間接認識 T 細胞性拒絶の同時制御法の開発

研究課題名（英文） Development of novel cellular therapy for T cell mediated rejection via direct and indirect pathway using regulatory liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) in transplantation

研究代表者

尾上 隆司 (ONOE TAKASHI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：90549809

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまで、肝類洞内皮細胞が抗原特異的な免疫寛容誘導能を持つ事を示してきた。本研究では実際にマウスモデルを用いて肝類洞内皮細胞を移入し免疫寛容誘導し得るかを検討した。免疫不全マウスに同種類洞内皮細胞移入し、キメラ肝を構築した。生着したキメラ内皮は PD-L1 を強く表出しており、免疫再構築後、キメラ内皮が誘導できた個体では、T 細胞の応答抑制を認めた。さらに同種心移植を行ったキメラ肝マウスではグラフト心生着がドナー特異的に有意に延長した。これより、アロ類洞内皮移入により移植臓器に対する免疫寛容誘導は可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We have shown that liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) has antigen specific immune-suppressive potential in vitro. In this study, we evaluated the possibility that adoptive transfer of isolated allogeneic LSECs induce immune-tolerance in vivo mouse model. Allogeneic BALB/cA LSECs were intraportally injected into immunodeficient RAG2/gc double-knockout (DKO) mice. After orthotopic allogeneic LSEC engraftment, engrafted LSECs expressed PD-L1 molecule. DKO mice were immune-reconstituted using C57BL/6 syngeneic splenocytes. After immune reconstitution, mixed lymphocyte reaction revealed specific inhibition of host alloreactive T-cell proliferation. Furthermore, allogeneic LSEC engraftment significantly prolonged subsequently grafted cognate allogeneic heart survival in DKO mice immune-reconstituted with syngeneic bone marrow transplantation. In conclusion, murine LSECs are capable of suppressing T cells with specificity cognate to LSECs in an in vivo model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：移植・消化器外科

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：(1) 肝移植 (2) 免疫寛容 (3) 移植免疫 (4) 類洞内皮細胞 (5) キメラ (6) PD-L1

1. 研究開始当初の背景

肝臓移植は劇症肝炎や慢性肝疾患の最終段階である肝不全に対して唯一根本的かつ最終的な治療法である。しかし同種の臓器又は細胞を移植する場合、T細胞を主体とした細胞性拒絶反応を回避するために免疫抑制剤による制御が不可欠となっている。これまでの免疫抑制剤の多大な進歩にも係わらず、移植後の非特異的免疫抑制剤の使用は、術後の肝炎ウイルス再発、易感染性、肝腫瘍の再発など、移植術後の生存率を低下させる大きなリスクとなっている。移植成績と患者 QOL の更なる向上のためには特異的免疫寛容導入プロトコルの開発が必須である。肝臓移植後の急性拒絶はレシピエントの T 細胞が、抗原提示細胞が提示するドナー抗原を認識して活性化した後、移植組織を攻撃することで惹起される。抗原提示細胞には class II により移植抗原を提示し同時に共刺激分子によって T 細胞を活性化し拒絶を惹起する、樹状細胞に代表される professional 抗原提示細胞と、class II は表出し抗原は提示するが共刺激分子の表出を欠き、その結果 T 細胞を寛容化する non-professional 抗原提示細胞がある。私は最近、肝類洞内皮細胞がこの non-professional 抗原提示細胞の性格を備え、T 細胞を抗原特異的に抑制することを確認した。マウス肝類洞内皮細胞によって抗原提示された T 細胞は直接および間接認識経路で死滅あるいは麻痺に陥り、移植抗原特異的免疫寛容が誘導されることを *in vitro* で示してきた。すなわち、肝類洞内皮細胞移入することでドナー特異的免疫寛容導入できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では同種肝臓から類洞内皮細胞を分離し、移植後のドナー肝臓に経門脈的に移入しキメラ類洞を構築することによる T 細胞性拒絶制御の可能性を、マウスを用いた *in vivo* モデルで検討する事を目的とした。また前臨床的研究として、同モデルにおいて実際に同種心移植を行い、同種類洞内皮細胞移入によるグラフト心生着延長効果の検討を行った。さらに肝類洞内皮細胞の寛容性メカニズムの検討を行った。

3. 研究の方法

① Balb/c マウスの肝臓から類洞内皮細胞を分離し、免疫不全 B6 マウス (B6-RAG2/gc ダブルノックアウトマウス) に門脈内移入することでキメラ類洞の構築を行った。さらにこの類洞内皮細胞の生着を組織免疫染色により評価した。

② 免疫不全 B6 マウスに Balb/c 類洞内皮細胞を門脈内移入しキメラ肝マウスを作成、4 週

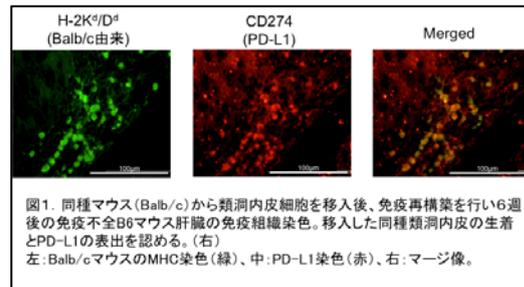
後に B6 マウスから同系骨髄移植にて免疫再構築を行った。免疫再構築後 (骨髄移植 6 週後)、マウスを犠牲させ、脾細胞を responder とした混合リンパ球試験を行い、同種反応性 (Balb/c 抗原反応性) T 細胞の応答を定量した。

③ ②において確立した免疫再構築キメラ肝マウスに対する同種 (Balb/c) 心移植モデルを用いて、類洞内皮細胞移入による寛容誘導の検討を *in vivo* モデルで行った。

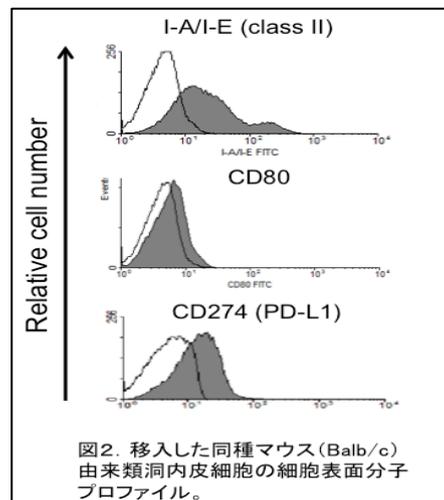
4. 研究成果

免疫再構築キメラ肝マウスの作成

同種異系マウス間で、免疫不全 B6 マウスに Balb/c マウスより分離した類洞内皮細胞を門脈内移入すると、4 週後には移入した類洞内皮細胞は生着しキメラ肝を構築した。続いて B6 マウスより脾細胞移入し免疫を再構築したが、免疫再構築後も MHC class I 染色によって移入類洞内皮細胞の生着およびキメラ構築が確認できた (図 1)。



移入した Balb/c 類洞内皮細胞は移入時に class II、CD80 といった分子を表出し抗原提示細胞としての性格を持っているのみならず、アポトーシス誘導分子である PD-L1 分子も表出していたが (図 2)、移入した類洞内皮細胞は生着後も PD-L1 分子を強く表出していた (図 1)。



類洞内皮細胞移入による類洞内皮キメラにより、同種反応性 T 細胞応答は抗原特異的に抑制される。

キメラ肝マウスを B6 マウス脾細胞を用いて免疫再構築後、同種反応性 T 細胞の応答を CFSE 色素を用いた混合リンパ球試験で検討した。同種類洞内皮細胞を移入したマウスでは、免疫再構築後も同種反応性 T 細胞の応答はサードパーティー (SJL マウス) に対する反応と比べ有意に抑制されていた。一方、類洞内皮細胞を移入していないマウスでは、免疫再構築後、同種反応性 T 細胞応答はサードパーティーに対する反応と同等であり、特異的免疫抑制は認めなかった (図 3)。

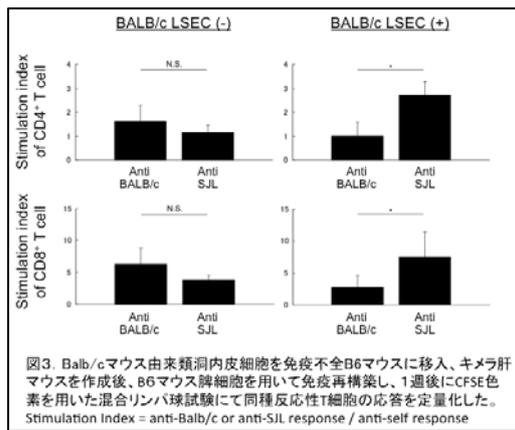


図3. Balb/cマウス由来類洞内皮細胞を免疫不全B6マウスに移入、キメラ肝マウスを作成後、B6マウス脾細胞を用いて免疫再構築し、1週後にCFSE色素を用いた混合リンパ球試験にて同種反応性T細胞の応答を定量化した。Stimulation Index = anti-Balb/c or anti-SJL response / anti-self response

さらに抗 PD-L1 抗体の投与により類洞内皮細胞移入による抗原特異的 T 細胞応答抑制効果は消失した (図 4)。

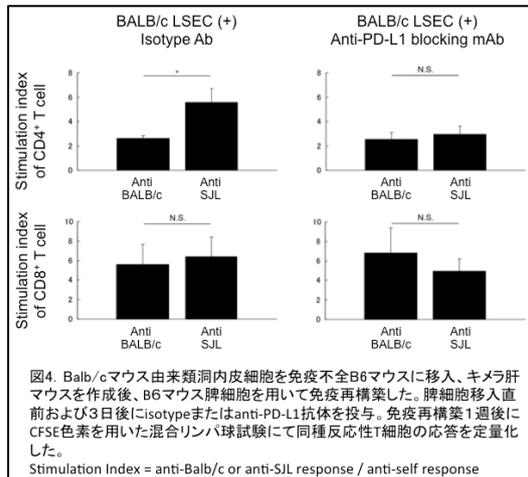


図4. Balb/cマウス由来類洞内皮細胞を免疫不全B6マウスに移入、キメラ肝マウスを作成後、B6マウス脾細胞を用いて免疫再構築した。脾細胞移入直前および3日後にisotypeまたはanti-PD-L1抗体を投与。免疫再構築1週後にCFSE色素を用いた混合リンパ球試験にて同種反応性T細胞の応答を定量化した。Stimulation Index = anti-Balb/c or anti-SJL response / anti-self response

これらの結果より移入した類洞内皮は反応性 T 細胞に対し特異的に免疫抑制効果を発揮し、表出する PD-L1 により免疫寛容が誘導されていることが示唆された。

類洞内皮細胞移入により同種移植心は生着が延長する。

次に前臨床的実験として、類洞内皮細胞の持つ免疫寛容性により移植臓器の生着延長が得られるか、心移植を用いた in vivo モデル

で検討を行った。類洞内皮移入後、骨髄移植により免疫再構築をしたキメラ肝マウスに対して、移入した類洞内皮細胞と同系マウスをドナーとした同種心移植を行った。類洞内皮細胞移入をしていないマウスでは移植後 17 日までに全例拒絶されたのに対し、類洞内皮細胞移入を行ったマウスではグラフト心生着が有意に延長した (図 5)。このグラフト心生着延長効果はドナー類洞特異的であり、サードパーティー心グラフトの生着延長は認めなかった。

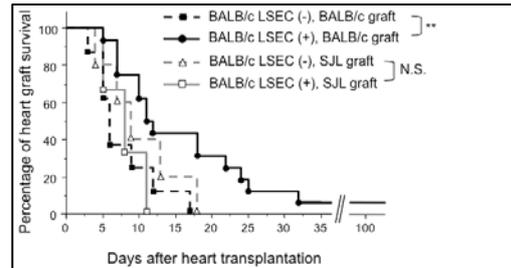


図5. Balb/cマウス由来類洞内皮細胞を免疫不全B6マウスに移入し、キメラ肝マウスを作成。2週後にB6マウスより骨髄移植(10x10⁶ 骨髄細胞)を行い免疫再構築を行った。免疫再構築6週後、再構築レベルを確認した後、移入した類洞内皮細胞と同じ(Balb/c)または違う(SJL)マウスをドナーとした同種心移植を行った。** < 0.01

これらの結果より、同種類洞内皮移入によるキメラ肝により移植臓器に対する免疫寛容誘導が可能であることが明らかとなった。

まとめ

拒絶反応を引き起こすことなく、免疫抑制剤を減弱または中止できる特異的免疫寛容を人為的に誘導することが可能であれば、移植後の免疫抑制剤による副作用、感染・がん発生などの合併症を防ぎ、予後をこれまで以上に改善できると考えられる。外来的に移入した類洞内皮細胞により完全ではないにしても移植臓器の生着延長を誘導できたことは、画期的な免疫寛容誘導細胞療法として有望と考えられる。またそのメカニズムとして PD-L1 分子が関与していることを示唆させる結果は非常に興味深く、今後の免疫寛容誘導法としての tissue engineering を含めた細胞療法の可能性を期待させる。

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 3 件)

1. 尾上隆司, T 細胞の経口トランス誘導と肝類洞内皮細胞, 臨床免疫・アレルギー科, 査読なし 54 巻, 2010, pp601-604.
2. Onoe T, Kalscheuer H and et al. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of human T cells depend on peripheral interactions with APCs. J Immunol, 2010, 184(12), pp6756-65. 査

読あり

3. Nikolic B, Onoe T and et al. Distinct requirements for achievement of allotolerance versus reversal of autoimmunity via nonmyeloablative mixed chimerism induction in NOD mice. *Transplantation*, 2010, 89(1), pp23-32. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

1. 尾上隆司, 生体部分肝移植における過小グラフト症候群に対する PGE1 門脈注入療法の有用性の検討, 第 46 回日本移植学会総会, 2010.10.21, 京都
2. 番匠谷将孝, 尾上隆司, 肝類洞内皮細胞のアロ応答性 T 細胞制御能: in vivo モデルでの解明, 第 46 回日本移植学会総会, 2010.10.21, 京都
3. Onoe T, Advantageous effect of a continuous injection of PGE1 via the portal vein for small-for-size graft in adult-to-adult living donor liver transplantation, The 8th Japan-Korea Transplantation Forum, 2010.10.20, Kyoto, Japan
4. 五十嵐友香, 尾上隆司, 糖鎖抗原を表出した肝類洞内皮細胞は B 細胞の抗体産生を抑制できる, 第 28 回日本肝移植研究会, 2010.7.2, 広島
5. 尾上隆司, ドナー肝由来活性化リンパ球移入を用いた肝移植後肝癌再発制御法の臨床評価, 第 46 回日本肝臓学会総会, 2010.5.27, 山形
6. 番匠谷将孝, 尾上隆司, 肝類洞内皮細胞の抗原特異的免疫寛容誘導能の解析, 第 46 回日本肝臓学会総会, 2010.5.27, 山形
7. Banshoudani M, Onoe T and et al. Allogeneic Liver Sinusoidal Endothelial Cells Negatively Regulate the Immune Response of Corresponding T Cells in a Liver Endothelium Repopulation Model. *American Transplant Congress 2010*, 2010.5.1, San Diego, USA
8. 番匠谷将孝, 尾上隆司, 肝類洞内皮細胞の抗原特異的免疫寛容誘導能~in vivo モデルでの解析~, 第 110 回日本外科学会定期学術集会, 2010.4.8, 名古屋
9. Banshoudani M, Onoe T and et al. LSEC tolerize allo-reactive T cells in a liver endothelium repopulation model. *2009 European Society of Organ Transplantation*, 2009.8.30, Paris, France
10. Banshoudani M, Onoe T and et al. Evidence for tolerizing allo reactive T cell by LSECs in a liver endothelium

repopulation in vivo model. 2009 American Transplantation Congress, 2009.5.30, Boston, USA

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾上 隆司 (ONOE TAKASHI)
広島大学病院・病院助教
研究者番号 : 9 0 5 4 9 8 0 9

(2) 研究分担者

()
研究者番号 :

(3) 連携研究者

()
研究者番号 :