

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659193

研究課題名(和文) ヒト移植肝のキメリズムの証明とキメラ細胞の抗老化作用の可能性

研究課題名(英文) Chimerism of human transplanted liver and possibility of anti-aging effect of chimeric hepatocytes

研究代表者

田久保 海誉 (Takubo, Kaiyo)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：00154956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：患者データベースの解析から、母親から胆道閉鎖症の女兒、男児への移植は拒絶反応の低いことがわかった。また、レシピエント年齢が低いことが、免疫抑制剤からの離脱に有利であることが示唆された。年齢の高いドナーからの移植では、レシピエントの肝細胞のテロメアの短縮が高度であることがわかった(Q-FISH法による測定)。移植片のテロメアは免疫学的によくコントロールされている症例では、延長する症例がみられた。母親からの男児への移植片中には多数のY染色体陽性細胞(主に血管内皮細胞)が観察された。しかし、ケラチン陽性細胞ではきわめて少数であった。

研究成果の概要(英文)：Based on the analysis on the database of the patients of living-donor liver transplantation (LDLT), it was indicated that maternal grafts protected daughter and son recipients from acute rejection after pediatric LDLT for biliary atresia. It was suggested that younger donors were better for LDLT patients to leave immunosuppressant. Q-FISH measurement of hepatocyte telomere lengths in donor liver and graft after LDLT indicated that donor age was a crucial factor affecting telomere length sustainability in hepatocytes after pediatric LDLT, and that the telomeres in grafts may be elongated somewhat longer when the grafts were immunologically well controlled. In the maternal grafts, many Y chromosome positive cells (mainly, endothelial cells) from son recipients were observed, whereas Y-chromosome and keratin-positive cells were very scanty in the grafts.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：生体肝移植 臨床病理学的研究 テロメア キメラ

1. 研究開始当初の背景

生体肝移植例のドナーとレシピエントとの関係については、年齢や性についての関係は十分には明らかではありません。また、現在までに、細胞の種類を同定して(病理組織学的同定や免疫蛍光法による同定)組織内の細胞種別にテロメア長を測定する方法を開発してきました(ソフトウエア Tissue Telo を開発した)。また、2014年に採択された原著論文の研究により、小児生体肝移植では、移植手術後同時期に得られたドナー内の肝組織とレシピエント体内のグラフト肝のテロメア長は、例外的にグラフト肝が長いことがあり、レシピエント骨髄幹細胞由来の肝細胞の存在の可能性が示唆されました。さらに、現在までの研究結果により、グラフト肝組織内のキメリズムを証明し、骨髄幹細胞由来の肝細胞とドナー由来の肝細胞のテロメア長を定量的 FISH (Q-FISH) 法により比較解析することを着想しました。もし、多量にレシピエント由来の肝細胞がグラフト肝の中に見出され、テロメア長がドナー由来の肝細胞よりも長い場合には、キメリズムの誘発(骨髄幹細胞の肝細胞化)により、移植肝の小型化や肝の抗老化や慢性肝疾患の治療につながると考えました。

2. 研究の目的

生体肝移植例のドナーとの関係について年齢や性について解析、キメラについても検討します。

また、キメラ(chimera)は同一個体内に異なる遺伝情報を持つ細胞が混在していることや、その個体を言います。脊椎動物では移植免疫があるため、生体内でキメラを作ることではできません。しかし、いくつかの例が報告され、多くは血液キメラの報告です。例えば、双生児の胚はしばしば胎盤における血液供給を共有しているため、血液幹細胞が他の胚へ移動可能で、移動した血液幹細胞が骨髄に定着した場合、血液キメラが作られます。二卵性双生児のペアの8%ほどは血液キメラであると報告されています。骨髄移植を受けた患者は医学用語上ではキメラと呼ばれています。また、マイクロキメリズム(micro-chimerism)とは、他者の細胞が体内に潜んでいることです。母子の間でも時にマイクロキメリズムは存在することが報告されています(Nelson JL 他: *Pediatr Dev Pathol.* 2009;12:337-46)。

一方、生体肝移植(先天性胆道閉鎖症例=CBA)に対しては、日本国内で多く行われています。我々はCBA肝と、同時期に採取した移植後の肝組織とドナーの肝組織のテロメア長を、我々の考案したQ-FISH法(測定法はTakubo K 他: *J Pathol* 2010, Aida J 他: *J Pathol* 2010, *Exp Gerontol* 2007 など有力6雑誌に2007年から7論文採択済みで

再現性があります)により、肝細胞のみを測定し、比較した論文を投稿中です(Sanada Y, 他10名, Takubo K. *World J Surgery*, 2012. Kawano Y, 他10名, Takubo K. *PloS One* 2014)。この論文の中では、テロメア長は多くの場合は、レシピエント内のグラフト肝とドナーのオリジナル肝で同等であり、グラフト肝が短い場合は、移植後に新たな肝炎のある場合でした。しかし、例外的にグラフト肝が長い場合があり、CBA患者の骨髄幹細胞の肝細胞分化の可能性がります。

以上を確かめるために、女性(ドナー)から男性への移植例を収集し、CBA患者体内のグラフト肝組織を用いてY染色体の有無を確かめ、骨髄幹細胞由来の肝細胞の存在の証明と、そのテロメア長を解析したいと考えました。

3. 研究の方法

(対象)自治医科大学移植外科で生体肝移植された患者とドナーの臨床病理学的データベースを作成します(連結可能匿名化)。特に、性、拒絶反応の詳細、免疫抑制剤からの離脱の時期と最終的(移植後10年)な有無を記録します。

(方法)

生体肝移植された患者とドナーの臨床病理学的データベースを解析しました。

キメラ細胞の存在の証明: 生検されたグラフト肝組織(特に女性から男性へ)を、抗サイトケラチン抗体を用いた免疫蛍光法により肝細胞を同定し、その検体上でY染色体DNAプローブを用いたFISHを行い、レシピエント(男性)由来の骨髄幹細胞由来の肝細胞を選別します。

グラフト肝組織は多数のY染色体を有する細胞(内皮細胞など)を含みます。レシピエント由来の肝細胞を証明するには、Y染色体とサイトケラチンの両者の陽性が必須です。

Q-FISH法によるテロメア長測定: 免疫蛍光法とY染色体FISHを施行した同じ切片上でテロメアとセントロメアのPNAプローブを用いてFISHを行い、テロメアとセントロメアの光度比から、Y染色体の有無による2群の症例のテロメア長(独自ソフト Tissue Telo を用いて)を知ります。

両者のテロメア長の差異などの解析は統計ソフトオリジンを用い、統計に関しては癌研ゲノム解析センター部長松浦正明博士(現、帝京大学医学部教授)と協議します。各研究の段階で、結果を英文論文として発表します

4. 研究成果

(1) 114例の生体肝移植例(2001-2012年)の臨床病理学的データベースを作成し、その解析から、原著論文が採択された。ドナーとレシピエントの性のマッチングに関し

では問題とされていなかった。しかし今回の解析でミスマッチは明らかに移植における拒絶反応が多いことを証明しました。母から女兒、男児への移植は拒絶反応の低いことから、妊娠によるキメラによる免疫応答に関する寛容が成立している可能性が示唆されました。実際の臨床上で、ドナーの性別を考慮すべきことを論文中で提案した。死体肝移植に関しても性のミスマッチに関する解析を行う次期の研究の動機となりました (Transplantation Int, 2014)。

(2) レシピエントとドナーの両者から肝組織の生検材料が得られている 12 例の肝細胞のテロメア長を比較解析しました。なお、レシピエント肝は Y 染色体プローブ (蛍光色素付加 DNA プローブ) による DNA・FISH 法により血管内皮細胞がレシピエント由来であることが実験で判明し、サザンブロット法などによるテロメア長測定では十分なデータが得られないことが判明しています。以上の解析から年齢の高いドナーからの移植では、レシピエントの肝細胞のテロメアの短縮が高度であることがわかりました。移植片のテロメアは免疫学的によくコントロールされている症例では延長する症例がみられました (PloS One 2014)。

(3) 生体肝移植後 10 年経過時に、レシピエントの免疫抑制剤内服 86 例と抑制剤離脱 23 例を比較解析しました。ドナー年齢が低い症例において、化学療法からの離脱例が有意に多いことが判明しました。前記(1)の結果と合わせて、年齢の若い母親からの移植が望ましいことがわかりました。また、レシピエントの年齢に関しては、両者に有意差はありませんでした (現在、投稿中)。

(4) 生体肝移植例のドナーとレシピエントのペアについて、女性 (主に母親) から男児への移植例の移植肝について研究を行った。2001 - 2010 年までの 35 例を用いた。術後 1-2 カ月に拒絶反応ありは 13 例であった。13 症例の内訳 (肝生検時期: ペア検体) 0.1y-10y : 1 症例、0.1y-5y-7y : 2 症例、0.1y-5y : 3 症例、0.1y-2y-5y : 3 症例、0.1y-2y : 4 症例。22 例は急性の拒絶反応はなかった。まず、Y 染色体 DNA・FISH、テロメア・セントロメア PNA・FISH、サイトケラチン免疫蛍光法による免疫蛍光法を実施した。類洞内の内皮細胞は Y 染色シグナルが陽性であった。現在、Y 染色体陽性細胞の分布の時間的変化に関する論文を作成中である。Y 染色体 DNA・FISH、サイトケラチン免疫蛍光法陽性肝細胞はきわめて少数のため、テロメア、セントロメア FISH イメージの蓄積を行っている。

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 3 件)

1. Sanada Y, Kawano Y, Miki A, Aida J, Nakamura K, Izumiyama NS, Ishikawa N, Arai T, Hirata Y, Yamada N, Okada N, Wakiya T, Ihara Y, Urahashi T, Yasuda Y, Takubo K. Maternal grafts protect daughter recipients from acute cellular rejection after pediatric living donor liver transplantation for biliary atresia. Transpl Int 2014 doi: 10.1111/tri.12273. [Epub ahead of print].

2. Kawano Y., Ishikawa N., Aida J., Sanada Y., Izumiyama-Shimomura N., Nakamura K., Poon SSS., Matsumoto K., Mizuta K., Uchida E., Tajiri T., Kawarasaki H., Takubo K. Q-FISH measurement of hepatocyte telomere lengths in donor liver and graft after pediatric living-donor liver transplantation: Donor age affects telomere length sustainability. PLoS ONE April 11, 2014. 9(4): e93749. doi:10.1371/journal.pone.0093749.

3. Sanada Y, Aida J, Kawano Y, Nakamura KI, Shimomura N, Ishikawa N, Arai T, Poon SS, Yamada N, Okada N, Wakiya T, Hayashida M, Saito T, Egami S, Hishikawa S, Ihara Y, Urahashi T, Mizuta K, Yasuda Y, Kawarasaki H, Takubo K. Hepatocellular Telomere Length in Biliary Atresia Measured by Q-FISH. World J Surg. 2012; 36: 908-916

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 仲村賢一、広瀬信行、下村-泉山七生貴、相田順子、石川直、田久保海蒼: Q-FISH 法により測定したテロメア長を指標とした超百歳リンパ球から樹立された i P S 細胞の評価 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013.6.6-8.

2. 石川直、仲村賢一、下村-泉山七生貴、相田順子、寺井政憲、豊田雅士、田久保海蒼: i P S 細胞化によるリプログラミング過程でのテロメア動態の Q-F I S H 法による解析. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013.6.6-8.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
東京都健康長寿医療センター研究所
老年病理学研究チーム 高齢者がん研究グループ独自ホームページ

<http://www.ttaggg-rtgp.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田久保海誉 (Takubo, Kaiyo)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
研究者番号：00154956

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：