

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790945

研究課題名 (和文) 制御性 T 細胞による肝移植寛容誘導機構の基礎的研究

研究課題名 (英文) Induction of transplant tolerance by regulatory T cell in rat liver transplantation

研究代表者

高屋敷 吏 (TAKAYASHIKI TSUKASA)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30456024

研究成果の概要 (和文)：本研究では移植寛容が確立したラットのリンパ球を CD4 陽性あるいは CD8 陽性にソーティングし、それぞれを養子移植することにより寛容誘導を確認した。その結果、予想された制御性 T 細胞分画 (CD4 陽性 CD25 陽性 T リンパ球) のみならず CD8 陽性の細胞分画にも寛容誘導能があることが明らかになった。これらの結果から、寛容が確立されたラット末梢リンパ球中に想定されていた制御性 T 細胞とは異なる細胞群が存在することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In present study, we established transplant tolerance in orthotopic rat liver transplantation and transplant tolerance was transferred adoptively by peripheral lymphocyte, within regulatory T cells. CD4 (+) T cells or CD8 (+) T cells from peripheral lymphocyte of long term survivor were adoptive transferred to naïve rat after cell sorting and we revealed that both groups were able to induce transplant tolerance in rat liver transplantation. These results suggested that regulatory T cells were existed not only in population of CD4 (+) CD25 (+) T cells but in CD8 (+) T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：肝臓外科学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肝移植は末期肝硬変や進行性の慢性肝疾患などの従来の治療法では治癒困難な重篤な肝疾患に対する唯一の治療法として確立されつつある。肝移植術後には移植グラフトの拒絶を防ぐために免疫抑制療法が原則としては必須であり、実際の臨床においては免疫抑制剤を半永久的に服用しなければならない。このような免疫抑制療法には易感染あるいは発癌といった種々の副作用や移植患者の QOL (Quality of Life) の低下など多くの問題がある。

(2) 一方、いくつかの実験モデルにおいては免疫抑制をせずとも肝移植寛容状態が誘導されることが明らかにされており、また臨床においても移植後寛容状態の症例が経験されることがある。このような寛容状態では生体に元来備わっている免疫抑制系が関与していることが想定され、ドナー特異的な免疫寛容状態が誘導されている。肝移植後寛容の確立、維持には生体において免疫抑制に働く制御性 T 細胞が重要な役割を果たしているが、依然としてその詳細な機序はいまだ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的はラット肝移植自然生着モデルを用いて MHC ミスマッチのドナー肝が生着した移植寛容ラット中に存在する末梢リンパ球中の制御性 T 細胞の免疫抑制誘導、維持に関する種々の実験的検討を行い、制御性 T 細胞による臓器移植後の移植寛容誘導およびその維持機構を明らかにすることである。

(2) 更には免疫抑制剤などによる免疫抑制療法を行わずに移植臓器を生着させ、ドナー臓器特異的な寛容状態を確立するという移植医療における究極の目標を目指し、その臨床応用に向けた基礎的検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) ドナー ; Lewis (LEW, RT11) ラット、レシピエント ; Dark Agouti (DA, RT1a) ラットを用いて同所性肝臓移植 MHC 不一致ラット自然生着モデルを作成する。このモデルは移植前にドナーに放射線照射 (ガンマ線 1000 rad) をすることにより 100% 拒絶に転ずる。移植後のレシピエント DA の脾臓あるいはリンパ節を摘出し末梢リンパ球を Isolation する。それを naïve DA に経静脈的に投与し (養子移植)、その 24 時間後に 1000 rad 照射後 LEW の肝臓を移植し生存率を評価する。このモデルでは個体生存が肝移植グラフトの生着を表しており、長期生存 (60 日以上と定義) をもって移植寛容が確立したと判断する。この検討することにより移植寛容ラット末梢リンパ球中の制御性 T 細胞が移植寛容状態の誘導、維持の中心的役割を果たしていることを明らかにする。

(2) 移植寛容が確立したラットの脾細胞あるいはリンパ球をフローサイトメトリにて CD4 陽性, CD8 陽性, CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の分画にソーティングし、それらを養子移植後に肝移植を行うことにより制御性 T 細胞の末梢リンパ球中での局在を検討する。またそれらの細胞群を in vitro で培養し上清中にある種々のサイトカインを含めた寛容誘導機構を解明する。さらにこれらの細胞を抗

原刺激などの操作を加えて生体内に再投与することにより、より強力な実験的な移植寛容を誘導する。

#### 4. 研究成果

(1) ラット肝移植モデルにおける自然正着および長期寛容誘導モデルおよび放射線照射による拒絶モデルの作成

naïve LEW から DA への肝移植は全て自然生着し、60 日以上生存したが (n=32)、ドナー LEW に放射線照射を付加することにより全例拒絶させることが可能であった

(MST;  $12.8 \pm 4.1$  日, n=10)。

(2) リンパ球養子移植における制御性 T 細胞の移植寛容誘導

移植寛容状態が確立して、長期生存した DA ラットの脾臓を摘出し脾細胞 (末梢リンパ球) の分離を行い、それらを放射線照射をおこなった拒絶モデルである DA ラットに養子移植を行ったところ、同モデルにおいても寛容誘導が起こり 60 日以上長期生存を得ることができた (n=10)。これより、移植寛容ラットの末梢リンパ球に寛容誘導能があることが確認され、なかでも末梢リンパ球中の制御性 T 細胞が免疫抑制、移植寛容誘導の中心的役割を果たしていることが示唆された。

(3) 移植寛容ラット末梢リンパ球培養上清中に発現しているサイトカインの検討

移植寛容が確立した長期生存 DA ラットから末梢リンパ球 (脾細胞あるいはリンパ節中のリンパ球) を 3 日間培養を行い、その上清中の IL-2, IL-4, IL-12, IFN- $\gamma$  などのサイトカインを測定したが、これらのサイトカインの増加減少は有意ではなかった。制御性 T 細胞による免疫抑制状態の誘導、維持にはこれら多くのサイトカインの関与が想定されたが、

本実験では移植寛容におけるサイトカインの関与は明らかには証明することは困難であった。

(4) 移植寛容モデルリンパ球分画の検討

移植寛容が確立された長期生存 DA ラットから脾細胞 (リンパ球) を分離し、フローサイトメトリーにて CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞のセルソーティングを行った。その結果同分画のリンパ球が寛容誘導ラットの脾細胞中で増加していることが明らかになり、移植寛容ラット末梢リンパ球における制御性 T 細胞の存在が示唆された。

(5) リンパ球分画別にみた移植寛容誘導

移植寛容が確立した長期生存 DA ラット中の脾細胞 (リンパ球) を MACS による磁気ビーズ法にて分離を行い、CD4 陽性、CD8 陽性にそれぞれソーティングし、更に放射線照射 DA ラットに養子移植を行った。その結果 CD4 陽性リンパ球の養子移植によって移植寛容は誘導可能であったが、同様に CD8 陽性細胞群の養子移植によっても約 30% 程度に寛容誘導が可能であった。したがって、CD8 陽性細胞群においても移植寛容誘導能があり、それらに制御性 T 細胞と同様の働きを持つ細胞 (リンパ球) が存在し得ることが示唆された。しかし、その寛容誘導は *in vivo* では完全ではなく従来の制御性 T 細胞を介すると考えられる寛容誘導とは異なる機序も想定された。

(6) 制御性 T 細胞に対する抗原刺激による移植寛容誘導および維持能の検討

寛容が誘導された DA の末梢リンパ球として脾細胞を Isolation し、*in vitro* で naïve LEW 脾細胞と co-culture 後に naïve DA ラットに養子移植し照射後 LEW 肝を移植し、その効果

の時間的推移を検討するため養子移植後1, 4, 14 日後に同様に肝移植を施行したところ、養子移植4 日後移植では、再び全例拒絶に転じたが(MST;  $10.3 \pm 0.5$  日,  $n=4$ )、リンパ球を *in vitro* にてドナー抗原で刺激してから養子移植をすると4 日後 ( $n=5$ )、14 日後 ( $n=3$ )、30 日後 ( $n=2$ )でも全例生着することが明らかになった。

## 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 2 件)

① Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Kato A, Yoshitomi H, Frukawa K, Mitsuhashi N, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Miyazaki M. Significance of repeated resection for recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 56, 2009, 1-5.

② Mitsuhashi N, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Nozawa S, Frukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Igarashi T, Miyazaki M. Usefulness of intraoperative fluorescence imaging to evaluate local anatomy in Hepatobiliary surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 15, 2008, 508-514.

[学会発表] (計 2 件)

①ラット肝移植自然生着モデルにおけるドナー特異的抗原刺激の関与 第108回日本外科学会定期学術集会 2008年5月17日

②ラット心移植モデルにおけるドナー抗原刺激による免疫寛容維持 第109回日本外科

学会定期学術集会 2009年4月4日

[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

高屋敷 吏 (TAKAYASHIKI TSUKASA)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30456024

