

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390356

研究課題名（和文） 臓器移植における再生間葉系肝幹細胞門脈内投与による新たな免疫寛容誘導法の確立

研究課題名（英文） Development of New Strategy of Immunological Tolerance Induction by Intraportal administration of donor specific Mesenchymal hepatic stem cell in Organ Transplantation

研究代表者

佐藤 好信（SATO YOSHINOBU）

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：20313538

研究成果の概要（和文）：本研究の全体構想は、これまでの臨床研究の成果を基に、臨床生体臓器移植における Operational Tolerance を誘導するメカニズムを解析しさらに肝幹細胞を中心とした再生医療を応用したスーパードナー抗原による新たな方法論を確立することである。基礎的検討としては、ヒト肝組織特に障害肝の ductular reaction の存在する領域に CD133+ NCAM+ human hepatic stem/progenitor 細胞の存在が確認された。特に障害の程度が高い程、その存在は明らかであった。しかし正常肝組織での肝幹細胞の確認はできなかった。やはり肝幹細胞は肝に何らかの障害がもたらされて初めて誘導されるものと考えられた。ドナー抗原の門脈内投与の免疫学的検討においては、免疫寛容誘導症例で FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性 T 細胞の割合が有意に増加しており、免疫寛容に関与していることが判明した。また肝障害度（MELD スコア）別に移植前後の免疫学的検討を行ったが、MELD スコア 20 以上の症例では、調節性 T 細胞が有意となっており肝障害度別に免疫状態を把握する事により移植後免疫抑制剤の使用方法を調整できることが判明した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to analyze the mechanisms of the induction of operational tolerance in clinical liver transplantation by the intra-portal administration of donor specific antigen and make the new method of induction of tolerance by hepatic stem cell. In the basic examination, the CD133+ NCAM+ human hepatic stem/progenitor cell was recognized around the region with existence of ductular reaction in the human liver with chronic or acute hepatitis. Especially, its existence was more clearly in the human liver with higher hepatic injury. However, it was not recognized in the normal human liver. In the immunological analysis of intra-portal administration of super donor antigens, the population of FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells increased in the transplant patients with no immunosuppressants. Treg. cells increased in the patients above MELD score 20. It was proved that the grasp of preoperative immunological situation of transplant patients take the better administration of immunosuppressants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：外科系臨床医学・外科学一般

科研費の分科・細目：一般外科、移植外科、移植免疫、肝臓

キーワード：移植・再生医療、免疫学、外科、免疫寛容、ドナー特異的抗原

#### 1. 研究開始当初の背景

臨床臓器移植免疫は長足の進歩を辿っており、新たな免疫抑制剤の開発とともに完全な免疫寛容の実現も可能な状況となってきている。さらにその中でドナーの免疫細胞を利用し免疫学的寛容を誘導する実験的試みと成果がメカニズムの解明と伴に国内外で報告されてきている。古くから肝細胞そのものに免疫寛容を誘導することが報告されている。また免疫学的寛容を誘導する免疫担当細胞としては、CD4(+)CD25(+)Treg細胞や、NKT細胞が報告されている。このTreg細胞をドナー抗原で刺激し、レシピエントに移入することによりグラフト生着の改善や免疫寛容を誘導するものである。欧米ではワシントン大学 Flye教授の教室 (Surgery 2003,134:p227, Surgery 2005,138:p329)が実験レベルで報告している。また我が国では順天堂大学奥村教授が *ex vivo* で CD28/B7 costimulation をブロックし誘導した抑制性T細胞で rhesus monkey の腎移植で免疫学的寛容を報告している。国内外で臓器移植における免疫寛容誘導の臨床への応用の機運が高まっているところである。

#### 2. 研究の目的

本研究の全体構想は、これまでの臨床研究の成果を基に、臨床生体臓器移植における Operational Tolerance を誘導するメカニズムを解析しさらに肝幹細胞を中心とした再生医療を応用したスーパードナー抗原による新たな方法論を確立することである。

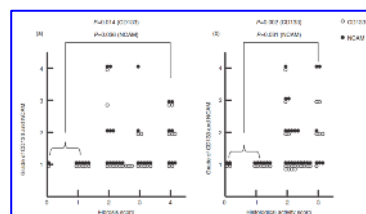
#### 3. 研究の方法

臨床研究1：これまで生体肝移植ドナー抗原門脈内投与症例で Almost Tolerance 症例の免疫学的解析を抑制性Treg細胞、NKT細胞、樹状細胞を中心に行う。  
間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell) は骨髄中などにわずかに存在する未分化の細胞で、自己増殖能を有し、中胚葉系の様々な細胞 (骨芽細胞, 軟骨細胞, 脂肪細胞, 骨格筋, 心筋, 靭帯, 腱など)

に分化するほか、組織修復能, 免疫抑制能を有することが知られている。この間葉系幹細胞を臓器移植に応用することを目的として、ラット腎移植モデルにおける効果を検討する。(方法) 間葉系幹細胞は Lewis ラット下肢骨より採取した骨髄細胞をフラスコ内にて培養し、フラスコ底面に接着する細胞を回収、4passage 以降の細胞を各実験に使用した。分化能の確認には各種条件下で骨芽細胞および脂肪細胞への分化を検討する。DA ラットリンパ節細胞を stimulator, Lewis ラットリンパ節細胞を responder とするリンパ球混合培養 (MLR) を行い、これに間葉系幹細胞を加え、その免疫抑制能を検討する。また DA より採取した腎臓を 24 時間氷上保存したのち、Lewis ラットに同所性腎移植を行い、移植後に間葉系幹細胞を投与し、生存期間を検討した。さらに他グループにおいて 3 日目にグラフトを採取し、RT-PCR にて各種 mRNA の発現を検討する。

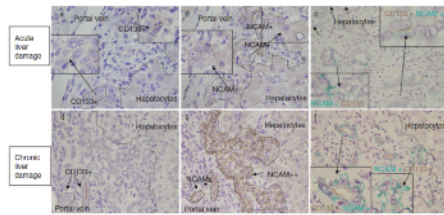
#### 4. 研究成果

(1) 急性または慢性肝障害におけるヒト hepatic stem/progenitor cell の臨床病理学的解析：hepatic stem/progenitor cell のマーカーとされる CD133 および NCAM 分子にて急性肝障害および慢性肝障害症例の肝組織を検討すると、fibrosis (f) と histological activity (a) によるスコア化によって評価すると F2, A2 以上で有意に CD133 および NCAM の発現が増加することが判明した。

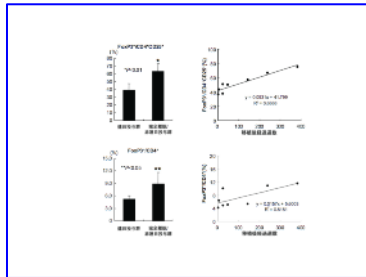


CD133 と NCAM により二重免疫染色施行すると、Ductular reaction (DR) のなかで、CD133+NCAM-, CD133+NCAM+and CD133-NCAM+ DR の3つに分類されることが判明した。さらに CD133-NCAM+ DR が他の2つよりも肝細胞に類似していることが判明した。しかし残念ながら正常肝組織において

は、この発現は微弱で、肝障害という刺激のなかで hepatic stem/progenitor cell が誘導されることが判明した。



( 2 )



基礎的検討としては、ヒト肝組織特に障害肝の ductular reaction の存在する領域に hepatic stem/progenitor 細胞の存在が確認された。特に障害の程度が高い程、その存在は明らかであった。しかし正常肝組織での肝幹細胞の確認はできなかった。やはり肝幹細胞は肝に何らかの障害がもたらされて初めて誘導されるものと考えられた。ドナー抗原の門脈内投与の免疫学的検討においては、免疫寛容誘導症例で FoxP3+/CD4+/CD25+調節性 T 細胞の割合が有意に増加しており、免疫寛容に関与していることが判明した。

## 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 10 件 )

1. Sato Y, Tomiyama C, Yamamoto S, Oya H, Kobayashi T, Kokai H, Miura K, Hirose Y, Hatakeyama K. Perioperative immunological differentiation in liver cirrhotic patients who underwent living related liver transplantation. Hepatogastroenterology 2012 Dec21;60(124) (Epub ahead of print) ( 査読あり )
2. Yoshinobu Sato, Hiroshi Oya, Satoshi Yamamoto, Hidenaka Kokai, Miura Kohei, Katsuyoshi Hatakeyama. Regulatory T cells activation in the patients who displaced operational tolerance in Intra-Portal Administration of Donor Specific Antigens in Living-Donor Liver Transplantation. Transplant Proc 2012;44:560-564 ( 査読あり )
3. K.Miura, Y.Sato, Kokai H, Hara Y, Oya H, Yamamoto S, Hatakeyama K. Liver transplantation surgical techniques for extensive retroperitoneal tumor with major blood vessel involvement: A case report. Transplant Proc.2012;44:579-580 ( 査読あり )
4. Kokai H, Sato Y, Yamamoto S, Oya H, Kobayashi T, Watanabe T, Miura K, Hatakeyama K. Isolated dissection of the superior mesenteric artery after living donor liver transplantation: a case report. Transpl Proc. 2012;44:588-589 ( 査読あり )
5. Oya H, Sato Y, Yamamoto S, Hara Y, Kobayashi T, Watanabe T, Kokai H, Miura K, Hatakeyama K. A New Technique of Lateral Approach for Laparoscopy-Assisted Donor Left Hepatectomy. Hepatogastroenterology 2011;58:110-111 ( 査読あり )
6. Yoshinobu Sato, Hiroshi Oya, Satoshi Yamamoto, Takashi Kobayashi, Yoshiaki Hara, Hidenaka Kokai, and Katsuyoshi Hatakeyama. Method for spontaneous constriction and closure of porto-caval shunt using a ligamentum teres hepatis in small-for-size graft liver transplantation. Transplantation 2010;90:1200-1203. ( 査読あり )
7. Tsuchiya A, Kamimura H, Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Sato Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y. Clinicopathological analysis of CD133(+) and NCAM(+) human hepatic stem/progenitor cells in damaged livers and hepatocellular carcinomas. Hepatol Res. 2009;39:1080-1090. ( 査読あり )
8. Sato Y, Oya H, Yamamoto S, Kobayashi T, Watanabe T, Kokai H, Yamagiwa S, Hatakeyama K. Intra portal donor specific antigen transfusion might prevent re-infection of hepatitis C virus after living related liver transplantation in hepatitis C hepatic cirrhosis. ( 査読あり ) Hepatogastroenterology 2009;56:205-207.
9. Oya H, Sato Y, Yamamoto S, Nakatsuka H, Kobayashi T, Watanabe T, Hara Y, Kokai H, Hatakeyama K. Impact of intraportal donor-specific leukocyte transfusion

for adult ABO-incompatible liver transplantation.  
Transplant Proc. 2009 ;41:222-225. ( 査読あり )

10. Sato Y, Oya H, Yamamoto S, Kobayashi T, Watanabe T, Kokai H, Yamagiwa S, Hatakeyama K. Intra portal donor specific antigen transfusion might prevent re-infection of hepatitis C virus after living related liver transplantation in hepatitis C hepatic cirrhosis.  
Hepatogastroenterology 2009;56:205-207.

( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

- 1 . Sato Y, Tomiyama C, Yamamoto S, Oya H, Kobayashi T, Kokai H, Miura K, Hirose Y, Hatakeyama K. Perioperative immunological differentiation in liver cirrhotic patients who underwent living related liver transplantation. 24<sup>th</sup> International Congress of The Transplantation Society. Berlin, Germany, 2012,9,15-19
- 2 . Yoshinobu Sato, Chikako Tomiyama, Hiroshi Oya, Satoshi Yamamoto, Kokai Hidenaka, Kohei Miura, Katsuyoshi Hatakeyama. Regulatory T cells activation in the patients who obtained operational tolerance in Intra-Portal Administration of Donor Specific Antigens in Living-Donor Liver Transplantation. 12th Congress of the Asian Society of Transplantation. Korea (Seoul). 2011.9.26
- 3 . Yoshinobu Sato, Hiroshi Oya, Satoshi Yamamoto, Yoshiaki Hara, Takashi Kobayashi, Kokai Hidenaka, Kohei Miura, Katsuyoshi Hatakeyama. COAGULATION BETWEEN DONOR AND RECIPIENT IN THE EARLY PERIOD AFTER LIVING DONOR LIVER TRANSPLANTATION. The 15th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Glasgow, United Kingdom. 2011.9.4-7
- 4 . Sato Y, Yamamoto S, Oya H, et al. Spontaneous constriction and closure method of porto-caval shunt creation using a ligamentum teres hepatis in small-for-size graft liver transplantation. XXIII International Congress of Transplantation (Vancouver, Canada) 2010.8.15
- 5 . Sato Y, Yamamoto S, Oya H, et al. Induction of operational tolerance and its mechanism by intraportal

administration of donor specific antigens in living-donor liver transplantation. American Transplant Congress (San Diego, USA) 2010.5.3

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

- 1 . Yoshinobu Sato, Hideki Nakatsuka, Toru Abo.

Coagulation and Wall Shear Stress in Living Donor Liver Transplantation. Coagulation: Kinetics, Structure Formation and Disorders , Recent Advances in Hematology Research 2012, ed. Anett M. Taloyan and David S. Bankiewicz, Nova Science Publishers.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 好信 ( SATO YOSHINOBU )  
新潟大学・医歯学系・講師  
研究者番号 : 20313538

### (2) 研究分担者

安保 徹 ( ABO TORU )  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号 : 30005079

松田 康伸 ( MATSUDA YASUNOBU )  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号 : 40334669

富山 智香子 ( TOMIYAMA CHIKAKO )  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号 : 80359702

### (3) 連携研究者

なし