

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 木村 鐘康

学位論文題名

肝移植後早期において NK 細胞によるアロ認識が好中球浸潤の増幅をもたらす肝虚血再灌流障害を増悪させる

(Alloreognition by NK cells contribute to augmented hepatic ischemia/reperfusion injury with higher host neutrophil infiltration during early phase after liver transplantation)

【背景と目的】

虚血再灌流障害においては、自然免疫システムが中心的な役割を示している。NK 細胞は自然免疫システムにおける重要な細胞であり、その抗原認識方法として、自己の MHC class I を持たない細胞を認識し傷害する事がわかっている。虚血再灌流障害の程度とグラフトの拒絶反応には正の相関があるとされているが、そのメカニズムはよくわかっていない。また NK 細胞と虚血再灌流障害の関連性についても未だに不明な点が多い。そこで、我々は肝移植後に起こる肝虚血再灌流障害において、自然免疫細胞、中でもNK細胞によるアロ抗原認識により、アロジェニック移植でシンジェニック移植よりも虚血再灌流障害によるダメージが大きいと仮説を立てた。本仮説を証明するために、GFPトランスジェニックラットをレシピエントとして実験に使用し、ドナーラットをアロジェニック、シンジェニックで 2 群に分けて肝移植を行うモデルを作成した。ドナー由来、レシピエント由来の細胞を区別することでNK細胞の果たす役割を調べた。

【材料と方法】

本研究における全ての実験は、米国の National Research Council's Guide for the Humane Care and Use of Laboratory Animals のガイドラインに準拠しており、「ピッツバーグ大学動物実験審議会」に承認されている。Lewis ラット (アロジェニック)、野生型 SD ラット (シンジェニック) よりそれぞれ肝グラフトを摘出し、UW 液に 4°C で 18 時間保存したのち、GFP+SD ラットをレシピエントとして同所性に移植を行った。レシピエントラットは肝移植後 1~48 時間の間にサクリファイスし、グラフト肝を摘出して解析を行った。一方のグループでは肝摘出の 24 時間前にドナーラットに対し NK 細胞の特異的除去抗体である抗アシアロ GM1 (AAGM1, 50ul/animal, Wako Chemical 社, Richmond, CA) を静注した後に上記同様に肝移植を行った。肝グラフト組織は 10%ホルマリンで固定し、H&E 染色を行った。壊死組織の占める割合評価は 1 スライドあたりの面積を測定し評価した。免疫組織染色は CD11b/c、CD161、RP-1 抗体を用いて凍結切片を染色した。染色された細胞の数は、cells per HPF 形式で数値化した。肝 NPC はコラゲナーゼ溶解で分離し、各種抗体で染色した後、LSR (BD Biosciences 社) にて 5 色のフローサイトメトリーを行った。また、RNA を肝組織より抽出し、SYBR Green 法で RT-PCR を行った。

【結果】

肝移植後 1, 3, 6, 24, 48 時間後に血清 ALT の値を測定したところ、アロジェニック移植 (Lewis⇒SD) 群でシンジェニック移植群 (SD⇒SD, Lewis⇒Lewis) と比較し ALT は高値を示した。また、肝移植後 48 時間での H&E 切片では壊死範囲はアロジェニックグラフトでシンジェニックグラフトよりも有意に広がった。また、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、NK 細胞の活性化受容体である NKG2D の mRNA レベルはアロジェニック移植群でシンジェニック移植群よりも高値を示した。次にナイーブ肝の分析を行ったところ、ラット肝内には多くの NK 細胞が存在することが判明し、その約 1/3 にあたる CD11b/c+ の、より活性化された成熟 NK 細胞の存在が判明した。次に肝移植後早期のグラフト肝を抗 CD161 抗体を用いて免疫組織染色したところ、アロジェニックグラフトでグラフト NK 細胞の数が早期から減少した。フローサイトメトリーによる解析でも同様にシンジェニックグラフトでは NK 細胞の割合がほとんど変化しなかったのに対し、アロジェニックグラフト肝内の NK 細胞は肝移植後 1 時間以内に速やかに減少した。このアログラフトでの NK 細胞数の減少は、主に CD11b/c+ の成熟 NK 細胞の減少によるものであった。次にフローサイトメトリーで肝内の宿主由来浸潤細胞を分析したところ、GFP+ 宿主由来浸潤細胞の割合はアロジェニックグラフトで高く、肝移植後 3 時間、6 時間で有意差を持って高値となった。細胞の系統を比較すると、アロジェニックグラフトで有意にミエロイド系細胞、とりわけ好中球が多かった。これらの結果をさらに追及するために、AAGM1 を使用し NK 細胞除去実験を行った。まずはナイーブ肝に AAGM1 を使用したところ、CD11b/c+ NK 細胞は劇的に有意差を持って肝内から除去された (>95%) が、CD11b/c- NK 細胞は除去効果が薄く、軽度の減少はあったものの統計学的な有意差はつかなかった。つまり、AAGM1 を使用することで肝内の NK 細胞のうちほぼ成熟 NK 細胞のみを除去することが分かった。以上の結果を踏まえ移植実験を行ったところ、アロジェニック肝移植群においては、AAGM1 ドナー前治療群が PBS6, 24 時間後に ALT 値にして 50~70% の著明なダメージ減少効果を認めたのに対し、シンジェニック肝移植群では効果は 40~50% と限定的であった。また、フローサイトメトリーでグラフト内に浸潤する宿主由来細胞の分析を行うと、アロジェニックグラフトの好中球浸潤の割合が 37%⇒25% と著明に減少していることが分かった。好中球の免疫組織染色では AAGM1 治療群のアロジェニックグラフトで、コントロール群に比較して有意に減少していた。これらの結果より、肝内成熟 NK 細胞が宿主好中球の動員、浸潤に関連している可能性が示唆された。

【考察と結論】

本研究は、NK 細胞が肝虚血再灌流障害において重要な役割を持つ事を示し、また、アロジェニック細胞を認識することで、シンジェニックグラフトよりもアロジェニックグラフトで ALT の高値、壊死組織の増大、宿主好中球の浸潤増加により肝障害が増大することを示した。肝内には元来多くの成熟した NK 細胞が存在し、肝内の NK 細胞は活性化されやすく、細胞溶解、サイトカイン産生を経て活性によって細胞死しやすい傾向にある。成熟 NK 細胞の除去により、肝虚血再灌流障害は著明に減少し、好中球の浸潤もアロジェニックグラフトにおいて著明な減少を認めた。