

## 【6】

氏 名	刈 屋 太 郎
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第666号
学位授与の日付	平成28年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (生体構築学)
学位論文題目	Direct evidence for activated CD8+ T-cell transmigration across portal vein endothelial cells in liver graft rejection (移植肝の門脈領域におけるレシピエントCD8+T細胞の血管外遊走の直接証明とメカニズム解析)
論文審査委員	(主査) 教授 窪 田 敬 一 (副査) 教授 正 和 信 英 教授 小 端 哲 二

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

再循環リンパ球は血液—組織—リンパをめまぐるしく駆け巡りながら、生体の免疫学的監視を恒常的に行っている。当研究室ではこれまでに恒常状態での再循環リンパ球の肝臓内遊走経路と動態を調べ、リンパ球は機能的毛細血管である肝類洞より血管外に出て、肝臓内を移動して門脈域のリンパ管起始部から肝臓外に出て行くことを見いだした (Liver Int 28: 319-30, 2008)。この門脈域は小葉間結合組織で三つ組みが存在する部位であり、多くの肝疾患においても白血球浸潤が強く起こって病変の中心となる部位であるが、細胞浸潤がどの部位の血管からどのようなメカニズムでおこるかについては未だに解明されていない。我々は上記の先行研究で再循環リンパ球の門脈壁直接通過の可能性を示唆する所見を得ていたが、稀な所見であったため更なる解析を行うことは困難であった。

#### 【目 的】

門脈域に大量の細胞が浸潤するラット移植肝の急性拒絶モデルを用いて、レシピエントの活性化Tリンパ球の遊走経路とそのメカニズムについて、形態学的に詳細に解析を行った。

#### 【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針に従って行った。

(1) 多重免疫染色による移植肝血管内皮細胞、遊走細胞における遊走関連分子の発現解析： まず ACI rat (ドナー) の肝臓をLewis rat (レシピエント) にカフ法を用いた同所性肝移植を施し、移植

後より経時的に移植肝とレシピエントのリンパ組織の新鮮凍結標本を作製した。このときリンパ球の活性化・増殖の指標として、屠殺1時間前にBrdUを静脈投与しておいた。4 $\mu$ m厚の凍結切片を作製し、これに白血球マーカー、各種接着分子やケモカインレセプター染色とIV型コラーゲンによる血管系染色、さらにBrdU染色を合わせた三重染色を行って、遊走細胞の種類と局在、血管内皮細胞における接着分子発現の経時的变化を観察した。

(2) 走査型 (SEM)、透過型 (TEM) 電顕解析による遊走細胞と血管内皮の超微細構造解析：移植肝を心臓より2%グルタルアルデヒド灌流して固定する。SEM試料はマイクロスライサーにより100 $\mu$ m厚切片を作製後、重金属による導電染色を施し、移植肝の血管壁に付着する白血球や門脈壁の立体構造変化を観察した。次にSEMにおける免疫染色 (免疫SEM) として、切片をanti-CD8 $\beta$ 抗体、続いて金コロイド標識二次抗体でインキュベートした後、同様にSEM解析を行った。SEM解析だけでは表面微細構造観察に限られてしまうため、並行してTEM解析による断面観察も合わせて行うことで、門脈壁透過白血球の微細構造について相補的な解析を行った。

(3) フローサイトメトリーによる遊走細胞の細胞遊走関連分子の発現解析：移植3日目の肝血管内のレシピエント遊走細胞をgentle perfusionにより単離・精製し、インテグリン、セレクトリン、ケモカイン受容体など白血球遊走関連分子の発現変化を解析した。

## 【結 果】

(1) レシピエント細胞の移植肝浸潤は2日後より始まり増大したが、興味深い事にこの増加は門脈域を中心におこっていた。抗T細胞または抗CD8 $\beta$ 抗体の免疫染色でも同様の所見が見られ、一部、門脈血管壁に付着する細胞も認められた。

(2) SEM解析でも同様に、2日後より白血球の門脈壁への接着が数多く見られた。そこで免疫SEM解析を行ったところ、移植4日後の門脈壁を通過するCD8 $\beta$ 陽性細胞 (CD8+T cell) を捉えることができた。TEM解析でも同様に門脈壁を通過中のリンパ球が認められたことからこの遊走経路の存在を実証する事ができた。

(3) そこで次にこの遊走機構について、移植肝の血管内皮細胞における細胞遊走関連分子の発現を調べたところ、移植2日後よりVCAM-1が門脈血管内皮に強く誘導されることがわかった。一方、ICAM-1は移植後の類洞の血管内皮細胞で発現増強が認められたが、門脈血管内皮では全く誘導されなかった。他の門脈選択的発現分子として、組織フィブロネクチン、VAP-1、P-selectinは発現が上昇したが、E-selectinやMAdCAM-1などは発現が変化しなかった。

(4) 遊走細胞側の分子発現の変化をフローサイトメトリーで解析を行った。解析は肝血管内に存在する細胞を灌流により集めて行った。レシピエントT細胞は活性化に伴って種々の分子に発現変動が見られた。この中で細胞接着に関わる $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンの発現上昇が顕著に認められ、T細胞のほぼ60%が $\alpha$ L $\beta$ 2 (LFA-1) 陽性、25%は $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA-4) 陽性を示した。

(5) 遊走T細胞におけるケモカインレセプター発現はCXCR3+CCR5-CXCR6であり、そのリガンドであるCXCL10は、門脈内皮細胞直下のドナーII型主要組織適合抗原遺伝子複合体 (MHCII) 強陽性細胞および一部の門脈基底膜部位に認められた。

## 【考 察】

ラット移植肝急性拒絶モデルを解析系に、形態学的解析を駆使する事により、T細胞の門脈壁直接遊走の決定的瞬間を捉える事に成功した。門脈血管内皮のVCAM-1と活性化T細胞におけるVLA-4が遊走T細胞の血管壁への接着に重要であると考えられた。ここで門脈域におけるCXCL10産生はCXCR3陽性T細胞を効率よく門脈壁に引き寄せる上で効果的であると考えられたが、その産生細胞の特性（ドナーMHCII強陽性、星状～多角形の細胞構造）から肝在住ドナー樹状細胞の関与が示唆された。一方、類洞血管内皮はICAM-1+, VCAM-1-であり、LFA-1+は活性化T細胞の多くに発現していたことから、類洞より血管外に出て、Disse腔經由で門脈域へと遊走する経路も存在すると考えられた。セレクトイン系は血管内皮と遊走細胞間で対応した発現がみられず、本系への関与が低いと考えられた。T細胞が門脈血管内皮細胞を横切る際の遊走経路は内皮細胞内を通過するtranscellular pathwayである可能性が示唆された。

## 【結 論】

本研究は、肝臓移植拒絶モデルにおいて、活性化T細胞が門脈内皮細胞を横断遊走する直接証拠を初めて示した。このプロセスにおいて門脈血管内皮細胞－レシピエントT細胞間のVCAM-1－VLA-4およびCXCL10－CXCR3の相互作用が重要な役割を果たすものと考えられた。門脈壁の直接通過経路は、肝生体防御の中核となる門脈域に迅速に到達する為のバイパスであると考えられ、このバイパスは血管内皮や直下の間質細胞と、遊走細胞のそれぞれが炎症によって機能変化し、相互作用することで構築されることが考えられた。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

門脈領域は、多くの肝疾患において白血球浸潤が強く起こって病変の中心となる部位であるが、細胞浸潤がどこから、どのようなメカニズムで起こるかは未だに解明されていない。申請者らはラット肝移植拒絶モデルを用いることで、活性化T細胞による門脈壁の直接通過とその分子機序について解析を行った。その結果、レシピエントT細胞の門脈血管壁への接着は移植2日目より認められた。走査型電子顕微鏡（SEM）と免疫染色を融合させた免疫SEM解析によって門脈壁を通過しつつあるCD8 $\beta$ 陽性T細胞像を世界で初めて捉えた。透過型電子顕微鏡解析でも同様の所見を得ており、移植肝拒絶モデルを用いることで、門脈壁直接通過が実在することを証明している。本モデル系を用いた遊走メカニズムの解析では、門脈血管内皮細胞特異的にvascular cell adhesion molecule-1が、活性化T細胞側にはそのリガンドである $\alpha 4\beta 1$ インテグリンがそれぞれ移植後に誘導されることを見いだしている。また、ケモカイン系の解析では、ケモカイン受容体のCXCR3が活性化T細胞に誘導されること、そのリガンドであるケモカインCXCL10は門脈壁内とその直下に局在するドナーのII型組織適合抗原複合体陽性細胞に局在することを明らかにしている。

### 【研究方法の妥当性】

申請者らは、門脈に多数の細胞浸潤が起こる実験系として、申請者の指導研究室がかねてより研究

を重ねてきたラット同種異系間の移植肝拒絶モデルを用いている。まず多重免疫染色による明視野の光学顕微鏡解析で血管壁と遊走細胞の局在や組織内分布の推移を調べた後に、観察するタイミングを絞って電子顕微鏡解析を行い、血管内皮細胞と遊走細胞の相互微細構造の変化を分析し、細胞が門脈壁を通過する決定的瞬間を捉えることに成功している。遊走機序の解析では、血管内皮と遊走細胞における血管外遊走関連分子の発現変化を、それらに対する様々な抗体を用いながら組織・細胞レベルで個別に解析している。適切な対照群の設定と客観的な統計解析も行っており、本研究方法は妥当なものとする。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

門脈壁を経由する血管外遊走はこれまでその可能性が示唆されてきたが、実際に証明したものはなく、本研究でその実在を示したことは極めて新奇性が高い。免疫SEM解析による白血球と血管内皮細胞という2種の細胞間の微細な相互作用を解析した研究もこれまで報告が無く、独創性に富む。

#### **【結論の妥当性】**

申請論文では、適切な実験モデルと対象を定めた上で広く詳細に解析している。さらに異なる解析手法で多面的に同一事象を解析しており、得られた各実験結果は互いに相補的である。これより導きだされた結論は理論的にも矛盾するものではなく、移植免疫学や肝臓病学など関連領域における知見を踏まえた妥当なものである。

#### **【当該分野における位置付け】**

肝門脈領域は肝臓における免疫応答の中核としてリンパ球や樹状細胞（DC）が相互作用する場であり、肝炎や感染症など種々の肝病態においても白血球浸潤が顕著に認められる領域である。これら浸潤細胞は時に非特異的に肝細胞を傷害し、肝線維化や肝不全にも繋がりうることから、これらの遊走経路とその機構の解明が必要とされてきた。申請者の指導研究室では、過去に再循環リンパ球による肝臓内遊走経路として、類洞より門脈に至る経路と、これとは別に僅かではあるが門脈壁直接通過する経路の可能性を報告していたが証明できていなかった。本研究は後者の遊走経路が実在することを直接的に証明したことになる。また、その遊走メカニズムはintercellular adhesion molecule-1非依存であることや、遊走経路に血管内皮細胞内を通過する可能性を有する等、最近報告されつつある新規血管外遊走に類似した特徴を有しており、当該領域の研究進歩に重要な情報となりうる。近い将来、生体顕微鏡等のライブイメージング技術が進歩すれば、異なる経路で門脈領域に遊走する2つの細胞群の関係性や各遊走過程に決定的な分子の同定など、より詳細な解析と新知見が得られるものと期待される。また、この遊走には移植肝のDCや血管内皮細胞など、肝臓側からの積極的な細胞動員が関与する可能性が示唆されたことも意義深い。この細胞遊走の本態は、有事における肝生体防御の一環として、免疫応答の中核を担う門脈領域へ素早くアクセスする為のバイパスであると考えられるが、移植免疫においてはむしろ逆効果になり、拒絶反応を起こす宿主免疫細胞をわざわざ招き入れてしまうことになる。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、移植免疫学や肝臓病学の理論を学び実践した上で作業仮説を立て、実験計画を立案した

後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究内容は当該領域の一流の国際誌に掲載予定であり、申請者の能力の高さを評価できる。

**【学位授与の可否】**

本研究は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Journal of Gastroenterology

51 : 985-998, 2016