

学位論文題名

ラット同種肝移植における
ICAM-1/LFA-1系の役割に関する検討

学位論文内容の要旨

I. 緒言

Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) とそのリガンドである inter-cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) は臓器移植における免疫応答で、抗原認識、標的細胞破壊、免疫学的寛容誘導などの重要な役割を果たす接着分子系のひとつと考えられている。しかし移植されたグラフトでのICAM-1発現状況の詳細は明かでない。また抗ICAM-1モノクローナル抗体(mAb)を用いた拒絶反応抑制が試みられているが、ドナーやグラフトへの投与の報告はない。そこで、ラット同種肝移植モデルを用いて肝移植前後の同抗原系の発現について検討するとともに、抗ICAM-1mAbのグラフト灌流による移植前投与の効果について検討した。

II. 研究方法

1. 動物：北海道大学動物実験センターで維持、飼育された近交系ラットACI(RT1^{av1})、LEW(RT1^l)を用いた。

2. モノクローナル抗体：マウス抗ラットICAM-1mAb、1A29(IgG1)、マウス抗ラットLFA-1 mAb、WT-1(IgG2a)を用いた。マウス抗ヒトICAM-1mAb、HA58(IgG1)をコントロール抗体とした。

3. 肝移植：2カフ法で同所性肝移植を行った。

実験1：ACI肝をLEWに移植する同種異系群、ACIからACIへの同種同系群の2群を作成した。ACIからLEWへの異系移植では、グラフト肝は急性細胞性拒絶反応により平均9.3 ± 0.6日で拒絶されたので、同系、異系の両群でレシーピエントラットを移植後2、4、7日に犠牲死させグラフト肝を採取した(各時点につき、異系群 n = 4、同系群 n = 3)。また正常ACI肝を採取した(n = 4)。採取した肝は、一部をH-E染色、残りを免疫組織化学染色した。

実験2：ACI肝を採取時に、lactate-Ringer液または前述のmAbを含む培養上清(10%胎児牛血清加RPMI1640) 2 mlで経門脈的に灌流した後同所性に移植した、ラットの組合せ、用いた灌流液により、以下の4群に分けた。A群：ACIドナー→LEWレシーピエン

ト、lactate-Ringer液灌流、B群：ACI→LEW、1A29を含む培養上清、C群：ACI→LEW、H A58を含む培養上清、D群：ACI→ACI、1A29を含む培養上清。各群の生存日数および死亡時に採取したグラフト肝の組織像をH-E染色で検討した。

4. 免疫組織化学染色(光顕)：液体窒素で凍結保存した肝標本は、薄切後アセトンで固定し、ABC法でICAM-1およびLFA-1染色を行った。

5. 免疫組織化学染色(電顕)：正常ACI肝および異系移植したグラフト肝を固定薄切後、horseradish peroxidaseで標識した1A29を加え室温で1時間反応させ、0.01% H₂O₂含有DAB液で発色させて、電子顕微鏡(日立H800)を用い75 keVで観察した。

6. 統計検定：数値は平均値±標準偏差で表し、統計検定にはStudent's t testを用いた。ラット生存曲線はKaplan-Meier法で求め、generalized Wilcoxon testで検定した。

III. 結 果

1. 免疫組織化学染色所見(光顕)：正常ACI肝では、ICAM-1は大きな門脈の内皮と一部の中心静脈に発現がみとめられた。類洞内皮の一部にも弱い発現がみられた。類洞リンパ球またはKupffer細胞と考えられるLFA-1陽性細胞が小数散在していた。異系移植では、全ての時点で小葉間門脈の内皮と小数の門脈域浸潤細胞にICAM-1の発現がみられた。類洞域では、移植後2日に巣状で強いICAM-1の発現がみられ、4日、7日にかけて増強した。4日、7日には肝細胞にもICAM-1の発現がみとめられた。胆管上皮には陽性染色はみられなかった。LFA-1陽性の細胞浸潤は経時的に増加し、その増加は特に類洞域で著明であった。同系移植では、移植後2、4、7日に血管内皮と一部の類洞内皮にICAM-1の発現がみられた。類洞内皮上の発現は正常ACI肝のそれよりもやや広汎であった。LFA-1陽性細胞の分布は正常ACI肝とほぼ同様であった。

2. 免疫組織化学染色所見(電顕)：正常ACI肝では、ICAM-1は一部の類洞内皮の表面にみとめられた。異系移植では、移植後4日、7日で肝細胞の細胞膜上に陽性染色がみとめられた。肝細胞質内には陽性染色はみられなかった。

3. 灌流肝移植後生存日数：ラットの平均生存日数は、A群； 9.3 ± 0.6 (n=5)、B群； 4.0 ± 2.3 (n=8)、C群； 9.8 ± 3.1 (n=6)で、D群では生存日数、1、2、3、3、14日以上(n=5)であった。B群の生存日数はA群、C群に比べて有意に短かった(B群vs A群、B群vs C群ともに $p < 0.01$)。D群でも1例を除いてラットは早期に死亡した。累積生存率でみると、B群の生存率はA群、C群に対して有意に低かった(B群 vs A群、B群 vs C群ともに $p < 0.01$)。

4. 灌流肝組織像：ラット死亡時に採取した灌流肝の組織像は、A群、C群では、門脈域の炎症性細胞浸潤、胆管上皮傷害、肝細胞破壊を特徴とする定型的な急性細胞性拒絶像を呈していた。これに対してB群、D群では、細胞浸潤は軽微であり、循環障害を示唆する斑状の虚血壊死巣が特徴的であった。

IV. 考 察

ラット同種移植肝急性細胞性拒絶の過程で、ICAM-1は移植後早期に類洞内皮に発現し、反応の進展にともなってさらに増強した。また肝細胞にも誘導された。同抗原は、*in vitro*ではIL-1、interferon- γ 、TNFなどのサイトカインにより誘導されると報告されており、グラフト肝での血管内皮や肝細胞での発現は、浸潤細胞から放出されたこれらサイトカインにより誘導されるものと考えられた。LFA-1陽性細胞は拒絶反応の過程で単核球浸潤の進行とともに増加したが、その増加は類洞域でのICAM-1の発現誘導に一致して類洞域で著明であった。このことは、ICAM-1/LFA-1系が移植肝拒絶の中で特に同種抗原の認識と反応の肝実質への進展過程で重要な役割を果たしていることを示している。

抗接着分子抗体を用いた拒絶反応抑制法として、移植後レシーピエントへの投与では、抗体の非特異的作用による感染防御力低下などの副作用が懸念され、ドナーないしグラフト臓器への移植前投与の検討が望まれる。正常肝では一部の血管内皮がICAM-1を発現しており、また樹状細胞にも発現していると考えられることから、抗ICAM-1mAbを移植前のグラフト肝に投与することにより抗原認識やエフェクター細胞のグラフト内浸潤を阻害し、生着延長をもたらす可能性があると考えられた。しかし、ACIからLEWへの異系移植、ACIからACIへの同系移植の両方で、抗ICAM-1mAb灌流グラフトは移植後早期に破壊され、ラットは死亡した。組織像の検討では巣状の虚血壊死が特徴的で、グラフト肝の循環障害がgraft lossの原因と考えられた。グラフトへの血流再開後に傷害が発生したと考えられ、抗体結合による血管内皮のfunctional stateの変化、抗原抗体複合物による再灌流障害の増強など、同種抗原特異的拒絶反応以外の機序が関与することが考えられた。

V. 結 語

ラット同種肝移植において

1. ICAM-1は移植後早期に類洞内皮に誘導され、拒絶反応の進行に一致してさらに増強した。
2. LFA-1陽性浸潤細胞は拒絶反応の進展に伴って増加したが、特に類洞域で著明であった。
3. 同系移植でもICAM-1は類洞内皮に軽度に誘導された。
4. 抗ICAM-1mAbのグラフトへの移植前経門脈投与により、移植肝に循環障害が発生し早期のgraft lossとなった。
5. 早期graft lossは同系移植でも発生し、本現象は同種抗原特異的拒絶反応以外の機序によるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 武 市 紀 年

学 位 論 文 題 名

ラット同種肝移植における ICAM-1/LFA-1系の役割に関する検討

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) / lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) 系は臓器移植における免疫応答で重要な役割を果たす接着分子系の一つと考えられている。しかし移植されたグラフトでの発現状況の詳細は明かではなく、また抗ICAM-1モノクローナル(mAb)を用いた拒絶反応抑制法として、ドナーやグラフトへの投与の報告はない。本研究では、ラット同種肝移植モデルを用いて肝移植前後の同抗原系の発現について検討するとともに、抗ICAM-1mAbのグラフトへの移植前投与による拒絶反応抑制効果について検討した。

研究方法

近交系ラットAC1(RT1^{av1})、LEW(RT1^l)を用い、2-カフ法で同所性肝移植を行った。マウス抗ラットICAM-1mAb、1A29(IgG1)、マウス抗ラットLFA-1mAb、WT-1(IgG2a)を用い、マウス抗ヒトICAM-1mAb、HA58(IgG1)をコントロール抗体とした。

(実験1) AC1肝をLEWに移植する同種異系群の2群を作成した。両群でレシピエントラットを移植後2、4、7日に犠牲死させグラフト肝を採取した(各時点につき、異系群n=4、同系群n=3)。また、正常AC1肝を採取した(n=4)。採取した肝は、一部をH-E染色に、残りを免疫組織化学染色用に供した。

(実験2) AC1肝を採取時にlactate-Ringer液または前述のmAbを含む培養上清(10%胎児牛血清加RPMI 1640) 2 mlで経門脈的に灌流後、同所性に移植し、以下の4群に分けた。

A群: AC1→LEW、lactate-Ringer液灌流

B群: AC1→LEW、抗ICAM-1抗体灌流

C群: AC1→LEW、コントロール抗体灌流

D群: AC1→AC1、抗ICAM-1抗体灌流。

各群の生存日数および死亡時に採取したグラフト肝の組織像をH-E染色で検討した。

液体窒素で凍結保存した肝標本は、薄切後アセトンで固定し、ABC法でICAM-1およびLFA-1染色を行った。また、正常AC1肝および異系移植したグラフト肝を固定薄切後、horseradish peroxidaseで標識した1A29を加え室温で1時間反応させ、0.01% H₂O₂含有DAB液で発色させて、電子顕微鏡(日立 H800)を用い75keVで観察した。

研究結果

1. 免疫組織化学染色所見(光顕): 正常AC1肝では、ICAM-1は大きな門脈の内皮と一部の中心静脈に発現を認めた。類洞内皮と一部にも弱い発現がみられ、類洞リンパ球またはKupffer細胞と考えられるLFA-1陽性細胞が小数散在していた。異系移植では、すべての時点で小葉間門脈の内皮と小数の門脈領域浸潤細胞にICAM-1の発現を認めた。類洞域では、移植後2日に巣状で強いICAM-1の発現がみられ、4日、7日にわたり増強した、4日、7日では肝細胞にもICAM-1の発現が認められた。胆管上皮には陽性染色は認められなかった。LFA-1陽性細胞の浸潤は、経時的に増加し、それは特に類洞域に著明であった。同系移植では、移植後2、4、7日に血管内皮と一部の類洞内皮にICAM-1の発現を認めた。類洞内皮での発現は正常AC1肝のそれよりもやや広汎であった。LFA-1陽性細胞は正常AC1肝とほぼ同様の分布であった。

2. 免疫組織化学染色所見(電顕): 正常AC1肝では、ICAM-1は一部の類洞内皮の表面に認められた。異系移植では、移植後4日、7日で肝細胞の細胞膜上に陽性染色が認められた。肝細胞質内に陽性染色は認められなかった。

3. 抗ICAM-1mAb灌流肝移植後生存日数：ラットの平均生存日数は、A群； 9.3 ± 0.6 ($n = 5$)、B群； 4.0 ± 2.3 ($n = 8$)、C群； 9.8 ± 3.1 ($n = 6$)で、D群では生存日数、1、2、3、3、14日以上 ($n = 5$)であった。B群の生存日数はA群、C群に比べて有意に短かった (B群 vs A群、B群 vs C群ともに $p < 0.01$)。D群でも1例を除いてラットは早期に死亡した。

4. 灌流肝組織像：ラット死亡時に採取した灌流肝の組織像は、A群、C群では定型的な急性細胞性拒絶像を呈していた。これに対してB群、D群では、細胞浸潤は軽微であり、循環障害を示唆する斑状の虚血壊死巣が特徴的であった。

以上より、ICAM-1/LFA-1系は同種移植肝拒絶反応において、同種抗原の認識と反応の肝実質への進展過程で重要な役割を果たすこと、また、抗ICAM-1mAbの移植前経門脈投与により循環障害が惹起され、早期にgraft lossになることが明らかになった。

審査にあたって、小林教授より mAbの血管内皮に対する障害作用の機序について、武市教授よりヒトへの応用に関連して他のラットの組合せでの可能性について、小野江教授より 投与したmAbの結合部位について、細川教授より MHCとの関連について、などの質疑があったが、申請者は概ね妥当な回答を行った。

本研究では、移植肝でのICAM-1/LFA-1系の発現状況の詳細が明かにされ、抗ICAM-1mAb投与により血管内皮が傷害されることがあることを示した点で意義があり、学位の授与に値するものと考ええる。