

表 題 同所性マウス肝臓移植モデルを用いた肝移植後虚血再灌流障害
の機序の解明

論文の区分 論文博士

著 者 名 横田 真一郎

所 属 自治医科大学附属病院 消化器センター 外科部門
古河赤十字病院 外科

2016年4月15日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療学系 専攻 消化器外科学 専攻科
職名・氏名 主任教授 佐田 尚宏

目次

第1章	はじめに	2
第2章	同所性マウス肝臓移植モデルの確立	3
第3章	実験材料	6
第4章	手術手技	10
第5章	結果	27
第6章	マウス肝臓移植モデルを応用した虚血再灌流障害の機序の解明	29
第7章	実験材料および方法	31
第8章	結果	37
第9章	考察	61
第10章	おわりに	66
	謝辞	67
	引用文献	68

第1章 はじめに

肝移植は、終末期肝疾患や原発性肝細胞癌に対して行われる確立された治療法である。肝移植を治療法として適用する上で、大きな課題の一つとして挙げられるのがドナー臓器不足である(1)。

アメリカの The Organ Procurement and Transplant Network のデータによると、アメリカ合衆国では、毎年 15000 人以上の肝移植待機患者がいるが、その内毎年 7000 人以下の患者しか肝移植を受けることができない。この深刻なドナー臓器不足の結果、移植臓器としての状態が比較的悪く本来であれば使用することが推奨されない臓器、いわゆるマージナル臓器(高齢者、心停止後ドナー、脂肪肝、冷保存時間が長い臓器)、の使用を必要に迫られてすることも多くなってきている(2, 3)。

虚血再灌流障害は、臨床において重要な問題であるにも関わらず、臓器移植の中でも最も研究が進んでいない分野と言われている(3, 4)。臓器保存液の中での長時間に及ぶ冷却保存と移植手術後の臓器への血液再灌流によって生じる虚血再灌流障害は、臨床において肝移植後の臨床成績に大きな影響を与えるという事がわかっている。移植後早期(最初の2週間)では、冷却保存時間は、再移植の頻度と臓器機能不全の頻度上昇と有意に関連がある(5)。また移植後晚期(3か月—12か月)では、死亡率の上昇と相関する事が指摘されている(6)。マージナル臓器は特に虚血再灌流障害の影響を受けやすいといわれており、虚血再灌流障害は拒絶や肝移植レシピエントの死亡率とも相関する(7)。移植後の虚血再灌流障害が肝移植後の早期、晚期の臨床成績に重大な影響を及ぼすことを鑑みると、虚血再灌流障害の分子的なメカニズムを解明し、新しい知見に基づいて効果的な治療戦略を開発することが重要と考えられる。もし虚血再灌流障害を低減させることができれば、肝移植後の臨床成績を改善し、またマージナル臓器の適応拡大によって、限られた臓器を有効利用できる可能性が広がると考えられる。

第2章 同所性マウス肝臓移植モデルの確立

移植の分野において、動物移植実験モデルは重要な研究手法であり、様々な移植に関わる病態のメカニズムの理解を深める上でも、また新しい治療方法を開発する上でも重要な役割を果たしていると言われており(8)。マウスを用いた同所性肝移植モデルは University of Pittsburgh で Qian らによって開発され、1991年に初めて報告された(9)。このモデルは、それ以前に報告されたラット同所性肝移植モデルで用いられたカフ法(手縫い吻合に比べると吻合自体を単純化し、吻合にかかる時間も短縮する事ができる)という特殊な血管吻合法を応用している(10)。それ以来、我々の研究室を始め、他の研究室においてもこのモデルは、肝臓内リンパ球の恒常性維持(11)、移植後虚血再灌流障害(12-15)、同種異系肝移植後の免疫寛容(16-18)、肝再生(19, 20)などの移植に関わる様々なメカニズム解明に重要な役割を果たしてきた。

肝臓は生命維持に必要な臓器であり、マウス同所性肝移植モデルは、異所性心移植や同所性片肺移植モデルなどの生命維持に必ずしも必要でない臓器移植モデルに比べて、より臨床に近いモデルということができる(8)。更に、肝臓は他の臓器と比べても免疫制御性の性質をもち、臨床においてもヒト同種異系グラフトレシピエントの一部において免疫抑制剤を投与しなくても拒絶反応が発生しない免疫寛容の状態が誘導される事がある(21-23)。肝移植後の免疫寛容の詳細なメカニズムは明らかになっていないが、肝臓の免疫寛容を誘導しやすい臓器としての特異的な性質の理解を深める事で、肝臓や他の臓器における炎症、または免疫に関連した病態に対する理解や治療戦略の開発に繋がる可能性があると思われる。よって、マウス肝移植モデルは炎症性肝疾患の分子生物学的なメカニズムの解明に非常に有用な研究手法となり得る。

マウス同所性肝移植モデルは手術としては、主に3つのパートに分かれている。これらの3つパ

ートは1) ドナー手術、2) バックテーブルにおける肝臓グラフトの準備（ドナー肝臓を摘出した後、レシピエント体内にドナー肝臓を移植する前に、冷たい保存液の入った容器にドナー肝臓を入れて行う血管吻合の準備）、3) レシピエント手術で構成されている(9, 24)。レシピエント手術には肝上部下大静脈、門脈、肝下部下大静脈と3つの血管吻合とステントを用いた胆管吻合が必要とする(図1)。またマウスは、ラットの1/10の大きさであり、手術は全て顕微鏡下で行われる。最後のレシピエント手術が技術的に最も困難であり、効率的にレシピエントの肝臓を摘出し、ドナー肝臓を移植するという事を20-30分以内に完了し、門脈血流を遮断している時間を最小限にしなければならない(9)。肝臓グラフトは「同所性」(正常の解剖学的位置)に移植され、ヒトにおける臨床的な移植手技とほぼ同じであり、腹腔内血管に心臓を移植する異所性マウス心移植モデルのような純粹に実験モデルとして行われる「異所性」(正常の解剖学的位置とは別の場所に)臓器移植よりはより臨床的なモデルといえる。しかし門脈血流遮断時間が長いとレシピエントが死に至る事もあり、異所性心移植モデルや同所性腎移植モデルなどの他のマウス臓器移植モデルと比較しても技術的に更に難易度が高いといわれている(8)。技術的難易度の高さが、おそらくこのモデルが世界でもごく限られた研究施設でのみ行われている主な理由だと思われる。我々の研究室で確立したマウス肝移植モデルの手術手技と実験材料をステップ毎に詳細に再現可能な形でプロトコールとして記載した。こうする事で、現時点ではこの技術が確立できていない研究者が、効率的にそして安定的にマウス肝移植モデルを再現できるようになれば幸いである。我々の本プロトコールの目的は、他の研究グループがマウス肝移植モデルを確立できるようにし、高い術後生存率を達成できるようにする事である。技術的に困難ではあるが、マウス臓器移植モデルは、ラットやブタなどのより大きな動物移植モデルに比べて、よりゲノム情報の解読が進んでいるため、遺伝子改変動物(ノック

アウトまたはトランスジェニック) や研究試薬がより多く低コストで存在するため、移植における様々な遺伝子の役割を解明するにあたり非常に有用なツールである(8, 20)。

いくつかの施設においては、肝動脈吻合も伴うマウス肝移植モデルを確立したと報告されているが本プロトコールよりも更に技術的難易度があがる。また肝動脈吻合を加えるメリットに関しては、依然として議論があり、その意義については結論が出たとは言い難い(24-26)。オックスフォード大学(26)から報告された研究では、肝動脈吻合は同種同系ドナーレシピエントの組み合わせ(CBA/Ca→CBA/Ca)肝移植後の肝障害、サイトカイン発現レベル、グラフト生存率に大きな影響を与えなかった。しかしチューリッヒ大学やカリフォルニア大学ロサンゼルス校の報告では、肝動脈吻合を加える事で冷保存無しまたは24時間冷保存後の同種同系の組み合わせ(BALB/c→BALB/c)を用いた肝移植後虚血再灌流障害において、肝障害が低下し、また生存率も改善した(24, 25)。これらの研究報告の結論の違いは、マウスの種が異なる事や、もしくはグループ間の技術的な差を反映しているのかもしれない。同種異系肝移植における動脈吻合の影響はこれまでに検討されていない。

マウスを用いた部分肝移植モデルもこれまでに報告されている(19, 20)。このモデルは臨床的には、全肝グラフトではなく、サイズの小さい部分肝グラフトを用いたヒト生体肝移植の実験モデルである。しかし、マウスの部分肝移植モデルは、部分肝切除(左葉、尾状葉、もしくは中葉を部分的に結紮し切除する事で比較的簡単に達成できる)を必要とする以外には基本的には同じ手術手技で行う事ができる(19, 20)。そのため我々は本プロトコールでは、肝動脈吻合を用いない同所性マウス肝臓移植モデルを記載する。このプロトコールを応用する事で動脈吻合を用いた肝臓移植モデルも部分肝移植モデルも確立する事ができる。

第3章 実験材料

実験動物

ドナーマウスの体重は可能であれば 25-30 g 程が理想である。25g より小さいマウスだと胆管ステントの留置が困難となる。また門脈 (PV) と肝下部下大静脈 (IHIVC) が吻合に短かすぎて、吻合自体が困難となる。一方で 35g 以上のマウスは腹腔内脂肪多くなるために手術自体が困難となる。

同種異系マウス心移植や皮膚移植と対照的に、同種異系マウス肝移植ではほとんどの組み合わせで拒絶反応が生じない(17, 18, 27)。ほとんどの報告において同種異系マウス肝臓移植はオスの C57BL/6(H-2^b) ドナーと C3H(H-2^k) レシピエントの組み合わせが使われている。

実験材料

- イソフルラン
- 注射用ヘパリン
- 0.9% 生理食塩水
- Viaspan University of Wisconsin (UW) 液
- 注射用ブプレネックス (塩酸ブプレノルフィン)
- 注射用セファゾリン
- PVP スクラブ液 (ポビドンイオディン 7.5%)
- 70% エタノール

実験器具

- JELCO[®] IV カテーテル 16G x 1-1/4 インチ (in) (図 1a)
- IV カテーテル 20G x 1-1/4 in (図 1a)
- BD Intramedic[™] ポリエチレンチューブ (PE10) (図 1a)

- カミソリ刃
- 実体顕微鏡 ライカワイルド M650, 倍率 6-40 倍
- 麻酔機
- Vetrosion[®] バイポーラー電気手術器
- 細径電気メス
- モスキート 止血鉗子 (図 1b)
- マイクロ開創器 (図 1b)
- 不織布ガーゼ
- シャープポイント綿棒
- マイクロ持針器 (図 1c)
- マクファーソン結紮鉗子 (図 1c)
- ウェルドンミニチュアブルドック鉗子 (図 1c)
- ジョンズホプキンスブルドック鉗子 (図 1c)
- ヴァナス氏水晶囊切開剪刀 (図 1c)
- ギル虹彩鉗子 (図 1c)
- ホスキン マイクロ鉗子 (図 1c)
- スティーブン剪刀
- ダーモント#5 ピンセット
- アドソンピンセット
- ジュウェラーピンセット
- チューブ遮断鉗子
- ヴァナス氏剪刀 刃長 3mm
- マイクロクリップ
- マイクロクリップアプリーケーター ロック付き
- 2-0 絹糸
- 5-0 絹糸

- 7-0 絹糸
- Micro AROSuture™ 10-0 ナイロン, 70 マイクロン, TAP ポイント
- 4-0 バイクリル
- 5ml シリンジ
- 1ml インスリンシリンジ
- 1/2 インスリンシリンジ 28G x 1/2
- IV カテーテル 22G x 1-1/4 in
- 27G x 1/2 ニードル
- 30G x 1/2 ニードル (先端鈍のL型注射針を作成するために用いた。)

以上の手術器具は使用前にオートクレーブ (>120°C) して滅菌した。

- 発泡スチロール容器 (肝臓グラフトをバックテーブルで準備するために使用)
 - 寸法 (長さ x 幅 x 高さ)
 - 内寸:18 x 15 x 4 cm
 - 外寸:21 x 18 x 5.5 cm
 - 厚み:1.5 cm
- 培養ディッシュ (60x15mm)

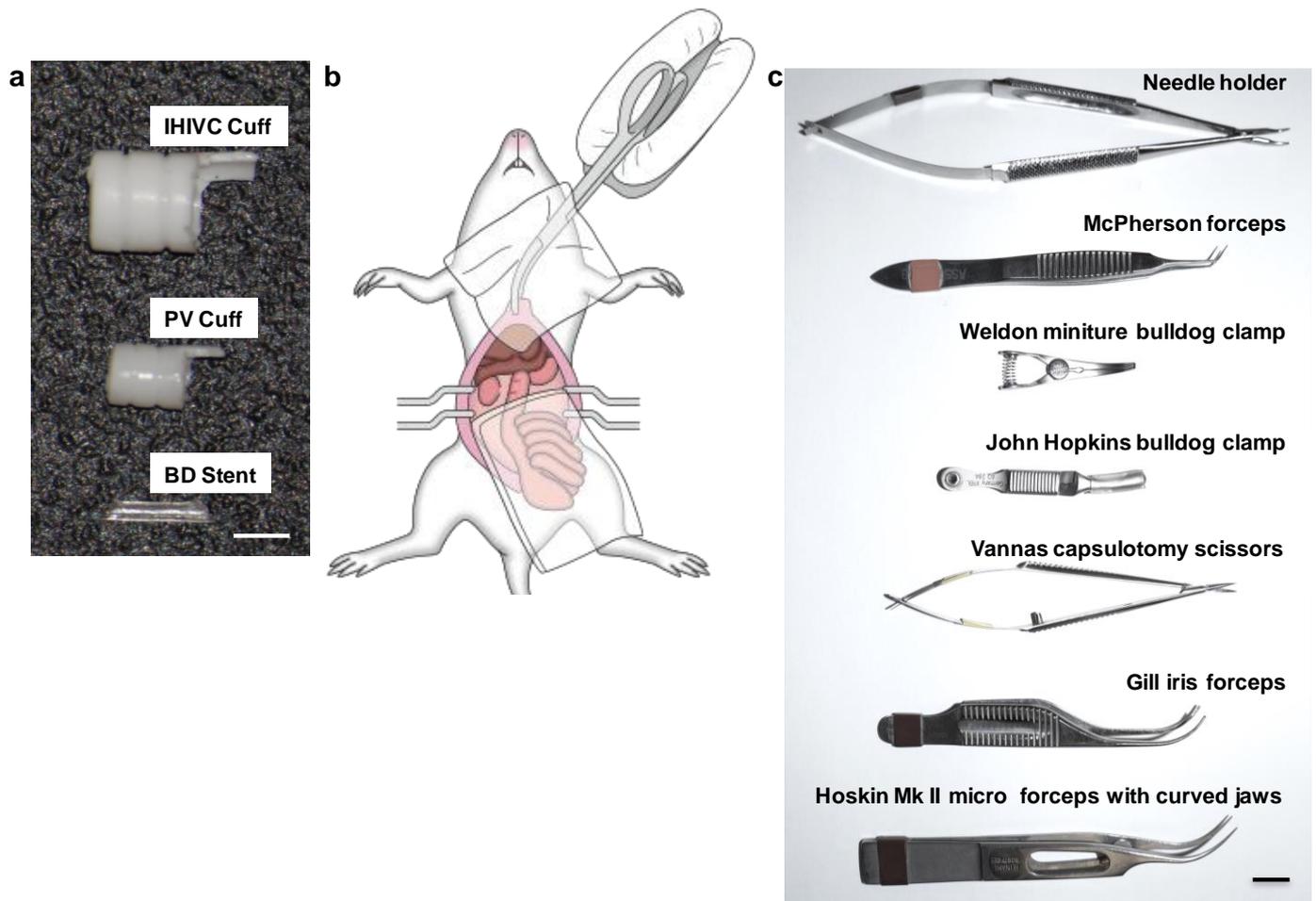


図1. マウス肝移植で使用した器具と手術中のマウスのポジションの図。

- (a) 肝下部大静脈、門脈に使用したカフと胆管ステント。
 - (b) ドナーとレシピエント手術中のマウスのポジションの図。
 - (c) プロトコール内で使用された手術器具。
- スケールバー 1mm(a), 1cm (c)。

第4章 手術手技

門脈と肝下部大静脈カフの作成 (所用時間 5-10分)

1. 門脈用のカフを 20Gカテーテルとカミソリを用いて作成する。20Gカテーテルの代わりに 18Gカテーテルを使用する事も可能だが、20Gカフの方が門脈に挿入が容易なので、我々は 20Gの使用を好む。金属製の内套を切離面として使用する。カフのボディは長さが 2mm になるように作成する。取手の部分は、術者の好みによって 1mm、もしくはそれ以上の長さにする (図 1a)。
2. カミソリを用いて、カフのボディに浅い溝を 2カ所作成する。2カ所の溝の内一つはドナー門脈を絹糸でカフに固定するのに使用できる。もう一つの溝はレシピエント手術の際の門脈吻合に利用する。
3. 16Gカテーテルを用いて、Step 1 と Step 2 と同様に肝下部大静脈カフを作成する。

胆管ステントの作成 (所用時間 5分)

4. 胆管ステントを作成する。カミソリを使って PE10 を長さ 2mm 程度の長さで台形の形に切って作成する (図 1a)。定規を用いて PE10 を上から押しつけてしごくようにして太さが 0.3-0.5mm 程度になるまで細くする。この際あまり強く押しつけると胆管ステントの内腔が狭まってしまうので、気をつける。内腔が狭まったり、閉塞してしまうと総胆管の閉塞を来し、レシピエントの生存率に影響を与える可能性がある。

ドナー手術 (所用時間 40-50分)

麻酔と開腹

5. ドナーマウスの麻酔導入を行う。マウスを麻酔用の容器に入れ、イソフルラン(通常 25g-30g のマウスに対して 1-2ml を使用する)。呼吸回数を注意深く観察し、呼吸回数が 1 秒に 1 回程度に低下したら手術台の上に固定する。
6. 麻酔がかかったマウスを実体顕微鏡下に置く。イソフルラン吸入で全身麻酔を維持する。麻酔機を調整し、3-4%の濃度と流量が 0.5-1l/分の空気または酸素を用いる。腹壁をポビドンイオディンと 70% エタノールで消毒する。
7. 剣状突起から恥骨まで腹部正中切開で開腹する。次に横切開も加え、バイポーラーを用いて腹壁からの出血を止める。切開を加えた後に麻酔を維持するためにイソフルランを 0.5-1%に減量する。術中マウスの呼吸回数を観察する事が重要である。麻酔深度を評価するために呼吸回数が 1 秒に 1 回程度になるようにイソフルラン吸入器を調整する。

ドナー肝臓摘出前の準備

8. モスキート鉗子を用いて剣状突起を把持して、マウスの頭側に展開する。粘土を用いてモスキート鉗子を固定する (図 1b)。
9. 小腸と大腸を濡らした不織布ガーゼ (6 cm x 6 cm) で覆い、腹腔の左側に置く。
10. 小さいガーゼ (3.5 cm x 3.5 cm) を用いて、左葉と中葉を剣状突起の方向にやさしく展開して尾状葉を露出する (図 1b)。
11. 尾状葉周囲の間膜を切離する。
12. 固有肝動脈を露出し、マクファーソン結紮鉗子(図 1c)を用いて周囲の組織から剥離する。固有

肝動脈を 10-0 ナイロン糸で結紮する (図 2a)。

13. 総胆管をマクファーソン結紮鉗子を用いて周囲組織から剥離して、7-0 絹糸を総胆管の下に通す。総胆管前壁を膵臓の上でカットする。胆管ステントを総胆管に挿入して 7-0 絹糸で固定する。この際胆管ステントを深く挿入しすぎて胆管合流部を閉塞しないようにする (図 2b)。
14. 次に濡れたガーゼで、右下葉を剣状突起の方向に展開して肝下部下大静脈を露出する。
15. 細径電気メスを用いて右腎動脈と静脈の上の後腹膜を剥離する。肝下部下大静脈を綿棒でやや展開して肝下部下大静脈の右側に合流している小静脈を焼灼する。
16. 右下葉を展開していたガーゼを外し、それを用いて門脈を覆い門脈の損傷を回避するのに用いる。肝下部下大静脈の左側で左腎動静脈の頭側の部分を剥離する。肝下部下大静脈を綿棒でやや展開して肝下部下大静脈の左側に合流している小静脈を焼灼する。肝下部下大静脈に合流する腰静脈も焼灼する。
17. 右副腎静脈を 7-0 絹糸で結紮する。肝下部下大静脈に近い部位を結紮する。
18. 右腎静脈周囲を剥離して、右腎動脈から分離する。10-0 ナイロンを右腎静脈下に置く。
19. 肝下部下大静脈周囲の後腹膜と脂肪を剥離する。

ドナー肝臓灌流と摘出

20. 20U (20 μ l) のヘパリンを 28G 針付きインスリンシリンジを用いて陰茎静脈から投与する。この際空気が入らないように注意する。微量の空気ですえも空気塞栓を来たし、マウスを死に至らしめる可能性がある。
21. ヘパリンが全身に分布するように 1 分待つ。その間に小さいガーゼを用いて十二指腸を動物の

- 左方向に展開し、門脈を露出する。左胃静脈と脾静脈が門脈に流入している位置を確認する。
22. 27G針と 5ml のシリンジを用いて、ゆっくりと 4℃に冷却した生食もしくは UW 液を肝下部下大静脈から注入しドナー肝臓を灌流する。左腎静脈が肝下部下大静脈に流入する部位よりやや尾側の部分から針を挿入する。灌流を始めた直ぐに門脈を脾静脈の尾側で切離し、灌流液の出口とする。ドナー肝臓から血液が流出し、肝臓が均一に白色になったら灌流を止める。通常 2-3ml 灌流液で肝臓の灌流を完了する事ができる。
 23. 胆管ステントが留置されている部位 (図 2b) より尾側で総胆管を切離する。
 24. 綿棒と鉗子を用いて門脈周囲の脂肪組織を剥離する。
 25. 左胃静脈と脾静脈を 10-0 ナイロン糸で結紮する。門脈本幹を脾静脈より末梢で切離する (図 2c)。
 26. 右腎静脈を 10-0 ナイロン糸で結紮して切離する。
 27. 右腎動脈を肝下部下大静脈より分離する。
 28. 10-0 ナイロン針を左腎静脈が流入するレベルより頭側の肝下部下大静脈に刺入し、結紮する。
10-0 ナイロンの一端をカフ付けのために残しておく。
 29. 肝下部下大静脈を左腎静脈より頭側で切離する (図 2d)。
 30. 濡れた不織布ガーゼを用いて、やさしく肝臓を展開して胆嚢を露出する。10-0 ナイロン針と持針器を用いる (図 1c)。針の鈍端を用いて、10-0 ナイロンを胆嚢管と肝床部の間を通して、胆嚢管を結紮する。胆嚢を剪刀または電気メスで開放して胆汁を排出する。
 31. ガーゼを用いて肝臓を尾側に展開して、肝上部下大静脈を露出する。鎌状間膜を切離後、肝上部下大静脈の前壁をまず切離し、その後後壁を切離する (図 2e)。左横隔膜静脈と肝上部下大

静脈の合流部が肝臓に近い場合は、レシピエント手術中に肝上部下大静脈吻合後の出血を避けるために、左横隔膜静脈を結紮切離する必要がある。しかし、我々の経験では、C57BL/6 をドナーとして使用する場合は、ほとんどの例で左横隔膜静脈を結紮する必要がない。できるだけ横隔膜に近い部位で肝上部下大静脈を切離して、レシピエント手術の際に肝上部下大静脈吻合を容易にするためにマージンを残すようにする。

32. 左三角間膜を切離して、濡れたガーゼを用いて左外側葉を右側に展開する。尾状葉の頭側にみられる傍食道血管を 7-0 絹糸で結紮する。
33. 肝臓と後腹膜の間の間膜と結合織を切離する。
34. 全肝を摘出して、ただちに冷たい (4°C) 生理食塩水もしくは UW 液が入った容器に入れる。ドナーマウスの死体は施設内のガイドラインに従って処分する。

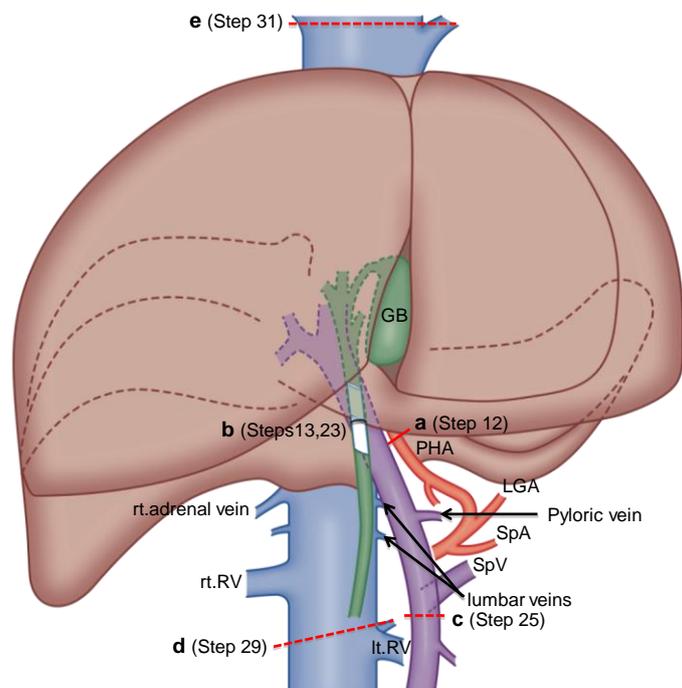


図2. マウスの肝臓の図とドナー肝臓摘出の際の切離ライン。

- (a) 固有肝動脈切離ライン
- (b) 総胆管に留置された胆管ステント
- (c) 門脈切離ライン
- (d) 肝下部下大静脈切離ライン
- (e) 肝上部下大静脈切離ライン

図内の点線は切離のみのライン、実線は結紮・切離ラインをそれぞれ示す。

略語

- PHA: 固有肝動脈
- LGA: 左胃動脈
- SpA: 脾動脈
- SpV: 脾静脈
- rt RV: 右腎静脈
- lt RV: 左腎静脈
- GB: 胆嚢

肝グラフトのバックテーブル処理（所用時間 15-30 分）

カフ付け

35. 蓋がない発泡スチロール容器に砕いた氷を入れ、培養ディッシュを肝臓グラフトを入れる容器として使う。容器は冷たい（4℃）生理食塩水もしくは UW 液で満たしておく。肝臓下面が見えるように臓器をおく。ウェルドンミニチュアブルドック鉗子（図 1c）の取手をモスキート鉗子でクランプする。モスキート鉗子を粘土で氷の上で固定する。
36. 16G カフの取手をブルドック鉗子で把持し、固定する（図 3a）。肝下部下大静脈を結紮した 10-0 ナイロンを引っ張り、16G カフの中を通し、肝下部下大静脈もカフの中を通す（図 3b）。
37. 肝下部下大静脈の内腔を確認し、16G カフに肝下部下大静脈を被せ、血管内腔が露出されるようにする。
38. 肝下部下大静脈を 7-0 絹糸で結紮しカフに固定する（図 3c）。2 回の結紮で通常はしっかりと固定される。
39. カフより頭側、右下葉よりも尾側で肝下部下大静脈を 5-0 絹糸で 1 回結紮する。
40. 20G カフを門脈に同様の手順で付ける（図 3d）。

支持糸の取り付け

41. 肝臓を回転させて、肝上部が露出するようにする。肝上部下大静脈の両側に 10-0 ナイロンで支持糸をかけておく（図 3e）。両側の支持糸をブルドッククランプ（図 1c）で把持しておく。

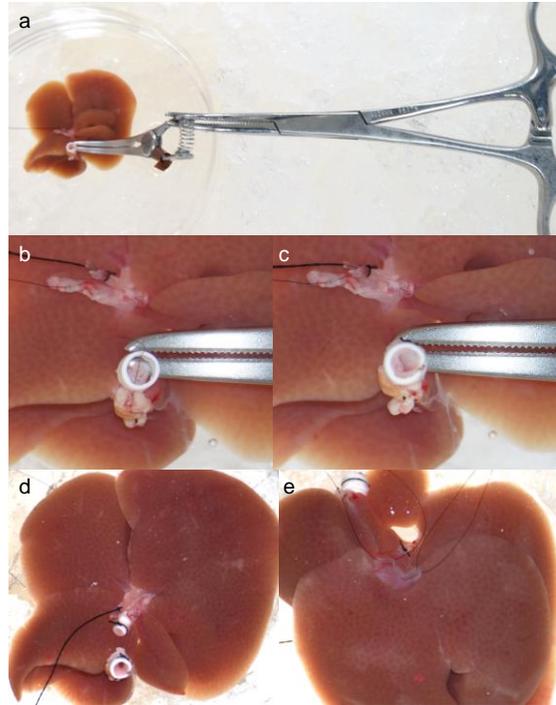


図3 肝グラフトのバックテーブル処理。

(a) ドナー肝臓は肝下面がみえるように、氷の上に置かれた冷たい生理食塩水またはUW液で満たされた培養ディッシュの中に置く。モスキート鉗子でウェルドンミニチュアブルドック鉗子を把持してカフ付けを行う。

(b) 肝下部下大静脈のカフ付けのために、肝下部下大静脈につけてある10-0ナイロンを16Gカフの中を通す。

(c) 肝下部下大静脈の内腔を確認し、内皮が露出するように肝下部下大静脈をカフに被せる。

(d) 肝下部下大静脈と門脈のカフ付けが完了した後。

(e) 肝上部下大静脈の両端に10-0ナイロンで支持糸を付けた後。

レシピエント手術（所用時間 70-90 分）

麻酔と開腹

42. ドナー手術ステップ 5-10 と同様に、レシピエントマウスに麻酔をかけ、腹部正中切開で開腹し、腸を濡れたガーゼで覆い、肝臓を展開する。マイクロリトラクターを用いて、腹壁を展開する（図 1b）。

無肝期の前の準備

43. 尾状葉の周囲の間膜を切離する。鎌状間膜を切離する。小さい濡れたガーゼを用いて、肝臓を下方に展開し、左三角間膜を切離する。
44. 左横隔静脈を 10-0 ナイロンで結紮する。この際、左横隔静脈に可能な限り近い部分で横隔膜に針を通す。
45. 傍食道血管を露出して 7-0 絹糸で結紮する。
46. 小さい濡れたガーゼで肝臓を展開して、肝上部下大静脈の尾側の後腹膜の空間を露出する。まず肝臓と後腹膜の間膜をバナス剪刀で切離する（図 1c）。次にギル虹彩鉗子（図 1c）を用いて肝臓と後腹膜の間のスペースを剥離する。
47. 肝臓を元のポジションに戻す。ギル虹彩鉗子を慎重に肝臓の背側、肝上部下大静脈の尾側に挿入する。2-0 絹糸を肝上部下大静脈の裏に通す。
48. 肝下部下大静脈を露出して、肝下部下大静脈の背側の細かい血管を焼灼する。腰静脈も Step 14-16 と同様に焼灼する。
49. 右副腎静脈を焼灼する。
50. ギル虹彩鉗子を用いて肝下部下大静脈の背側を剥離する。肝下部下大静脈が後腹膜の結合組織

から完全に遊離していることを確認する。

51. 肝門部を小さい濡れたガーゼで展開して露出する。固有肝動脈を 10-0 ナイロンで結紮する (図 4a)。
52. 総胆管を剥離して、門脈から分離する。総胆管を左右肝管合流部に出来る限り近い部位で 7-0 絹糸で結紮して、結紮の頭側で切離する (図 4b)。綿棒を用いて、門脈から総胆管を慎重に分離する。
53. 右門脈を 10-0 ナイロンで結紮する (図 4c 実線)。一端を長く残しておき、無肝期の際に支持糸として使用する。
54. 無肝期の準備をする。肝下部下大静脈や門脈を結紮する前に麻酔を調整し、マウスの呼吸回数が 1 秒に 1 回程度になる事を確認する。麻酔がそれ以上深く、呼吸回数が 1 秒に 1 回よりも遅い場合は、無肝期の最中に呼吸がとまり、マウスが死に至る可能性がある。
55. 5ml のシリンジと 22G カテーテルを用いて、門脈からゆっくりと冷たい生食を流し、グラフトの肝臓を灌流し、肝臓内から UW 液を洗い流すようにする。2-3ml の生食で灌流する。この際空気がグラフトの肝臓内に入らないように気をつける。

無肝期

56. マイクロクランプをまず肝下部下大静脈に、次に門脈にかける。この際クランプは可能な限り尾側に置くようにして、血管吻合の際のマージンを可能な限り長く残すようにする。肝上部下大静脈を露出し、2-0 絹糸をやさしく牽引し、ウェルドンミニチュアブルドッククランプを挿入できるスペースを肝上部下大静脈の背側につくるようにする。ブルドッククランプを横隔膜

と肝上部下大静脈の境界よりやや頭側に置く。

57. 肝上部下大静脈の前壁を右端から、前壁をレシピエントの肝臓に出来る限り近い部位で切離し、吻合に際してマージンが出来る限り残るようにする。
58. 肝上部下大静脈の後壁も右端からカットするようにする。後壁に肝実質が少し残るように切離する。肝実質を残す事で、肝上部下大静脈の後壁が吻合中に裂ける事を防ぐ（図 4d）。
59. 門脈を分岐部で切離する。切離ラインは右門脈の結紮部位よりやや頭側とする。そして、吻合のためマージンをできるだけ長く残すために肝下部下大静脈を可能な限り肝臓に近い部位で切離する（図 4c と図 4e）。
60. 肝臓を手で持ち、やさしく挙上する。肝臓と後腹膜の間の結合組織と間膜を切離する。摘出された肝臓は施設内のガイドラインに従って処分する。
61. 手術台を 90° 反時計周りに回転させ、レシピエントマウスの頭が術者から見て左側にくるようにする。血液を綿棒で拭いて、後腹膜表面から出血が無いことを確認する。
62. 肝上部下大静脈の両端にかけた支持糸を把持しているブルドック鉗子を持ち、肝グラフトをレシピエントの腹腔内に置く。
63. レシピエントの肝上部下大静脈の両端に支持糸をかける。
64. 後壁の連続縫合を肝上部下大静脈の左端から始める（図 5a）。後壁の吻合は通常 7-8 針で終わる。出血を防ぐために両端ではピッチを細かくする。肝上部下大静脈の後壁は非常に裂けやすいので、糸を締める際に急な動きは避けるようにする。
65. 肝上部下大静脈の右端から前壁の吻合を継続する。左端で前壁の吻合を完了する前に、肝上部下大静脈の内腔を生理食塩水でフラッシュして空気を出すようにする。少量の空気でも空気塞

栓を来し、レシピエントが死亡する可能性がある。

66. 手術台を 90° 時計回りに回転させ、レシピエントの頭部が正中に来るようにする。
67. 肝臓を小さい濡れたガーゼで頭側に展開して、肝門部を展開する。小腸を頭側に移動させ、レシピエント門脈がドナー門脈に近づくようにする。
68. 右門脈を結紮してあった糸をジョンズホプキンスブルドッククランプで把持する。ブルドッククランプをレシピエントの右側に置き、レシピエント門脈が頭側に立つようにする。
69. 10-0 ナイロンで支持糸を門脈後壁の左端にかける。ジョンズホプキンスブルドッククランプで支持糸を把持して、ブルドッククランプをレシピエントの左側に置く。この際門脈の前壁は下方にやや垂れている状態にして、門脈後壁と重ならないようにする。門脈前壁と後壁が重なるとカフ挿入が困難になる。
70. 7-0 絹糸をレシピエント門脈の周囲にかけて、1 回だけゆるめの結紮をしておく。右手で先端を鈍にした L-型注射針を用いて、レシピエント門脈の前壁をやや持ち上げながら、左手でホスキン MK II マイクロピンセット (図 1c) を用いてドナーカフの取手を持ち、レシピエント門脈内に挿入する (図 5b)。この際右手で生理食塩水を門脈に注入し、空気を取り除きながら注入する。レシピエント門脈にかけておいた 7-0 絹糸を結紮して、門脈吻合を完了する。門脈吻合中は急な動きは避け、門脈吻合が捻れなく完了する事を確認する。
71. まず門脈のクランプを開放し、その次に肝上部下大静脈のブルドッククランプを開放する。肝臓が灌流され、全身循環が再開する。

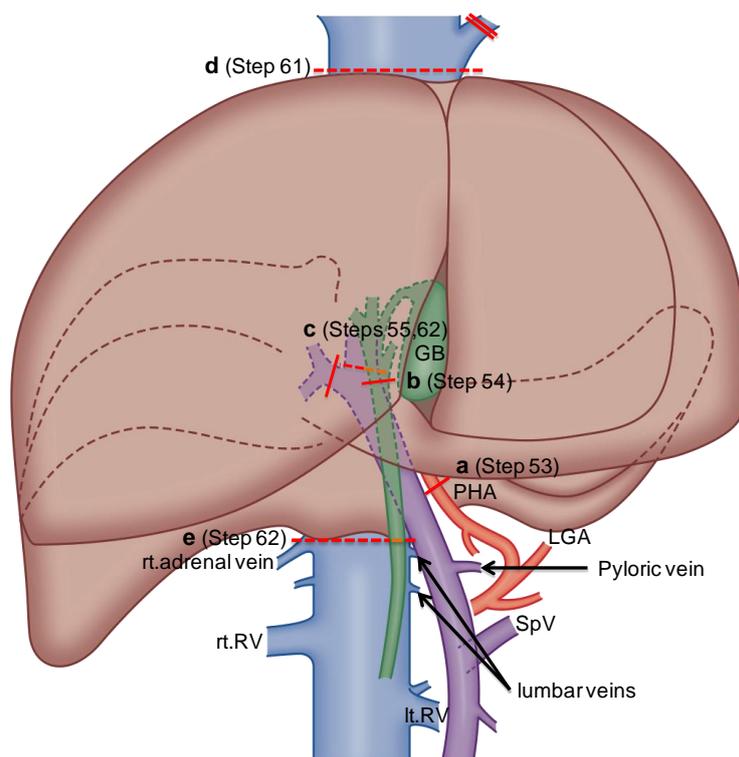


図4 レシピエント肝臓摘出術の際の切離ライン。

- (a) 固有肝動脈切離ライン
- (b) 総胆管切離ライン
- (c) 門脈切離ライン
- (d) 肝上部下大静脈切離ライン
- (e) 肝下部下大静脈切離ライン

図内の点線は切離のみのライン、実線は結紮・切離ライン、二重線は結紮のみをそれぞれ示す。

略語

- PHA: 固有肝動脈
- LGA: 左胃動脈
- SpA: 脾動脈
- SpV: 脾静脈
- rt RV: 右腎静脈
- lt RV: 左腎静脈
- GB: 胆嚢

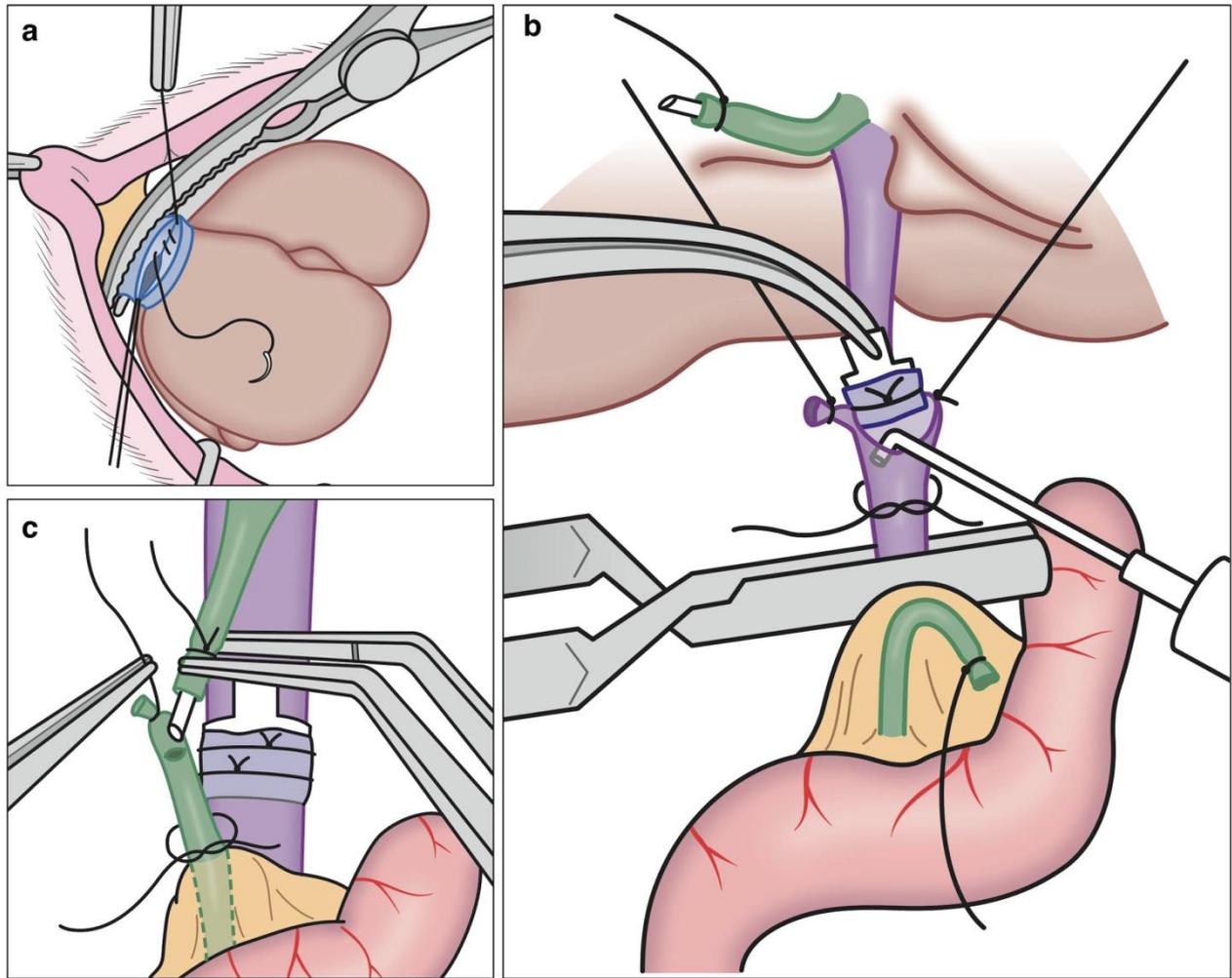


図5 レシピエント手術の際の血管吻合と総胆管再建の図。

- (a) 肝上部下大静脈吻合
- (b) 門脈吻合
- (c) 総胆管再建

肝下部下大静脈の吻合

72. 10-0 ナイロンで支持糸を肝下部下大静脈の後壁の両端にかける。この際、門脈吻合の際と同様に、肝下部下大静脈の前壁は下方にやや垂れており、後壁と重ならない状態にする。7-0 絹糸をレシピエント肝下部下大静脈の周囲にかけて、1 回だけゆるめの結紮をしておく。門脈吻合の際と同様に、右手で先端を鈍にした L-型注射針を用いて前壁を少し持ち上げ、左手でドナーカフの取手を持ち、レシピエント肝下部下大静脈内にカフを挿入する。かけておいた 7-0 絹糸を結紮して、肝下部下大静脈吻合を完了する。ラット肝移植モデルとは異なり、マウス肝移植モデルでは門脈と肝下部下大静脈吻合が完了する前に、門脈と肝下部下大静脈から血液を除去する必要はない。
73. まずドナー肝下部下大静脈にかけていた 5-0 絹糸をほどき、その後レシピエント肝下部下大静脈のクランプを開放する。

胆管吻合

74. 肝門部を露出して、ドナー胆管ステントを固定していた糸をチューブ遮断鉗子で把持し引き下げる。7-0 絹糸をレシピエント胆管にかけて 1 回ノットを作っておく。レシピエント胆管を把持して、ドナー胆管と直線で平行になるようにする。胆管の前壁を剪刀で切離し、レシピエント胆管内に胆管ステントを挿入する (図 5 c)。7-0 絹糸を結紮して胆管吻合が完了する。全ての吻合が完了した後の移植後の肝臓の写真と図を示す (図 6a と図 6 b)。

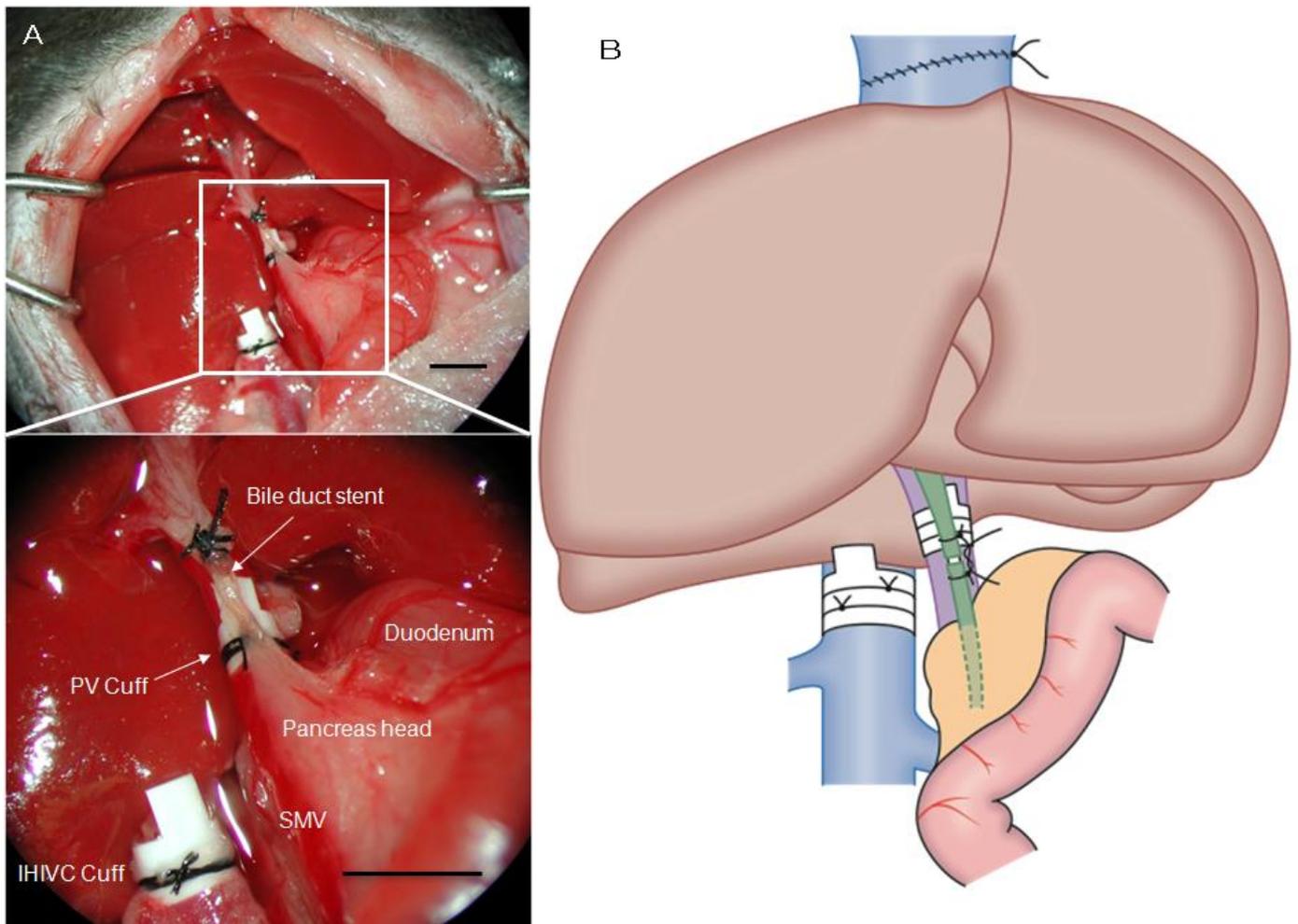


図 6. 同所性マウス肝移植において全ての吻合が完了した直後の再灌流された肝臓グラフト。

(a) 全ての吻合が完了した直後の再灌流された肝臓グラフト。下の画像は上の画像（倍率 10 x）の門脈 (Portal vein, PV) 肝下部下大静脈 (Infrahepatic inferior vena cava, IHIVC)、胆管 (bile duct) の拡大像（倍率 25 x）である。

(b) 全ての吻合が完了した移植後肝臓の全体像。

腹部閉鎖

75. 2-3ml の温かい生理食塩水を腹腔内に投与する。腹腔内出血が無いことを確認する。

76. 腹部正中創を 4-0 バイクリルの連続縫合で、2 層閉鎖する。

術後回復 (4-6 時間)

77. レシピエントマウスを温かいケージに入れ、回復を待つ。鎮痛薬と抗生剤を施設内の術後ガイドラインで示されたように適宜使用する。

78. 最初の 4-6 時間は、レシピエントマウスを 1-2 時間毎に観察して、レシピエントが完全に覚醒し、痛がっている様子が無いことを確認した上で飼育場所に戻すようにする。

第5章 結果

我々の研究室では過去5年間の間に4人の外科医をマウスの肝移植ができるようにトレーニングした。4人の外科医全員が、マウスの肝移植のトレーニングを開始する前に、ラットの肝移植手技に習熟していた。マウスの肝移植に習熟（レシピエントマウスが術後7日以上健康な状態で生存する）するには50例程度の経験を要した。同種同系（C57BL/6→C57BL/6）肝移植または同種異系肝移植（C57BL/6→C3H）後30日目の正常な肝臓組織の標本を図7aと図7bに示す。同種同系に比べて、同種異系の肝グラフト内では、以前の報告にもあるように門脈周囲や類洞内にわずかに炎症細胞の浸潤がみられた(28)。我々の施設では、マウス同種異系肝臓グラフトの研究を行い、ほとんどのマウスの種の組み合わせで、肝臓グラフトレシピエントは100日以上生存し、免疫抑制剤を使用せずとも免疫寛容の状態を示した(16, 17, 27)。肝移植後の免疫寛容の分子生物学的なメカニズムは未だに解明されていないが、そのメカニズムの一部はマウスや他の動物を用いた最近の研究報告や総説で報告されている(29-31)。

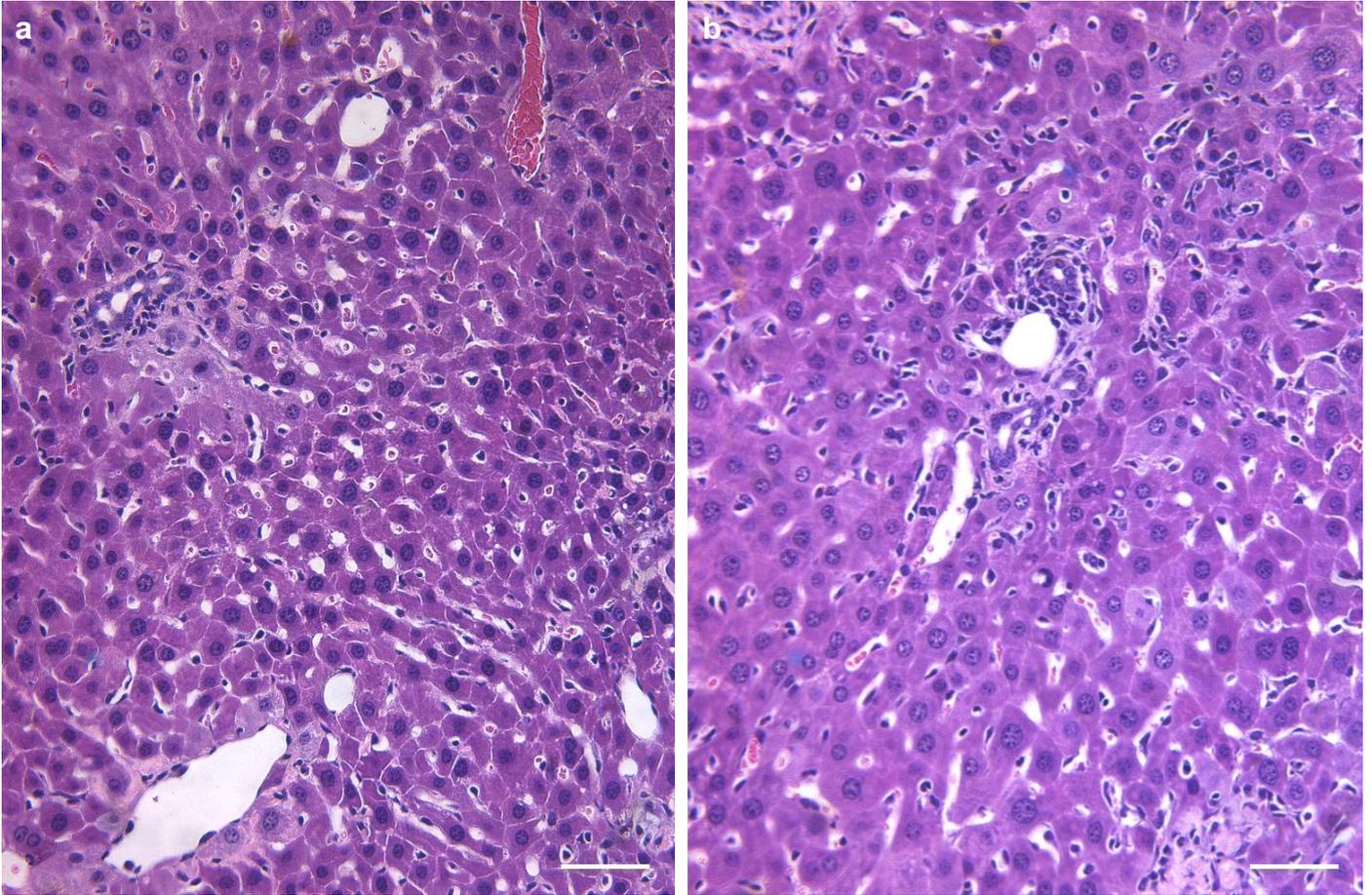


図 7. 肝移植後 30 日後のマウス肝臓グラフト。

(a) 同種同系肝移植後 30 日目の肝臓グラフトの組織像。

(b) 同種異系肝移植後 30 日目の肝臓グラフトの組織像。

同種異系に比べると同種同系肝移植後のグラフトには、門脈周囲や類洞における浸潤細胞が少ない。スケールバー、50 μ m。

第6章 マウス肝臓移植モデルを応用した虚血再灌流障害の機序の解明

Interferon regulatory factor 1 (IRF-1)は、ヒトの IFN β の制御因子として発見された核内転写因子である(32)。IRF-1 は、さまざまな臓器に、定常状態では低いレベルで発現しており、またナチュラルキラー (NK) 細胞、T 細胞(33)、マクロファージ(34)、樹状細胞(35-37)など様々な免疫細胞にも発現している。IRF-1 は特有のリンパ球分画の発達にも関わっている。IRF-1 欠損マウスの体内では、NK、NKT 細胞が肝臓、脾臓、胸腺内で著しく減少していると報告されている(38, 39)。また IRF-1 欠損マウスにおいて、CD8⁺細胞も胸腺、末梢血、脾臓、リンパ節で減少しているとの報告もある(40, 41)。これまでの報告によると、IRF-1 欠損マウスにおけるこれら細胞分画減少は、骨髄間質細胞におけるインターロイキン15 (IL-15) の発現低下が原因であると示唆されている(38, 42, 43)。

IL-15 は多機能性サイトカインであり、自然免疫、適応免疫の恒常性維持、活性化にかかわるとされているコモンサイトカインレセプター γ 鎖 (γ_c) ファミリーに含まれる(43-45)。IL-15 の遺伝子の発現は IRF-1 によって転写性に制御されている(32)。IRF-1 は、リポ多糖 (LPS) とインターフェロン γ (IFN γ) による刺激によって誘導される骨髄細胞の IL-15 mRNA の発現を制御している(38, 39)。IL-15R α はレセプターサブユニットであり IL-15 と結合してヘテロ二量体を形成する(46)。この IL-15/IL-15 R α 複合体が、他の細胞上にある別のヘテロ二量体受容体複合体である IL-2/IL-15R β と γ_c サブユニットと結合しシグナル伝達が生じる(44)。最近の報告ではこの可溶性 IL-15/IL-15 R α 複合体が、ヒトとマウスの血清中に存在する IL-15 の唯一の形態である事が指摘された(46)。IL-15R α は IL-15 と同様に、プロモーター領域に IRF 反応性の部位があり、IRF-1 を

COS-7 細胞（サル腎臓線維芽細胞様細胞）内で過剰発現させると、IL-15 R α プロモーターを活性化させる事ができる(47)。しかし、肝臓内の免疫細胞、非免疫細胞（肝細胞などの実質細胞）内で、IRF-1 が、定常状態もしくは炎症性の環境下（各種刺激のある環境下）において、IL-15 と IL-15R α の発現を制御しているのかという事は不明である(48)。

これまでに我々は、様々な肝障害モデルにおいて IRF-1 が重要な役割を果たしているという事を報告してきた(13, 49-52)。これらの肝障害モデルには、肝温阻血後虚血再灌流障害（門脈、肝動脈を血管クリップで遮断し、肝臓容積の 70%程度にあたる部位を一定時間虚血状態にした後にクリップを開放し、肝臓に虚血再灌流障害をおこす実験モデル）(49, 50)、同種同系肝移植後に生じる冷保存後虚血再灌流障害(13, 51)、免疫惹起性肝障害(52)が含まれる。しかし、どのように IRF-1 が肝臓内の免疫細胞を制御し、またこれらの免疫細胞がどのように肝臓に影響を与えるのかという事は明らかではない(53)。さらに、ヒト肝移植の際と同じ条件である同種異系肝移植の際の IRF-1 の役割も明らかではない。そこで我々は、IRF-1 が定常状態の肝臓内リンパ球の恒常性維持にどのような役割を担っているか、また臨床的なヒト肝移植とほぼ同様の吻合法を用いて行った同種異系同所性マウス肝移植後に生じる冷保存後虚血再灌流障害の病態においてどのような役割を果たしているかという事を本研究で検討した。

本研究で新たに得られた知見から IRF-1 は肝細胞と樹状細胞による IL-15/IL-15 R α 複合蛋白産生を介して肝臓内の NK 細胞、NKT 細胞、CD8 陽性細胞の恒常性を制御し、冷保存後虚血再灌流障害においては炎症性サイトカイン産生と細胞傷害性リンパ系顆粒の発現上昇を促進させるという事が示唆された。これらのメカニズムが、同種異系肝移植後に生じる冷保存後虚血再灌流障害に寄与すると考えられる。

第7章 実験材料および方法

ヒト同種異系肝移植グラフトの IRF-1 染色

ヒト同種異系肝移植グラフトの分析とヒト肝細胞分離培養はピッツバーグ大学倫理委員会に承認されたプロトコールに基づいて行われた。研究参加者である患者からは事前に書面による承諾が得られた。4人の患者から、肝移植前後（バックテーブル操作時と再灌流後（1-4時間））で2回生検サンプルが得られた。これらの生検サンプルは、ホルマリン固定された後パラフィン包埋された。パラフィン包埋された肝生検サンプルから4 μ mの切片が作られ、脱パラフィン化、加水処理を経て、抗原賦活化のためにクエン酸バッファーで処理された。Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories) で切片をブロックした後に、ウサギ由来抗 IRF-1 一次抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、ヤギ由来抗ウサギビオチン化二次抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)、ABC Kit (Vector Laboratories)、AEC Substrate Kit (ScyTek Laboratories) を用いて連続インキュベーションサイクルを行い、免疫染色を行った。その後ヘマトキシリン液を用いて、切片のカウンター染色を行った。MIRAX MIDI digital whole slide scanning system (Carl Zeiss Microimaging) を用いて、染色されたスライドのデジタル画像を取り込んだ。

実験動物

8-12週齢のオスの野生型 (WT) C57BL/6 (B6) マウス (IRF-1^{+/+}; H-2^b)、IRF-1 欠損マウス (IRF-1^{-/-}; IRF-1 ノックアウト (KO) マウス、B6 バックグラウンド、H-2^b)、IL-15R α 欠損マウス (IL-15R α ^{-/-}、IL-15R α KO、B6 バックグラウンド、H-2^b)、C3H/HeJ (H-2^k) マウスは The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) より購入した。全ての動物はピッツバーグ大学の動物施設で飼育し

た。全ての動物実験はピッツバーグ大学の動物実験倫理委員会であらかじめ承認された実験である。

同所性マウス肝移植

ドナーマウスからの肝臓のハーベスト、肝動脈吻合を伴わない同所性肝臓移植の方法は以前報告された(14, 17)のとはほぼ同様であるが、いくつかの修正を加えて行った。WT B6 または IRF-1 KO マウスが肝臓ドナーとして使われた。ドナー肝臓グラフトは 5mL の UW 液で下大静脈から灌流し、24 時間 4°C で冷保存した後に、レシピエントである C3H/HeJ に同所性に移植した。レシピエントは再灌流後 3 時間または 6 時間の時点で安楽死させ、血液と肝臓の組織を採取した。

肝細胞と非実質細胞の分離

肝細胞と非実質細胞 (nonparenchymal cells (NPC)) は正常肝もしくは移植後の肝グラフト内からコラゲナーゼ消化法を用いて分離した(12, 13)。最初の細胞を含む液体は細胞ストレイナー (70 μ m, BD Bioscience) を用いて濾過した後、肝細胞と NPC は低速度遠心 (45xg 5 分間) で分離した。

リアルタイム RT-PCR

RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて全 RNA 抽出を行い、RNA to cDNA EcoDry Premix (Double Primed; Clontech Laboratories) を使って cDNA に逆転写した。mRNA 発現量の定量は以前報告された(12)と同様の方法で SYBR Green RT-PCR と StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行った。各遺伝子の発現量は、マウスの場合は β -actin で、ヒトの場合は

GAPDH でそれぞれ標準化して、正常肝臓組織と比較して定量解析を行った。プライマー配列は附属のテーブル 1 に記載する。

共焦点免疫蛍光染色

マウス肝臓組織の IRF-1 の免疫蛍光染色を以前の報告 (50) と同様のやり方で行った。1 次抗体はウサギ抗 IRF-1 を用いた (Santa Cruz Biotechnology) . 2 次抗体 (ヤギ抗ウサギ Cy3; Jackson ImmunoResearch Laboratories) を加え、F-actin で対比染色を行った (Alexa Fluor 488 Phalloidin; Life Technologies)。

血清 IL-15/IL-15R α レベル

血清 IL-15/IL-15R α レベルまたは培養上清 IL-15/IL-15R α レベルはマウス IL-15/IL-15R α ELISA (eBioscience) を用いて測定した。

細胞培養

肝臓内の異なる細胞群 (肝細胞、肝臓内非実質細胞 (NPC)、CD11c⁺樹状細胞 (DC) のみ枯渇させた肝臓内 NPC[NPC- CD11c]、と CD11c⁺DC 単独[CD11c]) を WT もしくは IRF-1 KO マウスから分離して、同じ数 (5×10^6 cells/ml) の細胞を 37°C で 6 時間または 24 時間の期間、通常培地または LPS (30 μ g/ml) と IFN- γ (100U/ml) を含む刺激用培地で培養した。CD11c⁺DC の抽出方法は以前報告された方法と同様の手法を用いて行った (14, 54)。

可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体のマウスへの投与

ヒト遺伝子組み換え IL-15 とマウス遺伝子組み換え IL-15R α Fc を R&D System より購入し、以前報告された方法(55, 56)で準備した。可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体の機能を評価するために、IRF-1 KO マウスに 2.5 μ g の IL-15 と 15 μ g の IL-15R α Fc を 200 μ l の PBS に混ぜたものを、フローサイトメトリーのために細胞抽出を行う時点または肝移植のためにドナー肝臓をハーベストする時点から 4 日前に腹腔内投与した。

フローサイトメトリー

マウス細胞表面分子と細胞内 IFN- γ と Foxp3 の染色は以前の報告と同様の方法で行った(14)。肝臓 NPC は非特異的な抗体結合を防ぐために Fc γ R ブロッキングラット抗マウス CD16/32 モノクローナル抗体で処理した。細胞表面染色では、NPC は 30 分 FITC、PE、allophycocyanin、Pacific Blue、または PE-Cy7 と結合したモノクローナル抗体を用いて、CD3 (145-2C11)、CD4 (GK1.5)、CD8 (53-6.7)、CD11c (HL3)、CD45 (30-F11)、H2-K^b (AF6-88.5)、NK1.1 (PK136) (BD Biosciences)、CD19 (eBio 1D3; eBioscience)、F4/80 (BM8; BioLegend) を検出した。細胞内サイトカイン染色では、細胞は 4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% サポニンで透過処理を行った後に、抗マウス IFN- γ 抗体 (XMG1.2; BioLegend) を用いて染色した。Foxp3 染色では、細胞は Foxp3 Fix/Perm Kit (eBioscience) を用いて、固定・透過処理を行い、抗 Foxp3 モノクローナル抗体 (FJK-16s; eBioscience) を用いて染色した。適切な Ig アイソタイプコントロールは BD Pharmingen (San Diego) から購入した。フローサイトメトリーは LSR Fortessa フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて、データ解析は FlowJo ソフトウェア (version 7.6; TreeStar) を用いて

行った。

肝障害の評価

虚血再灌流後の肝障害の評価は血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) レベルを、再灌流後 3 時間または 6 時間の時点で以前報告されたのと同様の方法で測定して行った (12)。肝臓組織は肝グラフトレシピエントから安楽死後に直ちに採取し、10% ホルマリンで固定の後、パラフィン包埋・切片作成し、ヘマトキシリン・エオジンや TUNEL を用いて以前報告されたように染色した (13)。肝障害はスズキスコアを用いて、ブライント評価を行った (57)。

サイトカイン測定

血清サイトカイン (IFN- γ 、IL-6、TNF α) は cytometric bead array (BD Bioscience) を用いて測定した。

MTT 試験

肝細胞 (WT または IRF-1 KO) を通常の培地または IFN- γ (1000U/ml) を含む培地で 24 時間培養し、生存率を MTT 試験 (Roche Diagnostics) で測定した。

ヒト肝細胞培養

病理学的に正常な、外科的に切離されたヒト肝臓組織からヒト肝細胞を以前に報告された方法

(14)に従って、3段階コラゲナーゼ灌流法と密度勾配遠心法を用いて調整した。ヒト肝細胞はLPS(30 μ g/ml)とIFN- γ (250U/ml)を含む刺激用培地で培養され、刺激開始後0、1、3、6、または24時間の時点でRNA抽出のために採取された。

アデノウィルスベクターを用いた肝細胞遺伝子導入

IRF-1 マイクロRNA ヘアピン構造 (Ad-IRF-1-ショートヘアピンRNA[shRNA]) ; Vector Biolabs)を含む複製欠損型アデノウィルス(Ad)ベクター (ヒトAd 5型, dE1/E3) を以前報告されたのと同様に準備した(52)。IRF-1 のマイクロRNA ヘアピン配列は5' -TGCTGTTGACAGTGAGCGACCTGGCTAGAGATGCAGATTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATCTGCATCTCTAGCCAGGGTG CCTACTGCCTCGGA-3' . ターゲット配列は*Homo sapiens* IRF-1 mRNA (NM_002198.1) 3' -非翻訳領域(UTR) 227-245、*Mus musculus* IRF-1 mRNA (NM_008390.1) 3' -UTR 235-253、と*Rattus norvegicus* IRF-1 mRNA (NM_012591.1) 3' -UTR 227-245である。Ad-IRF-1-shRNAまたはスクランブル (SCR) shRNAを含むコントロールベクター (Ad-SCR-shRNA) を用いてヒト肝細胞に48時間かけて遺伝子導入した。細胞はその後LPS(30 μ g/ml)とIFN- γ (250U/ml) で6時間刺激した後にRNA抽出と機能解析を行った。

統計的解析

データは平均 \pm 1 標準誤差(SEM)で表した。グループ間の比較はStudent *t* testを用いて行った。ノンパラメトリックデータ (スズキスコア) はMann-Whitney *U* test を用いて解析した。グラフト生存の評価にはlog-rank test を用いた。*p*値<0.05が有意と捉えた。

第8章 結果

IRF-1 はヒト肝移植後の再灌流後の組織内で発現が亢進している。

IRF-1 の発現がヒト肝移植後の肝組織内で亢進しているか検証するために、肝移植後の肝臓組織を4人の患者（冷保存時間 8-16 時間）から採取し、IRF-1 の免疫染色を行った。生検は2つの時点、再灌流前（バックテーブル）と再灌流直後（灌流後）、で得られたものを用いた。IRF-1 の発現を評価した肝臓病理医は患者情報のない状態でブラインド評価を行った。図 8A で示されているように、IRF-1 の発現は再灌流後のサンプルで発現が亢進しており、肝細胞の核に主に局在している。バックテーブルで得られたサンプルでの IRF-1 の発現はほぼみられなかった。IRF-1 陽性の肝細胞数は、バックテーブルに比べて再灌流後に有意に増加していた（図 8B）。

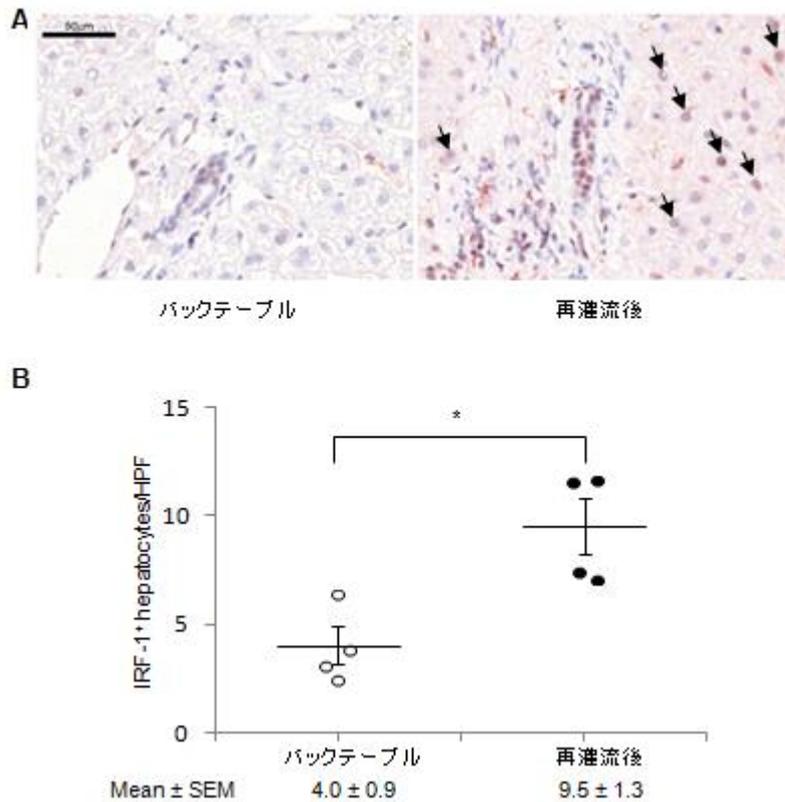


図 8. IRF-1 はヒト肝移植後の再灌流後の組織内で発現が亢進している。

(A) ヒト肝移植の際にバクテールと再灌流後に得られたサンプルを用いた IRF-1 の免疫染色 (赤色)。矢印は IRF-1⁺細胞を示す (n=4)。

(B) IRF-1⁺肝細胞/視野 (倍率 400 倍) を定量した (平均±標準誤差 (Mean±SEM)、15-20 視野/患者、n=4/時点)。 *p < 0.05

IRF-1 は長時間の冷保存時間を伴う同種異系肝移植後の肝細胞、NPC 両方において発現が亢進している。

長時間（24 時間）の冷保存を経たマウス同種異系（WT B6→C3H）肝移植後に、肝臓グラフト内における IRF-1 発現レベルを評価するために、われわれはまず再灌流後 6 時間の時点で採取された肝臓組織の RT-PCR を行った。以前同種同系のマウス肝移植モデルで報告した(13)ように、正常組織と比較して IRF-1 mRNA は著しく、そして有意に増加（8 倍）した（図 9A）。また肝移植後の肝臓グラフトから分離された肝細胞と NPC 両方において IRF-1 の発現が亢進していた。肝細胞の IRF-1 の発現(18 倍)は NPC の場合（7 倍）に比べて、より発現亢進の程度が大きかった（図 9B）。再灌流後 6 時間の時点で採取した肝臓グラフトの蛍光免疫染色で、IRF-1 蛋白発現が正常肝に比べ亢進しており、また発現が主に肝細胞内の核に主に局在している事を確認した（図 9C）。これらのデータは、同種異系肝移植後に IRF-1 mRNA と IRF-1 蛋白の発現が亢進しており、IRF-1 は肝細胞と NPC 両方に発現していて、さらに肝細胞内でより強く発現されるという事を示した。

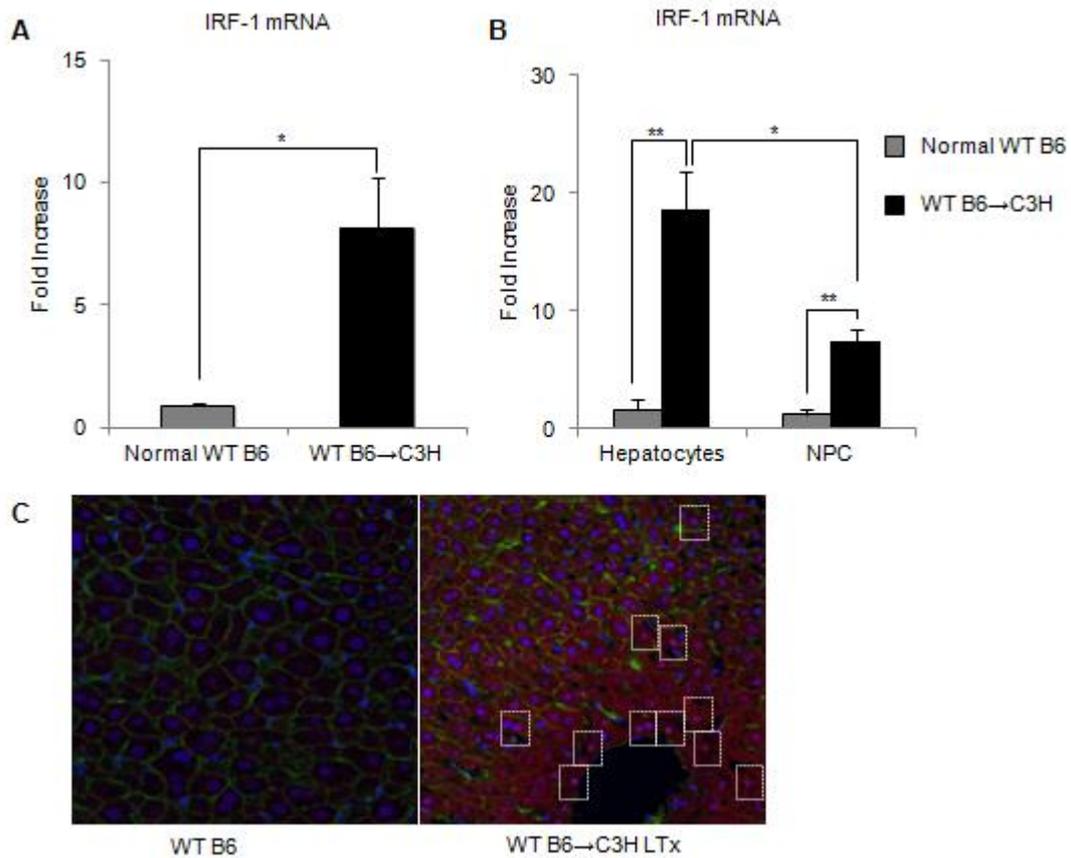


図 9. IRF-1 は長時間の冷保存時間を伴う同種異系肝移植後の肝細胞、NPC 両方において発現が亢進している。

(A) リアルタイム RT-PCR で測定した再灌流後 6 時間の時点での全肝組織の IRF-1 mRNA の発現 (n=3); *p<0.05.

(B) リアルタイム RT-PCR で測定した再灌流後 6 時間の時点での肝細胞と肝臓内 NPC の IRF-1 mRNA の発現。データは正常 WT B6 肝細胞または肝臓内 NPC を標準として表している。(n=3); **p<0.01, *p<0.05.

(C) 各種蛋白の蛍光免疫染色。IRF-1 (赤色), DAPI (青色), アクチン (緑色)。正常 WT B6 の肝臓と再灌流後 6 時間の時点での WT B6 肝グラフト (WT B6→C3H LTx)。点線の四角は IRF-1 陽性細胞を示している。

肝移植後虚血再灌流障害において IL-15 と IL-15R α の発現は、肝細胞、NPC 両方において IRF-1 依存性に亢進する。

IRF-1 は骨髄細胞または COS-7 細胞の *in vitro* で培養した状態において IL-15 と IL-15R α の発現を誘導するという事が知られているが (38, 39, 47)、*in vivo* の同種異系肝移植後の虚血再灌流障害の際に肝臓内で IL-15 もしくは IL-15R α の発現を誘導するか否かは明らかではない。WT B6 \rightarrow C3H の肝移植の再灌流後 6 時間の時点で、IL-15 と IL-15R α の発現は肝細胞内で正常肝細胞に比べ有意に亢進していた。正常の肝細胞に比べ肝移植後の肝細胞内で、IL-15mRNA の発現は 15 倍以上、IL-15R α mRNA の発現は 50 倍以上亢進していた (図 10A)。WT B6 \rightarrow C3H の肝移植後の肝内 NPC でも、正常肝細胞に比べて IL-15 と IL-15R α mRNA の有意な発現亢進が見られた (図 10A)。しかし IL-15 と IL-15R α mRNA の発現誘導の程度は、NPC に比べて肝細胞で有意に高い。そして次に IRF-1 KO ドナー肝臓を用いて、IRF-1 が肝移植後の肝臓内の IL-15 と IL-15R α の発現誘導に関与しているかを確認した。WT \rightarrow C3H に比べて、IRF-1KO \rightarrow C3H の肝移植では、IL-15 と IL-15R α mRNA の発現は、肝細胞と NPC 両方において低下していた (図 10A)。これらのデータは、IRF-1 は肝移植後の肝細胞と肝臓内 NPC の IL-15 と IL-15R α の発現誘導を制御しているという事を示唆している。次に、我々は肝移植後 6 時間の時点で、レシピエント血清内の IL-15/L-15R α 蛋白複合体を測定した。正常 C3H マウスに比べて、WT \rightarrow C3H レシピエントの血清 IL-15/L-15R α 蛋白複合体の有意な上昇がみられた (図 10B) が、IRF-1KO \rightarrow C3H レシピエントの血清内では血清 IL-15/L-15R α 蛋白複合体の上昇がみられなかった。これらのデータはドナー肝臓の IRF-1 が、肝臓内の IL-15 と IL-15R α mRNA の発現誘導と、肝移植後 6 時間の時点でレシピエント血清内の IL-15/L-15R α 蛋白複合体レベルを制御しているという事を示唆した。

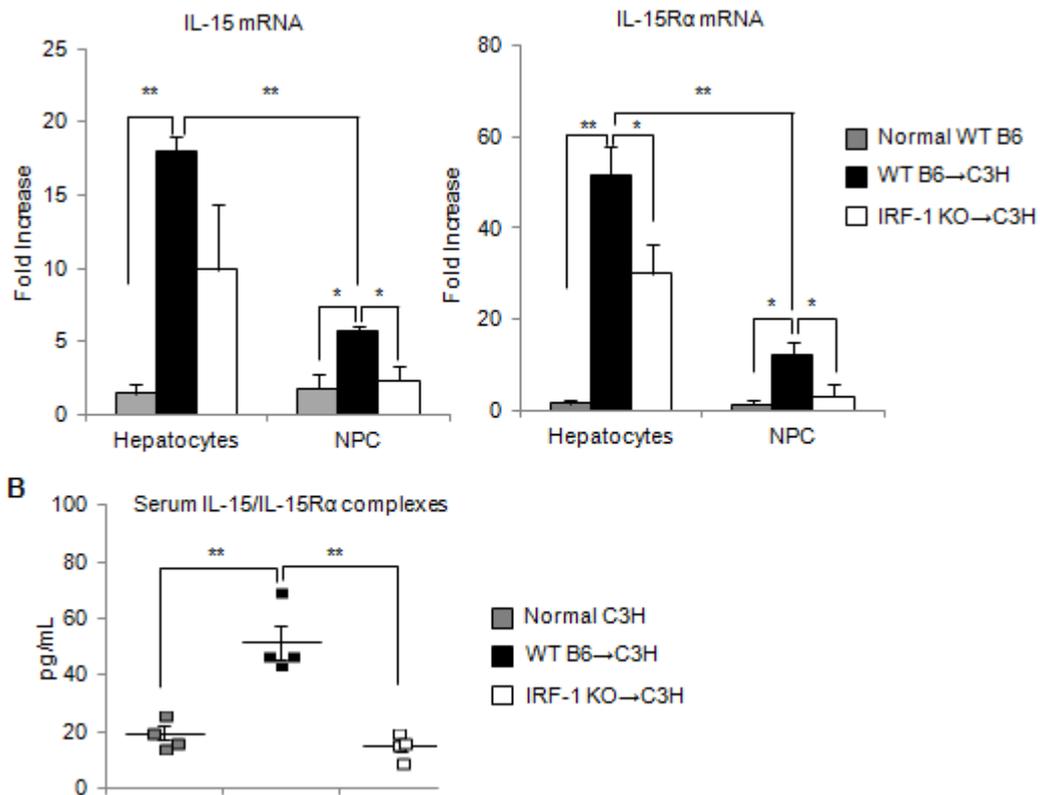


図 10. 肝移植後虚血再灌流障害において IL-15 と IL-15R α の発現は、肝細胞、NPC 両方において IRF-1 依存性に亢進する。

(A) リアルタイム RT-PCR で測定した再灌流後 6 時間の時点での肝細胞と肝臓内 NPC の IL-15 と IL-15R α mRNA の発現. データは正常 WT B6 肝細胞または肝臓内 NPC を標準として表している。(n=3); **p<0.01, *p<0.05.

(B) ELISA で測定した再灌流後 6 時間の時点でのレシピエント血清中の IL-15/IL-15R α 複合蛋白の濃度 (n=4); **p<0.01.

肝臓の細胞の中で、肝細胞が可溶性 IL-15/IL-15R α 蛋白複合体の主な産生源である。

ジフテリアトキシン投与によって CD11c 陽性樹状細胞 (CD11c⁺ DC) を枯渇させる事ができる CD11c ジフテリアトキシンレセプタートランスジェニックマウスを用いた研究によって、エンドトキシンショック (58) や CpG 誘発免疫活性化モデル (59) において CD11c⁺ DC が IL-15 の重要な産生源であるというエビデンスがある。他の報告では肝細胞を含む肝実質細胞も IL-15 や IL-15R α を発現しており (60)、造血細胞と同様に、定常状態における肝臓内の NK、NKT 細胞の発達に関与していると報告されている (61)。ヒト全肝臓組織 (62) またはヒト肝細胞癌細胞 (63) が IL-15 を産生するという報告はあるが、肝臓内のどの細胞が可溶性 IL-15/IL-15R α 蛋白複合体の主な産生源であるかは明らかではない。我々のここまでの実験結果とこれまでになされた研究報告に基づいて (58-63)、我々は肝臓の DC と肝細胞両方が主な産生細胞であると仮説を立てた。この仮説を検証するために、我々は異なる肝細胞群を分離し、通常の培地または LPS と IFN- γ を含んだ培地で 24 時間これらの細胞 (各群 5x10⁶ 細胞/ml) を培養した。図 11 に示したように、肝細胞は、他の細胞群 (NPC 全体群、NPC から DC を枯渇させた群 (NPC- CD11c⁺)、または DC (CD11c⁺) のみ) と比べても有意に多量の可溶性 IL-15/IL-15R α 蛋白複合体を分泌した。肝臓内 NPC の中では、DC を枯渇させると可溶性 IL-15/IL-15R α 蛋白複合体の分泌が有意に低下 (通常の培地では 38 \pm 6% 低下、LPS と IFN- γ を含んだ培地では 57 \pm 6% 低下) した事から、肝臓内 DC も可溶性 IL-15/L-15R α 蛋白複合体の主な産生源の一つである事がわかった。刺激に伴う可溶性 IL-15/IL-15R α 蛋白複合体の産生量は肝臓内の細胞群によって異なるという事がわかった。LPS と IFN- γ による刺激で、肝細胞 (1.2 倍)、NPC 全体 (1.5 倍)、NPC- CD11c⁺ (1.0 倍) と比較して樹状細胞 (3.7 倍) で最も産生量が増加した (図 11)。

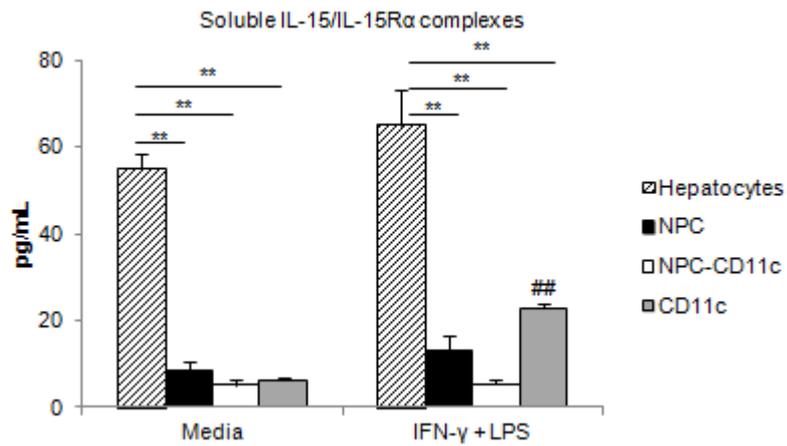


図 11. 肝臓の細胞の中で、肝細胞が可溶性 IL-15/IL-15R α 蛋白複合体の主な産生源である。

WT B6 の肝臓から分離された同じ数 (5×10^6 cells/ml) の様々な肝内の細胞群 (肝細胞、肝臓 NPC、肝臓 NPC から樹状細胞 (DC) を枯渇させた群 [NPC-CD11c] と CD11c⁺ DC のみ [CD11c]) を含む培養上清中の可溶性 IL-15/IL-15R α 蛋白複合体の濃度。各細胞は 37°C で 24 時間通常の培養液のみ (Media) または LPS ($30 \mu\text{g/ml}$) と IFN- γ (100U/ml) を含む培地で培養された。データは 3 回の実験で得られた平均値を示す; ** $p < 0.01$ vs 肝細胞; ## $p < 0.01$ 刺激された CD11c vs 培養液のみの CD11c。

IRF-1 はマウス肝細胞と樹状細胞において定常状態でも、刺激された場合でも IL-15 と IL-15R α mRNA 発現誘導、IL-15/IL-15R α 分泌を制御する。

これまでの研究で IL-15 と IL-15R α の遺伝子配列はいずれも IRF-1 結合部分が含まれると示唆されている (38, 47) が、定常状態または炎症性の環境で、IRF-1 が IL-15 と IL-15R α の発現制御を肝細胞と肝臓内造血細胞で同じように行っているかは明らかではない (48)。我々は肝細胞と DC をマウス肝臓から分離して、IRF-1 が IL-15 と IL-15R α 発現と IL-15/IL-15R α 分泌を制御しているか検証した。まず WT B6 または IRF-1 KO マウスから肝臓 DC を分離し、通常培地または LPS と IFN- γ を含んだ培地で 6 時間培養し、定常発現と刺激された際の IL-15 と IL-15R α の発現を評価した。図 12A に示されているように、WT マウスの肝臓から分離された CD11c⁺DC では LPS と IFN- γ による刺激によって IL-15 と IL-15R α mRNA の発現が上昇 (~7 倍程度) した。IRF-1 欠損 DC の定常状態での発現レベルと、刺激後の IL-15 と IL-15R α mRNA 発現は WT の場合と比べていずれも低下していた。WT と IRF-1 KO マウスから分離した肝臓 DC を通常培地または LPS と IFN- γ を含んだ培地で 24 時間培養し、上清内の分泌された IL-15/IL-15R α を測定した。WT 肝臓 DC は培養条件にかかわらず、IRF-1 KO DC に比べて有意に多量の IL-15/IL-15R α を分泌した (図 12B)。図 12C と 12D に見られるように、同様の所見がマウス肝細胞でもみられた。これらの結果は、IRF-1 はマウス肝臓から分離された肝細胞と肝臓 DC の定常状態でも刺激によって誘発された場合でも IL-15 と IL-15R α 発現両方を転写性に制御しているという事を示唆した。

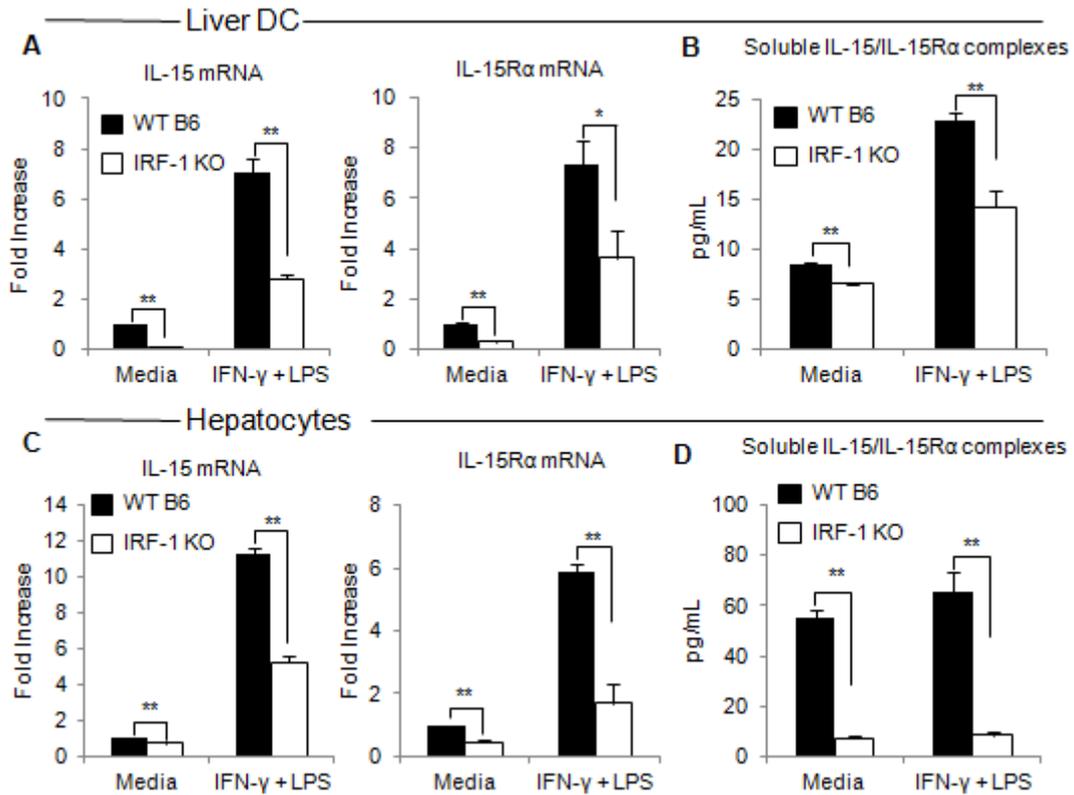


図 12. IRF-1 はマウス肝細胞と樹状細胞による定常状態および、刺激にともなう IL-15 と IL-15R α mRNA 発現誘導、IL-15/IL-15R α 分泌を制御する。

(A) リアルタイム RT-PCR で測定した培養開始後 6 時間の時点での肝臓 DC IL-15 と IL-15R α mRNA の発現。培地は通常培地のみと LPS (30 μ g/ml) と IFN- γ (100U/ml) を含んだ培地を用いた。肝臓 DC は WT または IRF-1KO マウスから分離された。データは通常培地の WT 肝臓 DC の値に比べて何倍増という形式で示されている； **p<0.01, *p<0.05.

(B) WT または IRF-1 KO から分離された同じ数の肝臓 DC (5x10⁶ cells/ml) を通常培地または LPS (30 μ g/ml) と IFN- γ (100U/ml) を含んだ培地で 24 時間培養し、培地上清中の IL-15/IL-15R α 複合蛋白の濃度を測定した。 **p<0.01.

(C) リアルタイム RT-PCR で測定した培養開始後 6 時間の時点での肝細胞の IL-15 と IL-15R α mRNA の発現。培地は通常培地のみと LPS (30 μ g/ml) と IFN- γ (100U/ml) を含んだ培地を用いた。肝細胞は WT または IRF-1KO マウスから分離された。データは通常培地の WT 肝細胞の値に比べて何倍増という形式で示されている； **p<0.01

(D) WT または IRF-1 KO から分離された同じ数の肝細胞 (5x10⁶ cells/ml) を通常培地または LPS (30 μ g/ml) と IFN- γ (100U/ml) を含んだ培地で 24 時間培養し、培地上清中の IL-15/IL-15R α 複合蛋白の濃度を測定した。 **p<0.01.

IRF-1 欠損マウスは定常状態において肝内 NK、NKT、CD8⁺ T 細胞を欠き、可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を全身投与するとこれらの肝臓内リンパ球数が回復する。

これまでの研究報告では、IRF-1 KO マウスは肝臓内 NK、NKT を欠くとしてきた(38, 39)が、他の肝臓内リンパ球、CD8⁺ T 細胞や他の臓器において IRF-1 によってコントロールされているとされる CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞(41, 64)、も影響を受けているのかは明らかではない。そして、IRF-1 KO マウスの肝臓内で減少しているリンパ球数が可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を全身投与することで実際に回復するのも不明である。これらの点を検証するために、我々は WT B6、IRF-1 KO、可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を全身投与した IRF-1 KO マウスから分離した肝臓内リンパ球の絶対数を測定した。WT マウスに比べ、IRF-1 KO マウスは肝臓内 NPC の絶対数が減少していた (図 13A)。マクロファージ、樹状細胞、B 細胞、制御性 T 細胞の絶対数は、WT と IRF-1 KO マウスの間で有意な差は認められなかったが (データ非表示)、NK、NKT、CD8⁺ T 細胞の数は WT と比較して IRF-1 KO の肝臓内で有意に減少していた (図 13B、13C)。WT と IRF-1 KO マウスの間で、CD4⁺ T 細胞の絶対数に差は見られなかった (図 13C)。IL-15/IL-15R α 複合体を投与すると IRF-1 KO マウスの肝臓内 NPC の数が増加した。この増加した NPC の数は WT マウスの肝臓内の NPC と同様のレベルまで回復した (図 13A)。図 13C で示されているように、IL-15/IL-15R α 複合体の投与によって、IRF-1 KO の肝臓内の NK、NKT、CD8⁺ T 細胞の数が増加したが、CD4⁺ T 細胞は増加しなかった。これらのデータは、IRF-1 KO マウスにおける肝臓内の NK、NKT、CD8⁺ T 細胞の欠損は、IRF-1 KO マウス体内の IL-15/IL-15R α 複合体の発現が低下している事が原因であり、IL-15/IL-15R α 複合体を全身投与する事で IRF-1 KO マウスの肝臓内のこれらのリンパ球数を回復させる事ができるという事を示唆した。

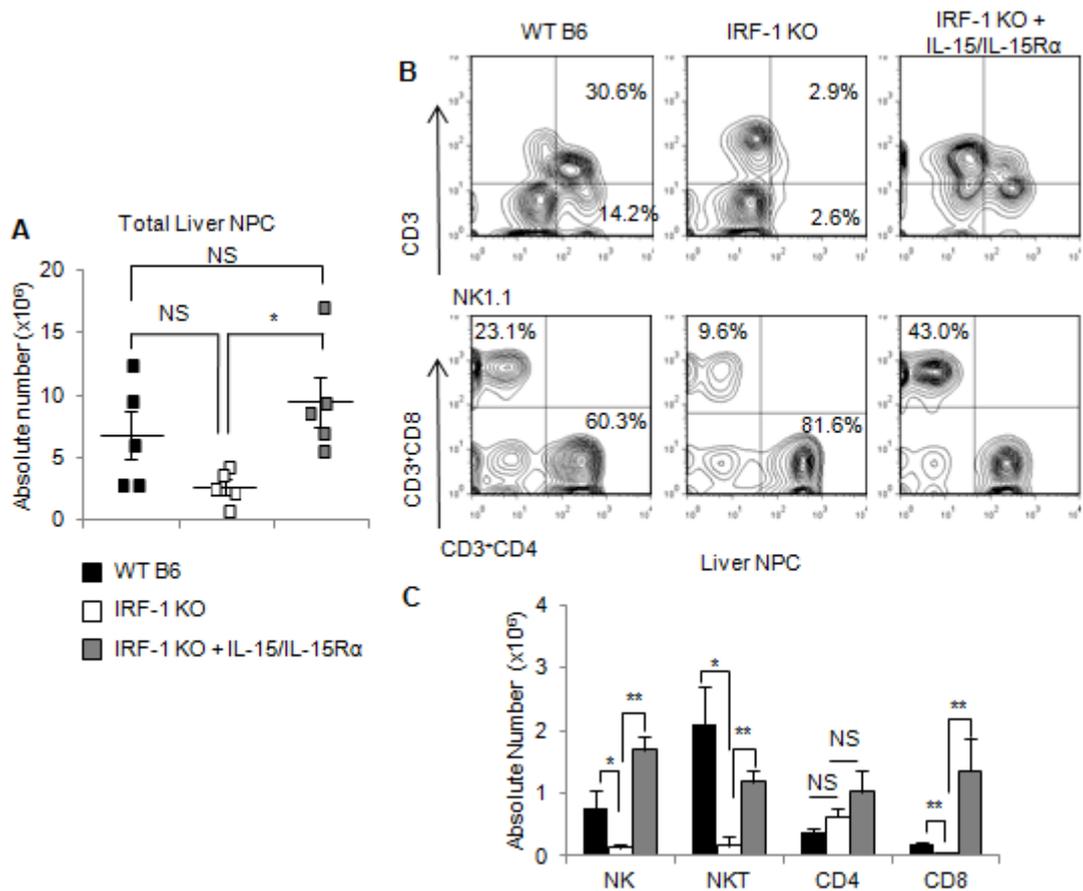


図 13. IRF-1 は定常状態において肝内 NK、NKT、CD8⁺ T 細胞の数を、可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体産生を介して制御する。

(A) WT B6 マウス、IRF-1 KO マウス、可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を分離の 4 日前に投与された IRF-1 KO マウスから分離された肝臓内非実質細胞(non-parenchymal cells (NPC)の絶対数。(平均 \pm 標準誤差; n=5); *p<0.05.

(B) 肝臓内リンパ球の頻度を CD45⁺細胞のパーセンテージで示した図。(n=5)

(C) 棒グラフは各リンパ球分画の絶対数を示す (平均 \pm 標準誤差; n=5); *p<0.05、**p<0.01.

IRF-1 KO 肝グラフトは虚血再灌流障害から保護されるが、IL-15/IL-15R α 複合体を術前投与する事で虚血再灌流障害は悪化する。

以前行われた研究ではNK (65)、NKT (66)、CD4⁺ T 細胞 (67) を含む肝臓内リンパ球は肝臓部分温虚血再灌流障害モデルの病態において重要な役割を果たしている事が示された。肝臓部分温虚血再灌流障害モデルと冷保存後の肝移植後に起きる冷虚血再灌流障害では同様のメカニズムを介して障害が起きる事もある (3) が、この二つの異なる実験モデルは必ずしも相関するわけではない (68, 69)。これまで肝移植後に起きる冷虚血再灌流障害におけるドナー肝臓由来リンパ球の役割を調べた研究はわずか (12, 70) であり、IRF-1 と IL-15/IL-15R α 複合体によって制御されている肝臓内NK、NKT、CD8⁺ T 細胞がどの様に肝移植後の冷虚血再灌流障害に影響を与えるかは明らかではない。そのため、我々は 24 時間の冷保存後に同種異系肝移植を行った。ドナー肝臓は WT B6、IRF-1 KO、可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を術前に投与した IRF-1 KO マウスから採取し、C3H レシピエントに移植した。図 14A に示されたように、IRF-1 KO ドナー肝を移植したレシピエントの血清 ALT と AST レベルは WT 肝臓を移植したレシピエントに比べると有意に低く、IRF-1 KO 肝グラフトは虚血再灌流障害から保護された。移植後肝臓組織の病理学的検討でも、IRF-1 KO 肝グラフトは WT 肝グラフトに比べて、病理組織学的障害を評価するスズキスコアでうっ血、壊死のスコアが有意に低かった (図 14B、14C)。しかし術前に可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を投与した IRF-1 KO マウスから採取した肝臓グラフトを C3H に移植すると、血清 ALT、AST レベルは上昇し、組織学的にもスズキスコアの悪化がみられ、IRF-1 KO と比較して虚血再灌流障害は悪化した (図 14A-C)。

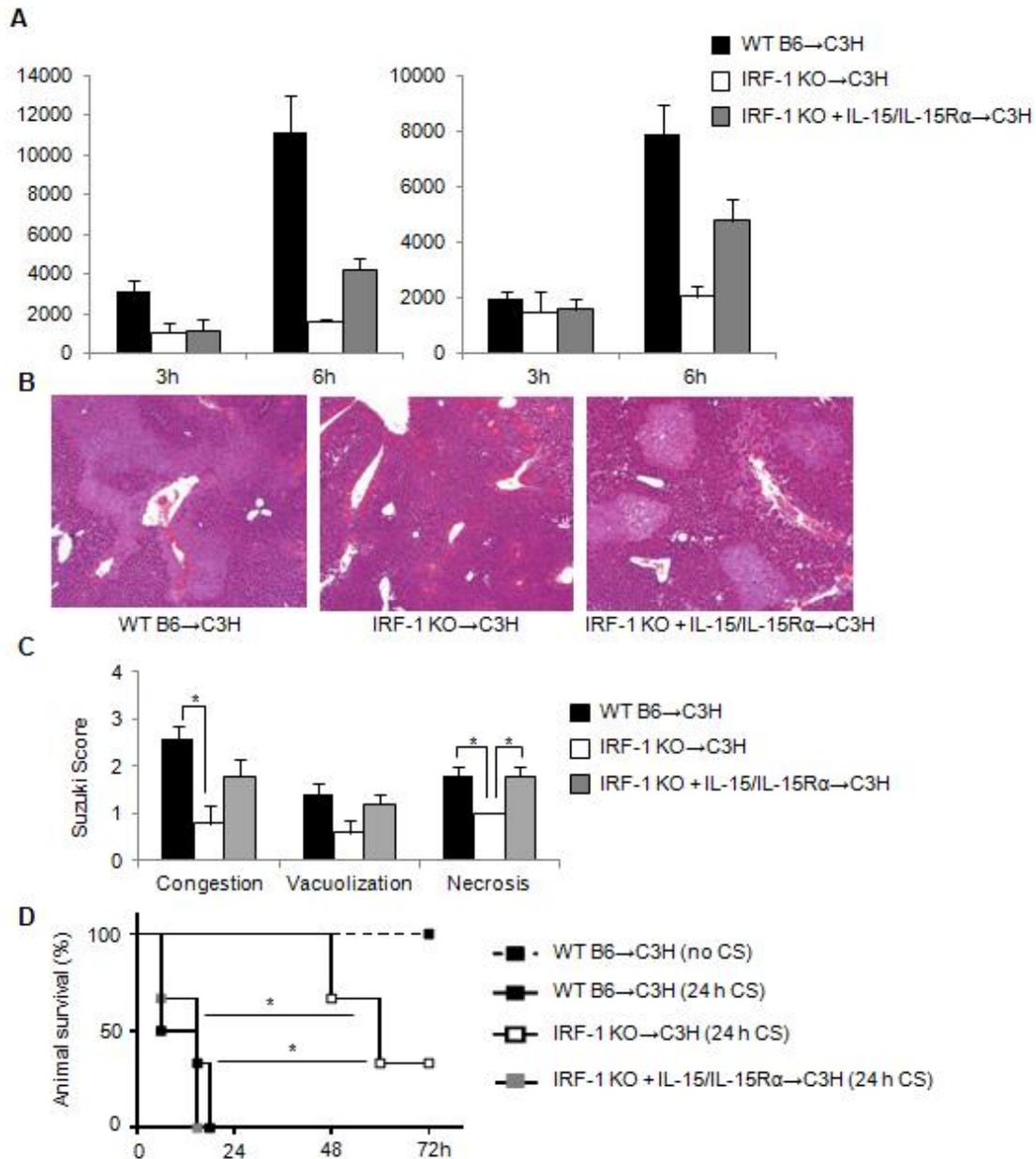


図 14. IRF-1 は IL-15/IL-15R α 複合体を介して虚血再灌流障害に寄与する。

(A) 再灌流後 3 時間と 6 時間の時点での同種異系肝臓グラフトレシピエントの血清 ALT と AST (平均±標準誤差; 各群 n=3-5); *p<0.05, **p<0.01.

(B) 肝臓組織では IRF-1 KO 肝臓グラフトレシピエントでは肝障害が有意に低下し、IRF-1 KO に可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を投与すると肝障害が部分的に悪化した。

(C) スズキスコアで評価した肝障害の程度 (平均±標準誤差; 各群 n=3-5); *p<0.05.

(D) 各群の生存率。長時間の冷保存時間がない WT 肝グラフトを移植されたレシピエント (no CS) (n=3)、24 時間冷保存された WT 肝グラフト (24h CS) (n=6), 24 時間冷保存された IRF-1 KO 肝グラフト (n=3)、術前に可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体が投与された IRF-1 KO (n=3); *p<0.05, log rank test.

IRF-1 KO 肝グラフトの生存は延長するが、生存延長効果は IL-15/IL-15R α 複合体によって低下する。

我々はさらにグラフトの生存率を検証し、ドナー肝臓内の IRF-1 欠損が、長期冷保存後の肝移植後虚血再灌流モデルにおいて同種異系肝臓グラフトの生存を延長しうるのか評価した。長時間の冷保存がない（保存時間 1 時間程度）WT 肝グラフトの移植ではレシピエントは 100% 生存したが、24 時間の冷保存時間後に移植した WT 肝グラフトの移植後にレシピエントが 24 時間以上生存する事はなかった（図 14D）。対照的に、IRF-1 KO グラフトのレシピエントは 24 時間の冷保存時間でも WT 肝グラフトに比べ有意に生存率が改善した。しかし、術前に可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を投与した IRF-1 KO 肝グラフトの生存率は有意に低下した。

IL-15R α KO 肝グラフトは虚血再灌流障害から保護される。

我々は IRF-1 KO マウスで観察された効果が、IL-15 R α KO マウスでも再現できるか検証するために、WT と IL-15R α KO 同種異系肝グラフトのレシピエント間の肝障害も比較した。WT 肝グラフトのレシピエントと比較して、IL-15R α KO 肝グラフトは再灌流後 6 時間の時点で肝障害から有意に保護され、血清 ALT と AST は低かった（ALT 30, 827 \pm 1, 988 vs 18, 967 \pm 1, 810 IU/l; ALT 13, 067 \pm 965 vs 8, 353 \pm 392 IU/l; n=3 移植/各群、p<0.05）。

IRF-1 KO 肝グラフトではドナー由来 NK1.1⁺ 細胞、細胞障害エフェクター分子、炎症性サイトカインが減少しており、可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を術前投与する事でこれらは回復する。

再灌流後 6 時間の時点で肝臓内細胞をフローサイトメトリー解析した結果、WT 肝グラフトに比べ、IRF-1 KO グラフトでは NK と NKT 細胞の数が著しく減少していた (図 15A)。対照的にマクロファージ、DC、CD4⁺T 細胞の絶対数に有意差はなかった。そして移植をしない状態では肝臓内の CD8⁺T 細胞の絶対数には有意差がみられたにも関わらず、移植後肝臓内においては CD8⁺T 細胞の絶対数には WT と IRF-1 KO グラフトで有意差はなかった。我々はこの移植前と移植後の CD8⁺T 細胞の絶対数の不一致は、肝臓内 NK1.1⁺細胞群と CD8⁺細胞のグラフト内での動態の違いが原因ではないかと仮説を立てた。図 15B に示したように、再灌流後 6 時間の時点で、ほぼ全て (~95%) の肝臓内 NK1.1⁺細胞はドナー由来 (H2^{b+}) であったが、CD8⁺細胞はほとんどがレシピエント由来のグラフト浸潤細胞 (H2^{b-}) であった。

我々は次に NK 細胞と NKT 細胞の中で IFN- γ ⁺細胞を評価した。IRF-1 KO 肝グラフト内では、これらの細胞は有意に減少していた (図 15C)。術前に可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を投与した結果、IRF-1 KO 肝グラフト内の NK1.1⁺細胞群の絶対数と IFN- γ 陽性率は回復した。IRF-1 KO 肝臓内の NK と NKT 細胞の減少と一致して、細胞障害性リンパ活性分子である NKG2D、IFN- γ 、細胞性メディアエーター (グランザイム B、パーフォリン) の mRNA は IRF-1KO グラフト内で WT グラフトに比べて有意に減少していた (図 16A)。しかし術前に可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を投与した結果、これらの細胞障害性エフェクター分子の発現は全て回復した。

図 16B に示したように、血清中の炎症性サイトカイン (IFN- γ 、IL-6、TNF- α) は WT グラフトのレシピエントに比べて、IRF-1 KO グラフトのレシピエントで有意に減少していた。しかし術前に可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を投与した結果、IRF-1 KO グラフトレシピエントの血清サイトカインレベルは、WT グラフトレシピエントの場合とほぼ同様のレベルまで (IFN- γ と TNF- α)、また

は部分的に (IL-6) 回復した。

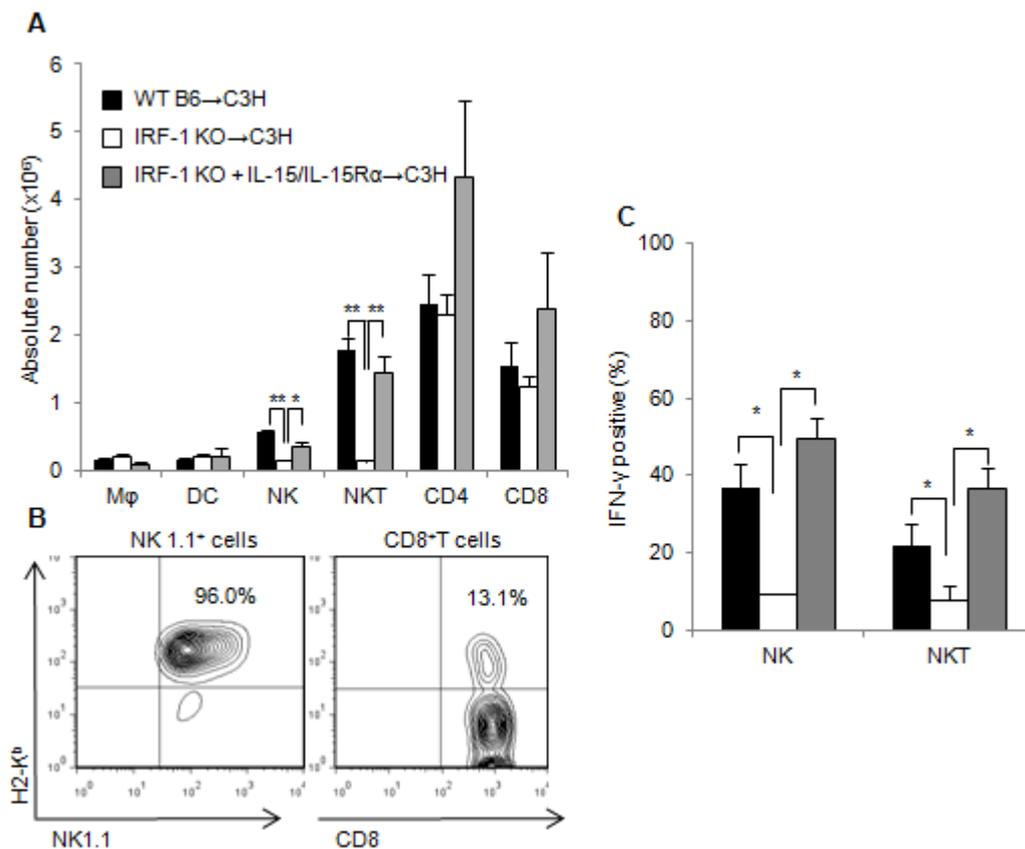


図 15. IRF-1 は可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を介してドナー由来 NK と NKT 細胞とこれらの細胞による IFN- γ 産生を制御する。

(A) 術後 6 時間の時点で分離された肝グラフト内の白血球各分画の絶対数。(平均±標準誤差; 各群 n=3-5); *p<0.05、**p<0.01。

(B) 肝臓グラフトレシピエントから分離された肝内ドナー由来 (H2^{b+}) NK1.1⁺ and CD8⁺T 細胞頻度を肝臓内 CD45⁺細胞のパーセンテージで示した。

(C) 3つの移植群の肝臓グラフト内の IFN- γ ⁺ NK と NKT 細胞 (平均±標準誤差; 各群 n=3); *p<0.05.

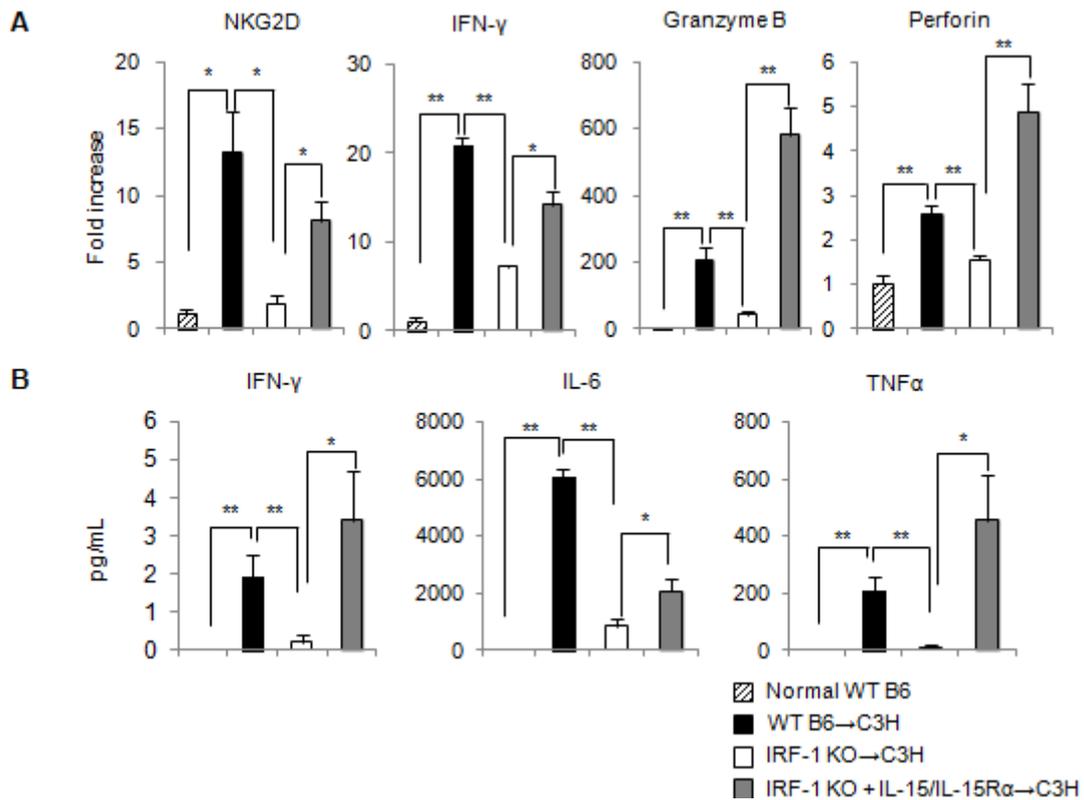


図 16. 可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体は肝グラフト内の細胞障害性エフェクター分子の発現を増加させ全身性炎症反応を促進する。

(A) 術後 6 時間の時点での肝臓グラフト内の細胞障害性分子の発現 (平均±標準誤差; 各群 n=3); *p<0.05、**p<0.01。

(B) cytokine bead array で測定した血清 IFN- γ 、IL-6、TNF α 蛋白発現レベル (平均±標準誤差; 各群 n=5); *p<0.05、**p<0.01。

可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体の術前投与は、IRF-1 KO の肝細胞死を悪化させる。

我々は次に、可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を投与した際に観察された細胞障害性エフェクター

分子と炎症性サイトカインの増加が TUNEL 染色によって評価された肝細胞死と相関があるかを検証した。図 17A と 17B に見られるように、IRF-1 KO グラフトは TUNEL 陽性肝細胞が WT グラフトの場合に比べて有意に少なかったが、可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を IRF-1 KO グラフトに投与すると TUNEL 陽性細胞が増加した。TUNEL 陽性細胞の増加は WT グラフトと同様のレベルには達しなかった。血清トランスアミナーゼ (図 14A) で示された肝障害の程度と一致していた。我々はこの完全ではなく、部分的な肝障害の悪化と肝細胞死の増加は IRF-1 KO の肝細胞が細胞死に抵抗性であるからではないかと推測した。実際に IRF-1 はアポトーシスの重要なメディエーターであり、IRF-1 KO 肝細胞は IFN- α (71) と IFN- γ (72) によって誘導されるアポトーシスに抵抗性であるとの報告がある。IRF-1 KO 肝細胞が IFN- γ による肝細胞死に抵抗性であるという事を検証するために、我々は WT または IRF-1 KO マウスから分離した肝細胞を IFN- γ と培養し、肝細胞の生存率を確認した。IFN- γ 存在下で 24 時間培養した後、WT 肝細胞の生存率は著しく低下 (~80%) したが、IRF-1 KO 肝細胞は比較的高い生存率を示し、IFN- γ による細胞死に抵抗性である事を示した (図 17C)。

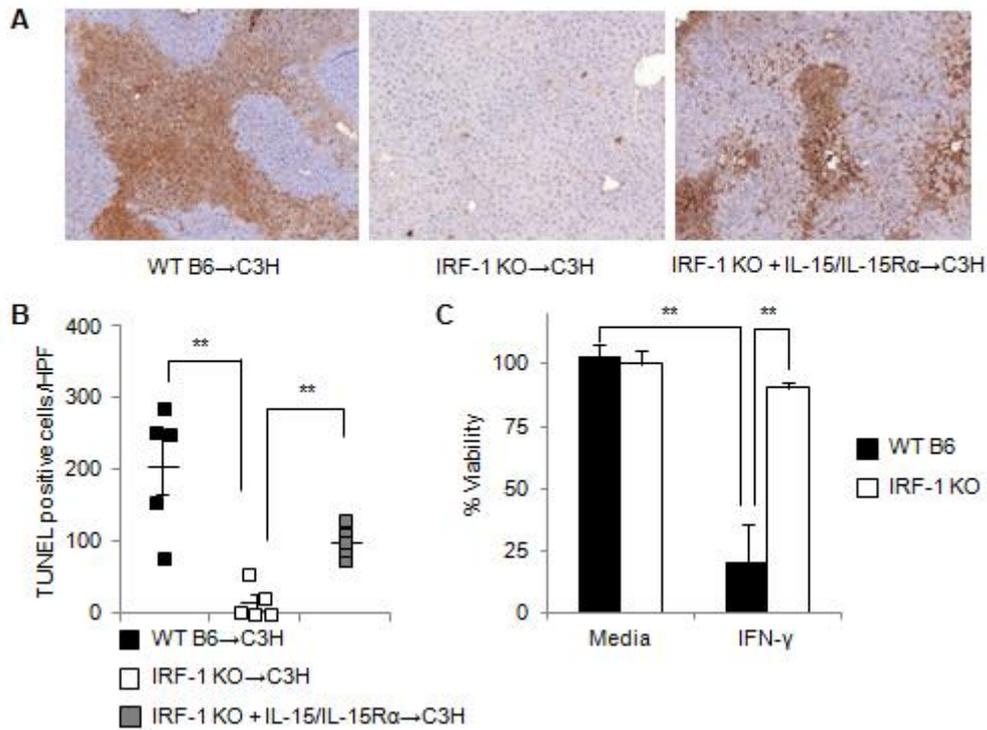


図 17. 可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体は肝グラフト内の肝細胞死を促進する。

(A) WT, IRF-1KO または IL-15/IL-15R α を術前投与された IRF-1KO ドナーをレシピエントに移植後 6 時間の時点の肝組織の TUNEL 染色。

(B) 1 視野あたりの TUNEL⁺ 細胞 (倍率 x200) を各移植群で定量し比較した。(平均±標準誤差; 各群 n=5); **p<0.01.

(C) 肝細胞の生存率を MTT 試験で測定。WT もしくは IRF-1KO マウスから分離された肝細胞を通常の培地または IFN- γ (1000U/ml) を含む培地で 24 時間培養し、肝細胞の生存率を測定した。; **p<0.01。

ヒト肝細胞は IRF-1、IL-15、IL-15R α を発現しており、IRF-1 の遺伝子を抑制すると IL-15 と IL-15R α の両方の発現が低下する。

次に我々は、組織学的に正常であり外科的に切除されたヒト肝臓組織から肝細胞を分離して、IRF-1、IL-15、と IL-15R α の発現を評価した。IRF-1 mRNA は刺激後 1 時間で発現が亢進し、3 時間でピークを迎えた (図 18A)。これらのデータは我々がマウス、ラットの肝細胞を用いて得た結果と同様であった (13, 49)。IL-15 と IL-15R α の発現誘導は刺激後 3 時間以内に生じて、6 時間後にピークに達した (図 18B, 18C)。次に、IRF-1 が直接ヒト肝細胞内の IL-15 と IL-15R α の発現を制御しているのか確認するために、IRF-1 を特異的に抑制する microRNA を含んだアデノウィルスベクター (Ad-IRF-1-shRNA) を使用した (52)。遺伝子導入効率は GFP 蛋白の発現で評価して、90% 以上の導入効率であった (図 18D)。コントロールベクター (Ad-SCR-shRNA) と比べても、Ad-IRF-1-shRNA ベクターは効果的に定常状態でのヒト肝細胞内の IRF-1 の発現 (データ非表示) と LPS と IFN- γ で惹起される IRF-1 の発現を抑制した。また IRF-1 の遺伝子発現を抑制する事で、定常状態における IL-15 mRNA と IL-15R α mRNA の発現 (データ非表示) 及び刺激された際に惹起される IL-15 と IL-15R α の発現が抑制された。これらの結果は IRF-1 がヒト肝細胞において IL-15 と IL-15R α の mRNA の発現を制御する上で重要な役割を果たしている事を示した。本研究において判明した結果とその解釈は図 19 で要約した。

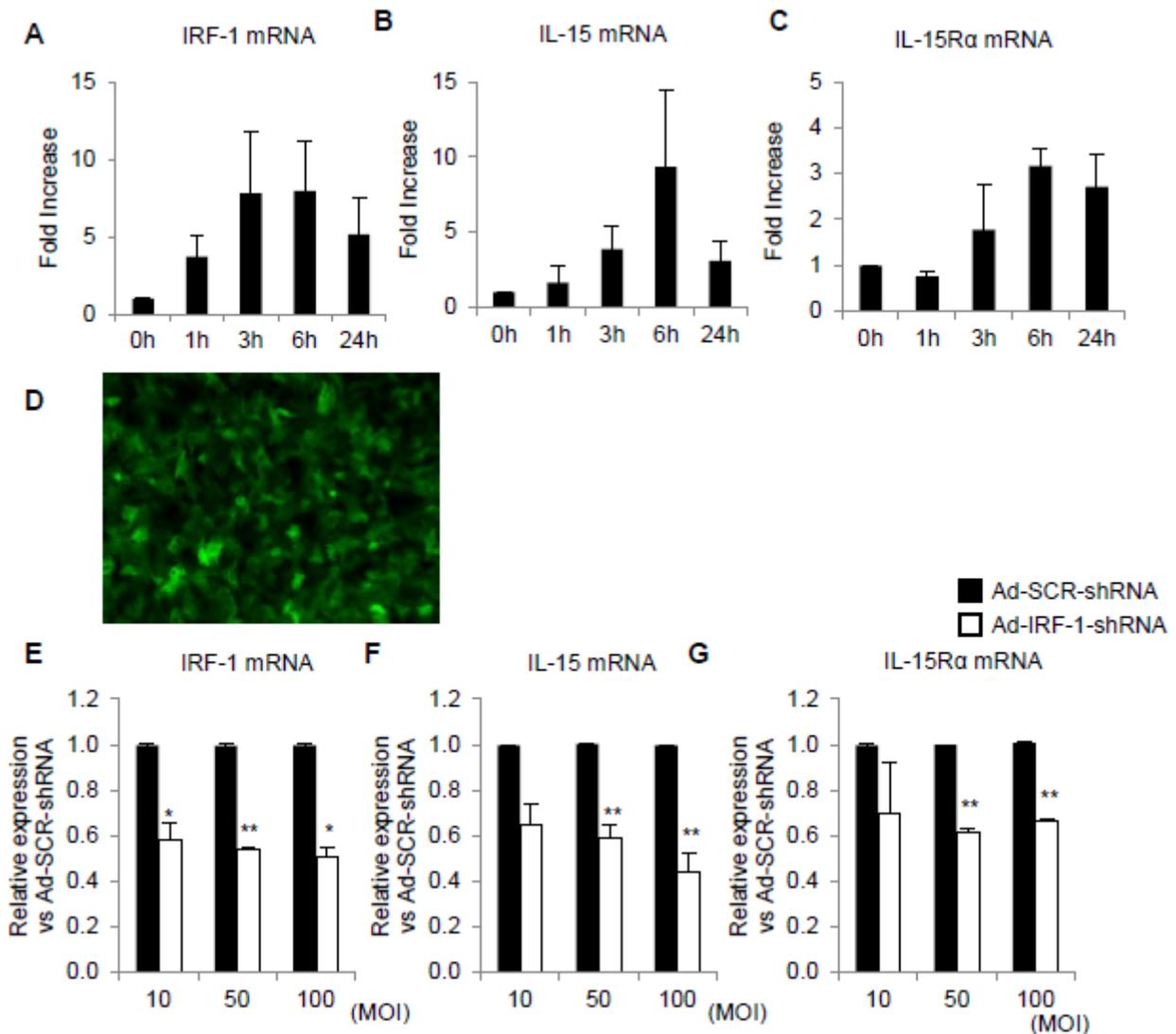


図 18. IRF-1 は ヒト肝細胞における IL-15 と IL-15R α を制御する。
 (A-C) リアルタイム RT-PCR で測定したヒト初代培養肝細胞における IRF-1 (A), IL-15 (B) と IL-15R α mRNA (C) の発現の経時的変化。肝細胞は LPS (30 μ g/ml) と IFN- γ (250U/ml)を含む培地で培養された。データは刺激されていない肝細胞を 1 として示した。(平均 \pm 標準誤差; 各群 n=3)
 (D-G) Ad-IRF-1-shRNA またはコントロールベクター(Ad-SCR-ShRNA)で遺伝子導入後 48 時間後のヒト初代肝細胞の IRF-1 (E)、 IL-15 (F)、と IL-15R α mRNA (G) の発現をリアルタイム RT-PCR で測定し比較した。遺伝子導入効率は肝細胞の GFP 発現で確認した。肝細胞は LPS (30 μ g/ml) と IFN- γ (250U/ml)を含む培地で培養された、培養開始 6 時間後に RNA を抽出した。データは Ad-SCR-shRNA に対する相対的な発現量で表した。(平均 \pm 標準誤差; 各群 n=3); *p<0.05, **p<0.01.
 MOI = multiplicity of infection。

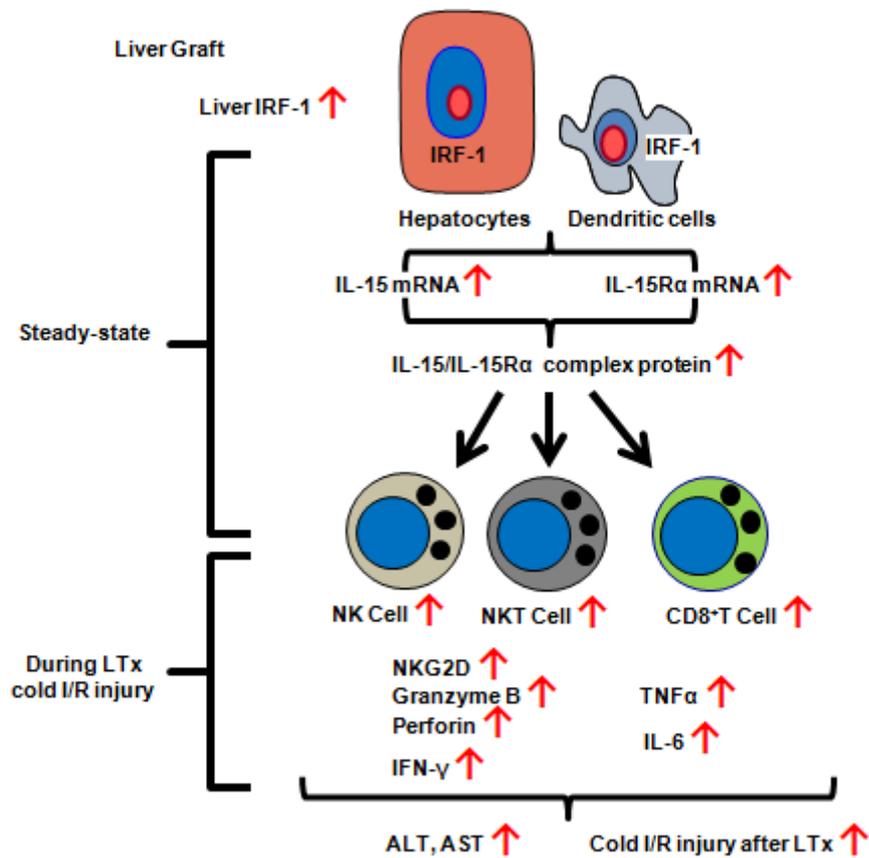


図 19. 本研究で得られた知見に基づいた IRF-1 の肝臓内リンパ球恒常性維持と肝移植後虚血再灌流障害における自然免疫活性化における役割に関する仮説。

肝細胞と DC において IRF-1 は IL-15 と IL-15R α mRNA の発現を制御し、これらの細胞による可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体産生 に関わっている。肝細胞は定常状態と炎症性の環境において可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体の主な産生源である。可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体は肝臓内の NK、NKT、CD8⁺T 細胞の恒常性維持と肝移植後の虚血再灌流時におけるこれらの細胞の活性化に参与している。虚血再灌流時においては、細胞障害性エフェクター分子（NKG2D, グランザイム B, パーフォリン, IFN- γ ）の発現が増幅され、レシピエント血清中には炎症性マーカー（IFN- γ , TNF α , IL-6)の上昇がみられる。これらの炎症反応によって、肝障害の悪化を来し、血清 ALT と AST レベルは有意に増加する。

第9章 考察

IRF ファミリーは、ほ乳類においては9つの転写因子から構成されており、造血細胞の発達、自然・適応免疫反応、癌発生などにおいて中心的な役割を果たしている(73)。IRF-1はこのファミリーの中で最初に同定され、低いレベルではあるが定常状態においても実質細胞と非実質細胞(NPC)の両方の様々な細胞に発現している。IRF-1の発現を強く誘導するものとしては、type I と type II IFN、LPS、ウィルス感染、二本鎖RNAに加え、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6などの様々なサイトカインが挙げられる(36, 74)。IRF-1は非常に多様な機能を果たしており、転写因子として発現を調節するターゲット遺伝子には抗菌反応、Th1免疫反応、アポトーシス誘導などに関わる iNOS、IL-12p40、カスパーゼ1などが挙げられる(32)。我々は以前 IRF-1 はマウスとラットを用いた冷保存後の同種同系肝移植に伴う虚血再灌流障害において肝細胞のアポトーシス誘導を促進する役割を果たしている事を示した(13, 51)。しかし、肝臓内の IRF-1 の発現が、定常状態においてどのような免疫調節性の役割を果たしているか、またこの免疫調節性の作用が冷保存後の同種異系肝移植に伴う虚血再灌流障害にどのような影響を及ぼすかは明らかではなかった。本研究では我々は IRF-1 KO ドナーグラフトは WT ドナーに比べて、冷保存後虚血再灌流障害において著しく保護される(～90%程度)という事を示した。本研究で判明したのは、IRF-1 KO グラフトにおいて IL-15/IL-15R α 複合体の発現が低下しており、その結果として虚血再灌流障害において自然免疫反応の低減と肝臓内のリンパ球減少がみられ、これらの一連の分子的機序が IRF-1 KO のグラフト保護作用に寄与しているという事である。

肝臓は、腸管で吸収された食物や腸内細菌に関連する物質を含んだ血液が門脈を介して直接流れる唯一の臓器である(75-77)。肝臓内の免疫細胞としてはNK細胞、NKT細胞、CD8⁺陽性細胞などが

他の実質臓器の場合に比べて豊富に含まれており (78-80)、これまでの研究では肝臓内の微小環境が、肝臓内の特徴的な免疫細胞の構成の維持に関わっていると考えられてきた (62, 77, 78)。しかし、具体的にどのように肝臓内のリンパ球の恒常性が維持されているのかという分子的機序は詳細には分かっていなかった。我々の知る限りにおいては、肝臓を構成する各細胞の IL-15/IL-15R α 複合蛋白産生能を検証した研究はこれまでなかった (48)。そのため我々は可溶性 IL-15/IL-15R α 複合蛋白産生源として肝臓内の実質細胞と NPC 両方を調べた。本研究は肝細胞が *in vitro* の刺激のない定常状態と刺激のある炎症環境の両方において可溶性 IL-15/IL-15R α 複合蛋白の主な産生源であるとする研究成果を示した我々が知る限りにおいて初めての報告である。我々は IRF-1 は肝細胞と肝内樹状細胞の IL-15 と IL-15R α mRNA の定常状態における発現と刺激により誘導された際の発現の両方を転写性に制御しているという事も示した。さらに我々は IRF-1 が定常状態と刺激された際に肝細胞と肝内樹状細胞により IL-15/IL-15R α 複合体産生に重要な役割を果たしている事を確認した。またヒト肝細胞を用いてマウスで得られた知見がヒトでも同様であることを示した。特異的に IRF-1 を抑制する事で、IRF-1 が定常状態と刺激により誘導された際の IL-15 と IL-15R α mRNA の発現を制御しているという事を示す事ができた。

これらの知見は IL-15 に関して新たな理解をもたらしたと思われる。骨髄移植を用いた骨髄キメラ実験によって、これまでの考えでは放射線抵抗性の骨髄間質細胞の IRF-1 の発現が IL-15 の発現誘導に重要であり、その結果 NK 前駆細胞の骨髄における成熟に関わるとされてきた (32, 36, 38, 42, 43)。しかし、これまでの報告では、肝細胞のような他の放射線抵抗性実質細胞が臓器内のリンパ球の発達・成熟に重要な役割を果たしているという可能性を除外していなかった。最近の報告では肝細胞のような実質細胞も IL-15 や IL-15R α 蛋白を発現しており (60)、またそのことで T 細

胞生存や CD8⁺陽性細胞の分化に有利な微小環境を作っているとの結果が報告された(81)。実際に我々も本研究で肝細胞が可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を、樹状細胞などを含む他の免疫細胞に比べても、多量に分泌するという事を示した(58, 59)。興味深い事に、肝細胞が可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体の主な産生源であるという本研究で得られた知見は、肝細胞が IL-7 (IL-15 と同じコモンサイトカインレセプター γ 。ファミリーの一員であり、ナイーブとメモリーCD4⁺ と CD8⁺細胞の生存を延長する作用を持つ) の産生源であるとする最近の報告(82)と一致している。また我々の報告は、IRF-1 が Huh7 (ヒト肝細胞癌細胞株) 細胞での IL-15R α の発現誘導を制御しており、また IRF-2 (IRF ファミリーの一員) が IL-7 と IL-15R α の発現を制御しているとする最近の報告とも関連している(83)。後者の報告では IRF-2 は C 型肝炎ウイルス感染によって肝臓での発現が著しく低下し、結果として肝細胞の IL-7 と IL-15R α が低下する事により、C 型肝炎ウイルスに特異的な CD8⁺細胞による反応性が低下し、その結果 C 型肝炎ウイルスを排除できなくなり、C 型肝炎ウイルス感染が持続する可能性が示唆された(83)。

肝細胞が肝臓の細胞の大部分 (60-80%) を占める事を考えると(77)、本研究での知見とこれまでに報告された結果から、肝細胞の IRF-1 発現は可溶性 IL-15/IL-15R α 複合蛋白産生を介して、肝臓内の NK 細胞、NKT 細胞、CD8⁺T 細胞の発達・維持に重要な役割を果たしている可能性があることを示唆された。実際に IRF-1 KO マウスの肝臓から分離したリンパ球のうち NK 細胞、NKT 細胞、CD8⁺T 細胞の数は WT マウスに比べて著しく減少していた。IRF-1 KO マウスに可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を投与すると、肝臓内の NK 細胞、NKT 細胞、CD8⁺T 細胞の数は WT マウスとほぼ同等になった。これらの結果を総合すると IRF-1 KO マウスの肝臓のリンパ球数が低下しているのは、IL-15/IL-15R α 複合蛋白の発現が低下しているからであり、IRF-1 KO マウスの造血細胞は外部か

ら投与された可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体に反応して分化し増殖する能力を保持しているという事が示唆された。これらの結果は IRF-1 KO マウスの骨髄細胞に対してリコンビナント IL-15 を加えると *in vitro* で増殖するという結果と一致している (38)。しかし我々の結果は、骨髄間質細胞と肝臓実質細胞のそれぞれがどの程度肝臓内の NK 細胞、NKT 細胞、CD8⁺T 細胞の分化・維持に寄与しているのかは明らかにできなかった。肝細胞特異的 IRF-1 欠損マウスを作製する事ができれば、明らかになる可能性がある。

我々の *in vivo* の結果は、冷保存後の虚血再灌流障害において肝グラフト内の肝細胞と NPC には、IRF-1 依存性に IL-15 と IL-15R α mRNA が発現しているという事を示した。IL-15 と IL-15R α mRNA は NPC よりも肝細胞で有意に発現が亢進しており、肝細胞がやはり IL-15 と IL-15R α の主な産生源である事を示唆した。レシピエント血清中の可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体は WT グラフトでは再灌流後 6 時間の時点で上昇したが、IRF-1 KO グラフトでは上昇しなかった。これらの結果は、可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体の産生源は主に肝臓グラフトであり、レシピエント由来の細胞ではないという事を示唆した。IRF-1 KO グラフトのレシピエントの血清中の可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体はほぼ正常値であり、生存率の改善、肝障害の軽減、TUNEL⁺細胞の減少、グラフト NK と NKT 細胞の減少、細胞障害性エフェクター分子 (NKG2D、グランザイム B、パーフォリン) と炎症性サイトカイン (IFN- γ 、IL-6、TNF- α) の減少と相関した。IRF-1 KO ドナーに可溶性 IL-15/IL-15R α 複合体を投与すると、細胞障害性エフェクター分子と炎症性サイトカインは有意に上昇し、肝障害と肝細胞死は部分的に悪化し、レシピエント生存率は低下した。これらの事は、外因性 IL-15/IL-15R α 複合体は肝臓内での免疫細胞の発達と増殖を促進し、IRF-1 KO 肝グラフトレシピエントの自然免疫応答を回復させ、肝移植後の肝細胞の生存率に影響を与える事を示唆した。これ

らの *in vivo* 実験での新知見は、外因性 IL-15 は炎症性サイトカインを誘導するとして報告と一致する。この報告によると、リコンビナント IL-15 を 7 日間正常の WT マウスに投与すると肝臓内の炎症性サイトカイン (IFN- γ と TNF α) の発現増加、組織学的炎症所見と肝臓内での caspase-3⁺ 細胞の増加がみられた (60)。我々は更に外因性 IL-15/IL-15R α 複合体の IRF-1 KO 同種異系グラフト内での炎症促進効果が IL-15R α -KO グラフトで再現できるか検証した。IL-15R α -KO グラフトレシピエントは WT グラフトのレシピエントに比べて有意に低い ALT、AST 値がみられ、肝臓グラフトは肝障害から保護された。これらの結果はドナー肝グラフトの IL-15R α 欠損は肝臓を障害から保護するように作用し、IRF-1 KO を用いた実験で得られた内容と同様の結果であった。本研究で得られた知見は、IL-15 が NK1.1⁺細胞と CD8 細胞の生存と活性化に関わり (84-88)、NKG2D、グランザイム B、パーフォリン、IFN- γ の発現を亢進するとして様々な炎症や感染モデルで得られた知見と一致する (56, 89-92)。術前に IL-15/IL-15R α 複合体を投与した IRF-1 KO マウスの肝グラフトにおいて、肝障害が完全にではなく、部分的に悪化したのは以前報告された (13, 71, 72) ように IRF-1 KO マウスの肝細胞がアポトーシスに抵抗性であるからではないかと仮説を立てた。本研究では IRF-1 KO 肝細胞は WT 肝細胞に比べて IFN- γ による細胞死に抵抗性であることがわかった。これらの結果を統合すると、本研究の結果によって、IRF-1 は IL-15/IL-15R α 複合体を介して自然免疫応答を制御しており、肝移植後の虚血再灌流障害の病態において重要な役割を果たしているという事を示した。

第 10 章 おわりに

本研究は、IRF-1 が肝実質細胞と肝臓内免疫細胞による IL-15/IL-15R α 産生を介して肝臓内の NK、NKT、CD8⁺T 細胞の生存・維持に関わっており、同種異系肝臓移植後に生じる虚血再灌流障害において、自然免疫応答を活性化する事で肝障害に寄与するという事を新たに示した。我々の新知見は、IRF-1 もしくはその下流にある IL-15/IL-15R α をターゲットとすることが、肝移植後の虚血再灌流を低減するために効果的なアプローチになる事が示唆された。

謝辞

本論文の作成にあたり、自治医科大学消化器・一般外科 安田是和 前主任教授、Thomas E. Starzl Transplantation Institute, Department of Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine の Angus W. Thomson 教授、David A. Geller 教授から貴重な御指導と御助言を賜りました。

研究期間中に御助言を下された村瀬紀子先生、植木伸也先生、Kikumi S. Ozaki 先生、木村鐘康先生、また日々の研究遂行にあたり様々な形で御協力頂いた吉田理先生（現愛媛大学消化器・内分泌・代謝内科学）小野嘉大先生、Angélica Pérez-Gutiérrez 先生、笠原尚哉先生、寺谷工先生にこの場を借りて深く感謝致します。

また本研究期間中に様々な形で御支援下さった自治医科大学 消化器・一般外科佐田尚宏主任教授、Alan K. Lefor 教授、小西宏明中央手術部前教授、宮倉安幸先生、鯉沼広治先生、笹沼英紀先生、三木厚先生に御礼申し上げます。

本論文は、以下の二つの論文を元に作成された。

1. Yokota S, Ueki S, Ono Y, Kasahara N, Perez-Gutierrez A, Kimura S, Yoshida O, Murase N, Yasuda Y, Geller DA, Thomson AW. Orthotopic mouse liver transplantation to study liver biology and allograft tolerance. *Nature Protocols* 11: 1163-1174 (2016)
DOI:10.1038/nprot.2016.073
2. Yokota S, Yoshida O, Dou L, Spadaro AV, Isse K, Ross MA, Stolz DB, Kimura S, Du Q, Demetris AJ, Thomson AW, Geller DA. IRF-1 promotes liver transplant ischemia/reperfusion injury via hepatocyte IL-15/IL15R α production. *J. Immunol* 194 (12): 6045-6056 (2015)
DOI: 10.4049/jimmunol.1402505.

Copyright©2015 The American Association of Immunologists, Inc.

引用文献

1. Wertheim, J. A., H. Petrowsky, S. Saab, J. W. Kupiec-Weglinski, and R. W. Busuttil. 2011. Major challenges limiting liver transplantation in the United States. *Am J Transplant* 11: 1773-1784.
2. Nickkholgh, A., J. Weitz, J. Encke, P. Sauer, A. Mehrabi, M. W. Buchler, J. Schmidt, and P. Schemmer. 2007. Utilization of extended donor criteria in liver transplantation: a comprehensive review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 22 Suppl 8: viii29-viii36.
3. Zhai, Y., H. Petrowsky, J. C. Hong, R. W. Busuttil, and J. W. Kupiec-Weglinski. 2013. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 79-89.
4. Zhai, Y., R. W. Busuttil, and J. W. Kupiec-Weglinski. 2011. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant* 11: 1563-1569.
5. Furukawa, H., S. Todo, O. Inventarza, A. Casavilla, Y. M. Wu, C. Scotti-Foglieni, B. Broznick, J. Bryant, R. Day, and T. E. Starzl. 1991. Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplantation* 51: 1000-1004.
6. Burroughs, A. K., C. A. Sabin, K. Rolles, V. Delvart, V. Karam, J. Buckels, J. G. O'Grady, D. Castaing, J. Klempnauer, N. Jamieson, P. Neuhaus, J. Lerut, J. de Ville de Goyet, S. Pollard, M. Salizzoni, X. Rogiers, F. Muhlbacher, J. C. Garcia Valdecasas, C. Broelsch, D. Jaeck, J. Berenguer, E. M. Gonzalez, R. Adam, and A. European Liver Transplant. 2006. 3-month and 12-month mortality after first liver transplant in adults in Europe: predictive models for outcome. *Lancet* 367: 225-232.
7. Howard, T. K., G. B. Klintmalm, J. B. Cofer, B. S. Husberg, R. M. Goldstein, and T. A. Gonwa. 1990. The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation* 49: 103-107.
8. Chong, A. S., M. L. Alegre, M. L. Miller, and R. L. Fairchild. 2013. Lessons and limits of mouse models. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a015495.
9. Qian, S. G., J. J. Fung, A. V. Demetris, S. T. Ildstad, and T. E. Starzl. 1991. Orthotopic liver transplantation in the mouse. *Transplantation* 52: 562-564.
10. Kamada, N., and R. Y. Calne. 1979. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 28: 47-50.
11. Klein, I., and I. N. Crispe. 2006. Complete differentiation of CD8+ T cells activated locally within the transplanted liver. *J Exp Med* 203: 437-447.
12. Ueki, S., A. Castellaneta, O. Yoshida, K. Ozaki, M. Zhang, S. Kimura, K. Isse, M. Ross, L. Shao, D. B. Stolz, A. W. Thomson, A. J. Demetris, D. A. Geller, and N. Murase. 2011. Hepatic B7 homolog 1 expression is essential for controlling cold ischemia/reperfusion injury after mouse liver transplantation. *Hepatology* 54: 216-228.
13. Ueki, S., R. Dhupar, J. Cardinal, A. Tsung, J. Yoshida, K. S. Ozaki, J. R. Klune, N. Murase, and D. A. Geller. 2010. Critical role of interferon regulatory factor-1 in murine liver transplant ischemia reperfusion injury. *Hepatology* 51: 1692-1701.

14. Yoshida, O., S. Kimura, E. K. Jackson, S. C. Robson, D. A. Geller, N. Murase, and A. W. Thomson. 2013. CD39 expression by hepatic myeloid dendritic cells attenuates inflammation in liver transplant ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatology* 58: 2163-2175.
15. Yokota, S., O. Yoshida, L. Dou, A. V. Spadaro, K. Isse, M. A. Ross, D. B. Stolz, S. Kimura, Q. Du, A. J. Demetris, A. W. Thomson, and D. A. Geller. 2015. IRF-1 promotes liver transplant ischemia/reperfusion injury via hepatocyte IL-15/IL-15R α production. *J Immunol* 194: 6045-6056.
16. Yoshida, O., S. Kimura, L. Dou, B. M. Matta, S. Yokota, M. A. Ross, D. A. Geller, and A. W. Thomson. 2014. DAPI2 deficiency in liver allografts results in enhanced donor DC migration, augmented effector T cell responses and abrogation of transplant tolerance. *Am J Transplant* 14: 1791-1805.
17. Qian, S., A. J. Demetris, N. Murase, A. S. Rao, J. J. Fung, and T. E. Starzl. 1994. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 19: 916-924.
18. Dahmen, U., S. Qian, A. S. Rao, A. J. Demetris, F. Fu, H. Sun, L. Gao, J. J. Fung, and T. E. Starzl. 1994. Split tolerance induced by orthotopic liver transplantation in mice. *Transplantation* 58: 1-8.
19. Conzelmann, L. O., Z. Zhong, H. Bunzendahl, M. D. Wheeler, and J. J. Lemasters. 2003. Reduced-size liver transplantation in the mouse. *Transplantation* 76: 496-501.
20. Tian, Y., R. Graf, W. Jochum, and P. A. Clavien. 2003. Arterialized partial orthotopic liver transplantation in the mouse: a new model and evaluation of the critical liver mass. *Liver Transpl* 9: 789-795.
21. Demetris, A. J., J. G. Lunz, 3rd, P. Randhawa, T. Wu, M. Nalesnik, and A. W. Thomson. 2009. Monitoring of human liver and kidney allograft tolerance: a tissue/histopathology perspective. *Transpl Int* 22: 120-141.
22. Sanchez-Fueyo, A., and T. B. Strom. 2011. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology* 140: 51-64.
23. Feng, S., U. D. Ekong, S. J. Lobritto, A. J. Demetris, J. P. Roberts, P. Rosenthal, E. M. Alonso, M. C. Philogene, D. Ikle, K. M. Poole, N. D. Bridges, L. A. Turka, and N. K. Tchao. 2012. Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants. *JAMA* 307: 283-293.
24. Tian, Y., H. A. Rudiger, W. Jochum, and P. A. Clavien. 2002. Comparison of arterialized and nonarterialized orthotopic liver transplantation in mice: prowess or relevant model? *Transplantation* 74: 1242-1246.
25. Shen, X. D., F. Gao, B. Ke, Y. Zhai, C. R. Lassman, S. Tsuchihashi, D. G. Farmer, R. W. Busuttil, and J. W. Kupiec-Weglinski. 2005. Inflammatory responses in a new mouse model of prolonged hepatic cold ischemia followed by arterialized orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 11: 1273-1281.
26. Steger, U., B. Sawitzki, A. M. Gassel, H. J. Gassel, and K. J. Wood. 2003. Impact of hepatic rearterialization on reperfusion injury and outcome after mouse liver transplantation. *Transplantation* 76: 327-332.
27. Starzl, T. E., and F. G. Lakkis. 2006. The unfinished legacy of liver transplantation: emphasis on immunology. *Hepatology* 43: S151-163.
28. Qian, S., J. J. Fung, A. J. Demetris, and T. E. Starzl. 1991. Allogeneic orthotopic liver transplantation in mice: a preliminary study of rejection across well-defined MHC barriers. *Transplant Proc* 23: 705-706.

29. Benseler, V., G. W. McCaughan, H. J. Schlitt, G. A. Bishop, D. G. Bowen, and P. Bertolino. 2007. The liver: a special case in transplantation tolerance. *Semin Liver Dis* 27: 194-213.
30. Morita, M., D. Joyce, C. Miller, J. J. Fung, L. Lu, and S. Qian. 2015. Rejection triggers liver transplant tolerance: Involvement of mesenchyme-mediated immune control mechanisms in mice. *Hepatology* 62: 915-931.
31. Yokota, S., O. Yoshida, Y. Ono, D. A. Geller, and A. W. Thomson. 2016. Liver transplantation in the mouse: Insights into liver immunobiology, tissue injury, and allograft tolerance. *Liver Transpl* 22: 536-546.
32. Taniguchi, T., K. Ogasawara, A. Takaoka, and N. Tanaka. 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19: 623-655.
33. Galon, J., C. Sudarshan, S. Ito, D. Finbloom, and J. J. O'Shea. 1999. IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells. *J Immunol* 162: 7256-7262.
34. Barber, S. A., M. J. Fultz, C. A. Salkowski, and S. N. Vogel. 1995. Differential expression of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2, and interferon consensus sequence binding protein genes in lipopolysaccharide (LPS)-responsive and LPS-hyporesponsive macrophages. *Infect Immun* 63: 601-608.
35. Miyamoto, M., T. Fujita, Y. Kimura, M. Maruyama, H. Harada, Y. Sudo, T. Miyata, and T. Taniguchi. 1988. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 54: 903-913.
36. Lohoff, M., and T. W. Mak. 2005. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 5: 125-135.
37. Gabriele, L., A. Fragale, P. Borghi, P. Sestili, E. Stellacci, M. Venditti, G. Schiavoni, M. Sanchez, F. Belardelli, and A. Battistini. 2006. IRF-1 deficiency skews the differentiation of dendritic cells toward plasmacytoid and tolerogenic features. *J Leukoc Biol* 80: 1500-1511.
38. Ogasawara, K., S. Hida, N. Azimi, Y. Tagaya, T. Sato, T. Yokochi-Fukuda, T. A. Waldmann, T. Taniguchi, and S. Taki. 1998. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391: 700-703.
39. Ohteki, T., H. Yoshida, T. Matsuyama, G. S. Duncan, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. 1998. The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ (NK1+ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells. *J Exp Med* 187: 967-972.
40. Guy-Grand, D., and P. Vassalli. 1993. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5: 247-252.
41. Matsuyama, T., T. Kimura, M. Kitagawa, K. Pfeffer, T. Kawakami, N. Watanabe, T. M. Kundig, R. Amakawa, K. Kishihara, A. Wakeham, and et al. 1993. Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* 75: 83-97.
42. Waldmann, T. A., and Y. Tagaya. 1999. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 17: 19-49.
43. Fehniger, T. A., and M. A. Caligiuri. 2001. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97: 14-32.
44. Waldmann, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy

- and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 6: 595-601.
45. Becknell, B., and M. A. Caligiuri. 2005. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol* 86: 209-239.
 46. Bergamaschi, C., J. Bear, M. Rosati, R. K. Beach, C. Alicea, R. Sowder, E. Chertova, S. A. Rosenberg, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 2012. Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Ralpha in human and mouse serum. *Blood* 120: e1-8.
 47. Mariner, J. M., Y. Mamane, J. Hiscott, T. A. Waldmann, and N. Azimi. 2002. IFN regulatory factor 4 participates in the human T cell lymphotropic virus type I-mediated activation of the IL-15 receptor alpha promoter. *J Immunol* 168: 5667-5674.
 48. Huntington, N. D. 2014. The unconventional expression of IL-15 and its role in NK cell homeostasis. *Immunol Cell Biol* 92: 210-213.
 49. Tsung, A., M. T. Stang, A. Ikeda, N. D. Critchlow, K. Izuishi, A. Nakao, M. H. Chan, G. Jeyabalan, J. H. Yim, and D. A. Geller. 2006. The transcription factor interferon regulatory factor-1 mediates liver damage during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G1261-1268.
 50. Dhupar, R., J. R. Klune, J. Evankovich, J. Cardinal, M. Zhang, M. Ross, N. Murase, D. A. Geller, T. R. Billiar, and A. Tsung. 2011. Interferon regulatory factor 1 mediates acetylation and release of high mobility group box 1 from hepatocytes during murine liver ischemia-reperfusion injury. *Shock* 35: 293-301.
 51. Kim, K. H., R. Dhupar, S. Ueki, J. Cardinal, P. Pan, Z. Cao, S. W. Cho, N. Murase, A. Tsung, and D. A. Geller. 2009. Donor graft interferon regulatory factor-1 gene transfer worsens liver transplant ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 146: 181-189.
 52. Cao, Z., R. Dhupar, C. Cai, P. Li, T. R. Billiar, and D. A. Geller. 2010. A critical role for IFN regulatory factor 1 in NKT cell-mediated liver injury induced by alpha-galactosylceramide. *J Immunol* 185: 2536-2543.
 53. Linfert, D., T. Chowdhry, and H. Rabb. 2009. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando)* 23: 1-10.
 54. Bamboat, Z. M., L. M. Ocuin, V. P. Balachandran, H. Obaid, G. Plitas, and R. P. DeMatteo. 2010. Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion. *J Clin Invest* 120: 559-569.
 55. Stoklasek, T. A., K. S. Schluns, and L. Lefrancois. 2006. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol* 177: 6072-6080.
 56. Kroemer, A., X. Xiao, N. Degauque, K. Edtinger, H. Wei, G. Demirci, and X. C. Li. 2008. The innate NK cells, allograft rejection, and a key role for IL-15. *J Immunol* 180: 7818-7826.
 57. Suzuki, S., L. H. Toledo-Pereyra, F. J. Rodriguez, and D. Cejalvo. 1993. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 55: 1265-1272.
 58. Ohteki, T., H. Tada, K. Ishida, T. Sato, C. Maki, T. Yamada, J. Hamuro, and S. Koyasu. 2006. Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J Exp Med* 203: 2329-2338.
 59. Kuwajima, S., T. Sato, K. Ishida, H. Tada, H. Tezuka, and T. Ohteki. 2006. Interleukin 15-dependent

- crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat Immunol* 7: 740-746.
60. Suzuki, A., S. McCall, S. S. Choi, J. K. Sicklick, J. Huang, Y. Qi, M. Zdanowicz, T. Camp, Y. X. Li, and A. M. Diehl. 2006. Interleukin-15 increases hepatic regenerative activity. *J Hepatol* 45: 410-418.
 61. Schluns, K. S., E. C. Nowak, A. Cabrera-Hernandez, L. Puddington, L. Lefrancois, and H. L. Aguila. 2004. Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5616-5621.
 62. Golden-Mason, L., A. M. Kelly, D. G. Doherty, O. Traynor, G. McEntee, J. Kelly, J. E. Hegarty, and C. O'Farrelly. 2004. Hepatic interleukin 15 (IL-15) expression: implications for local NK/NKT cell homeostasis and development. *Clin Exp Immunol* 138: 94-101.
 63. Yamaji, K., S. Nabeshima, M. Murata, Y. Chong, N. Furusyo, H. Ikematsu, and J. Hayashi. 2006. Interferon-alpha/beta upregulate IL-15 expression in vitro and in vivo: analysis in human hepatocellular carcinoma cell lines and in chronic hepatitis C patients during interferon-alpha/beta treatment. *Cancer Immunol Immunother* 55: 394-403.
 64. Fragale, A., L. Gabriele, E. Stellacci, P. Borghi, E. Perrotti, R. Ilari, A. Lanciotti, A. L. Remoli, M. Venditti, F. Belardelli, and A. Battistini. 2008. IFN regulatory factor-1 negatively regulates CD4+ CD25+ regulatory T cell differentiation by repressing Foxp3 expression. *J Immunol* 181: 1673-1682.
 65. Beldi, G., Y. Banz, A. Kroemer, X. Sun, Y. Wu, N. Graubardt, A. Rellstab, M. Nowak, K. Enjyoji, X. Li, W. G. Junger, D. Candinas, and S. C. Robson. 2010. Deletion of CD39 on natural killer cells attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 51: 1702-1711.
 66. Lappas, C. M., Y. J. Day, M. A. Marshall, V. H. Engelhard, and J. Linden. 2006. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J Exp Med* 203: 2639-2648.
 67. Shen, X., Y. Wang, F. Gao, F. Ren, R. W. Busuttil, J. W. Kupiec-Weglinski, and Y. Zhai. 2009. CD4 T cells promote tissue inflammation via CD40 signaling without de novo activation in a murine model of liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 50: 1537-1546.
 68. Klune, J. R., and A. Tsung. 2010. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. *Surg Clin North Am* 90: 665-677.
 69. Zhang, M., S. Ueki, S. Kimura, O. Yoshida, A. Castellaneta, K. S. Ozaki, A. J. Demetris, M. Ross, Y. Vodovotz, A. W. Thomson, B. S. D, D. A. Geller, and N. Murase. 2013. Roles of dendritic cells in murine hepatic warm and liver transplantation-induced cold ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 57: 1585-1596.
 70. Pommey, S., B. Lu, J. McRae, J. Stagg, P. Hill, E. Salvaris, S. C. Robson, A. J. d'Apice, P. J. Cowan, and K. M. Dwyer. 2013. Liver grafts from CD39-overexpressing rodents are protected from ischemia reperfusion injury due to reduced numbers of resident CD4+ T cells. *Hepatology* 57: 1597-1606.
 71. Castellaneta, A., O. Yoshida, S. Kimura, S. Yokota, D. A. Geller, N. Murase, and A. W. Thomson. 2014. Plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha promotes murine liver ischemia/reperfusion injury by induction of hepatocyte IRF-1. *Hepatology* 60: 267-277.
 72. Kano, A., T. Haruyama, T. Akaike, and Y. Watanabe. 1999. IRF-1 is an essential mediator in IFN-gamma-induced cell cycle arrest and apoptosis of primary cultured hepatocytes. *Biochem Biophys*

73. Tamura, T., H. Yanai, D. Savitsky, and T. Taniguchi. 2008. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 26: 535-584.
74. Geller, D. A., D. Nguyen, R. A. Shapiro, A. Nussler, M. Di Silvio, P. Freeswick, S. C. Wang, D. J. Tweardy, R. L. Simmons, and T. R. Billiar. 1993. Cytokine induction of interferon regulatory factor-1 in hepatocytes. *Surgery* 114: 235-242.
75. Gao, B., W. I. Jeong, and Z. Tian. 2008. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47: 729-736.
76. Corbitt, N., S. Kimura, K. Isse, S. Specht, L. Chedwick, B. R. Rosborough, J. G. Lunz, N. Murase, S. Yokota, and A. J. Demetris. 2013. Gut bacteria drive Kupffer cell expansion via MAMP-mediated ICAM-1 induction on sinusoidal endothelium and influence preservation-reperfusion injury after orthotopic liver transplantation. *Am J Pathol* 182: 180-191.
77. Racanelli, V., and B. Rehermann. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43: S54-62.
78. Crispe, I. N. 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 27: 147-163.
79. Gao, B., S. Radaeva, and O. Park. 2009. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol* 86: 513-528.
80. Swain, M. G. 2010. Natural killer T cells within the liver: conductors of the hepatic immune orchestra. *Dig Dis* 28: 7-13.
81. Correia, M. P., E. M. Cardoso, C. F. Pereira, R. Neves, M. Uhrberg, and F. A. Arosa. 2009. Hepatocytes and IL-15: a favorable microenvironment for T cell survival and CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* 182: 6149-6159.
82. Sawa, Y., Y. Arima, H. Ogura, C. Kitabayashi, J. J. Jiang, T. Fukushima, D. Kamimura, T. Hirano, and M. Murakami. 2009. Hepatic interleukin-7 expression regulates T cell responses. *Immunity* 30: 447-457.
83. Larrea, E., J. I. Riezu-Boj, R. Aldabe, L. Guembe, I. Echeverria, A. Balasiddaiah, P. Gastaminza, M. P. Civeira, P. Sarobe, and J. Prieto. 2014. Dysregulation of interferon regulatory factors impairs the expression of immunostimulatory molecules in hepatitis C virus genotype 1-infected hepatocytes. *Gut* 63: 665-673.
84. Huntington, N. D., H. Puthalakath, P. Gunn, E. Naik, E. M. Michalak, M. J. Smyth, H. Tabarias, M. A. Degli-Esposti, G. Dewson, S. N. Willis, N. Motoyama, D. C. Huang, S. L. Nutt, D. M. Tarlinton, and A. Strasser. 2007. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol* 8: 856-863.
85. Inoue, S., J. Unsinger, C. G. Davis, J. T. Muenzer, T. A. Ferguson, K. Chang, D. F. Osborne, A. T. Clark, C. M. Coopersmith, J. E. McDunn, and R. S. Hotchkiss. 2010. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J Immunol* 184: 1401-1409.
86. Ashkar, A. A., S. Reid, E. F. Verdu, K. Zhang, and B. K. Coombes. 2009. Interleukin-15 and NK1.1+ cells provide innate protection against acute *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the gut and in systemic tissues. *Infect Immun* 77: 214-222.
87. Zanoni, I., R. Spreafico, C. Bodio, M. Di Gioia, C. Cigni, A. Broggi, T. Gorletta, M. Caccia, G. Chirico, L. Sironi, M. Collini, M. P. Colombo, N. Garbi, and F. Granucci. 2013. IL-15 cis presentation is required for optimal NK cell activation in lipopolysaccharide-mediated inflammatory conditions. *Cell Rep* 4:

88. Epardaud, M., K. G. Elpek, M. P. Rubinstein, A. R. Yonekura, A. Bellemare-Pelletier, R. Bronson, J. A. Hamerman, A. W. Goldrath, and S. J. Turley. 2008. Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8⁺ T cells. *Cancer Res* 68: 2972-2983.
89. Meresse, B., Z. Chen, C. Ciszewski, M. Tretiakova, G. Bhagat, T. N. Krausz, D. H. Raulet, L. L. Lanier, V. Groh, T. Spies, E. C. Ebert, P. H. Green, and B. Jabri. 2004. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 21: 357-366.
90. Fehniger, T. A., S. F. Cai, X. Cao, A. J. Bredemeyer, R. M. Presti, A. R. French, and T. J. Ley. 2007. Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* 26: 798-811.
91. Strengell, M., S. Matikainen, J. Siren, A. Lehtonen, D. Foster, I. Julkunen, and T. Sareneva. 2003. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol* 170: 5464-5469.
92. Fehniger, T. A., H. Yu, M. A. Cooper, K. Suzuki, M. H. Shah, and M. A. Caligiuri. 2000. Cutting edge: IL-15 costimulates the generalized Shwartzman reaction and innate immune IFN-gamma production in vivo. *J Immunol* 164: 1643-1647.