

氏名	横田 真一郎
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 720号
学位授与年月日	平成 28年 8月 25日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第3項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 富 永 真 一 (委員) 教授 高 橋 将 文 教授 長 嶺 伸 彦

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

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方法である。肝移植後の虚血再灌流障害は移植後の成績に重大な影響を与える重要な課題である。本研究では、核内転写因子である IFN regulatory factor-1 (IRF-1) と IRF-1 によってその発現が調節されるといわれているインターロイキン 15(IL-15)がどのような免疫調節性作用を肝臓内のリンパ球に及ぼし、またこれらの細胞が、肝移植後虚血再灌流障害にどのように寄与しているのかという事を追求する目的で研究を行った。

### 2 研究方法

本研究では、まずヒト肝移植後の生検組織を用いて、実際の肝移植後虚血再灌流の際に IRF-1 の発現上昇の有無を確認した。次にヒト肝移植とほぼ同様の血管・胆管吻合法を用いたマウス同所性同種異系肝移植モデルと、IRF-1 ノックアウト (KO) マウスを用いて、IRF-1 と IL-15 の肝移植後虚血再灌流における役割を調べた。そして shRNA を用いて特異的にヒト肝細胞内の IRF-1 の発現を抑制すると IL-15 の発現にどのような影響を及ぼすかを検討した。

### 3 研究成果

ヒト肝移植後数時間の時点で採取した肝生検組織では、移植前 (バックテーブル生検組織) に比べて、IRF-1 の発現が蛋白レベルで有意に上昇している事が確認された。またマウス同所性肝移植モデルでも、移植後早期の時点で、IRF-1 の発現が上昇している事を確認した。また IRF-1KO マウスをドナーとして用いた場合、野生型 (WT) マウスをドナーとして用いた場合に比べて肝障害が 90%近く低減された。IL-15 と IL-15R $\alpha$  は mRNA レベルで IRF-1 と同様に移植後の発現亢進がみられ、可溶性 IL-15/IL-15R $\alpha$  蛋白複合体も肝移植後のレシピエントの血清内で上昇がみられた。肝内の様々な細胞を分離・培養したところ、実質細胞である肝細胞からの可溶性 IL-15/IL-15R $\alpha$  複合体の分泌が最も多く、次に免疫細胞である肝内樹状細胞からの分泌が多かった。IRF-1 は定常状態と、刺激された状態での IL-15 と IL-15R $\alpha$  の発現を調節していた。shRNA を用いて特異的にヒト肝細胞の IRF-1 を抑制しても同様の結果が得られた。IRF-1KO マウスの肝

臓内にはナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT細胞（NKT）と CD8 陽性細胞の数が WT マウスに比べ有意に減少していた。遺伝子組み替え可溶性 IL-15/IL-15R $\alpha$  複合体を IRF-1KO マウスに投与するとこれらの免疫細胞の数が回復し、移植後の細胞傷害性エフェクター分子の発現、全身性炎症反応、肝障害がいずれも悪化した。

#### 4 考察

IRF-1 は9つの転写因子で構成される IRF ファミリーの中で最初に発見された転写因子である。実質細胞、免疫細胞を含め様々な細胞に定常状態では比較的低いレベルで発現しており、I型、II型インターフェロン、リポ多糖（LPS）や様々なサイトカインで発現が惹起される。これまで IRF-1 は様々な肝障害モデルで発現が上昇し、重要な役割を果たしているという事が確認されていたが、肝臓内の IRF-1 の発現が、どのように肝臓内の免疫細胞に影響を及ぼし、また肝移植後の虚血再灌流障害に影響を与えるのかという事はよく理解されていなかった。本研究では、IRF-1 は肝移植後虚血再灌流障害の際に肝細胞由来可溶性 IL-15/IL-15R $\alpha$  複合体の発現を上昇させ、その結果肝臓内の自然免疫担当細胞（NK, NKT, CD8 陽性細胞）が増加して、炎症反応を増悪させているという事が示唆された。

#### 5 結論

本研究では IRF-1 が肝臓実質細胞、免疫細胞による可溶性 IL-15/IL-15R $\alpha$  複合体産生を介して、肝臓内の NK、NKT、CD8 陽性細胞の恒常性を調節し、肝移植後虚血再灌流障害の際に自然免疫細胞活性化を介して肝障害に寄与するという新しい知見が得られた。本研究で得られた新知見から、IRF-1 と IL-15/IL-15R $\alpha$  を治療ターゲットとする事により効果的に肝移植後の虚血再灌流障害を低減する事ができるかもしれないという事が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

肝移植は、生命維持に必須な臓器を移植するという意味で大変重要な治療手段であり、その際に問題となる虚血再灌流障害の低減を目指す研究は治療成績の向上のために必要不可欠である。

本研究は、より多くの研究者が安定的に再現できる同所性マウス肝臓移植モデルを確立し、肝移植の際の炎症、免疫が関与する病態の理解を深め、虚血再灌流障害に対する新たな治療戦略を開発することを目指して行われた。

申請者はマウス肝移植モデルについて使用器具を含む実験材料や手術手技を Step-by-Step で詳細に記載し、次にこのモデルを使って虚血再灌流障害の機序の解明に取り組み、以下の結果を得た。

- 1) 虚血再灌流障害において、IL-15/IL-15R $\alpha$  の発現が IRF-1 依存性に亢進している。
- 2) IRF-1 ノックアウト（IRF-1 KO）マウスからの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 $\alpha$  複合体を投与すると、虚血再灌流障害が生じる。
- 3) IRF-1 KO マウス肝グラフトではNK、NKT細胞が減少しており、IL-15/IL-15R $\alpha$  複合体投与で回復するが同時に肝細胞死が促進される。

これらの結果から、IRF-1 $\uparrow$ →IL-15/IL-15R $\alpha$  $\uparrow$ →NK, NKT $\uparrow$ →虚血再灌流障害という図式が

提案された。ヒト生検組織及びヒト初代培養肝細胞でなされた実験結果もこの図式を支持している。

本研究は、技術的難易度の高い同所性マウス肝臓移植手術が他の施設でも容易に再現できる詳細なプロトコールを提供したこと（Nat. Protocol in press）及び虚血再灌流障害の機序の解明に重要な手がかりを与えたこと（J. Immunol.194, 6045-6056, 2015）で科学の進歩に大きく寄与しており、審査委員全員一致で審査論文は博士論文にふさわしいと判断された。

## 試問の結果の要旨

申請者は審査論文に関して、まず安定的に再現できる同所性マウス肝臓移植モデルを確立することが虚血再灌流障害の低減のために重要な研究であることを述べ、その手技の詳細につき説明した。ついで臓器移植モデルとサイトカインとの関連に基づいて虚血再灌流障害に至る経路の図式を提示した。実験は申請者自身により精力的になされており、申請者の実験技術は高いレベルに達していると判断された。専門外の審査員から、肝臓部分温虚血再灌流障害、バックテーブルなどの専門用語の意味を問われ分かりやすく説明した。サイトカインやNK細胞などの免疫学的内容の理解も十分であった。

申請者がこの研究の意義を十分に理解し、研究を主体的に推進して来たことが示された。

以上により、申請者の学識、研究能力は博士の学位を授与するに値すると委員全員一致で認められた。