



Title	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し肝虚血再灌流障害を増悪させる
Author(s)	木村, 鐘康
Description	配架番号 : 2178
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11931号
Issue Date	2015-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11931
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62691
Type	doctoral thesis
File Information	Shoko_Kimura.pdf



学 位 論 文

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し
肝虚血再灌流障害を増悪させる

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

2015 年 6 月

北 海 道 大 学

木 村 鐘 康

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	9 頁
考察	27 頁
総括および結論	31 頁
謝辞	32 頁
引用文献	33 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文へ投稿中である。

1. Shoko Kimura, Kikumi S. Ozaki, Shinya Ueki, Matthew Zhang, Shinichiro Yokota, Donna B. Stolz, David A. Geller and Noriko Murase
Contribution of Alloantigens to Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury: Roles of NK cells and Innate Immune Recognition of Non-self
Liver Transplantation

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Shoko Kimura, Shinya Ueki, Kikumi S. Ozaki, Matthew Zhang, Rita M Sico, Noriko Murase
Possible roles of innate immune “non-self” recognition during hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury after liver transplantation (LTx)
XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15th- 19th, 2010, Vancouver, Canada
2. Shoko Kimura, Shinya Ueki, Kikumi S. Ozaki, Matthew Zhang, Rita M Sico, Noriko Murase
Possible roles of innate immune “non-self” recognition during hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury after liver transplantation (LTx)
American Transplant Congress 2011, April 30th- May 4th, Philadelphia, United States

緒言

1. 論文の背景

肝移植は末期肝不全に対する唯一の根治的治療法であるが、肝虚血再還流障害は今日でも重要な問題の一つである。虚血再還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¹。虚血再還流障害により惹起される初期の免疫反応がどのように拒絶反応と関連していくのかに疑問を抱いた事が本研究のスタートラインとなった。

虚血再還流障害に置いて自然免疫は宿主の第一の防御ラインとして重要な役割を持っている。自然免疫の分野は、近年パターン認識受容体 (PRRs: pattern recognition receptors) の発見により飛躍的に進歩を遂げた。微生物に対する宿主防御は、PRRs が病原体関連分子パターン (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) を認識することにより惹起される^{2,3}。自然免疫システムは非自己病原体に対する免疫の大きな役割を占めているが、PRRs は内因性のストレスやダメージ関連分子パターン

(DAMPs: danger-associated molecular patterns) を介した細胞障害シグナルをも認識している⁴。肝虚血再還流障害は臨床でも直面する大きな問題点の一つで、特に出血性ショック、敗血症性ショック、腹部手術、肝移植時に問題となる。免疫学的な観点からすると、虚血再還流時の初期の炎症性反応は、マクロファージや樹状細胞等のいわゆる見張り細胞上の PRRs を介した内因性ストレスシグナルにより媒介され、それに続く炎症性メディエーターの産生と宿主白血球の呼び寄せにより成り立っている^{5,6}。

非自己の認識は自然免疫反応の惹起にとって重要である。肝移植に伴う肝虚血再還流障害は、様々な DAMPs (核内タンパク、核酸、細胞外基質蛋白等) が障害された肝グラフトより放出され、それらが宿主にとっての非自己として認識される事で引き起こされる。しかしながら、自然免疫に関わる細胞が、初期の虚血再還流障害の段階で肝同種移植グラフトをアロ抗原として認識し反応を増強させているかどうかはいまだに不明である。自然免疫システムは、自己・非自己の選別に PRRs だけでなく、他にもいくつかの手段を持っている。そのうちのひとつとしては、ナチュラルキラー (NK) 細胞による“変化した”、“喪失した”自己の選別という方法がある。NK 細胞は、細胞の MHC class I の有無を認識し、MHC class I の発現の低い、もしくは無い細胞を非自己として選択的に細胞死させるという

働きがある事が知られている^{7,8}。この働きは、MHC class I の発現の低い感染した細胞や癌化した細胞を正常な細胞と選別し除去するという重要な役割を担っている。NK 細胞はこの役割を、目標となる細胞の MHC class I と抑制性の受容体が結合することで NK 細胞の細胞障害作用を抑制する一方、MHC を持たない細胞に対しては抑制作用が働かずに細胞障害作用が引き起こされるといった具合に、細胞表面にある様々な抑制性、もしくは促進性の受容体を介して行っている^{9,10}。この関連で、NK 細胞は同種幹細胞移植でおこる拒絶反応や骨髄移植での早期グラフト障害の主役であるとされている^{7,11}。さらに、最近の臨床研究では、抑制性のキラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR : killer cell immunoglobulin-like receptors) とターゲット細胞の表出する HLA class I を不適合化することで、白血球を抑制し移植片対宿主病 (GVHD) を予防する可能性が示されている¹²⁻¹⁴。

本研究では、NK 細胞の非自己認識能力に着目し、肝虚血再還流障害時の自然免疫反応では、NK 細胞によるアロ抗原の認識が重要であるとの仮説を立てた。故に、我々はアロ抗原の存在下で早期の肝虚血再還流障害が増強するかどうかを研究した。この仮説を証明するために、GFP トランスジェニック SD (Sprague Dawley) ラットをレシピエントとして、同系 (syngeneic) の野生型 SD ラットと同種異型 (allogeneic) の LEW (Lewis) ラットより肝グラフトを摘出し、UW 液に 18 時間冷保存後肝移植を行った。両群間での虚血再還流障害の程度、GFP+レシピエント由来細胞のグラフト内への遊走、移植後早期における炎症性分子の増殖について比較を行った。また、GFP-ドナーNK 細胞の反応を研究しその役割を究明するために、肝移植前に肝内の NK 細胞を枯渇させて実験を行った。

2. テーマに関して何がわかっていて何がわかっていないのか

わかっている事：虚血再還流障害においては、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。

わかっていない事：虚血再還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

3. 本研究で明らかになった事

NK 細胞は肝虚血再還流障害において重要な役割を示した。NK 細胞のアロ抗原認識により、同種異型移植では同系移植に比べより虚血再還流

障害が増強される事が判明した。今後は **NK** 細胞をコントロールすることで、肝虚血再還流障害の治療に役立つ可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AAGM1:	anti-asialo GM1
ALT:	alanine transaminase
BSA:	bovine serum albumin
DAMPs:	danger-associated molecular patterns
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
H&E:	hematoxylin and eosin
I/R:	ischemia/reperfusion
IHC:	immunohistochemistry
KIR:	killer cell immunoglobulin-like receptor
LFA-1:	lymphocyte function-associated antigen-1
LTx:	liver transplantation
Mig/CXCL9:	monokine induced by gamma interferon/chemokine ligand9
NKG2D:	natural killer group2, member D
NPC:	nonparenchymal cells
PAMPs:	pathogen-associated molecular patterns
PRRs:	pattern recognition receptors
ROS:	reactive oxygen species

実験方法

薬品と試薬

コラゲナーゼ (type IV)、牛血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) は Sigma 社 (St Louis, MO) より購入した。

実験中で使われている Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Pacific Blue (PB), Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 700, PE/Cy7 接合の抗ラット CD3, CD4, CD8 α , CD11b/c, CD45, CD45R, CD45RC, CD62L, CD161a, RP-1 モノクローナル抗体 (mAb) はそれぞれ eBioscience 社 (San Diego, CA)、Serotec 社 (Oxford, UK)、BD Pharmingen 社 (San Diego, CA) より購入した。

動物

オスの Lewis (RT.1¹) ラットは Harlan Sprague Dawley 社 (Indianapolis, IN) より購入し、生後 8~10 週で実験に使用した。GFP トランスジェニックと野生型の SD ラットは、もともと大阪大学岡部勝先生¹⁵により生成された繁殖コロニーをピッツバーグ大学で飼育維持しているものを使用した^{16,17}。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。

肝移植と実験デザイン

以前より一般的に行われている手法¹⁸で肝動脈再建を行わない同所性肝移植を行っている。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。【図 1】

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抗アシアロ GM1 (AAGM1, 50ul/animal, Wako Chemical 社, Richmond, CA) を静注した後上記同様に肝移植を行った。

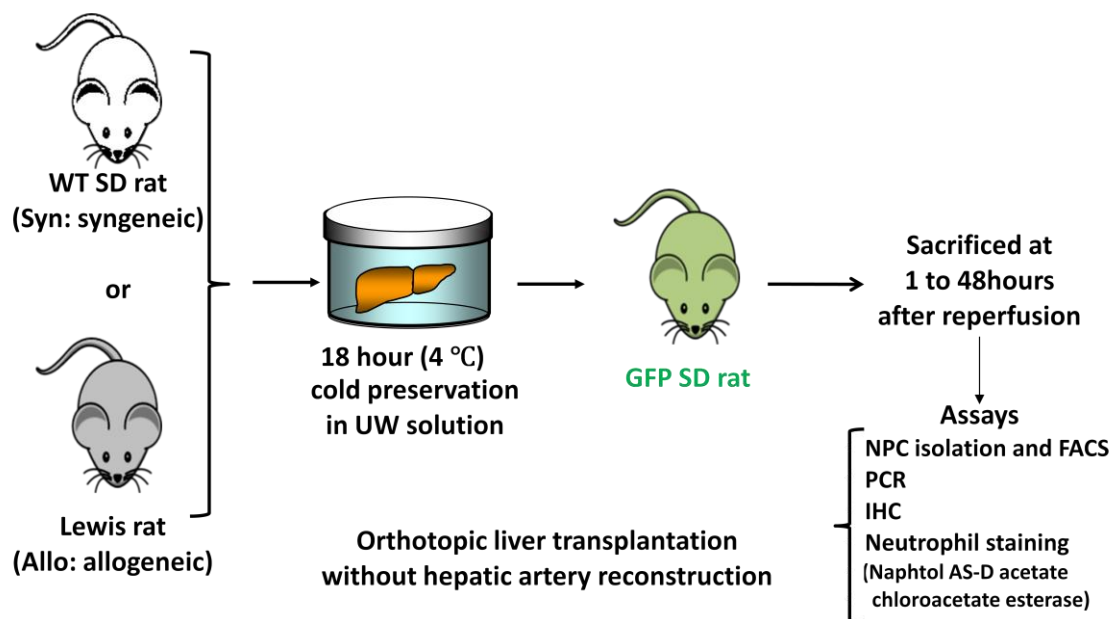


図1. 18時間冷保存ラット肝同所性移植モデル

野生型 (WT) SD ラット (シンジェニック)、Lewis ラット (アロジェニック) より肝を摘出し、UW 液に 18 時間 4℃で冷保存し、GFP+SD ラットをレシピエントとして肝動脈再建無しの同所性肝移植を行った。レシピエントは肝移植後 1~48 時間で犠牲死させ、グラフト肝を摘出し様々な実験を行った。

病理組織学的評価と免疫組織染色

肝グラフト組織は 10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋組織としたのち厚さ 6μm にスライスしヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を行った。壊死組織の占める割合評価は盲検下に行い、1 スライドあたりランダムに 10 ヲ所の弱角視野 (x40) を抽出し、NIH の画像解析ソフトを使用して分析を行った。また、好中球はエステラーゼ AS-D 染色キット

(Naphthol AS-D chloroacetate esterase staining kit : Sigma 社) で染色を行った。

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^{16,19}。染色された細胞の数は、盲検下に 20 ヲ所の強角視野 (x200) でカウントし cells per HPF という形式で数値化した。

肝白血球分離とフローサイトメトリー

肝の非実質細胞 (NPC:nonparenchymal cells) はコラゲナーゼ溶解の後、500rpm、5 分の遠心分離で上澄み採取を計 3 回繰り返し、1500rpm、

5 分の遠心分離で沈殿物として分離され採取した¹⁶。分離された NPC は各種抗体と混合し 30 分間 4°C で低温放置し染色した後、LSR (BD Biosciences 社) にて 5 色のフローサイトメトリーを行った。データの解析は Flowjo 7.5 (Tree Star, Oregon Corporation, Ashland, OR) を使用して行った。

定量リアルタイム PCR

RNA を肝組織より抽出し、SYBR Green、適切なサイズの各種プライマーを用いて mRNA の発現を定量化した²⁰。サンプルの解析は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems 社) を用いて行った。各種遺伝子の発現量は GAPDH mRNA により標準化され、正常対照との比較で DD Ct 法により計算され数値化した^{21,22}。

統計学的解析

数値結果は平均±標準偏差で示した。片側 t 検定もしくは ANOVA で有意差を検定した。p 値は 0.05 未満を優位とした。

実験結果

予備実験

① モデル作成

実験を行う前にまずはラット肝移植のモデル作りから始まった。初めは他の実験でサクリファイスしたラットの死体や、実験で使用できないメスのラットを用いて手術手技の練習をした。動物の尊い命を無駄にできないため、1回1回の練習を大切に、ビデオを撮影し手技の問題点等を毎回考察しながらトレーニングを積んだ。レシピエントが初めて10日以上長期生存するまでに15回の練習肝移植が必要であった。コンスタントに長期生存するようになるまではさらに15例、合計30例、約2カ月のトレーニング期間が必要であった。

② 肝移植後早期のグラフト NPC 組成調査実験と、宿主由来好中球浸潤の違い、好中球の活性について

18時間冷保存にて虚血再還流障害移植モデルを作成し、シンジェニックグラフトとアロジェニックグラフトで、肝内のレシピエント由来 NPC の組成がどのように違ってくるのかを知るために、移植後1~3時間でラットをサクリファイスし、肝グラフトより NPC を分離した後にフローサイトメトリーでレシピエント (GFP+) NPC の細胞組成を調べた。その結果、最も大きな違いを認めたのが CD11b/c bright、RP-1+の好中球の割合であった (本実験図 9)。このことから、実験当初は好中球に着目し好中球の活性化マーカーとして CD161 (NKR-P1) や CD62L を測定し両群間の違いを探していた。肝移植後1時間で CD161 の発現に統計学的な優位差が出たものの (図 2)、差はあまり顕著ではなく、他の時間軸でも有意差は見られなかったためネガティブデータとして扱った。この結果により、好中球の浸潤数自体に差はあるものの、あくまで好中球は他の細胞が出すケモカインやサイトカインに呼び寄せられて集まるものなので、好中球自身の活性や好中球自身がアロ抗原を認識するものではないという結論に至り、視点を変えてドナーの自然免疫細胞に着目し次の実験へと進めた。

❖ Graft infiltrating neutrophils

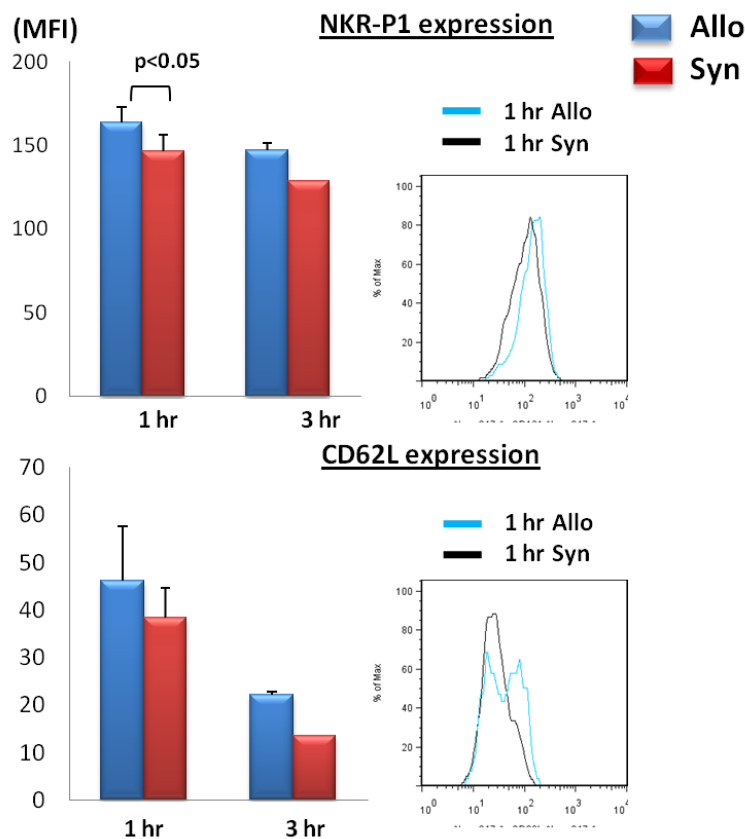


図 2. グラフト内 GFP+好中球の活性比較

アロジェニック移植後、シンジェニック移植後の肝内への GFP+宿主由来浸潤好中球の CD161 (NKR-P1)、CD62L の発現をフローサイトメトリーで比較した。N=各 3、MFI: mean fluorescence intensity.

③ NK 細胞由来の IFN- γ 放出に関する研究

アロジェニック移植後とシンジェニック移植後にドナーの NK 細胞に違いがある事がわかり (本実験図 7)、NK 細胞由来の炎症性サイトカイン IFN- γ に両群間で違いがあるかどうかを調べる実験を行った。まずは移植後 1, 3 時間で採取した肝グラフトの RT-PCR を行い IFN- γ mRNA の増殖を調べたが、結果に非常に大きなばらつきがあり、優位差がつかなかった (図 3 左)。次にフローサイトメトリーで IFN- γ の核内染色を行い陽性細胞の割合を見たが、ドナー、レシピエントどちらの細胞からもほとんど陽性細胞が検出されなかった (図 3 右)。これらの結果より、(少なくとも

NK 細胞由来の) IFN- γ にはあまり大きな役割は無いと考え、他の炎症性サイトカインやケモカインに着目することとした。

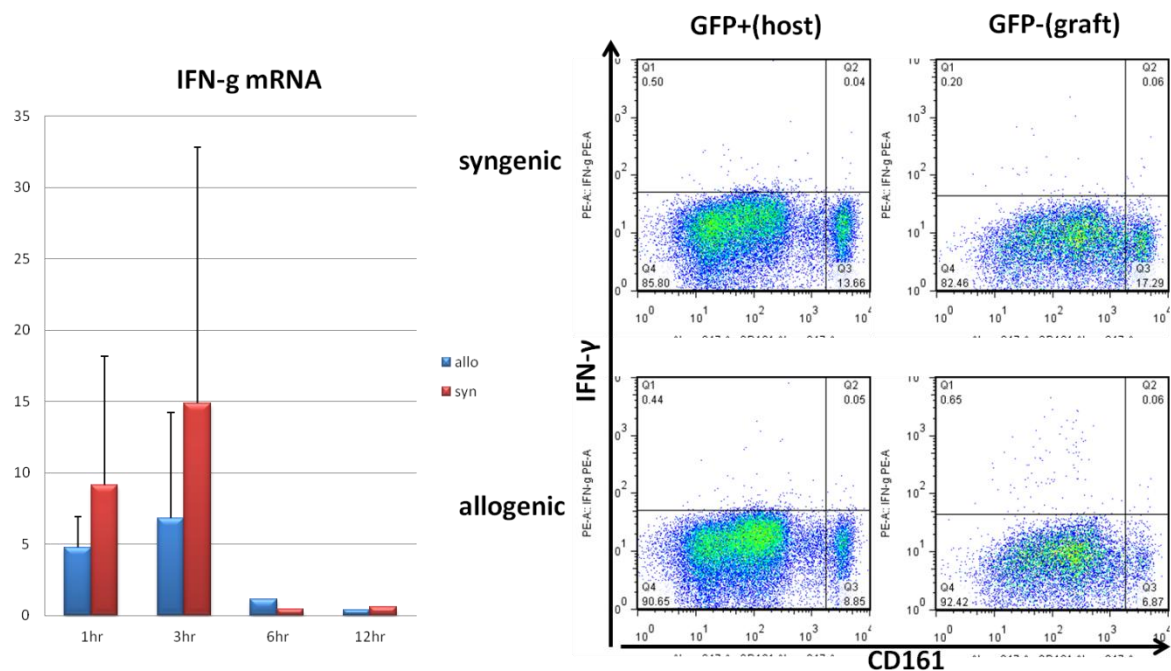


図 3. 肝グラフト内の IFN- γ 発現

左図：アロジェニック移植グラフトとシンジェニック移植グラフトで RT-PCR を行い、1, 3, 6, 12 時間後の IFN- γ の mRNA レベルを調べた。

右図：肝移植後 1 時間の肝グラフト NPC を分離した後、IFN- γ の核内染色を行いフローサイトメトリーで IFN- γ 陽性細胞の割合を調べた。

本実験

① シンジェニックグラフト肝に比べ、アロジェニック肝で優位に肝移植後の虚血再還流障害によるダメージが増強されていた。

まず最初に、アロジェニック移植 (Lewis⇒SD) と、シンジェニック移植 (SD⇒SD) で肝虚血再還流障害の程度に違いがあるかどうかを調べるため、両群でグラフト 18 時間 UW 液下冷保存後の肝移植を行い、肝再還流後 48 時間以内の肝障害の程度を評価した。再還流後 1, 3, 6, 24, 48 時間後に血清 ALT (alanine transaminase) レベルを調べたところ、アロジェニック移植の方が高い傾向にあり、肝障害のピークとなる 6 時間の値はシンジェニック移植群と比べ優位に高い値となった

(2252 ± 517 vs 648 ± 101 , $p < 0.05$)。念のため Lewis、SD ラットの間で肝障害の程度に違いがないかを調べたが、Lewis⇒Lewis 群、SD⇒SD 群の間で肝障害の程度に有意差は無く、どちらの群も有意差を持ってアロジェニック移植群 (Lewis⇒SD) より肝障害の程度が少なかった (図 4A)。48 時間で比較した肝壊死組織の割合はアロジェニック移植群で優位に広がった (図 4B)。

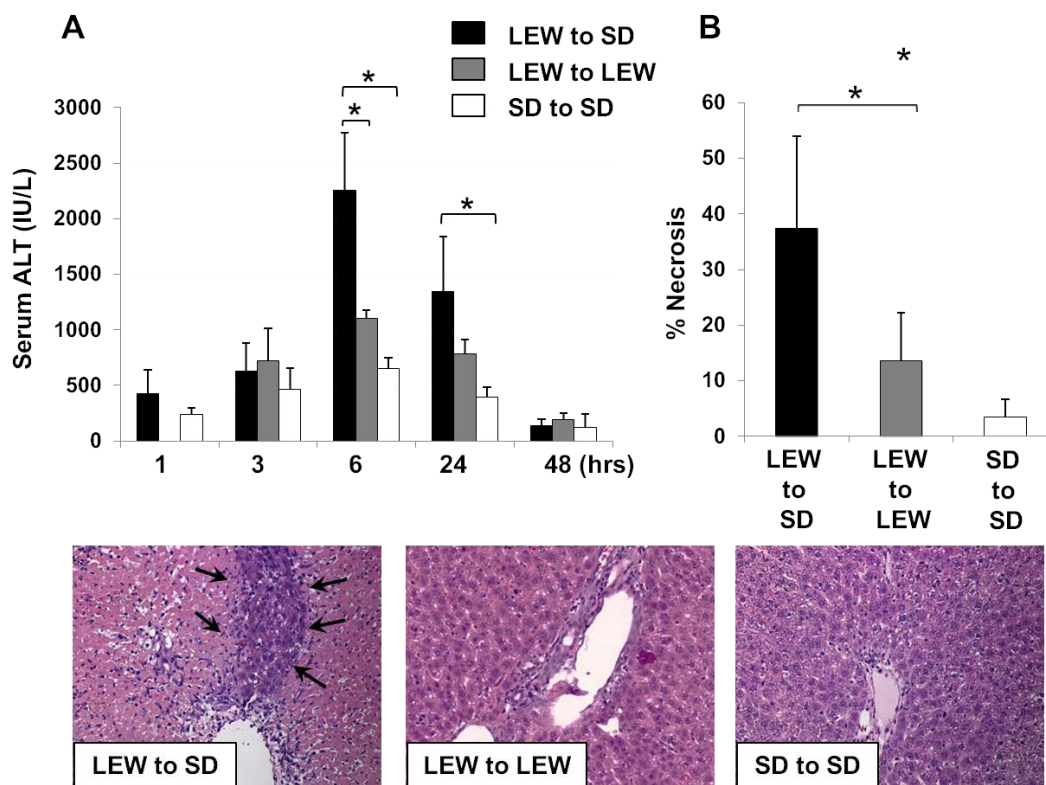


図 4：アロジェニック、シンジェニック移植後の虚血再還流障害

- A. 肝移植後 1, 3, 6, 24, 48 時間後に血清 ALT の値を測定した。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。各タイムポイントで N=5-10、*p<0.05.
- B. 肝移植後 48 時間での H&E 切片における壊死範囲 (矢) の形態学的分析では、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優位に広がった。N=各グループ 4-10、*p<0.05、代表的な組織写真 (x100 倍) を示した。

肝虚血再還流後に起こる自然免疫反応により、肝グラフト内では速やかに炎症性サイトカインの上昇が認められるが、次に、アロジェニック移植群で肝障害が強かったことに関連して、炎症性サイトカインも同様に上昇を示すかどうかを調べた。肝内炎症性サイトカインの IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α の mRNA レベルは肝移植後早期に上昇し 1~3 時間でピーク値を示す。アロジェニック移植グラフト内のこれらのサイトカイン mRNA レベルはシンジェニック移植グラフトに比べ高値を示し、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の値は有意差を持って高かった (図 5)。さらに、NK 細胞の活性型受容体である NKG2D の mRNA レベルもアロジェニック移植群で優位に高値を示した。これらの結果により、肝移植後に起こる肝虚血再還流障害は、アログラフトで優位に増強され、また炎症反応、NK 細胞の活性化も優位に高いということが示された。

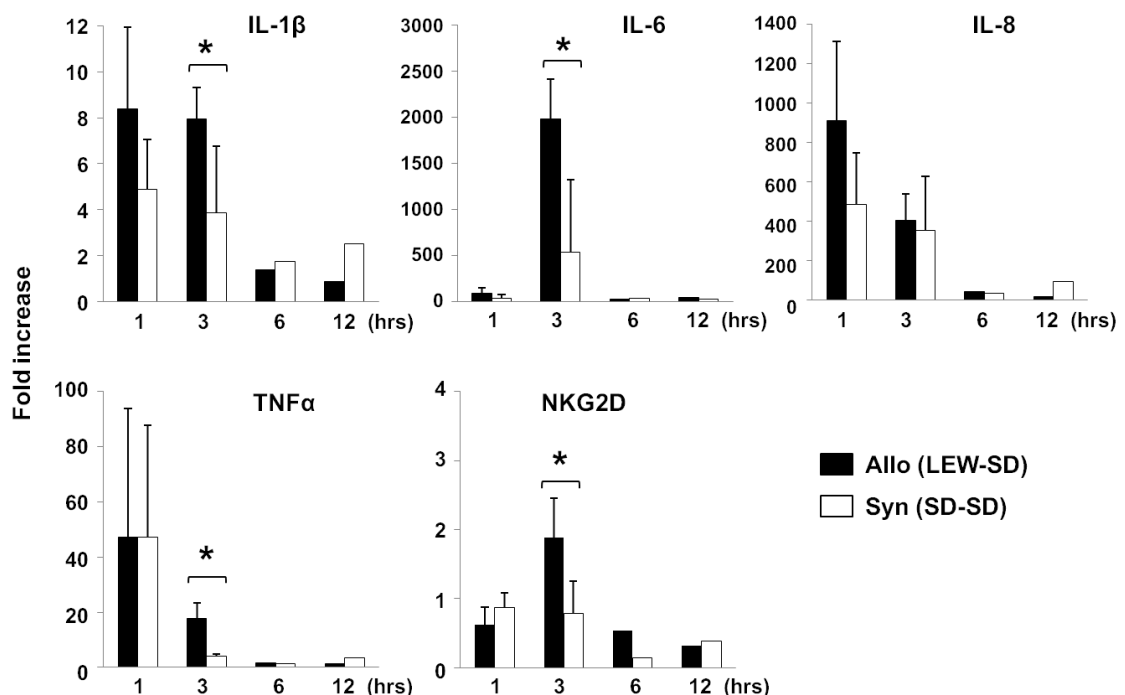


図 5. アロジェニック移植とシンジェニック移植後の肝炎症性反応

18 時間グラフト UW 下冷保存肝移植後 1, 3, 6, 24 時間の肝グラフトサンプルを、アロジェニック移植群 (Lewis $\Rightarrow$ SD)、シンジェニック移植群 (SD $\Rightarrow$ SD) よりそれぞれ摘出し、SYBR Green 定量リアルタイム PCR で分析した。IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 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。また、アロジェニック移植群では NKG2D の速やかな増殖も認めた。* $p < 0.05$ 。

② ナイーブ肝内の CD11b/c+ と CD11b/c- NK 細胞

アロジェニックグラフトで虚血再還流障害が増強されたという事実に、肝内に在留している NK 細胞が関わっているかどうかを調べるため、まずはナイーブ（未移植、未治療）ラット肝内に存在する NK 細胞の特性を調べた。ナイーブラットの肝 NPC を分離し、CD45+ の NPC をフローサイトメトリーで分析した。その結果、肝内には、脾臓や血液内と比べ多くの CD161+ NK 細胞が存在することが分かった ($25.4 \pm 0.9\%$) が、一方で CD161dimCD3+NKT 細胞は肝内、脾臓内、血液内で占める割合にあまり差はなく比較的少なかった ($\sim 3.8\%$) (図 6A 上段)。さらに、肝内には CD11b/c+ の NK 細胞も多く存在することが判明した (図 6A 下段、B)。

CD11b/c は NK 細胞の活性化マーカーの一つであると言われ、CD11b/c+ NK 細胞は、NK 細胞の中でもより成熟したサブセットと言われており、よりターゲット細胞を殺す能力に優れ、刺激によりインターフェロン γ を多く産生するタイプである事が示されている^{23,24}。ナীবラット肝内の CD11b/c+ NK 細胞をさらに詳しく調べたところ、CD11b/c- NK 細胞と比べ、より CD86、B220、MHC classII の発現が高いことが分かった（図 6C）。また、免疫組織染色では、CD11b/c+ NK 細胞と CD11b/c- NK 細胞どちらも肝類洞内に存在することが分かった（図 6D）。人間の肝内にも成熟した NK 細胞が多く存在し、常に「変化した自己」や悪性細胞を見張り免疫を維持している²⁵。これらの結果により、肝内に存在する NK 細胞、特に CD11b/c+ の成熟した NK 細胞が非自己を認識することにより肝虚血再還流障害に重要な役割を持っている可能性を示唆した。

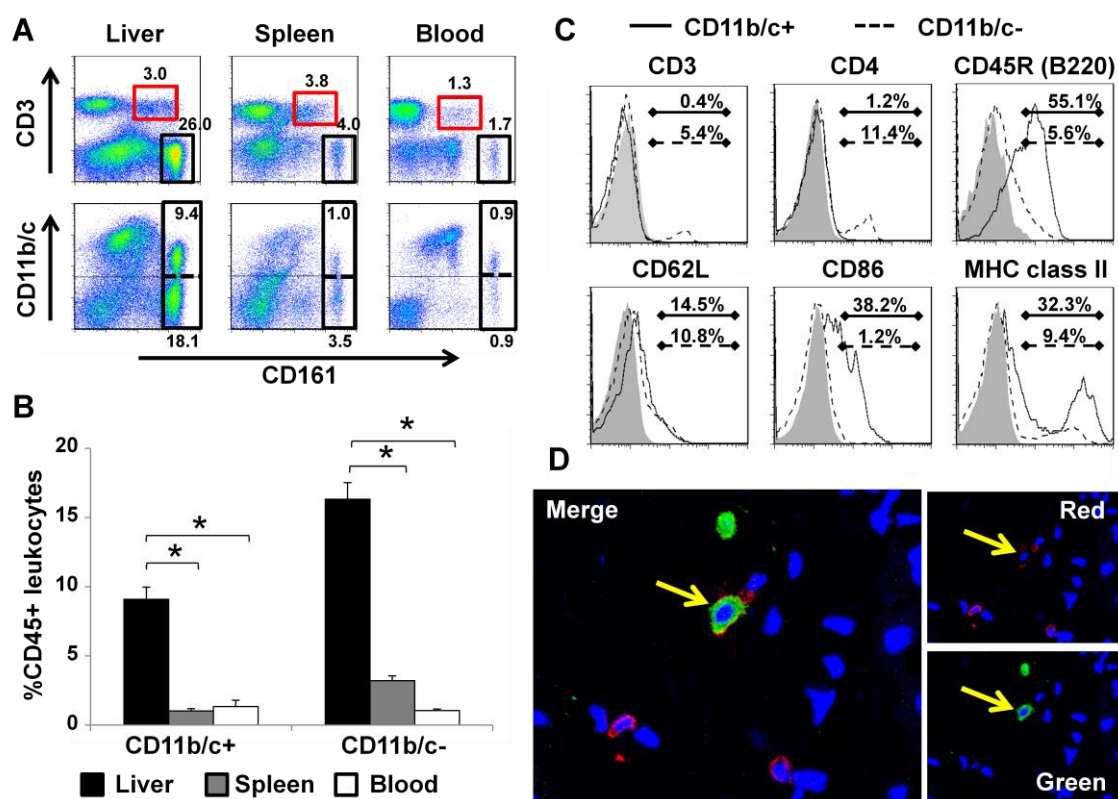


図 6. 肝内 NK 細胞とその他の白血球

ナীবラットの肝 NPC をコラゲナーゼによる肝溶解と異なった速度での遠心分離によって分離した。肝 NPC、脾細胞、血中白血球を単細胞にまで分離し、5 色のフローサイトメトリーを行い、CD45+ の白血球をゲートして分析した。

A. CD161+細胞の CD3（上段）、CD11b/c（下段）発現をフローサイト

メトリーした。CD161dimCD3+NKT 細胞（赤枠内）の割合は全てのサンプルで 4%に満たなかった。

- B. 肝 NPC、脾、血球における CD11b/c+ と CD11b/c- の CD161+NK 細胞の割合を示した。N=3-4、*p<0.05
- C. 肝 NPC 内の CD11b/c+ と CD11b/c- の NK 細胞における CD3、CD4、CD45R (B220)、CD62L、CD86、MHC class II の発現を比較した。
- D. ナイーブ肝切片を CD161 (緑)、CD11b/c (赤)、Hoechst 核染色 (青) で免疫組織染色した。黄色の矢で示した細胞は CD11b/c+CD161+ の NK 細胞。倍率 x200. N=2 の代表的な組織写真を示した。

③ 肝移植後肝虚血再還流障害中に肝内の CD11b/c+ の成熟 NK 細胞は早期にアログラフトから消失する

18 時間グラフト冷保存後のアロジェニック肝移植 (Lewis⇒GFP+SD) 群とシンジェニック肝移植 (野生型 SD⇒GFP+SD) 群において、肝内の NK 細胞移植後虚血再還流障害早期において大きな変化を示した。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、シンジェニックグラフトではグラフト NK 細胞 (GFP-CD161+) の数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ではグラフト NK 細胞の数が早期から減少した (図 7A)。フローサイトメトリーによる解析を行うと、免疫組織染色の結果同様、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 (図 7B)。活性化された成熟 NK 細胞は、早期にアポトーシス細胞死するとされている^{26,27}が、これらの結果は、アロジェニック肝移植後の虚血再還流障害で、アログラフト内の成熟 NK 細胞がより速やかに活性化されるという可能性を示唆した。

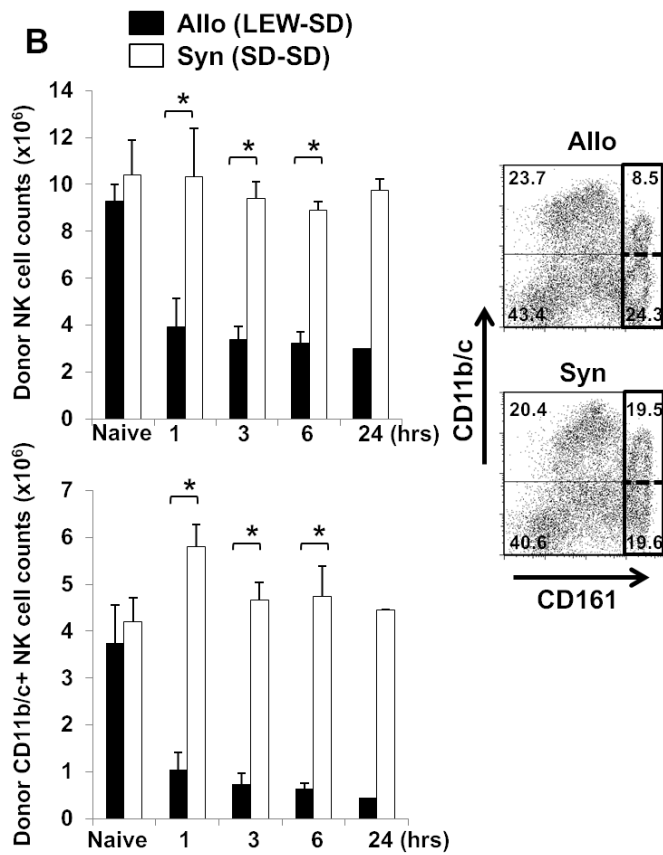
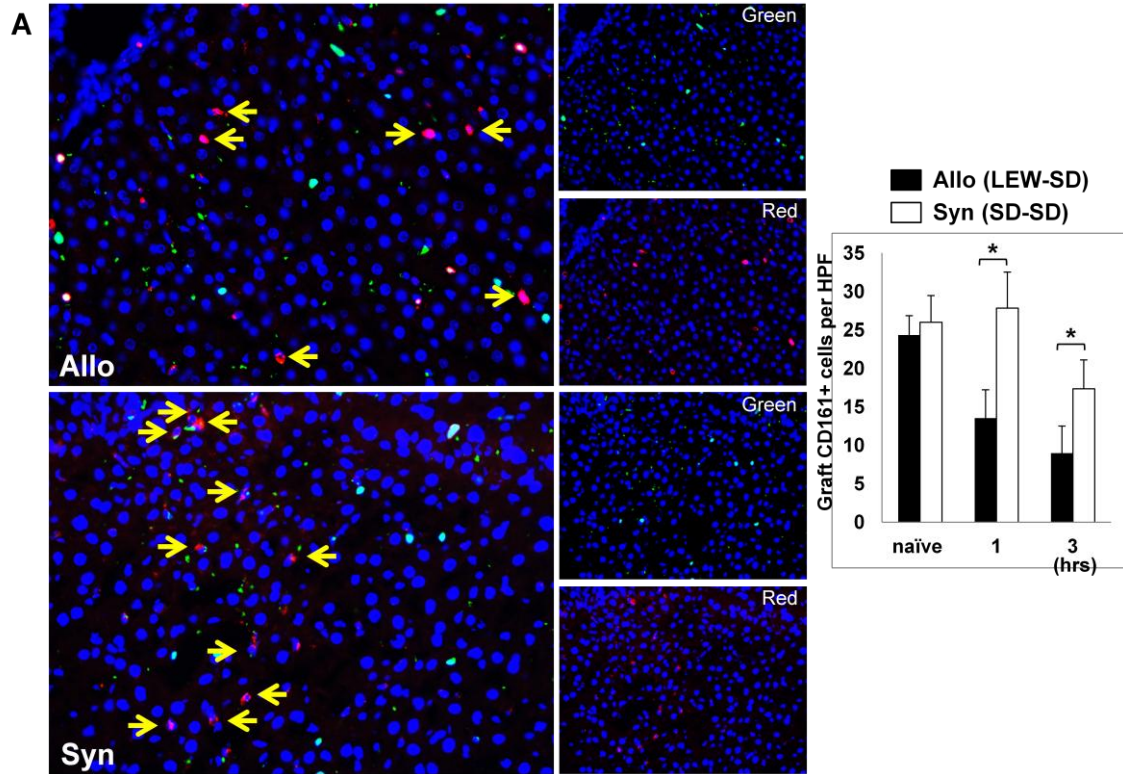


図 7. アロジェニック、シンジェニック肝虚血再還流障害後の宿主、グラフト NK 細胞の比較

18 時間グラフト冷保存後のアロジェニック肝移植 (Lewis⇒GFP+SD) 群とシンジェニック肝移植 (野生型 SD⇒GFP+SD) 群の肝グラフトサンプルを移植後 1、3、6、24 時間後に採取した。

- A. 肝移植後グラフト内の CD161 (赤) 免疫組織染色。NK 細胞 (赤、黄色矢印) の数をカウントし HPF (x200) で定量化した。1 時間における代表的な写真を示した。N=3、*p<0.05.
- B. フローサイトメトリーで、ドナー由来 NK 細胞 (CD45+,GFP-) と、ドナー由来 CD11b/c+ NK 細胞の割合を調べた。グラフはフローサイトメトリーの % と NPC 細胞数カウントから計算した細胞数。肝内のドナー NK 細胞はアロジェニックグラフト内から速やかに消失した。*p<0.05. 3 時間後の代表的なフローサイトメトリーの写真を示した。

④ 肝グラフト内への宿主白血球の浸潤がアロジェニック移植でシンジェニック移植よりも多い

肝虚血再還流時におこる自然免疫による炎症性の反応には、肝グラフト内への白血球の動員も含まれるため、次に、現在まで証明したアロジェニック肝移植での虚血再還流障害の増強、および肝内の NK 細胞の消失が、移植後早期の宿主白血球浸潤と関連があるかどうかを調べた。移植肝の免疫組織染色では、全てのタイムポイントにおいて、アロジェニックグラフトの方がシンジェニックグラフトよりも宿主由来の GFP+白血球の浸潤が多く、移植後早期の 1、3 時間後で有意差が認められた (図 8A)。さらに、具体的にどのような細胞が多くアログラフト内に浸潤しているかを調べるために、グラフト肝の NPC を分離してフローサイトメトリーで分析した。CD45+の肝 NPC のうち、GFP+宿主由来浸潤細胞の割合は一貫してシンジェニックグラフトより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 (図 8B)。さらに移植後 3 時間での GFP+宿主由来浸潤細胞の系統解析を進めると、CD11b/c+ミエロイド系細胞の割合がアロジェニックグラフトで特に高く、シンジェニックグラフトで約 50%に対し約 70%となった (図 8C)。

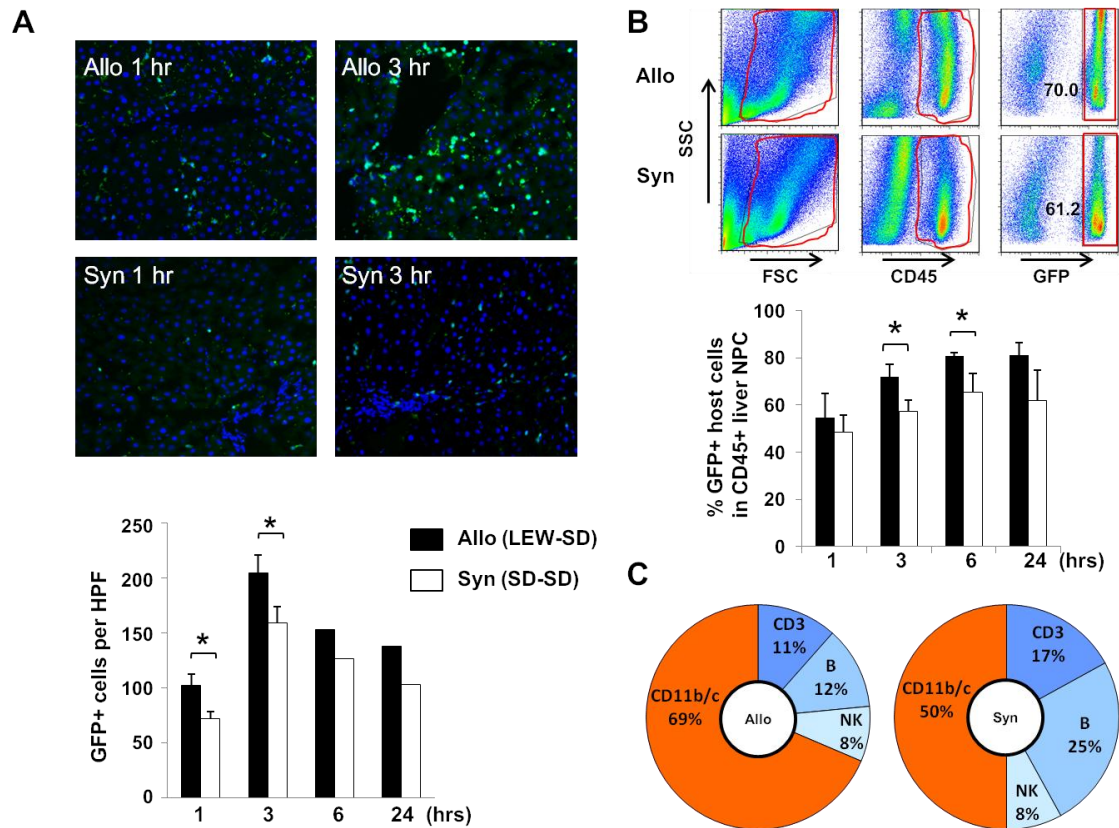


図 8. 肝虚血再還流障害後早期のアロジェニックグラフト、シンジェニックグラフト内への GFP+宿主由来細胞浸潤の比較

18 時間グラフト冷保存後のアロジェニック肝移植 (Lewis⇒GFP+SD) 群とシンジェニック肝移植 (野生型 SD⇒GFP+SD) 群の肝グラフトサンプルを移植後 1, 3, 6, 24 時間後に採取した。

- A. GFP+の宿主由来浸潤細胞数を、凍結切片で強角視野でカウントした (HPF、x200 倍)。アロジェニックグラフト内に、シンジェニックグラフト内よりも移植後早期で優位に多くの GFP+宿主由来細胞浸潤が見られた。N=各 3-4、* $p<0.05$ 。1, 3 時間後の代表的な組織写真を示した。
- B. グラフト肝より NPC を分離し、CD45+でゲートした細胞をフローサイトメトリーで分析した (上段)。GFP+宿主由来浸潤細胞の割合は、3, 6 時間で統計学的な優位差を持ってアロジェニックグラフトの方がシンジェニックグラフトよりも多かった。N=各 3、* $p<0.05$ 。
- C. 移植後 3 時間でアロジェニックグラフト、シンジェニックグラフト内の GFP+宿主由来浸潤細胞の組成を示した。GFP+細胞のうち、アロジェニックグラフトでは CD11b/c+のミエロイド系細胞の浸潤が多く、シンジェニックグラフトではより CD3+T 細胞や B220+B 細胞の占める割合

合が多かった。N=3.

⑤ 宿主好中球がアログラフト内により多く動員された

上述したとおり、宿主 CD11b/c+細胞の浸潤がシンジェニックグラフトと比べアロジェニックグラフトで特に多かったため、フローサイトメトリーでさらに GFP+宿主由来浸潤細胞の分析を進めた。その結果、違いの大きな部分を占めたのは CD11b/c bright+, RP-1+の好中球であることが分かった(図 9A 下段)。CD11b/c+もしくは RP-1+の顆粒球タイプの細胞は、移植後 1 時間において、アロジェニックグラフト内で宿主由来浸潤細胞の約 20%を占めたのに対し、シンジェニックグラフトでは約 5%であった(図 9A 上段)。さらに、グラフト組織片をナフトール AS-D 染色したところ、統計学的な優位差には至らなかったが、アロジェニックグラフトの方がシンジェニックグラフトよりも全てのタイムポイントで染色細胞が多く、フローサイトメトリーの結果を裏付けた(図 9B)。

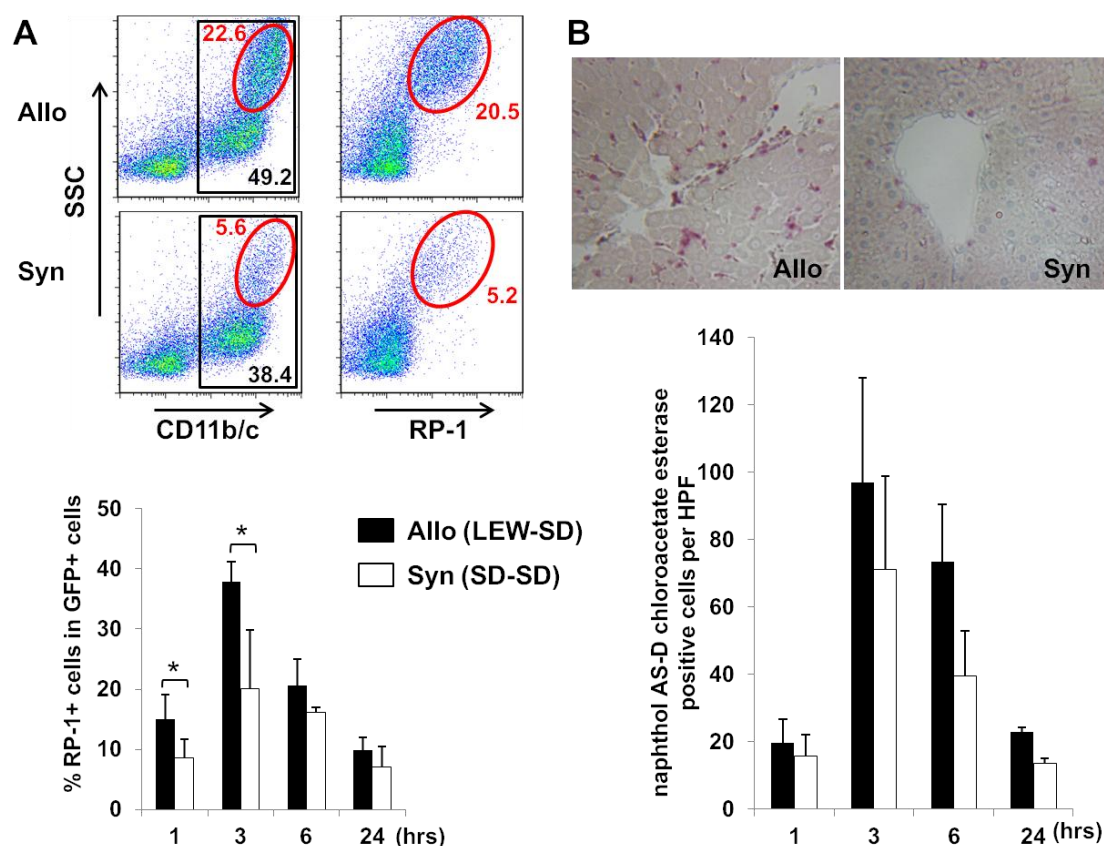


図 9. アロジェニック、シンジェニック移植後の GFP+宿主ミエロイド系細胞

18 時間グラフト冷保存後のアロジェニック肝移植 (Lewis⇒GFP+SD) 群とシンジェニック肝移植 (野生型 SD⇒GFP+SD) 群の肝グラフトサンプルを移植後 1、3、6、24 時間後に採取した。肝グラフトより NPC を分離し、CD45+GFP+宿主浸潤細胞をフローサイトメトリーで分析した。

- A. 上段：GFP+宿主浸潤細胞のうち、CD11b/c+細胞（黒枠）、とりわけ SSC high CD11b/c+細胞（赤丸、好中球）の占める割合がアロジェニック群でシンジェニック群よりも多かった。RP-1 陽性であることから好中球であると確認した（赤丸）。下段：GFP+RP-1+好中球の占める割合を移植後 1、3、6、24 時間後で示した。N=3、* $p<0.05$ 。
- B. Napthol AS-D chloroacetate による免疫組織染色で好中球を染色（赤色）し陽性細胞数をカウントした。好中球の数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多い傾向にあった。N=各 3、* $p<0.05$ 。3 時間後の代表的な写真を掲載した。

これらの結果より、アロジェニックグラフトで増強された肝虚血再還流障害は、速やかな肝内 CD11b/c+成熟 NK 細胞の活性化・消失、炎症性サイトカイン、ケモカインの産生増殖、ならびに宿主好中球の浸潤に関連していることが示唆された。肝内に存在する成熟 NK 細胞が感染した細胞や癌化した細胞を排除する見張り免疫としての重要な役割を持っていることから、我々はアロジェニックグラフトの虚血再還流障害増強に、肝内の成熟 NK 細胞が関連していると仮説を立てた。その仮説を証明するため、肝内の成熟 NK 細胞を除去して更なる実験を行った。

⑥ 抗アシアロ GM1 治療により効果的に肝内 CD11b/c+NK 細胞の除去が可能であった

遺伝子操作により NK 細胞だけを欠損した動物モデルを作成することは困難である代わりに、抗アシアロ GM1 (AAGM1) は NK 細胞除去薬として *in vivo* で広く使用されてきた^{28,29}。AAGM1 の肝内 NK 細胞除去効果を調べるために、ラットに AAGM1 を静注し、24 時間後にサクリファイスして肝 NPC を分離しフローサイトメトリーで解析した。PBS を静注したコントロール群と比べ、CD11b/c+NK 細胞は劇的に優位差を持って肝内から除去されたが、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優位差はつかなかった (図 10)。CD161+, CD3+

の NKT 細胞はもともとラット肝内には少ないが、AAGM1 により 3%から 1.3%まで減少した。

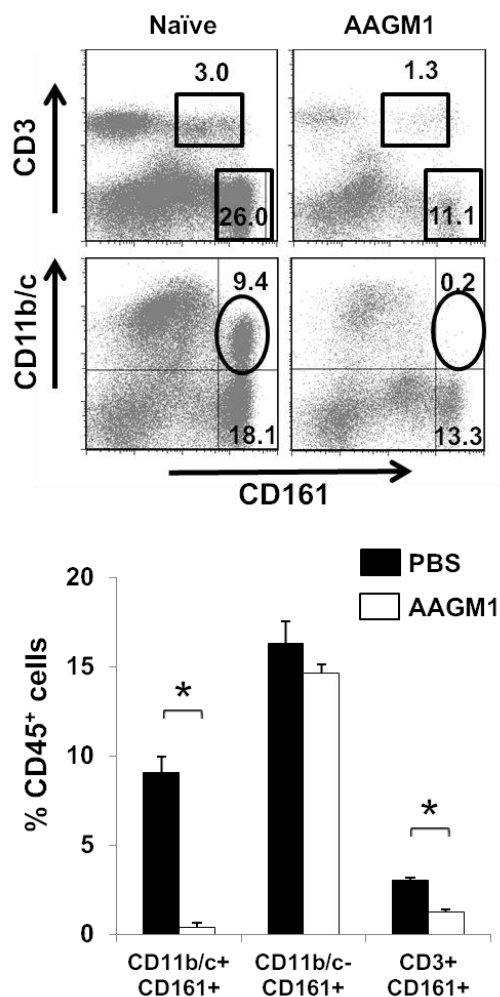


図 10. 抗アシアロ GM1 による肝 CD11b/c+成熟 NK 細胞除去効果

ナীবラットに抗アシアロ GM1 (AAGM1) を 50μl 静注し 24 時間後に犠牲死させた。肝 NPC、血液内の白血球を分離しフローサイトメトリーで分析した。コントロール群には PBS を同量静注した (N=各 3)。

上段：肝 NPC は CD45 でゲートし、CD3+CD161+NKT 細胞、CD11b/c+、CD11b/c-NK 細胞の割合を示した。

下段：肝内の CD11b/c+NK 細胞、CD11b/c-NK 細胞、CD3+NKT 細胞の割合を AAGM1 群、PBS 群で示した。*p<0.05.

⑦ 肝虚血再還流障害は成熟 NK 細胞が無いことにより減少した

グラフトの CD11b/c+成熟 NK 細胞の *in vivo* での役割を調べるために、ドナーに AAGM1 前治療を施してから、今までと同様 18 時間 UW 液下グラフト冷保存後に肝移植を行った。アロジェニック肝移植群 (Lewis⇒GFP+SD) においては、AAGM1 ドナー前治療群が PBS 治療コントロール群に対し、6, 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 (図 11A 左)。シンジェニック肝移植群 (SD⇒GFP+SD) でも AAGM1 治療群で優位な ALT 減少効果を認めたものの、効果は 40~50%と限定的であった (図 11A 右)。これらの結果より、肝内の CD11b/c+成熟 NK 細胞はアロジェニック肝グラフトの虚血再還流障害において重要な役割を果たしていると推測された。

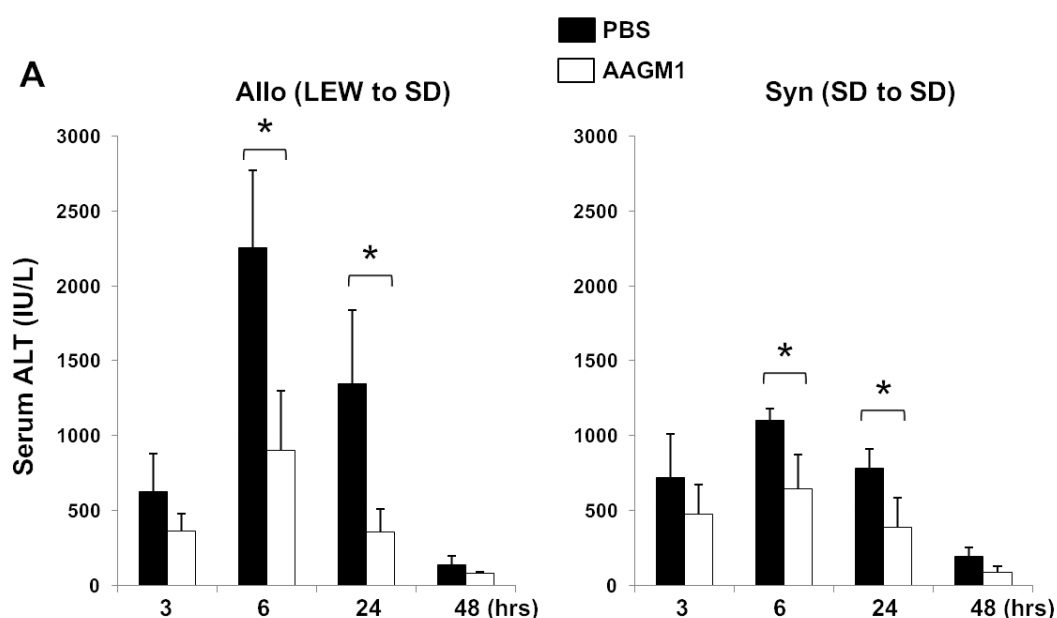


図 11. NK 細胞除去後の肝虚血再還流障害

グラフト摘出 24 時間前に AAGM1 治療を行い UW 液下 18 時間グラフト冷保存後に肝移植を行った。

A. アロジェニック (Lewis⇒SD)、シンジェニック (SD⇒SD) 肝移植後 3, 6, 24, 48 時間後の血清 ALT レベルを測定し AAGM1 治療群、PBS コントロール群とで比較した。N=各 4-6、*p<0.05.

移植後 48 時間後の病理組織学的評価により、AAGM1 治療群は PBS コントロール治療群に対し著明な壊死組織範囲の減少を認めた (図 11B)。肝内の CD11b/c+成熟 NK 細胞が欠如することで、GFP+宿主由来浸潤細

胞の割合も減少した (図 11C)。特にアロジェニックグラフトでは、AAGM1 治療群の GFP+ 宿主由来細胞数がコントロール PBS 治療群と比べ 50% 以下にまで低下した。さらに、フローサイトメトリーで肝 NPC 内の GFP+ 宿主由来細胞の系統分析を行ったところ、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 (図 11D)。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、PBS コントロール治療群のアロジェニックグラフトと比較して優位に減少していた (図 11E)。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。

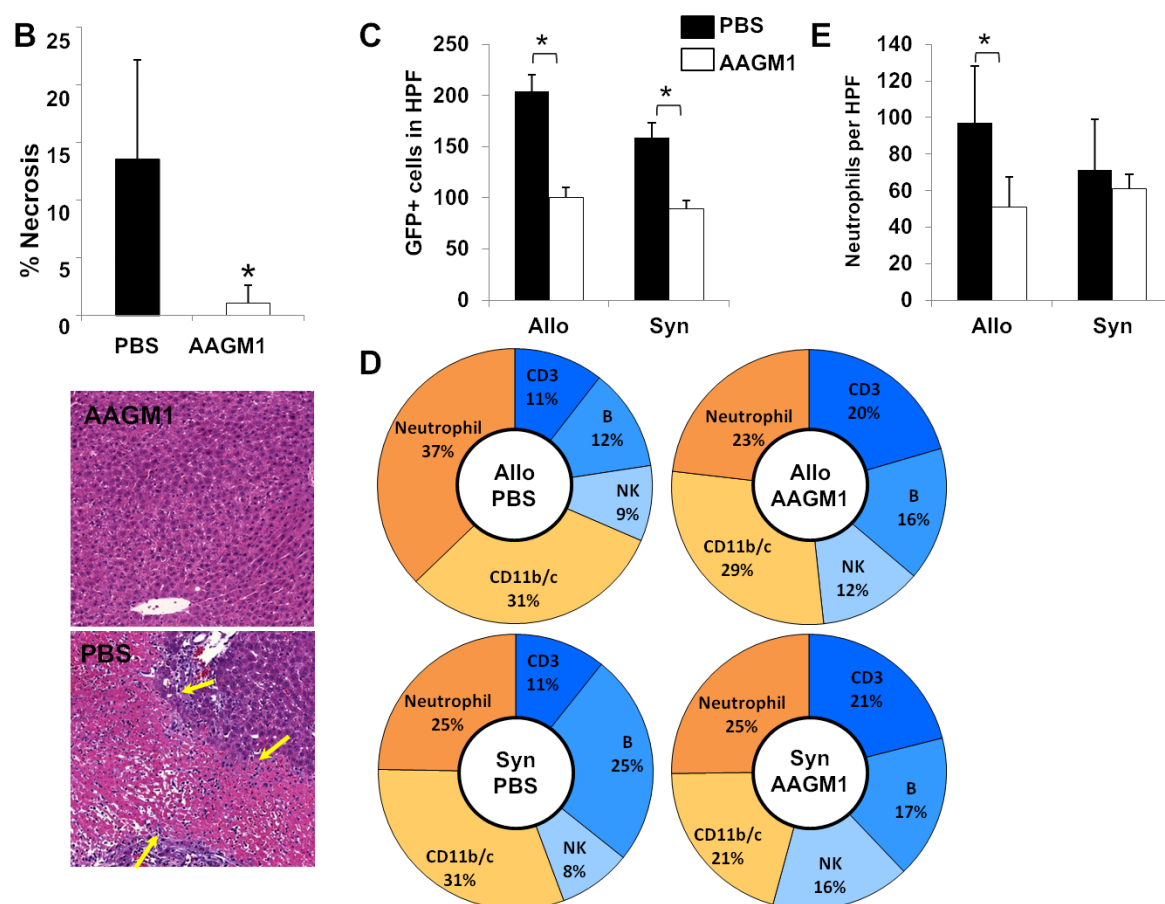


図 11

- B. 18 時間冷保存後 Lewis⇒SD アロジェニック移植を行い、移植後 48 時間の肝組織 (H&E, x100) を調べたところ、AAGM1 治療群で優位に壊死範囲の減少を認めた。N=各 3、*p<0.05.
- C. Lewis⇒GFP+SD アロジェニック移植を行い、AAGM1 治療群、コントロール PBS 群で移植後 3 時間の肝組織を調べ、GFP+ 宿主由来浸潤細胞

胞の数を比較した。N=各 3、* $p<0.05$ 。

D. 移植後 3 時間で AAGM1 治療群、PBS コントロール群のアロジェニックグラフト、シンジェニックグラフト計 4 群に分け、肝 NPC を分離しフローサイトメトリーを行い CD45+GFP+宿主由来浸潤細胞の組成を示した。

E. 移植後 3 時間で AAGM1 治療群、PBS コントロール群のアロジェニックグラフト、シンジェニックグラフト計 4 群のグラフト組織を用いて、Naphthol AS-D chloroacetate による免疫組織染色で好中球を染色（赤色）し陽性細胞数をカウントした。N=各 3、* $p<0.05$ 。

⑧ 肝内成熟 NK 細胞の欠如による炎症性メディエーターの減少

好中球の動員にはサイトカインやケモカインが重要であるため、次に肝のサイトカイン、ケモカイン、NK 細胞関連の細胞障害分子の遺伝子発現を RT-PCR で調べた。肝のサイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8) mRNA レベルは AAGM1 治療群でコントロール PBS 治療群と比べ優位に低かった。細胞障害分子 (Perforin、GranzymeB)、NKG2D も優位な低下を認めた (図 12)。

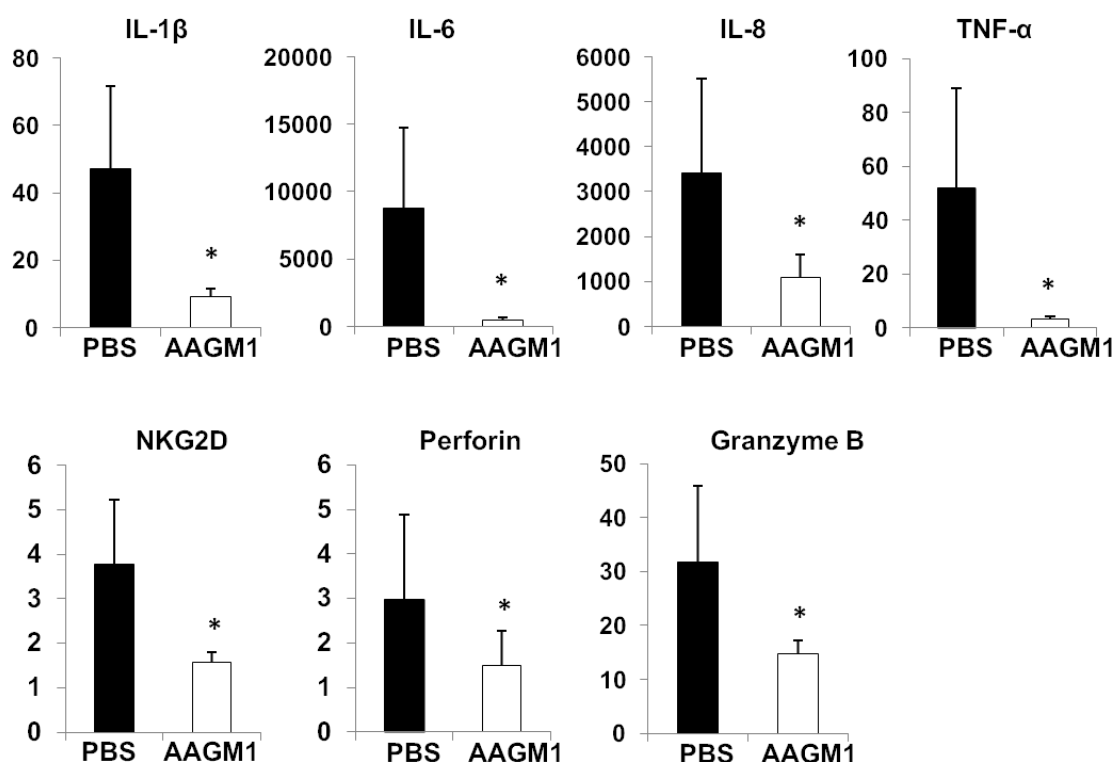


図 12. RT-PCR

AAGM1 治療群と PBS コントロール群で 18 時間冷保存後の肝移植を行い、移植後 3 時間でグラフトを採取し RT-PCR を行った。N=各 3、* $p<0.05$ 。

考察

本実験では、18 時間冷保存後の肝移植モデルを使用することで、移植後早期の虚血再還流障害がアロジェニック移植でシンジェニック移植と比較し優位に増強されるということが証明された。血清 ALT のピーク値、肝壊死組織の面積はそれぞれアロジェニックグラフトでシンジェニックグラフトに比較し優位に高い値を示した。アロジェニック移植でダメージが増強したことに関連して、GFP+の宿主由来細胞のより迅速で多量な浸潤を認め、さらに TNF- α 、IL-6、IL-1 β と言った炎症性サイトカイン mRNA レベルもより増殖を示した。これらの発見は、自然免疫細胞が移植後肝虚血再還流障害の早期相で、内因性危険シグナルだけでなく、アロ抗原をも認識し、反応している事を示唆した。宿主由来細胞の浸潤が増えた要因は、主に好中球浸潤が増えた事であった。これらの違いは、肝内にもともと存在する成熟 NK 細胞が早期に活性化され、グラフトから消失するという事実と関連性があると考えられ、この現象はシンジェニックグラフトには見られず、アロジェニックグラフトにのみ認められた。さらに、肝成熟 NK 細胞を除去することでアロジェニックグラフトの移植後ダメージが著明に軽減され、早期の宿主好中球浸潤も大きく減少した。これらの結果より、虚血再還流障害の早期相において、肝内 NK 細胞が自己・非自己の認識を介し自然免疫反応の開始誘導に重要な役割を果たしているということが示唆された。

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好中球の浸潤が多いという現象は腎臓、心臓移植の研究ですでに確認されている。UW 液 4 時間冷保存後のアロジェニック (F344 $\Rightarrow$ Lewis) と、シンジェニック (Lewis $\Rightarrow$ Lewis) ラット腎移植で、アロジェニックグラフトでより再還流後 24 時間以内の好中球と LFA-1 陽性細胞の浸潤が多かったことが報告されている³⁰。しかしながら、著者らは早期のグラフト機能、接着因子の発現、CD68+マクロファージの浸潤に違いを見いだせず、虚血再還流障害急性期の炎症反応は免疫学的な背景とは関連性がないと結論付けている。また、マウスの心移植実験で、シンジェニック (B6 $\Rightarrow$ B6) とアロジェニック (A/J $\Rightarrow$ B6) の組み合わせで移植を行い、再還流後 24 時間以内にアロジェニックグラフトの方が著しい好中球の浸潤、組織へのダメージによる壊死を認めたとしている³¹。その他にも、いくつかの研究で再還流後早期 (24 時間以内) のアロジェニックグラフトでのダメージ増強、サイトカイン・

接着因子の上昇を肝移植³²、腎移植³³、心移植³⁴モデルの実験で発表がなされている。しかし、これらの研究はいずれも後の適応免疫反応に焦点を置いており、早期にみられたアロジェニック、シンジェニックの違いに関してはさらに追及することなく疑問を残したままとなっている。つまり、これらの報告は、移植後虚血再還流障害に対する自然免疫反応が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増幅されているという我々の結果をサポートするものであるが、その詳細なメカニズムはまだ明らかにされていないといえる。

好中球は人間の血中にある白血球の中で最も多くを占めており、障害のある部位に真っ先に到達する自然免疫細胞の一つである。アロジェニックグラフトに好中球浸潤が多い理由は、もしかすると好中球によるアロ抗原直接認識によるものかもしれないが、好中球の即時反応は、一般的に非特異的で過去の細菌暴露等とも関連がないとされており、やはり他の自然免疫細胞によるアロ抗原認識が仲介している可能性が高いと考えられる。

El-Sawy Tらは、アロジェニックグラフトでおこる早期の好中球増幅効果はIFN- γ を抑制することで抑えられると言っており、CD4TやNK細胞ではなくCD8T細胞を除去することでその効果が得られるとしている³¹。著者らは、宿主のメモリーCD8T細胞がアロジェニックグラフトの内皮細胞に反応し、IFN- γ を産生することで内皮細胞を刺激しIFN- γ 依存性のケモカイン(Mig/CXCL9)を発現させて好中球を呼び寄せると結論付けている。それに対し、本実験では、アロジェニックグラフトとシンジェニックグラフトで早期のNK細胞の反応に大きな違いを認め、NK細胞の活性型受容体であるNKG2DのmRNAレベルはアロジェニックグラフトで高値を示した。さらに、NK細胞を除去することでアロジェニックグラフトの早期好中球浸潤が大幅に減少した。NK細胞は肝内に存在する白血球の重要な役割を占めており、我々の結果は肝虚血再還流障害にNK細胞が非常に重要な役割を持っており、シンジェニックグラフトでもその効果は認めしたが、アロジェニックグラフトでより顕著な役割を持っていることが示唆された。

NK細胞には、その表現型と機能によっていくつかのサブセットがある。人間では、CD56 dimのNK細胞は主に末梢（脾臓、血液）に存在し、細胞障害性を持ち、パーフォリン表出しIFN- γ を産生する役割を持つ。またCD56 brightのNK細胞は、パーフォリンを持たず未熟なタイプとされて

いる。マウスにおいては、NK 細胞のサブセットは CD11b の発現により定義されている。CD11b low のサブセットは骨髄やリンパ節に存在し、パーフォリンの発現が少なく、人間の CD56 bright の NK 細胞に相当する。一方で CD11b+ NK 細胞はより成熟したサブセットで、細胞殺傷能力が高く、様々な刺激により IFN- γ を産生する特徴を持つ。本研究では、肝内に脾臓や血中と比べ著しく多い割合の成熟した CD11b/c+ NK 細胞を確認した。肝内の NK 細胞は腫瘍細胞に対し高い殺傷能力を持ち、より多くの顆粒を内包し、より TRAIL、パーフォリン、グランザイム B を高く発現するとして知られており、IL-2 で刺激した脾臓の NK 細胞と似た性質を持つ³⁵⁻³⁷。本実験では、シンジェニックグラフトでは変化がなかったのに対し、アロジェニックグラフトから肝内の CD11b/c+ NK 細胞は速やかに消失した。また、CD11b/c- NK 細胞の関してはどちらもあまり差はなかった。さらに、AAGM1 は肝内で CD11b/c+ NK 細胞を選択的に除去し、AAGM1 治療群では著明に虚血再還流障害が減少し、好中球の浸潤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顕著に減少を認めた。

活性化した NK 細胞はアポトーシスによる細胞死を迎えるが、活性化が引き金となる NK 細胞の死は強力な細胞溶解活性と炎症性サイトカインの産生を引き起こす²⁶。実際、CD11b+ や CD56 dim の成熟した NK 細胞は細胞死に至りやすい。NK 活性型受容体である KIR や CLIR と sHLA が結合することで FasL を産生し NK 細胞の表面の Fas と結合して NK 細胞のアポトーシスを誘導し IFN- γ を産生する²⁷。活性型好中球により生成された ROS は CD56 dim の NK 細胞は殺傷できるが CD56 bright の NK 細胞はできない^{38,39}。NK 細胞の活性は細胞内の顆粒より細胞質にグランザイム B が出ることと関連し、それにより活性化が引き金となる細胞死が起こる⁴⁰。この故に、肝虚血再還流障害時にターゲット細胞（アロジェニック細胞）により NK 細胞の活性化が起こり、細胞死するという事が関連している可能性があると考え。近年 NK 細胞の抑制性、促進性受容体が発見され、また HLA class I が NK 細胞の重要なリガンドであることが発見されてから、アログラフトの拒絶と免疫寛容の誘導における NK 細胞の役割は重点的に研究が進められている⁴¹⁻⁴³。しかし、NK 細胞の虚血再還流障害における役割はほとんどされていない。マウスの腎温阻血モデルにおいては、NK 細胞がパーフォリン依存性の機序で尿細管上皮細胞を壊死させるということが証明されている⁴⁴。本研究は、アロジェニック、シンジェニック移植における NK 細胞の肝虚血再還流障害に対する関連を調べた最初

の実験である。

総括および結論

① 本研究全体から得られた新知見

- ・ 本研究は、NK 細胞が肝虚血再還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、肝虚血再還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。

② 新知見の意義

NK 細胞が虚血再還流障害において、特にアロ抗原認識をすることで大変重要な役割を持つことが分かったため、今後はさらに NK 細胞と自然免疫のアロ反応性に関する理解を深めることで肝移植による虚血再還流障害を克服する一助となることを期待したい。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されるか、また今後の課題について

自然免疫、獲得免疫において NK 細胞の果たす重要な役割が証明されつつあるので、今後はそれらがどのように関連していくのかについてのメカニズムの解明が求められる。また、大動物、人間においても同様の結果が得られるかどうかの研究にも期待したい。

謝辞

稿を終えるにあたり、研究者としては全くの初心者であった私を丁寧にご指導いただきました University of Pittsburgh, Department of Surgery, Thomas E. Starzl Transplant Institute の村瀬紀子先生、David A. Geller 先生、また北海道大学消化器外科学 I の植木伸也先生に深い謝意を表します。また、このような素晴らしい留学の機会を与えて下さりました北海道大学消化器外科 I 藤堂省前教授、ならびに学位論文の指導をいただきました北海道大学消化器外科 I 武富紹信教授に厚くお礼申し上げます。また、GFP トランスジェニックラットを供給いただきました大阪大学岡部勝先生、論文の構成に関し多大な協力をいただきました Thomas E. Starzl Transplant Institute 秘書の Carla Foraythe にもお礼申し上げます。

引用文献

1. Clavien, P. A., Harvey, P. R. & Strasberg, S. M. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: an overview and synthesis of current studies. *Transplantation*. 53-5, 957-978(1992)
2. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140(6), 805-820(2010)
3. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1(2), 135-145(2001)
4. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 10(12), 826-837(2010)
5. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am. J. Transpl.* 11(8), 1563-1569(2011)
6. Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Seminars in liver disease*. 2007;27(4):339-50. Epub 2007/11/06.
7. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986;319(6055):675-8. Epub 1986/02/20.
8. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today*. 1990;11(7):237-44. Epub 1990/07/01.
9. Bix M, Liao NS, Zijlstra M, Loring J, Jaenisch R, Raulet D. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature*. 1991;349(6307):329-31. Epub 1991/01/24.
10. Joncker NT, Raulet DH. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. *Immunological reviews*. 2008;224:85-97. Epub 2008/09/02.
11. Murphy WJ, Kumar V, Bennett M. Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID). Evidence that natural killer cells can mediate the specificity of marrow graft rejection. *The Journal of experimental medicine*.

- 1987;165(4):1212-7. Epub 1987/04/01.
12. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007;110(1):433-40. Epub 2007/03/21.
 13. Willemze R, Rodrigues CA, Labopin M, Sanz G, Michel G, Socie G, et al. KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2009;23(3):492-500. Epub 2009/01/20.
 14. Velardi A, Ruggeri L, Mancusi A, Aversa F, Christiansen FT. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Current opinion in immunology*. 2009;21(5):525-30. Epub 2009/09/01.
 15. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS letters*. 1997;407(3):313-9. Epub 1997/05/05.
 16. Tomiyama K, Ikeda A, Ueki S, Nakao A, Stolz DB, Koike Y, et al. Inhibition of Kupffer cell-mediated early proinflammatory response with carbon monoxide in transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology*. 2008;48(5):1608-20. Epub 2008/10/31.
 17. Ozaki KS, Kimura S, Nalesnik MA, Sico RM, Zhang M, Ueki S, et al. The loss of renal dendritic cells and activation of host adaptive immunity are long-term effects of ischemia/reperfusion injury following syngeneic kidney transplantation. *Kidney international*. 2012;81(10):1015-25. Epub 2012/01/27.
 18. Takahashi Y, Ganster RW, Gambotto A, Shao L, Kaizu T, Wu T, et al. Role of NF-kappaB on liver cold ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002;283(5):G1175-84. Epub 2002/10/17.
 19. Toyokawa H, Nakao A, Stolz DB, Romanosky AJ, Nalesnik MA, Neto JS, et al. 3D-confocal structural analysis of bone marrow-derived

- renal tubular cells during renal ischemia/reperfusion injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2006;86(1):72-82. Epub 2005/11/01.
20. Neto JS, Nakao A, Toyokawa H, Nalesnik MA, Romanosky AJ, Kimizuka K, et al. Low-dose carbon monoxide inhalation prevents development of chronic allograft nephropathy. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006;290(2):F324-34. Epub 2005/09/01.
 21. Cikos S, Bukovska A, Koppel J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC molecular biology*. 2007;8:113. Epub 2007/12/21.
 22. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8. Epub 2008/06/13.
 23. Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol*. 2006;176(3):1517-24. Epub 2006/01/21.
 24. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology*. 2008;9(5):503-10. Epub 2008/04/22.
 25. Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *Journal of leukocyte biology*. 2009;86(3):513-28. Epub 2009/06/23.
 26. Taga K, Yamauchi A, Kabashima K, Bloom ET, Muller J, Tosato G. Target-induced death by apoptosis in human lymphokine-activated natural killer cells. *Blood*. 1996;87(6):2411-8. Epub 1996/03/15.
 27. Spaggiari GM, Contini P, Dondero A, Carosio R, Puppo F, Indiveri F, et al. Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction. *Blood*. 2002;100(12):4098-107. Epub 2002/10/24.
 28. Kasai M, Yoneda T, Habu S, Maruyama Y, Okumura K, Tokunaga T. In vivo effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature*. 1981;291(5813):334-5. Epub 1981/05/28.
 29. Habu S, Fukui H, Shimamura K, Kasai M, Nagai Y, Okumura K, et al. In vivo effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK activity and

- enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J Immunol.* 1981;127(1):34-8. Epub 1981/07/01.
30. Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, et al. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney international.* 2000;58(5):2166-77. Epub 2000/10/24.
 31. El-Sawy T, Miura M, Fairchild R. Early T cell response to allografts occurring prior to alloantigen priming up-regulates innate-mediated inflammation and graft necrosis. *The American journal of pathology.* 2004;165(1):147-57. Epub 2004/06/25.
 32. Shen K, Zheng SS, Park O, Wang H, Sun Z, Gao B. Activation of innate immunity (NK/IFN-gamma) in rat allogeneic liver transplantation: contribution to liver injury and suppression of hepatocyte proliferation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2008;294(4):G1070-7. Epub 2008/02/23.
 33. Gottmann U, Notheisen A, Brinkkoetter PT, Yard BA, Waldherr R, Schnuelle P, et al. Influence of donor pretreatment with dopamine on allogeneic kidney transplantation after prolonged cold storage in rats. *Transplantation.* 2005;79(10):1344-50. Epub 2005/05/25.
 34. Furukawa Y, Libby P, Stinn JL, Becker G, Mitchell RN. Cold ischemia induces isograft arteriopathy, but does not augment allograft arteriopathy in non-immunosuppressed hosts. *The American journal of pathology.* 2002;160(3):1077-87. Epub 2002/03/14.
 35. Vanderkerken K, Bouwens L, Wisse E. Characterization of a phenotypically and functionally distinct subset of large granular lymphocytes (pit cells) in rat liver sinusoids. *Hepatology.* 1990;12(1):70-5. Epub 1990/07/01.
 36. Vermijlen D, Luo D, Froelich CJ, Medema JP, Kummer JA, Willems E, et al. Hepatic natural killer cells exclusively kill splenic/blood natural killer-resistant tumor cells by the perforin/granzyme pathway. *Journal of leukocyte biology.* 2002;72(4):668-76. Epub 2002/10/16.
 37. Luo D, Vanderkerken K, Chen MC, Vermijlen D, Asosingh K,

- Willems E, et al. Rat hepatic natural killer cells (pit cells) express mRNA and protein similar to in vitro interleukin-2 activated spleen natural killer cells. *Cellular immunology*. 2001;210(1):41-8. Epub 2001/08/04.
- 38.Hansson M, Asea A, Ersson U, Hermodsson S, Hellstrand K. Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J Immunol*. 1996;156(1):42-7. Epub 1996/01/01.
- 39.Harlin H, Hanson M, Johansson CC, Sakurai D, Poschke I, Norell H, et al. The CD16⁻ CD56(bright) NK cell subset is resistant to reactive oxygen species produced by activated granulocytes and has higher antioxidative capacity than the CD16⁺ CD56(dim) subset. *J Immunol*. 2007;179(7):4513-9. Epub 2007/09/20.
- 40.Ida H, Nakashima T, Kedersha NL, Yamasaki S, Huang M, Izumi Y, et al. Granzyme B leakage-induced cell death: a new type of activation-induced natural killer cell death. *European journal of immunology*. 2003;33(12):3284-92. Epub 2003/11/25.
- 41.Obara H, Nagasaki K, Hsieh CL, Ogura Y, Esquivel CO, Martinez OM, et al. IFN-gamma, produced by NK cells that infiltrate liver allografts early after transplantation, links the innate and adaptive immune responses. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(9):2094-103. Epub 2005/08/13.
- 42.Young NT. Immunobiology of natural killer lymphocytes in transplantation. *Transplantation*. 2004;78(1):1-6. Epub 2004/07/17.
- 43.Pratschke J, Stauch D, Kotsch K. Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2009;22(9):859-68. Epub 2009/04/24.
- 44.Zhang ZX, Wang S, Huang X, Min WP, Sun H, Liu W, et al. NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol*. 2008;181(11):7489-98. Epub 2008/11/20.