

令和元年6月5日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09014

研究課題名(和文) 肝線維化における自然免疫を介した肝再生への誘導

研究課題名(英文) Induction of liver regeneration via innate immunity in liver fibrosis

研究代表者

阿部 和道 (ABE, KAZUMICHI)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30468128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝線維化における古典的樹状細胞 (conventional DC:cDC) の役割を解明することを目的に研究し、以下の結果を得た。1. CpGにより刺激されたcDCは抗炎症性サイトカインであるIL-10を産生した。2. 活性化マクロファージが産生した炎症性サイトカインをIL-10が抑制した。3. CpGを投与するとIL-10が上昇し、四塩化炭素誘導の肝線維化が軽減するが、トランスジェニックマウスでcDCを消失することでALTが上昇し、肝線維化が進行し、その結果有意に生存率が低下した。cDCは肝臓の炎症と線維化を抑制するのに重要な役割を担っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肝線維化におけるcDCの役割を解明することが目的であり、炎症の中心的存在であるcDCと自然免疫に焦点をあてている点が特色である。生体のホメオスターシスとして、腸管内から門脈を介して流入するLPSやCpGによって、または肝障害後のネクロシス自己細胞によってKupffer細胞や肝星細胞の活性化が過剰とならないように、cDCがその活性化を制御している可能性が予想される。肝線維化におけるcDCの研究はまだほとんどなされていない。これらの機序が解明できれば、将来的には慢性肝炎・肝硬変に対する新たな抗線維化療法のターゲットになりえると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the role of conventional dendritic cells (cDC) in liver fibrosis, and obtained the following results. 1. CpG-stimulated cDC produced anti-inflammatory cytokines such as IL-10. 2. IL-10 suppressed inflammatory cytokines produced by activated macrophages. 3. Administration of CpG results in elevation of IL-10 and reduction of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis, but depleting cDC in transgenic mice results in elevation of ALT and progression of liver fibrosis. The survival rate decreased significantly. cDC plays an important role in suppressing inflammation and fibrosis in the liver.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝線維化 樹状細胞 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓における炎症が慢性化すると、活性化肝星細胞 (HSC) は線維を産生し続け肝硬変へ至り、肝不全や門脈圧亢進症、肝細胞癌の合併症を引き起こし、予後を左右する要因となる。近年、その病態の発症機序に沿った抗線維化療法が注目されている。肝障害後の肝線維化のメカニズムとして、自然免疫を介した Toll 様受容体 4 (TLR4) リガンドによるマクロファージの活性化、PDGF、TGF- β の産生亢進が起こり、これらサイトカインによる HSC の活性化が主要な経路と考えられている (Seki E et al. Nature Med. 2007)。近年、肝内の古典的樹状細胞 (conventional DC:cDC) がネクローシス自己細胞由来の因子 (DAMPs) 刺激による TLR9 を介して活性化し、IL-10 産生により肝障害を改善していることが報告された (Bamboot ZM et al. J Clin Invest. 2010)。肝線維化において cDC が抗炎症性に働くことが予測されるが、その役割については十分に理解されていない。本研究の申請者らは、これまで自然免疫の認識機構のひとつである TLR ファミリーのうち、TLR9 のリガンドである CpG DNA (CpG) と実験肝炎モデルに関する検討を行ってきた (Abe K et al. Fukushima J Med. Sci 2005)。炎症モデルにおける CpG の抗炎症作用が Type I IFN を介していることを証明し (Katakura K et al. Gastroenterology 2004, J Clin Invest. 2005)、腸管粘膜におけるホメオスタシスに TLR9 signaling が重要であることも報告した (Lee J, Katakura K et al. Nature Cell Biol 2006)。また CpG を介した cDC の役割についても報告し (Abe K et al. Proc Natl Acad Sci USA 2007)、CpG をマウスへ繰り返し投与することで、肝線維化を抑制することも確認した (Abe K et al. AASLD 2010)。CpG がマクロファージにおける MMP9 や MMP13 の発現を上昇させることや、その MMPs が肝線維化を改善することが予想される。本研究では、TLR9 を介した肝線維化進展・制御における cDC の役割に注目した

2. 研究の目的

cDC は抗原提示能を含む多彩な機能を有する細胞である。肝線維化進展・制御のメカニズムには、微生物由来の因子 (PAMPs) や DAMPs の刺激によって認識するレセプター (TLRs) を介してマクロファージや HSC が重要な役割を担っていることが知られているが、cDC の役割に関してはまだ十分に理解されていない。本研究では、肝線維化における cDC の機能的特性とマクロファージとの関係について解析を行い、さらに肝線維化の軽減実験を行い、その役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

肝線維化マウスモデルにおける古典的樹状細胞の抑制性の役割

検討 1: 既報に準じて 8-12 週齢の B6.FVB-Tg (Itgax-DTR/EGFP) 57Lan/J:cD11c-DTR マウス (DTR マウス) にジフテリアトキシン (DT) 100ng を週 2 回腹腔内投与し cDC を消失させ、四塩化炭素 (CCl₄) 投与 (0.5 mL/Kg, 週 2 回) 開始 6 週間後の生存率を評価した。cDC が消失した状態で肝線維化がさらに進行すれば生命維持が困難となることが予想される。それは逆に cDC が存在していれば、抑制性の役割により肝線維化の進行を抑制あるいは生命維持に關与する可能性がある。この独自仮説に基づいて検討を行った。

検討 2: CCl₄ 誘導の肝線維化は、投与を休止すると肝線維化が改善することが報告されている。その変化を利用して、肝線維化の改善過程で cDC が關与している可能性があり、以下の方法で cDC の役割について検討を行った。CCl₄ を 6 週間投与し、CCl₄ 投与終了から 24h 後に DT を投与、CCl₄ 投与終了 72h 後に ALT 値、肝組織を評価した。肝臓での炎症程

度、肝線維化の程度がどれだけ変化しているか評価することで、cDCの肝線維化の改善過程における役割を理解できると思い検討した。

肝線維化マウスモデルにおける TLR9 を介した古典的樹状細胞の抑制性の役割

検討 3: 6-8 週齢の C57BL/6 マウスに CCl₄ を投与し、CCl₄ 投与開始 3 週間後から CpG (10μg/mouse)を 1 回/週で皮下投与、CCl₄ 投与開始 6 週間後に肝組織、TNF-α、IL-6、IL-10 mRNA を評価した。既報では、肝内の cDC が DAMPs 刺激による TLR9 を介して活性化し、IL-10 産生により肝障害を改善していることが報告されている。炎症や肝線維化が改善する可能性が期待される。

検討 4: CCl₄ 投与開始 3 週間後から CpG を週 1 回で皮下投与し、DT を投与し cDC を消失させ、CCl₄ 投与開始 6 週間後の生存率を評価した。CpG 投与による TLR9 を介した cDC の抑制効果があれば、cDC を消失させることによりその効果も消失する可能性がある。

検討 5: CCl₄ を 6 週間投与し、CCl₄ 投与開始 3 週間後から CpG を週 1 回で皮下投与し、CCl₄ 投与終了から 24h 後に DT を投与し、CCl₄ 投与終了 72h 後に ALT、肝組織を評価した。TLR9 を介した活性化の元で、肝臓での炎症程度、肝線維化の程度がどれだけ変化しているか評価することで、cDC の肝線維化の改善過程における役割を理解できると思い検討した。

検討 6: 骨髄由来の cDC を培養して CpG で刺激して 24 時間培養したのち、上清中の TNF-α、IL-6、IL-10 を ELISA で測定した。

検討 7: マクロファージ細胞株 (RAW246.7) に rIL-10 を添加し、6 時間培養した後、LPS で刺激し、3 時間後上清で ELISA を用いて TNF-α、IL-6 を測定した。

4 . 研究成果

肝線維化マウスモデルにおける古典的樹状細胞の抑制性の役割

検討 1 の結果: CCl₄ 投与群は全例が 6 週間生存し、CCl₄/DT 投与群は全例 10 日以内に死亡した (Log rank test $P < 0.01$)。cDC が消失したことで肝線維化が進行し、肝不全に伴い死亡した可能性が推測され、cDC が肝線維化において抑制に働いている可能性が示された。

検討 2 の結果: CCl₄/DT 投与群は CCl₄ 投与群と比較して有意に ALT が上昇し、肝線維化進行を認めた。cDC が肝臓における炎症を抑制し、肝線維化改善に関与している可能性が示された。

肝線維化マウスモデルにおける TLR9 を介した古典的樹状細胞の抑制性の役割

検討 3 の結果: CCl₄ 投与群では TNF-α、IL-6 が上昇し肝線維化が進行していた。CpG/CCl₄ 投与群では IL-10 が上昇し、肝線維化が軽減していた。IL-10 を介した肝線維化抑制効果の可能性が示唆された。

検討 4 の結果: CCl₄/CpG 群は全例生存し、CCl₄/CpG/DT 群では 6 週までに全例死亡した。CpG 投与により TLR9 を介した活性化で IL-10 が上昇し、肝線維化を改善していたが、cDC が消失するとその効果も消失した。

検討 5 の結果: CCl₄/CpG/DT 投与群は CCl₄/CpG 投与群と比較して有意に ALT が上昇し、肝線維化進行を認めた。CpG 投与により TLR9 を介した活性化で IL-10 が上昇し、肝線維化を改善していたが、cDC が消失するとその効果も消失し、肝臓の炎症、肝線維化が誘導された。

検討 6 の結果: 骨髄樹状細胞は CpG の刺激で、TNF-α、IL-6 だけでなく、IL-10 を産生し

た。

検討 7 の結果：IL-10 は、LPS 刺激による活性化マクロファージが産生した TNF- α 、IL-6 を抑制した。

cDC が CpG で活性化され、IL-10 を介してマクロファージからの炎症性サイトカインを抑制し、炎症や肝線維化の制御に重要な役割を担っていることが考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大平 弘正

ローマ字氏名：Hiromasa Ohira

所属研究機関名：福島県立医科大学

部局名：消化器内科学講座

職名：教授

研究者番号 (8桁): 90274951

(2)連帯研究者

研究協力者氏名：片倉 響子

ローマ字氏名 : Kyoko Katakura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。