

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10027

研究課題名(和文) 肝移植免疫における肝星細胞の小胞体ストレス応答を介した免疫制御に関する研究

研究課題名(英文) Immune response mediated by hepatic stellate cells with endoplasmic reticulum stress in liver transplantation.

研究代表者

荒川 悠佑 (ARAKAWA, Yusuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・徳島大学専門研究員

研究者番号：00448325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植において免疫寛容誘導による免疫抑制剤からの離脱は究極の目標である。Kupffer細胞とともに肝星細胞は免疫寛容環境の維持に重要な役割を果たしていると推測される。肝内免疫と肝星細胞に関する報告はこれまでなく、そのメカニズムは不明である。免疫制御と小胞体ストレスに関してはこれまでに、小胞体ストレス経路の1つであるPERK経路が自然免疫を担うマクロファージのCHOP誘導を介したアポトーシス抑制や、獲得免疫の恒常性維持のためその源となる造血幹細胞の品質維持に関与していることが報告されている。本研究での目的は、肝移植免疫における肝星細胞の役割と小胞体ストレスの関与を明らかにすることである。

研究成果の概要(英文)：Withdrawal from immunosuppressant by induction of tolerance is the ultimate goal in liver transplantation. It is speculated that together with Kupffer cells, hepatic stellate cells play an important role in maintaining the immune tolerance environment. There have been no reports on intrahepatic immunity and hepatic stellate cells, and its mechanism is unknown. Regarding immune regulation and endoplasmic reticulum stress, the PERK pathway, which is one of the endoplasmic reticulum stress pathways, has been reported to inhibit apoptosis via CHOP induction of macrophages responsible for innate immunity. It is also reported that it is involved in maintaining quality of hematopoietic stem cells. The purpose of this study is to clarify the role of hepatic stellate cells and the involvement of endoplasmic reticulum stress in liver transplantation immunity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝移植 肝内免疫 肝星細胞 小胞体ストレス

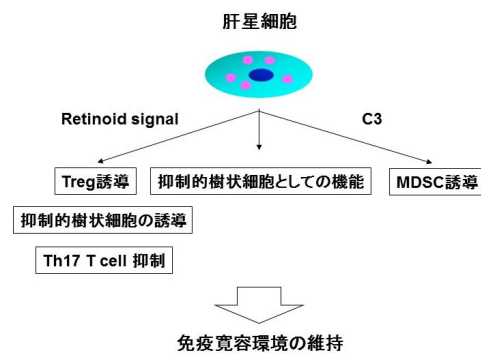
1. 研究開始当初の背景

(1) 肝内免疫の維持

肝臓への血流は腸管から門脈を介して供給されており、肝細胞はこれらに含まれる異物や有毒物質を類洞内で処理する。このような解剖学的臓器特性上、不必要な免疫活性をおさえることが肝内免疫を安定に保つために必要である。つまり肝内免疫は immunogenic ではなく tolerogenic になっているべきであると考えられる。肝類洞壁細胞 (liver sinusoidal endothelial cell) や Kupffer 細胞等とともに肝星細胞 (Hepatic stellate cell) はこの免疫寛容環境の維持に重要な役割を果たしていると報告されている。(Immunol Rev, 2000)

(2) 肝星細胞による免疫制御

本研究において我々が着目した肝星細胞 (伊東細胞) は、群馬大学の伊東俊夫教授により発見され、肝類洞外の Disse 腔に存在する肝線維芽細胞系の細胞であり、ビタミン A 貯蔵を行うとともに、筋線維芽細胞へ分化し膠原線維を産生し、肝炎及び肝硬変の肝線維化過程において中心的な役割を担っている (Liver int. 2009)。免疫と肝星細胞についてのこれまでの報告では、**retinoid signal を介した免疫寛容環境の形成 (J immunology 2014)、免疫抑制的な抗原提示細胞としての機能 (Hepatology 2008) myloid derived suppressor cell (MDSC) の誘導 (Hepatology 2011) といった役割があげられるが、その詳細な免疫制御の機序は不明である。**



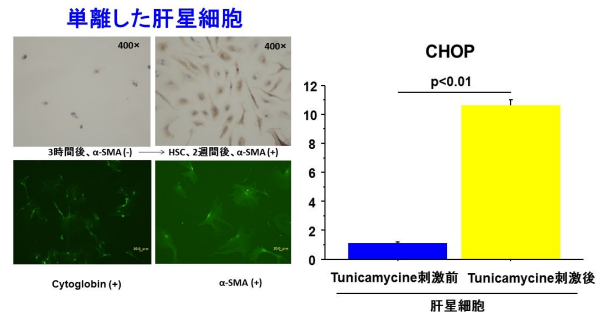
(3) 免疫制御と小胞体ストレス

小胞体は体内に Ubiquitous に存在しており、小胞体ストレス応答は生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。免疫制御と小胞体ストレスに関してはこれまでにいくつかの報告がみられ、小胞体ストレス経路の1つである PERK 経路が自然免疫を担うマクロファージの CHOP 誘導を介したアポトーシス抑制や (Nat Cell Biol 2009)、獲得免疫の恒常性維持のためその源となる造血幹細胞の品質維持に参与していることが報告されている (Nat Cell Biol 2011)。

(4) 小胞体ストレスと肝星細胞

これまでに肝星細胞と小胞体ストレスに関しては、肝星細胞による肝線維化に関するとの報告があるが (J Hepatol 2013)、免疫制御に関する研究は皆無である。我々

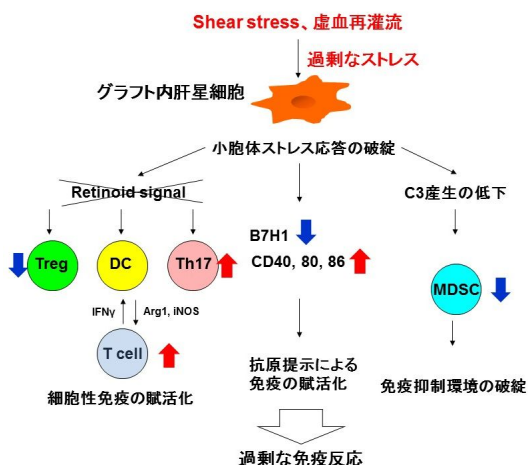
は実際にマウス肝臓より分離培養することに成功しており、小胞体ストレス誘導剤 tunicamycin を用い加齢肝における肝星細胞の小胞体ストレス応答を評価している。



2. 研究の目的

肝移植において免疫寛容誘導による免疫抑制剤からの離脱は究極の目標である。元来肝臓は門脈血流を介して腸管などからの異物が取り込まれているにも関わらず、肝内免疫は一定に制御されており、**肝内免疫をコントロールするメカニズムの存在が示唆され、肝星細胞が重要な変化・役割を担っていることが推測される。**肝内免疫と肝星細胞に関する報告はこれまでなく、そのメカニズムは不明である。近年、適切な免疫機能の調節に関して、小胞体ストレスが重要な役割をはたしていることが報告されている。本研究では、肝移植免疫における肝星細胞の役割と小胞体ストレスの関与について、ヒト及びマウス検体より単離した肝星細胞を用いた in vitro の実験、ノックアウトマウスを用いた in vivo の実験により明らかにする。肝移植モデルを用いて肝星細胞と小胞体ストレス応答について以下の項目に関する検討を行う。

- (1) 肝星細胞における小胞体ストレス応答
- (2) ストレス誘導下における肝星細胞と免疫応答
- (3) 過少グラフトモデルを用いた肝星細胞と免疫応答
- (4) ノックアウトマウスを用いた各モデルにおける各主要調節器 (ATF6, PERK, IRE1)の関与



3. 研究の方法

in vitro 実験で、マウスより isolation した肝星細胞を用いて、小胞体ストレスを誘導し、その免疫制御能を評価する。さらに小胞体ストレスノックアウトマウスを用いて、小胞体ストレス経路の関与を検討する。iv vivo ではマウス肝移植を行い、肝移植後のグラフト肝より肝星細胞を単離しその免疫能を確認する。さらに小胞体ストレスノックアウトマウスの肝臓をグラフトとして用いて、小胞体ストレス経路の関与を検討する。

in vitro における肝星細胞の小胞体ストレス応答を介した免疫制御に対する検討

(1) 小胞体ストレス誘導による肝星細胞の免疫制御能についての検討

小胞体ストレス応答誘導剤 (tunicamycin) を投与し、小胞体ストレスマーカー Bip (GRP78), CHOP, XBP-1, ATF6 を PCR, Western blot で測定し、免疫表面マーカー MHC class1/2, CD11b, CD11c, CD40, CD80, CD86, B7H1, Gr1, B220, F4/80 を FACS を用いて測定する。また、骨髄より採取した未熟骨髄細胞と共培養を行い、その Treg, torelogenic DC、MDSC への分化誘導能を評価する。



(2) 小胞体ストレス経路 (ATF6, PERK, IRE1)ノックアウトマウスを用いた検討

小胞体ストレス経路ノックアウトマウスより単離した肝星細胞を用いた検討
小胞体ストレス誘導剤 (tunicamycin) を加え免疫能を wild type マウスから isolation した肝星細胞と比較・検討する。
評価項目は検討 1 と同様とする。

in vivo 肝星細胞の小胞体ストレス応答を介した免疫制御に対する検討

(1) 肝移植モデルにおける検討

移植グラフトより肝星細胞を移植後に採取し、その免疫能を検討する。検討項目は小胞体ストレスマーカー、免疫表面マーカーに加えて、Treg, torelogenic DC、MDSC への分化誘導能を評価する。



(2) 肝移植モデルにおける小胞体ストレス経路 (ATF6, PERK, IRE1)ノックアウトマウスを用いた検討

小胞体ストレス経路ノックアウトマウスよりグラフトを採取し、wild type マウスへ肝移植を行い、グラフトの生着率、グラフト内の肝星細胞を単離しその免疫能を検討する。

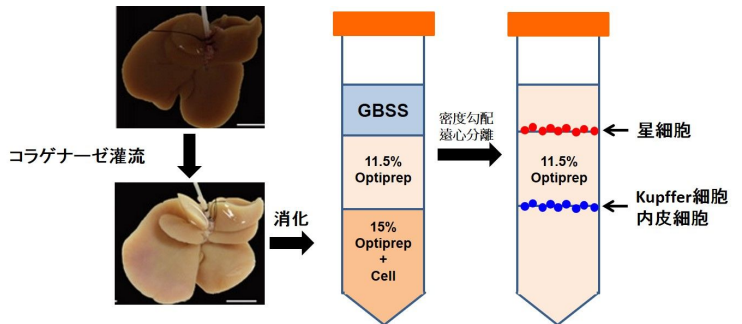


(3) 肝移植モデルにおけるケミカルシャペロンを用いた小胞体ストレス軽減による移植免疫寛容に関する検討

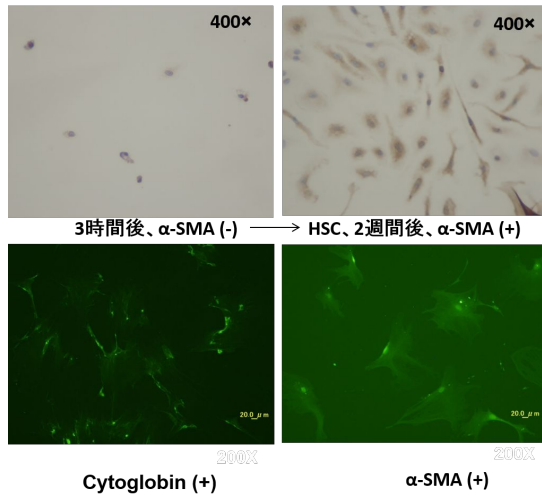
ケミカルシャペロン誘導剤 (TUDCA : tauroursodeoxycholic acid) による前処置を行い、小胞体ストレスを軽減したグラフトを移植することで、免疫反応制御を確認する。

4. 研究成果

マウス肝星細胞の単離

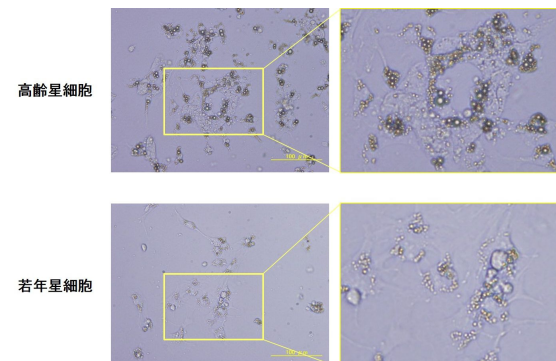


単離星細胞

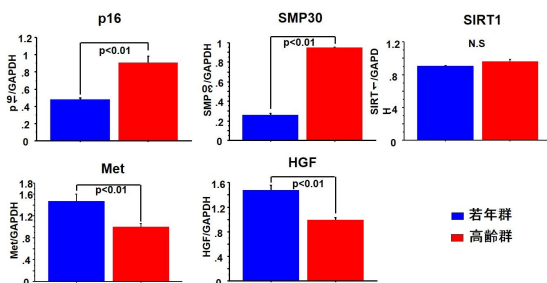


分離した星細胞は培養後 SMA positive となり活性化される。

若年肝星細胞と高齢星細胞の比較検討



高齢星細胞には脂肪滴が多い。



高齢肝星細胞において、肝再生マーカーの発現が減弱。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Rui feng, Morine Y, Ikemoto T, Imura S, Iwahashi S, Saito Y, Shimada M.

Photobiomodulation with red light emitting diodes accelerates hepatocytes proliferation through reactive oxygen species / extracellular signal-regulated kinase pathway.

DOI:10.1111/hepr.13182

Hepato Res. 2018 Apr 30. [Epub ahead of print] (査読有)

2. Saito Y, Morine Y, Shimada M

Mechanism of impairment on liver regeneration in elderly patients: Role of hepatic stellate cell function.

doi: 10.1111/hepr.12872.

Hepato Res. 2017;47(6):505-513 (査読有)

3. Yamada S, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Arakawa Y, Iwahashi S, Saito Y, Yoshikawa M, Teraoku H, Shimada M.

Liver regeneration after splenectomy in patients with liver cirrhosis.

doi: 10.1111/hepr.12573.

Hepato Res. 2016;46(5):443-449. (査読有)

[学会発表](計 3 件)

1. Saito Y, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Iwahashi S, Yoshikawa M, Yoshimoto T, Shimada M

Preoperative Prognostic Nutritional Index Predicts Both Short-and Long-Term Outcomes after Liver Resection For Hepatocellular Carcinoma.

AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS

2017 (ACS), 2017年10月22日-26日, SAN DIEGO CONVENTION CENTER (SAN DIEGO, CA, USA)

2. Feng R, Shimada M, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Iwahashi S, Saito Y, Yoshikawa K,

Yoshimoto T, Higashijima J

18th Congress of the European Society for Organ Transplantation(ESOT)2017, 2017年9月24日-27日, the Centre de Convencions Internacional de Barcelona (CCIB) (Barcelona, Spain)

3. 齋藤 裕, 奥村 仙示, 森根 裕二, 平山 明由, 梶浦 大資, 多々納 浩, 居村 暁, 池本 哲也, 岩橋 衆一, 吉川 雅登, 良元 俊昭, 高田 厚史, 島田 光生

メタボローム解析を用いた肝切除後代謝物解析と肝再生因子の解明

第117回日本外科学会定期学術集会 ワークショップ, 2017年4月27日-29日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒川 悠佑 (ARAKAWA, Yusuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・徳島大学専門研究員

研究者番号: 00448325

(2)研究分担者

島田 光生 (SHIMADA, Mitsuo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 10216070

池本 哲也 (IKEMOTO, Tetsuya)

徳島大学・病院・特任准教授
研究者番号: 20398019

森根 裕二 (MORINE, Yuji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号: 60398021

居村 暁 (IMURA, Satoru)

徳島大学・病院・特任教授
研究者番号: 90380021

親泊 政一 (OYADOMARI, Seiichi)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・教授
研究者番号: 90502534