

令和元年6月19日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08751

研究課題名(和文)肝固有Kupffer細胞のコレステロール代謝における役割

研究課題名(英文)The function of Kupffer cells in cholesterol metabolism

研究代表者

中島 弘幸(Nakashima, Hiroyuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・免疫・微生物学・助教)

研究者番号：10574064

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)：肝臓は代謝臓器であると同時に、免疫臓器でもある。Kupffer細胞は、NKT細胞やNK細胞、遊走マクロファージと共に肝臓の免疫機能を担っている。FGF5欠損マウスに高脂肪食を摂取させると遊走マクロファージが強く活性化され、非アルコール性脂肪性肝炎と炎症を惹起することを明らかにした。コレステロールの核内レセプターLXRは肝臓に特異的に発現されている。この分子を欠損させると高コレ食により、マクロファージの活性化、NKT細胞とTh2サイトカインの消失により炎症を悪化させる。腎臓にもNKT細胞は存在し、尿管上皮細胞や糸球体内皮細胞を傷害することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓のマクロファージには古くから知られているKupffer細胞だけでなく、遊走マクロファージがあり、様々な炎症において中心的な役割を果たす。コレステロールの経口摂取は、この遊走マクロファージを強く活性化し、免疫細胞のバランスを傷害し、過栄養状態の臓器障害を悪化させる。このメカニズムが、肝臓において非アルコール性脂肪性肝炎を惹起することを確認したことは大変有意義である。さらに腎臓においても同様に、NKT細胞が臓器障害の主役となることを明らかにしたことで、生活習慣病における慢性腎疾患の原因の一端を示唆できたことは有意義であった。

研究成果の概要(英文)：The liver is not only a metabolic organ but also an immune organ. Kupffer cells, NKT cells, NK cells, and recruiting macrophages, comprise the effective immune system in the liver.

We reported that in FGF5-deficient mice, high-fat diet consumption strongly activates recruited macrophages and cause non-alcoholic steatohepatitis. The cholesterol nuclear receptor LXR is specifically expressed in the liver. Depletion of this molecule causes macrophage activation, loss of NKT cells as well as Th2 cytokines, which in turn, cause inflammation. NKT cells are also present in the kidney and injure tubular epithelial cells and glomerular endothelial cells.

研究分野：自然免疫

キーワード：Kupffer細胞 マクロファージ 自然免疫 脂質代謝 非アルコール性脂肪性肝炎 コレステロール代謝  
NKT細胞

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

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は最大の実質臓器であり代謝臓器である。その一方で Kupffer 細胞や Natural Killer T (NKT)細胞、Natural Killer (NK) 細胞といった特徴的な自然免疫細胞を多量に有し、自然免疫臓器としての大きな一面がある。代謝と免疫という全く異なった機能が、一つの臓器に存在しているのは何らかの理由があるのではないだろうか。両者は独立して機能しているわけではなく、表裏一体となり相互に影響し合っているのではないだろうか。近年、代謝疾患は免疫細胞による慢性炎症が、発症と病態悪化の要因となることが明らかにされ、両者の関連が注目されている。この二つの機能が同居している肝臓は、病態解明のための極めて有用な研究対象である。肝独自の幹細胞から分化する Kupffer 細胞の、コレステロール代謝に果たす役割を明らかにする。

### 2. 研究の目的

肝臓に於ける Kupffer 細胞、マクロファージ、NKT 細胞の機能がコレステロール代謝とどのように関連しているか解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

コレステロール過剰摂取マウス、NASH モデルマウス、コレステロール核内レセプターの欠損マウスを用いて、肝臓単核球を分離しフローサイトメトリーにて細胞の組成を確認する。また、急性肝炎を惹起する物質を用いて、各自然免疫細胞がどのように関連しているか確認する。

### 4. 研究成果

Fibroblast growth factor 5 (FGF5) は哺乳類において体毛の長さを決定する因子として知られている。この遺伝子を欠損したマウスに高脂肪食を8週間摂取させると、肝臓に脂肪化とともに強い炎症所見と繊維化がみられ、ヒトにおける NASH に酷似した病変をきたす。さらに我々は、このモデルにおいて肝単核球のうち特にマクロファージが異常に増加していることを見出した。増加している細胞群は F4/80 が陽性であり CD68 と CD11b の両者が陽性であった。この特異的なマクロファージは CR1g 遺伝子が陰性であり、貪食能も弱いため CD11b 陽性分画、すなわち遊走 KC/M 由来であると考えられた。この分画は炎症性サイトカインである TNF の mRNA の発現が亢進しており、FasL を表出していることから、炎症の起点となり肝細胞を傷害する可能性が高い。抗 TNF 抗体を継続的に投与しながら高脂肪食を摂取させると、FasL の発現は抑制され、肝機能は改善した。遊走 KC/M は骨髄由来であり、放射線に対して強い感受性を持つ特徴がある。そこで高脂肪食を摂取させながら、低用量放射線 (1Gy) を週1回8週間照射すると、肝障害が著しく改善することを見出した。肝組織を比較すると放射線照射群は肝細胞の脂肪化は抑制されていないが、炎症性細胞の浸潤と繊維化が消失していた。肝臓から採取される細胞量は減量し、特に特徴的にみられる CD68, CD11b 両者が陽性である分画が消失していた。これらの結果は FGF 5 欠損マウスに高脂肪食を摂取させた際に出現する特異的なマクロファージが、このモデルにおける炎症に主要な役割を果たすことを示している。単純脂肪肝と NASH との違いは炎症と繊維化の出現であるが、その発症メカニズムにおいて遊走 KC/M が主要な役割を果たすことを明らかにした。

Liver X receptor (LXR)はオキシステロールによって発現が亢進する分子であり、コレステロール過剰に適応するために発現すると考えられている。この2つの分画があり、は主として肝臓に発現されており、は全身に発現されている。LXR をノックアウトすると、高コレステロール食摂取により著しい肝臓の脂肪化と炎症反応の亢進を認め、NASH に類似した病変を発症する。そのメカニズムは諸説あるが、今回我々は肝臓内のマクロファージに着目して発症メカニズムを解析した。高コレステロール食摂取は、CD11b 陽性分画を増加および活性化することで、LPS 等の細菌由来抗原に対して過剰な炎症反応をきたす。そして invariant NKT 細胞は逆にその数を減少させ、IL-4 といった Th2 サイトカインの発現が抑制され、炎症反応をさらに悪化させる。ヒトにおける非アルコール性脂肪性肝炎の発症メカニズムのうちの一つと考えられる。肝臓における非実質細胞のなかで最大の数をもつ細胞は類洞内皮細胞である。この細胞は免疫細胞ではないが、小さな物質を貪食する機能を有し、ケモカインである MCP-1 を分泌することで炎症性マクロファージを肝臓内に遊走させる機能を発揮することを見出した。さらにこの機能は加齢によって亢進し、高齢マウスにおける過剰な炎症反応の発現のメカニズムの一つと考えられた。機能亢進には細胞内の遊離コレステロールの上昇が重要であり、非アルコール性脂肪性肝炎の発症メカニズムとの関連も示唆される。

NKT 細胞は NK 抗原と T 細胞レセプターの両者を保有するユニークな細胞である。主に肝臓に存在しているがその機能は明らかになっていない。我々は不要となった肝細胞にアポトーシスを誘導する一方で、肝再生を促進する作用を持つことを報告してきた。NKT 細胞は Fas/FasL を介して肝細胞にアポトーシスを誘導し、その一方で Perforin/Granzyme を介して主に腫瘍細胞を傷害すると考えられている。GalCer によって活性化された NKT 細胞は高齢マウスにおいて多臓器不全をきたすことを過去に報告した。多臓器不全においてこの細胞は腎臓も傷害するこ

とを過去に報告したが、今回さらに詳細に検討を実施し、活性化された NKT 細胞は Perforin/Granzyme を介して糸球体内皮細胞を傷害し、その一方で Fas/FasL を介して尿細管上皮細胞を傷害することを明らかにした。異なる細胞に対して異なる分子を使い分けて細胞傷害をきたすことは非常に興味深い。全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患において、NKT 細胞が果たす役割はいまだ不明のままである。α-GalCer の投与により腎障害が改善することから、NKT 細胞は腎障害を抑制すると考えられてきた。しかし我々は α-GalCer の反復投与はむしろ NKT 細胞に Anergy を引き起こし、機能を低下させることを明らかにした。すなわち、NKT 細胞は腎臓においても肝臓と同様に不要となった細胞の除去に機能している可能性が高い。近年、生活習慣病の罹患率が上昇し慢性腎疾患の有無が生活習慣病の予後を決めると言われている。我々は過去に高コレステロール食の摂取が NKT 細胞を活性化させると報告した。この活性化させた NKT 細胞は肝臓のみならず、腎臓においても慢性腎疾患の発症に関与し、生活習慣病の発症や悪化に関与する可能性がある。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

平成 28 年度

Activation and increase of radio-sensitive CD11b+ recruited Kupffer cells/macrophages in diet-induced steatohepatitis in FGF5 deficient mice

**Nakashima, H.** Nakashima, M. Kinoshita, M. Ikarashi, M. Miyazaki, H. Hanaka, H. Imaki, J. Seki, S.

2016 Scientific Reports

DOI: 10.1038/srep34466

平成 29 年度

Dysregulation of Kupffer Cells/Macrophages and Natural Killer T Cells in Steatohepatitis in LXR Knockout Male Mice

Endo-Umeda Kaori, **Nakashima Hiroyuki**, Umeda Naoki, Seki Shuhji, Makishima Makoto

2018 Endocrinology

DOI: 10.1210/en.2017-03141

In vivo Lipopolysaccharide Tolerance Recruits CD11b<sup>+</sup> Macrophages to the Liver with Enhanced Bactericidal Activity and Low Tumor Necrosis Factor-Releasing Capability, Resulting in Drastic Resistance to Lethal Septicemia

Kinoshita Manabu, Miyazaki Hiromi, **Nakashima Hiroyuki**, Nakashima Masahiro, Nishikawa Makoto, Ishikiriyama Takuya, Kato Shoichiro, Iwaya Keiichi, Hiroi Sadayuki, Shinomiya Nariyoshi, Seki Shuhji

2017 Journal of Innate Immunity

DOI: 10.1159/000475931

平成 30 年度

Liver X receptors regulate hepatic F4/80 + CD11b+ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice.

Endo-Umeda, K. **Nakashima, H.** Komine-Aizawa, S. Umeda, N. Seki, S. Makishima, M.

2018 Scientific Reports

DOI: 10.1038/s41598-018-27615-7

Activated natural killer T cells in mice induce acute kidney injury with hematuria through possibly common mechanisms shared by human CD56

Uchida, T. **Nakashima, H.** Ito, S. Ishikiriyama, T. Nakashima, M. Seki, S. Kumagai, H. Oshima, N.

2018 Am J Physiol Renal Physiol

DOI: 10.1152/ajprenal.00160.2018

Repeated administration of alpha-galactosylceramide ameliorates experimental lupus nephritis in mice

Uchida, T. **Nakashima, H.** Yamagata, A. Ito, S. Ishikiriyama, T. Nakashima, M. Seki, S.

Kumagai, H. Oshima, N.  
2018 Scientific Reports  
DOI: 10.1038/s41598-018-26470-w

〔学会発表〕(計 10件)

2016年

Activation and increase of radio-sensitive CD11b+ recruited Kupffer cells/macrophages in diet-induced steatohepatitis in FGF5 deficient mice

**Nakashima, H.** Nakashima, M. Kinoshita, M. Seki, S.

The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology

Activation of PPAR gamma protects against postburn infection by regulating innate immune response

Miyazaki, H. Kinoshita, M. **Nakashima, H.** Nakashima, M. Seki, S.

The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology

Excessive activation of liver natural killer cells and phenotypic alteration and dysfunction of Kupffer cells in diabetic mice with sepsis, and reversal by insulin treatment

Kinoshita, M. Miyazaki, H. **Nakashima, H.** Nakashima, M. Seki, S.

The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology

2017年

Medical countermeasures using LPS tolerance to address lethal toxic shock and fatal bacterial sepsis

Manabu Kinoshita, Nariyoshi Shinomiya, Hiromi Miyazaki, **Hiroyuki Nakashima**, Masahiro Nakashima, Shuji Seki

Chemical and Biological Defense Science & Technology Conference (国際学会)

In vivo LPS tolerance recruits CD11b+ macrophages to the liver with enhanced bactericidal activity and low TNF-releasing capability, resulting in drastic resistance to lethal septicemia

Kinoshita Manabu, Miyazaki Hiromi, **Nakashima Hiroyuki**, Nakashima Masahiro, Nishikawa Makoto, Hagiwara Kohsuke, Seki Shuhji

Shock Society: Shock 47 (国際学会)

Liver sinusoidal endothelial cells and resident Kupffer cells are involved in cholesterol metabolism in mice

**Nakashima Hiroyuki**, Kato Shoichiro, Ishikiryama Takuya, Nakashima Masahiro, Kinoshita Manabu, Seki Shuhji

日本免疫学会総会

Repeated administrations of  $\alpha$ -galactosylceramide slow the progression of lupus nephritis in BWF1 mice

Nakashima Masahiro, Uchida Takahiro, Ito Seigo, Ishikiryama Takuya, **Nakashima Hiroyuki**, Kumagai Hiroo, Seki Shuhji

日本免疫学会総会

2018年

Liver sinusoidal endothelial cells are involved in the aggravation of liver injury induced by the activated NKT cells in aged mice.

**H. Nakashima**, M. Nakashima, M. Kinoshita, S. Kato, T. Ishikiryama, and S. Seki

International congress of European Association of Study of Liver (国際学会)

Liver X Receptor activation exerts the different effects on the function of liver resident Kupffer cells and recruited macrophages

Takuya Ishikiryama, **Hiroyuki Nakashima**, Shoichiro Kato, Kori Endo-Umeda, Masahiro Nakashima, Manabu Kinoshita, Makoto Makishima, Shuhji Seki

日本免疫学会総会

LPS preconditioning potently enhances liver antitumor activity in mice despite marked suppression of inflammatory response

Manabu Kinoshita, **Hiroyuki Nakashima**, Masahiro Nakashima, Takuya Ishikiriya, Shoichiro Kato, Hiromi Miyazaki

日本免疫学会総会

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：関 修司

ローマ字氏名：Shuhji Seki

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：医学教育部医学科専門課程

職名：教授

研究者番号(8桁)：80531392

研究分担者氏名：木下 学

ローマ字氏名：Manabu Kinoshita

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：医学教育部医学科専門課程

職名：准教授

研究者番号(8桁)：70531391

研究分担者氏名：中島 正裕

ローマ字氏名：Masahiro Nakashima

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：医学教育部医学科専門課程

職名：助教

研究者番号(8桁)：70738103

### (2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。