

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K19061

研究課題名(和文) NKT細胞依存性炎症反応及び抗腫瘍活性に対する核内受容体LXRの影響

研究課題名(英文) Effects of liver X receptor on regulation of NKT cell-induced inflammation and antitumor activity

研究代表者

梅田 香織 (ENDO-UMEDA, Kaori)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10445744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体liver X receptor (LXR)はコレステロール代謝調節を担う転写因子であるが自然免疫制御にも関与することが知られている。本研究課題では、LXRが高発現する肝臓に着目し、肝臓免疫細胞におけるLXRの機能を欠損マウスを用いて探索した。その結果、LXR欠損マウスにおいてナチュラルキラーT(NKT)細胞が顕著に減少し、NKT細胞依存性サイトカイン産生の減少及びがん細胞の肝転移が増加することを見出した。また、肝臓におけるNKT細胞の減少は胸腺における分化・成熟化の異常によることを明らかにした。以上の結果より、LXRはNKT細胞の機能維持に必須であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの報告により、LXRがマクロファージなどの免疫細胞において抗炎症作用を有することは知られているが、NKT細胞における機能解析は行われていなかった。NKT細胞はインターフェロン やインターロイキン-4などのサイトカインを産生する他、高い抗腫瘍活性を保持するため、がんのみならず自己免疫疾患などの病態の進展にも関与することが知られている。我々は欠損マウスを用いた解析によりLXRがNKT細胞の胸腺における分化成熟化及び肝臓における抗腫瘍免疫に必須であることを初めて見出した。本研究においてNKT細胞を標的としたがんや自己免疫疾患の治療薬としてのLXRリガンドの薬剤開発への可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The nuclear receptor liver X receptor (LXR) regulates cholesterol metabolism and innate immunity. We focused on the regulation of hepatic immune cells by LXR and analyzed these cell population and function using its knockout mice. We found that the population of natural killer T (NKT) cells, which is abundantly present in mouse liver and regulates inflammation and antitumor immunity, was drastically reduced in LXR-deficient mice. The NKT cell-mediated cytokine production and antitumor activity were also diminished, leads to increased tumor metastasis into the liver. Additionally, we found that a decreased number of hepatic NKT cells was the consequence of its impaired development and maturation at the early stage in thymus. These results demonstrated that LXR plays an important role in hepatic immune response through regulating development and function of NKT cells.

研究分野：生化学

キーワード：LXR NKT細胞 肝臓 胸腺 抗腫瘍活性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Liver X receptor (LXR)  $\alpha$  及び LXR $\beta$  は 1990 年代後半にオーファン受容体としてクローニングされた核内受容体であり、コレステロールの代謝産物であるオキシステロールがリガンドとなること、欠損マウスの解析によりコレステロール恒常性維持に必要な転写因子であることが明らかとなった。また、マクロファージなどの免疫細胞の LXR が NF- $\kappa$ B の活性を non-genomic に抑制するメカニズムで抗炎症作用を有することが報告されたことから、LXR は動脈硬化や脂質異常症のみならず自己免疫疾患などの治療標的としても注目されている。

(2) ナチュラルキラー T (natural killer T, NKT) 細胞は CD1d 拘束性に糖脂質を抗原として認識する T 細胞の亜種群の 1 つであり、胸腺内外での分化を経て肝臓などの組織に存在している。NKT 細胞の主なサブタイプであるタイプ I 型 NKT 細胞は普遍的な T 細胞受容体を有することから invariant NKT (iNKT) 細胞と呼ばれている。iNKT 細胞は海綿成分である  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -galactosylceramide,  $\alpha$ -GalCer) によって選択的に活性化され、Th1 サイトカインであるインターフェロン  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN $\gamma$ ) と Th2 サイトカインである IL-4 を産生するユニークな細胞であり、NK 細胞に次ぐ強い抗腫瘍活性を保持することから、炎症のみならず腫瘍免疫、アレルギー、感染免疫など多岐にわたる機能を有している。

(3) 研究代表者は先行研究 (若手研究 B、平成 25~27 年度、課題番号: 25860248 「肝免疫細胞における核内受容体 LXR の機能解析」) において、肝臓は LXR が高発現し機能する主要な臓器であること、マウスへの高コレステロール食付加によって肝免疫細胞組成が変化すること (引用文献 1) に着目し、肝常在免疫細胞群に対する LXR の影響を検討した。肝臓には Kupffer 細胞や NKT 細胞、NK 細胞などの免疫細胞が豊富に存在し、肝細胞と協調しながら肝免疫恒常性を維持している (発表論文, Endo-Umeda and Makishima, 2019)。そこで、野生型と LXR 欠損マウスの肝臓における免疫細胞分布を比較したところ、LXR 欠損マウスにおいて、総免疫細胞数が増加していたこと、高炎症性サイトカイン産生能を有するマクロファージ (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞) 及びそのサイトカイン誘導能が有意に増加していたこと (発表論文, Endo-Umeda et al., *Sci Rep*, 2018)、その一方で iNKT 細胞数が顕著に減少していたことを見出した。しかし、NKT 細胞における LXR の選択的機能は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、研究代表者が先行研究において見出した「コレステロール代謝調節センサー LXR 欠損マウスにおいて NKT 細胞の分布が減少する」という新たな知見に着目し、①NKT 細胞誘導性炎症反応または抗腫瘍活性に対する LXR 欠損の影響を解析すること、②LXR 欠損マウスにおける NKT 細胞機能障害メカニズムの解析すること、により NKT 細胞が関与する炎症及び抗腫瘍活性における LXR の役割を解明することを目的とする。また、将来的に NKT 細胞を標的としたがんなどに対する LXR リガンドの薬剤開発に向けての可能性を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) LXR 欠損マウスにおける NKT 細胞分布。C57BL/6J (野生型)、*Nr1h3*<sup>-/-</sup> (LXR $\alpha$  欠損)、*Nr1h2*<sup>-/-</sup> (LXR $\beta$  欠損) 及び *Nr1h3*<sup>-/-</sup>;*Nr1h2*<sup>-/-</sup> (LXR $\alpha/\beta$  欠損) マウスの肝臓または脾臓より免疫細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて NKT 細胞 ( $\alpha\beta$ -T cell receptor (TCR) <sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>) 及び iNKT 細胞 ( $\alpha\beta$ TCR<sup>+</sup>CD1d- $\alpha$ -GalCer tetramer<sup>+</sup>) 分布を評価した。

(2) NKT 細胞依存性サイトカイン産生能の評価。野生型、LXR $\alpha$  欠損、LXR $\beta$  欠損及び LXR $\alpha/\beta$  欠損マウスに iNKT 細胞リガンドである  $\alpha$ -GalCer を尾静脈投与し、継時採血を行い、血中 IL-4 及び IFN- $\gamma$  濃度を ELISA 法を用いて評価した。

(3) NKT 細胞依存性抗腫瘍活性の評価。野生型及び LXR $\alpha/\beta$  欠損マウスにマウス T 細胞由来リンパ腫 EL-4 細胞を尾静脈投与した。18 時間後にコントロール (PBS) または  $\alpha$ -GalCer を尾静脈投与し生存率を観察した。また、野生型及び LXR $\alpha/\beta$ -KO マウスに EL-4 細胞を尾静脈投与し 4 週間後にがん細胞の肝転移巣を比較した。

(4) LXR 欠損マウスにおける胸腺細胞の解析。野生型及び LXR $\alpha/\beta$  欠損マウスより胸腺を摘出し、フローサイトメトリーを用いて iNKT 細胞分布及び抗 CD24 抗体、抗 CD44 抗体、抗 NK1.1 抗体を用いて iNKT 細胞の分化過程を解析した。

全ての実験は 2-4 ヶ月齢の雄マウスを用いて実施した。また遺伝子組換え実験においてはカルタヘナ法及び日本大学遺伝子組換え実験規程に基づいて実施した。動物実験については日本大学動物実験内規に定める手続きを踏まえた上で行った。

#### 4. 研究成果

(1) LXR 欠損マウスにおける NKT 細胞分布。先行研究により、LXR $\alpha/\beta$  欠損マウスの肝臓において NKT 細胞 ( $\alpha\beta$ TCR $^{+}$ NK1.1 $^{+}$ ) が顕著に減少する知見を得た。本検討では iNKT 細胞を特異的に検出するため CD1d tetramer を用いて解析を行った。その結果、野生型と比較し LXR $\alpha$  欠損および LXR $\beta$  欠損において部分的であるが有意な減少を認めた。一方、LXR $\alpha/\beta$  欠損マウスにおいては完全に消失しており (図 1 A)、iNKT 細胞制御には LXR $\alpha$  と LXR $\beta$  の両方のアイソフォームが関与することが示された。また、iNKT 細胞減少効果は LXR $\alpha/\beta$  欠損マウスの脾臓においても観察され (図 1B)、肝臓に限定されて生じる現象ではないことが示された。

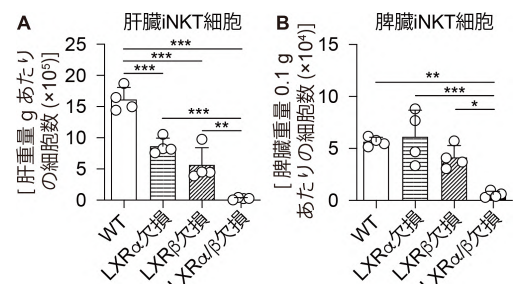


図 1 肝臓(A)及び脾臓(B)における iNKT 細胞数

(2) NKT 細胞依存性サイトカイン産生能の評価。これまでの我々の知見により、単離した肝臓免疫細胞に  $\alpha$ -GalCer を添加後に誘導される IL-4、IFN- $\gamma$  発現が、LXR $\alpha/\beta$  欠損マウス由来細胞では完全に消失することが示された。この効果を *in vivo* で検証するために、 $\alpha$ -GalCer 投与後の血中 IL-4 及び IFN- $\gamma$  濃度を評価した。その結果、野生型において投与 3 時間後に IL-4 が、24 時間後に IFN- $\gamma$  が一過性に産生されるが (発表論文, Endo-Umeda et al., *Endocrinology*, 2018)、この投与時間において IL-4 濃度は LXR $\beta$  欠損において 50 %程度の減少を認め、LXR $\alpha/\beta$  欠損においては完全に消失した (図 2A)。また、IFN- $\gamma$  については LXR $\alpha$  欠損および LXR $\beta$  欠損においては 50-70 %程度の減少を、また LXR $\alpha/\beta$  欠損においては完全な消失を認めた (図 2B)。以上のことから、(1) で得られた知見と相関し、LXR は肝臓局所のみならず、全身性の iNKT 細胞の機能を制御することが示された。

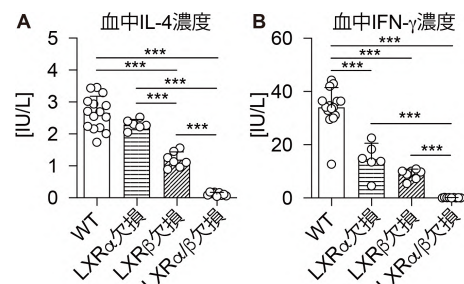


図 2  $\alpha$ -GalCer 投与後の血中 IL-4 濃度(A)及び IFN- $\gamma$  濃度(B)

(3) NKT 細胞依存性抗腫瘍活性の評価。EL-4 細胞はマウスに投与すると肝臓への転移を認めるが、 $\alpha$ -GalCer 投与によりその肝転移と生存率が回復することが知られている (引用文献 2)。野生型においてはこの報告と一致し、EL-4 細胞投与後に生存率は低下するが、 $\alpha$ -GalCer 投与によりほぼ全てのマウス (14 頭中 13 頭) の生存率は回復した (図 3)。一方、LXR $\alpha/\beta$  欠損マウスは EL-4 投与群において野生型と比較し生存率が低下し、さらに  $\alpha$ -GalCer 投与による回復は観察されなかった。また、EL-4 細胞投与 4 週間後の肝転移を評価したところ、LXR $\alpha/\beta$  欠損マウスにおいて顕著ながん転移巣が観察された。

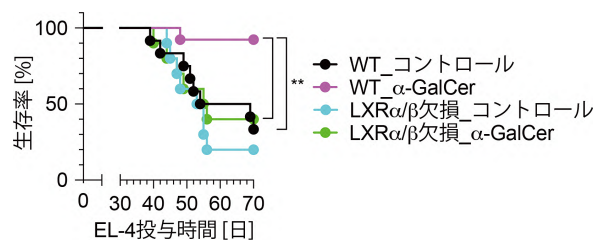


図 3 EL-4 細胞投与後の生存率及び  $\alpha$ -GalCer 投与の効果

(4) LXR 欠損マウスにおける胸腺の解析。胸腺における iNKT 細胞を評価したところ、野生型と比較し LXR $\alpha/\beta$  欠損マウスにおいて有意な減少を認めた (図 4A)。iNKT 細胞の分化過程を解析したところ、両群において最も未熟な Stage 0 (CD24 $^{+}$ CD44 $^{-}$ ) においては変化を認めないが、Stage 1 (CD44 $^{+}$ NK1.1 $^{-}$ )、Stage 2 (CD44 $^{+}$ NK1.1 $^{-}$ )、Stage 3 (CD44 $^{+}$ NK1.1 $^{+}$ ) の細胞群は顕著に減少した (図 4B)。以上の結果より、LXR は iNKT 細胞の初期の分化・成熟化を制御することが示された。

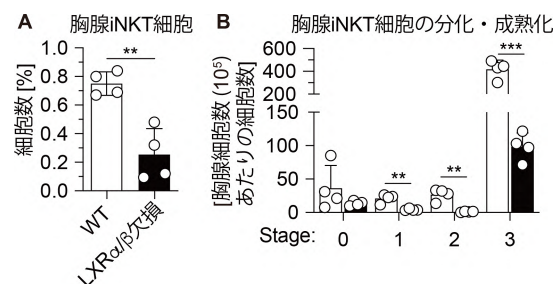


図 4 胸腺 iNKT 細胞数(A)及び胸腺 iNKT 細胞の分化・成熟化(B)。WT (白)、LXR $\alpha/\beta$  欠損 (黒)。

以上、(1) から (4) の検討により、LXR は iNKT 細胞を介したサイトカイン産生及び抗腫瘍活性に必須であること、LXR は iNKT 細胞の胸腺における分化・成熟化を制御することが初めて明らかとなった。胸腺 iNKT 細胞分化における LXR の詳細な機能解析には細胞特異的 LXR 欠損マウスを用いた検証が必要であり、今後の課題である。iNKT 細胞は高い抗腫瘍活性を有することから、ヒトでは細胞数が少ないにも関わらず、新規のがん治療に用いられ、臨床試験も進められている。LXR は iNKT 細胞の機能維持に必要な因子であることから、将来的に NKT 細胞を標的としたがんに対する LXR リガンドの薬剤開発が期待できる。研究代表者は共同研究により、作用選択的な LXR リガンドを開発しており (引用文献 3 など)、今後はこれらのリガンドを用いた抗腫瘍活性に対する効果を検証する予定である。

<引用文献>

1. Shono S, Habu Y, Nakashima M, Sato A, Nakashima H, Miyazaki H, Kinoshita M, Tsumatori G, Shinomiya N, Seki S. The immunologic outcome of enhanced function of mouse liver lymphocytes and Kupffer cells by high-fat and high-cholesterol diet. *Shock*, 36(5):484-493, 2011.
2. Inui T, Nakashima H, Habu Y, Nakagawa R, Fukasawa M, Kinoshita M, Shinomiya N, Seki S. Neutralization of tumor necrosis factor abrogates hepatic failure induced by  $\alpha$ -galactosylceramide without attenuating its antitumor effect in aged mice. *J Hepatol*, 2005 43(4):670-678, 2005.
3. Nomura S, Endo-Umeda K, Aoyama A, Makishima M, Hashimoto Y, Ishikawa M. Styrylphenylphthalimides as novel transrepression-selective liver X receptor (LXR) modulators. *ACS Med Chem Lett*, 6:902-907, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Endo-Umeda Kaori, Makishima Makoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Liver X Receptors Regulate Cholesterol Metabolism and Immunity in Hepatic Nonparenchymal Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5045 ~ 5045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20205045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Endo-Umeda Kaori, Nakashima Hiroyuki, Komine-Aizawa Shihoko, Umeda Naoki, Seki Shuhji, Makishima Makoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Liver X receptors regulate hepatic F4/80+CD11b+ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27615-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Endo-Umeda Kaori, Nakashima Hiroyuki, Umeda Naoki, Seki Shuhji, Makishima Makoto	4. 巻 159
2. 論文標題 Dysregulation of Kupffer Cells/Macrophages and Natural Killer T Cells in Steatohepatitis in LXR Knockout Male Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1419 ~ 1432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2017-03141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅田（遠藤）香織
2. 発表標題 核内受容体LXRによる肝臓免疫調節作用
3. 学会等名 第15回 Lipid Club（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅田（遠藤）香織，中島弘幸，梅田 直，関 修司，横島 誠
2. 発表標題 肝臓免疫細胞における核内受容体LXRの自然免疫調節作用
3. 学会等名 日本レチノイド研究会 第28回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅田（遠藤）香織、中島弘幸、関 修司、横島 誠
2. 発表標題 核内受容体LXR の肝免疫細胞における脂質代謝及び炎症調節メカニズムの解明
3. 学会等名 第2回Neo Vitamin D Workshop学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関