

平成 21 年 5 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590751

研究課題名 (和文) 自己免疫性肝炎の発症進展を規定する肝内における抗原特異的免疫寛容破綻の解析

研究課題名 (英文) Mechanisms of the breakdown of antigen specific immunotolerance in autoimmune hepatitis.

研究代表者

銭谷 幹男 (ZENIYA MIKIO)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70138767

研究成果の概要：

マウスへの肝細胞と樹状細胞の融合細胞の投与により得られる自己免疫性肝炎モデルの免疫動態の解析を行い、肝炎を引き起こす自己反応性活性化 T 細胞は肝内でアポトーシスに陥るが、その頻度は外来抗原特異性 T 細胞に比し有意に低く、炎症によりさらに低下することが明らかとなった。また炎症により肝内に自己反応性 T 細胞がリクルートするが、それは肝細胞や類洞内皮細胞の補助分子、接着分子発現、ケモカイン、サイトカイン産生が Th1 反応誘導性に変化することによることが明らかにされた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：自己免疫性肝炎、免疫寛容破綻

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性肝炎 (AIH) の発症進展機序は不明である。我々はマウスに肝細胞と樹状細胞 (DC) の融合細胞 (FC) を投与すると肝炎が惹起され、肝内に浸潤している CD8 陽性細胞は *in vitro* で肝細胞障害性を示すことを明らかにした。

本モデルでは、(1)肝細胞特異的細胞障害性 T 細胞、自己抗体が出現している、(2) FC 投与後の IL-12 追加投与により肝炎の程度が増悪する、(3) 一端軽快した肝炎が IL-12 投与

により再燃する、といった特徴を有する。

また我々は、(4) 正常な肝臓内では活性化 CD8 細胞がアポトーシスに陥る、(5) 糖脂質が自己免疫性肝疾患の自己抗原として機能し得ることも明らかにした。

以上の 5 つの現象が有する意義をさらに解明すれば、AIH の発症進展に関わる免疫学的病態を明らかにできると考えるに至った。

2. 研究の目的

(1)AIH 発症の分子病態の解析

自己免疫反応を制御し免疫寛容維持機構に関わる $\gamma\delta$ T 細胞、CD25+CD4+T reg 細胞、NKT 細胞などの免疫制御性細胞群の、発症時における動態と機能を解析する。

ついで、上述した肝臓内で生じる抗原特異的 CD8 細胞のアポトーシス動態を解析する。特に FC の皮下投与時と門脈内投与時の差異を検討し、CD8 細胞の活性化部位（肝内カリリンパ節か）がアポトーシスに及ぼす影響を検討する。また、CD4 細胞についても同様の検討を行い、CD4、CD8 細胞の肝内でのアポトーシス動態の差異を明らかにする。

さらに、IL-12 投与による肝内免疫環境（肝細胞や類洞内皮細胞における接着・補助刺激分子発現動態、サイトカインプロファイル）の変化を検討し、IL-12 による肝細胞障害増強効果の詳細を明らかにする。

(2)AIH 再燃の分子病態の解析

寛解誘導・維持に関わる免疫制御性細胞群の動態の経時的変化、特に IL-12 による肝炎再燃誘導時の量的、機能的変化を解析する。

次に、再燃時のメモリー細胞の動態を解析する。本モデルでは、FC 投与により活性化された自己反応性 T 細胞がメモリー細胞化して生き残り、IL-12 投与により再活性化され肝炎が増悪する可能性がある。近年、メモリー細胞の性状、分化・維持機構が分子レベルで解明されているが、肝内には通常メモリー T 細胞と異なる活性化されアポトーシス感受性を示すメモリー T 細胞が集積し易いとの報告もあり、肝疾患における肝内メモリー T 細胞動態についてはコンセンサスが得られていないのが現状である。そこで本モデルにおけるメモリー T 細胞動態を経時的に解析し、AIH 再燃との関わりを解明する。

(3)疾患特異的自己抗原ペプチド、脂質の同定

本モデルでみられる自己抗体、CTL の認識抗原の同定を、SELEX 法、cDNA ライブラリー発現クローニング法により試みる。

また、FC または肝炎を起こしたマウスの肝内樹状細胞が発現する CD1 分子が提示している脂質をカラムクロマト、ESI-MS を用いて分析し、その性状を解明する。

3. 研究の方法

(1)AIH の肝内における活性化 T 細胞アポトーシス動態の検討

①AIH 発症時の肝内における自己反応性、外来抗原特異性 T 細胞のアポトーシス動態

肝炎発症マウス脾細胞から CD8 細胞を分離し *in vivo* で FC により再度活性化し自己反応性活性化 CD8 細胞を得た。また、正常マウス脾細胞から CD8 細胞を分離し *in vivo* で肝

内に存在しない SIINFEKL ペプチドにより活性化し外来抗原特異的活性化 CD8 細胞を得た。これら活性化 CD8 細胞をアポトーシスマーカー (MitoTracker Red) と活性化マーカー (CFSE) で染色、SIINFEKL を腹腔内投与し肝内発現させた正常マウス、AIH 発症マウスの門脈に注入、その後各マウスの肝臓と脾臓から CD8 細胞を経時的に分離し、CFSE、MitoTracker Red 陽性細胞数を FACS で測定、正常肝内、AIH 発症肝内での外来性抗原特異的活性化 T 細胞、自己反応性活性化 T 細胞のアポトーシス動態を経時的、定量的に解析した。また、各経時的ポイントで肝臓の組織切片を作製、共焦点レーザー顕微鏡観察により、活性化 T 細胞のアポトーシスが生ずる部位、アポトーシス細胞と接触している細胞を同定し、アポトーシス誘導に関わる細胞を推定した。

以上の検討により、正常肝臓と AIH 発症肝臓の自己反応性活性化 T 細胞のアポトーシス誘導機能の差異を明らかにし、その変化が AIH 発症に及ぼす影響を考案した。また、活性化 CD4 細胞についても同様の検討を加え、CD4、CD8 細胞の差異を明らかにした。

②自己反応性 T 細胞の活性化場所、肝内免疫環境の肝内 T 細胞アポトーシス動態への影響の検討

FC の門脈内投与（自己反応性 T 細胞活性化部位は肝内）、皮下投与（リンパ節内）時の自己反応性 T 細胞を正常肝に門脈内投与し、肝内アポトーシス動態の差異を検討した。

(2)AIH 経過中の免疫制御機構の動態と機能

①肝内の免疫抑制性補助分子の発現動態

T 細胞活性化を抑制し自己反応性 T 細胞制御を介し免疫寛容維持に携わるとされる Notch、PD-1L、B7-H4、Tim-3 の各分子の肝内発現動態を免疫組織化学的検討により検討するとともに、肝臓から RNA を分離し、それぞれの特異プライマー、内部コントロールプライマーを用いた半定量的 RT-PCR により発現を遺伝子レベルで検討した。また FC 投与前での成績を比較し、肝炎発症にともなうこれら分子の発現動態変化を解析した。

②肝細胞、類洞内皮細胞の抑制性サイトカイン産生動態

肝内での免疫寛容誘導に関与すると考えられる肝細胞、類洞内皮細胞の IL-10 産生変化を、免疫組織化学的方法、半定量的 RT-PCR 法により蛋白、遺伝子レベルで解析した。

③活性化 T 細胞の肝移行性の変化

IL-12 投与、非投与 SCID マウスに、*in vivo* で肝細胞融合 DC により活性化した自己反応性 T 細胞、IL-2 で刺激した抗原非特異的活性化 T 細胞をそれぞれアイソトープラベルして投与し、肝内への T 細胞集積動態をオートラジオグラフィで解析、IL-12 が自己反応性、

抗原非特異的 T 細胞の肝移行性に及ぼす影響を明らかにした。また、naïve T 細胞、memory T 細胞に分けて検討し、両サブセットの差異も検討した。

④肝細胞、類洞内皮細胞の補助分子、接着分子発現の変化

IL-12 投与マウス類洞内皮細胞の ICAM-1、VCAM-1、VAP-1 等の接着分子発現、肝細胞の MHC class I、II、CD80、CD86、CD40、PD-1 等の機能分子、補助分子の発現を免疫組織化学的手法により解析した。また正常マウスの肝細胞、類洞内皮細胞を分離、培養し *in vitro* で IL-12 添加培養した際のこれら補助分子、接着分子の遺伝子発現を RT-PCR 法により半定量的に解析した。

⑤肝細胞、類洞内皮細胞のサイトカイン、ケモカイン産生プロファイルの変化

IL-12 投与マウスの肝細胞、類洞内皮細胞のサイトカイン、ケモカイン産生動態を特異的プローブを用いた *in situ hybridization* により検討した。さらに正常マウスの肝細胞を分離培養し *in vitro* で IL-12 添加培養し、各種サイトカイン、ケモカインの蛋白、遺伝子発現を Cytometric Bead Array 法、リボスクレアーゼアッセイで定量解析した。

(3)疾患特異的自己抗原の同定

①cDNA ライブラリー発現クローニングによる CTL が認識する自己抗原の同定

肝炎惹起マウス脾細胞から ALT 遊離アッセイを用い自己肝細胞障害性 CTL クローンを作製を試みた。肝炎が惹起された肝臓から肝細胞を分離し mRNA を抽出、合成した cDNA をファージにパッケージングして発現ライブラリーを作製。COS 細胞にプラスミドプールと抗原提示に必要な class I cDNA を導入し過剰発現させ、CTL クローンと混合培養し IL-2 分泌を指標にスクリーニングを行い CTL 認識抗原遺伝子が導入された COS 細胞を検出する。得られた cDNA から様々な長さの cDNA 断片を作製し COS 細胞に導入し CTL の反応を検討、MHC 結合ペプチドモチーフを参考に T 細胞エピトープの決定を試みた。

②CD1 が提示する脂質の性状分析と自己抗原としての機能の解析

免疫に用いた FC または肝炎惹起マウスの肝内 DC の膜可溶性分画からモノクローナル抗体を用いて CD1a、1b、1c 分子を分離した。酸処理により抗体を分離し、Folch 法により有機溶媒を用い CD1 結合脂質分画を抽出、カラムクロマトにより糖脂質、リン脂質を溶出し、メタノリシス-GC 法、ESI-MS により性状分析を試みた。

4. 研究成果

(1)AIH の肝内における活性化 T 細胞アポトーシス動態の検討

①正常肝内で AIH を惹起する自己反応性活性化 CD8 細胞のアポトーシスが生じるかを検討したところ、外来抗原特異性 CD8 細胞と同様に、自己反応性活性化 CD8 細胞もアポトーシスに陥ることが示された。しかし、自己反応性活性化 CD8 細胞がアポトーシスに陥る頻度は外来抗原特異性 CD8 細胞と比較すると有意に低いことが明らかとなった。

②AIH 発症時の肝内における自己反応性、外来抗原特異性 T 細胞のアポトーシス動態を解析したところ、自己反応性 T 細胞のアポトーシスは、正常肝におけるアポトーシス誘導に比し低下していることが明らかになった。また、外来抗原特異性 T 細胞のアポトーシス動態も、正常肝におけるアポトーシス誘導に比し低下していることが明らかになった。

③肝内免疫環境が肝内での T 細胞アポトーシス動態に影響を及ぼし AIH 発症に寄与する可能性を検討したところ、肝内で IFN γ 、IL-12 が豊富に存在している状態では正常肝でみられる外来抗原特異性 CD8 細胞のアポトーシス誘導が低下していた。

(2)IL-12 投与時の肝内免疫環境変化の解析

①活性化 T 細胞の肝移行性の変化

IL-12 投与、非投与 SCID マウスに、*in vivo* で肝細胞融合 DC により活性化した自己反応性 T 細胞、IL-2 で刺激した抗原非特異的活性化 T 細胞をそれぞれアイソトープラベルして投与し、肝内への T 細胞集積動態をオートラジオグラフィで解析したところ、IL-12 は自己反応性、抗原非特異的 T 細胞の肝移行性を増強することが明らかとなった。また、naïve T 細胞、memory T 細胞に分けて検討したところ、両サブセットの肝移行性に差異を認めなかった。

②肝細胞、類洞内皮細胞の補助分子、接着分子発現の変化

IL-12 投与マウス類洞内皮細胞の ICAM-1、VCAM-1、VAP-1 等の接着分子発現、肝細胞の MHC class I、II、CD80、CD86、CD40、PD-1 の発現を免疫組織化学的手法により解析したところ、ICAM-1、VCAM-1、VAP-1、MHC class I、II、CD80 の発現増強を認めたが、CD86、CD40、PD-1 の発現は変化がなかった。

③肝細胞、類洞内皮細胞のサイトカイン、ケモカイン産生プロファイルの変化

IL-12 投与マウスの肝細胞、類洞内皮細胞のサイトカイン、ケモカイン産生動態を特異的プローブを用いた *in situ hybridization* により検討したところ、Th1 細胞を誘導する作用を有するケモカインおよび Th1 サイトカインの産生増強が認められたが、Th2 細胞を誘導する作用を有するケモカインおよび Th1 サイトカインの産生増強は認めなかった。

(3)疾患特異的自己抗原の同定

①cDNA ライブラリー発現クローニングによる CTL が認識する自己抗原の同定

肝炎惹起マウス脾細胞から ALT 遊離アッセイを用い自己肝細胞障害性 CTL クローンの作製を試みたが、分離当初は肝細胞障害性を示すものの、残念ながらクローン樹立には至らなかった。肝内浸潤 CD8 細胞を分離し CTL クローンの樹立を試みたが、やはりクローンを得ることはできなかった。そこで肝炎が惹起された肝臓から肝細胞を分離してそこから mRNA を抽出、合成した cDNA をファージにパッケージングして発現ライブラリーを作製し、COS 細胞にプラスミドプールと抗原提示に必要な class I cDNA を導入し過剰発現させ、肝細胞障害活性を示す肝内浸潤 CD8 細胞と混合培養し、その IL-2 分泌を指標にスクリーニングを行い CTL 認識抗原遺伝子が導入された COS 細胞の検出を試みたが、残念ながら有意な結果を得ることができず、T 細胞エピトープを決定することはできなかった。

②CD1 が提示する脂質の性状分析と自己抗原としての機能の解析

免疫に用いた FC または肝炎惹起マウスの肝内 DC の膜可溶性分画からモノクローナル抗体を用いて CD1a、1b、1c、1d 分子を分離する。酸処理により抗体を分離し、Folch 法により有機溶媒を用い CD1 結合脂質分画を抽出、カラムクロマトにより糖脂質、リン脂質を溶出し、メタノリシス-GC 法、ESI-MS により性状分析して、DC が CD1 分子を介して T 細胞を活性化すると考えられる脂質抗原の同定を試みた。しかし CD1 分子から結合脂質分画を抽出する実験がうまくいかず、残念ながら CD1 が T 細胞に提示する脂質抗原の正常解析を行うには至らなかった。

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 7 件)

- ① Hennes EM et al. (10 名中②番目) Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008 48 : 169-76. 査読有
- ② Iwasaki S, et al. (8 名中③番目) The efficacy of ursodeoxycholic acid and bezafibrate combination therapy for primary biliary cirrhosis: A prospective, multicenter study. *Hepatol Res*. 2008 ;38:557-64. 査読有
- ③ Torisu Y, et al. (7 名中⑥番目) Human homolog of NOTUM, overexpressed in hepatocellular carcinoma, is regulated

transcriptionally by beta-catenin/TCF. *Cancer Sci*. 2008 ;99(6):1139-46. 査読有

- ④ Oikawa T, et al. (8 名中⑧番目) Intrahepatic expression of the co-stimulatory molecules programmed death-1, and its ligands in autoimmune liver disease. *Pathol Int*. 2007 ;57(8):485-92. 査読有
- ⑤ Takahashi H, et al. (2 名中②番目) Do DCs influence the antiviral effect of interferon/ribavirin by changing their profile during the therapy? *J Gastroenterol*. 2006 41(8):816-7. 査読有
- ⑥ Oikawa T, et al. (9 名中⑧番目) Preferential involvement of Tim-3 in the regulation of hepatic CD8+ T cells in murine acute graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2006 ;177(7):4281-7. 査読有
- ⑦ Komita H, et al. (7 名中⑥番目) Interferon-gamma produced by interleukin-12-activated tumor infiltrating CD8+T cells directly induces apoptosis of mouse hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2006 45(5):662-72. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① H Takahashi et al. Reciprocal changes of Tr1 and Th17 are involved in the pathogenesis of autoimmune liver diseases. 第 59 回アメリカ肝臓学会年次学術集会 2008 年 11 月 2 日 アメリカ・サンフランシスコ
- ② C Saeki et al. Increased intrahepatic Foxp3 + Treg may participate in the natural occurring recovery of experimental autoimmune hepatitis. 第 59 回アメリカ肝臓学会年次学術集会 2008 年 11 月 2 日 アメリカ・サンフランシスコ
- ③ 高橋宏樹 銭谷幹男. 自己免疫性肝炎の発症機構と病態 (シンポジウム) 第 44 回日本肝臓学会総会 2008 年 6 月 6 日 松山
- ④ 国安祐史 他. 肝臓における活性化 CD8+T 細胞の抗原特異的 Stunning の誘導 第 44 回日本肝臓学会総会 2008 年 6 月 5 日 松山
- ⑤ 高橋宏樹他. 原発性胆汁性肝硬変症における IL-10 産生性 Tr1 および Th17 の動態の解析 第 44 回日本肝臓学会総会 2008 年 6 月 5 日 松山
- ⑥ H Takahashi et al. GLUCOCORTICOID RESISTANCE IN AUTOIMMUNE HEPATITIS ASSOCIATES TO INCREASED EXPRESSION AND ACTIVITY OF P-GLYCOPROTEIN IN T CELL. 第 58 回アメリカ肝臓学会年次学術集会 2007 年 11 月 5 日 アメリカ・ボストン
- ⑦ 国安祐史 他. APL が肝臓における抗原特

異的活性化リンパ球の捕捉除去に及ぼす影響の解析 第 43 回日本肝臓学会総会 2007 年 6 月 1 日 東京

- ⑧ 高橋宏樹他. 自己免疫性肝炎の T 細胞における P 糖蛋白質の発現および機能とステロイド治療抵抗性の関連 第 43 回日本肝臓学会総会 2007 年 5 月 31 日 東京
- ⑨ H Takahashi et al. INTRAHEPATIC NKT CELL AND SOLUBLE CD1D HAVE A SIGNIFICANT ROLE IN THE IMMUNO PATHOGENESIS OF AIH BUT NOT IN PBC. 第 57 回アメリカ肝臓学会年次学術集会 2006 年 10 月 29 日 アメリカ・ボストン
- ⑩ 高橋宏樹他. 自己免疫性肝疾患における可溶性 CD1d 分子遺伝子発現動態の解析 第 42 回日本肝臓学会総会 2006 年 5 月 25 日 京都
- ⑪ 及川恒一他. 自己免疫性肝疾患における PD-1/PD-L1/PD-L2 の肝内発現動態の解析 第 42 回日本肝臓学会総会 2006 年 5 月 25 日 京都
- ⑫ 佐藤憲一他. HCV トランスジェニックマウスにおける初期免疫応答 第 42 回日本肝臓学会総会 2006 年 5 月 26 日 京都

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

銭谷 幹男 (ZENIYA MIKIO)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70138707

(2) 研究分担者

国安 祐史 (KUNIYASU YUSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10338890

天野 克之 (AMANO KATAUSI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70424645

(3) 連携研究者