

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05978

研究課題名（和文）インターロイキン-19の肝免疫システムにおける新規調節機能

研究課題名（英文）The role of IL-19 in the liver immunity

研究代表者

東 泰孝（AZUMA, YASUTAKA）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50298816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、IL-19遺伝子欠損マウス（KO）を用いて特注飼料による脂肪肝および肝線維化の病態を解析して、非アルコール脂肪性肝炎（NASH）におけるIL-19の役割を追究した。特注飼料による病態を解析したところ、野生型マウス（WT）では脂肪肝の病態を示したのに対して、IL-19KOでは肝線維化まで進行していた。さらに、*in vitro*実験系を用いたメカニズム解析により、IL-19は脂質代謝を抑制してATP産生へとシフトさせることを明らかにした。本研究結果により、IL-19は脂質代謝系を抑制して脂肪肝から線維化形成を抑制する役割を担うことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、IL-19は脂質代謝系を抑制して脂肪肝から線維化形成を抑制する役割を担うことを明らかとしたところに学術的意義がある。NASHの病態生理は複雑であり、肝臓内の多くの細胞種が複数のレベルで関与する。今後、基礎研究成果の有効活用のためにも、また治療への応用展開を視野に入れるためにも、病態発症モデルを用いて各種薬物や阻害薬などの効果検証は重要である。その際、探索研究において、ヒトの病態に類似した疾患モデル動物の活用は有用性が高い。IL-19KOに特注飼料を与えることでNASHへと進展する本研究課題の成果は、探索研究に活用できる可能性が大きいところに学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this research project, the role of IL-19 in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) was investigated by analyzing the pathogenesis of fatty liver and liver fibrosis induced by custom-made diets in IL-19 gene-deficient (KO) mice. The pathophysiology of fatty liver in wild-type (WT) mice was analyzed using a custom-made diet, whereas the IL-19KO mice exhibited a fatty liver pathology that progressed to liver fibrosis. Furthermore, mechanistic analysis using an *in vitro* experimental system revealed that IL-19 suppresses lipid metabolism and shifts it to ATP production. These findings demonstrate that IL-19 plays a role in suppressing fibrosis formation from fatty liver by inhibiting the lipid metabolism system.

研究分野：薬理学

キーワード：インターロイキン-19 肝線維化 脂質代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IL-19はIL-10とのホモログサーチにより2000年に発見されたサイトカインであり、IL-20、IL-22、IL-24、IL-26とともにIL-10ファミリーを構成する。IL-10とのアミノ酸レベルの相同性は21%であるものの、立体構造的にIL-10と類似することからIL-10ファミリーに分類される。IL-19を産生する免疫系細胞では、活性化されたマクロファージが主要な産生細胞であり、マクロファージよりは少ないものの単球およびB細胞からも産生される。非免疫系細胞では、ケラチノサイトからIL-19が産生される。臨床的には、IL-19は喘息と乾癬に関与すると報告されている。加えて、近年、加齢、2型糖尿病、肺血症、歯周病、心疾患、リウマチ、尿毒症など広範な疾患・病気に関与することが報告されている。しかしながら、これらの報告はほとんどが各疾患におけるIL-19の濃度変動について示した結果であり、免疫学系全般におけるIL-19の役割はほとんど明らかにされていない。このような現況の中、研究代表者は2003年よりIL-19に関する研究を展開し、IL-19遺伝子欠損マウスを作出し、マクロファージが主に関与する炎症性腸疾患モデルにおいて組織炎症が著明に増悪することを見出し、2010年、世界で初めてIL-19遺伝子欠損マウスを用いた成果発表を行った。加えて、IL-19が炎症性腸疾患に関与することも世界で初めての報告である。本研究結果により、今までIL-19の役割は喘息や乾癬に関与することが報告されつつも、その全体的な役割解明にはほど遠かった現状を、炎症性腸疾患発症における急性期のマクロファージへの知見を足がかりとして、今後のIL-19に関する役割解明の新展開が期待される。臨床的には炎症性腸疾患発症にはマクロファージだけでなく、T細胞あるいは他の免疫担当細胞も重要な役割を果たすことが知られている。マクロファージは病原因子に直接応答して炎症反応を引き起こすだけでなく、生体内に侵入した異物に応答したT細胞によっても活性化を受けて炎症反応を惹起する。肝臓は門脈を介して腸管から細菌成分が流入するため、生体防御反応が常に働いている。肝臓の免疫系における生体防御反応は、抗原と自身の生体内の分子構造を識別することから始まる。急性あるいは慢性の肝障害は肝細胞死を伴うため不可逆性の肝細胞障害であるのに対して、脂肪肝ならびに炎症と線維化が認められる非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は可逆性の肝細胞障害を示す。肝臓は傷害に対して高い再生能を有するが、線維化が出現し、これがさらに進展することで肝の硬化が進行する。線維化の進行した肝硬変に対する根本的な治療法は肝移植など特殊な治療法に限られ、免疫学的アプローチからの肝細胞障害や線維化に至る病態解明および内科的新規治療法の開発が望まれている。このためには、肝臓特有の免疫機能を明らかにすることが重要となる。

2. 研究の目的

本研究課題は、IL-19は肝臓においてどのような役割を演じるのか、との問いに成果を示すことで、肝免疫の特徴の一端を明らかにすることを目的とする。4種類のモデルを用いて肝疾患におけるIL-19の生理作用について世界で初めて明らかにする。肝臓にはマクロファージの一種であるクッパー細胞が存在する、また、IL-19の主たる産生細胞はマクロファージであることから、IL-19遺伝子欠損(KO)マウスに加えて、CD11b特異的に過剰発現させたIL-19トランスジェニック(Tg)マウスを用いてIL-19の機能を明らかにする。本研究では、急性肝障害と肝線維化の2つの病態に着目する。急性肝障害の主な原因は化学物質や薬剤によることから発症機序の異なる2つの薬物を用いる。肝線維化についても発症機序の異なる2つのモデルを用いて、野生型(WT)マウス、IL-19 KOマウスおよびIL-19 Tgマウスの間で比較検討を行う。また、肝障害、脂肪滴の沈着、炎症ならびに線維化などの病態の増悪または緩和が認められた場合には、さらにそのメカニズムについて詳細な解析を進める。

3. 研究の方法

急性肝障害モデル(四塩化炭素)

WTマウスとIL-19 KOマウスに、四塩化炭素を2 mL/kgにて腹腔内に投与する。

【肝障害】血清中のASTおよびALT値をキットにより測定する。ASTおよびALTは肝細胞に存在する酵素であり、肝障害の指標となる。【組織学的評価】HE染色を施し肝細胞などの損傷を観察する。また、TUNEL染色を施し死細胞の有無を観察する。客観的評価のため画像解析ソフトにより定量化を行う。【サイトカイン産生量】投与4、12、24時間後に採血を行い、血中のTNF- α などの各種炎症性サイトカインの産生量を、MAGPIXを用いて測定する。【IL-19発現】肝臓におけるIL-19の発現をリアルタイム定量PCR(QPCR)により解析する。【免疫染色】IL-19発現細胞をIL-19に対する抗体を用いて解析する。また、マクロファージや肝星細胞などに対する各種マーカーを用いてIL-19発現細胞を同定する。【過酸化脂質】肝臓を用いて、組織中過

酸化障害を示す過酸化脂質 (TBARS) の濃度をチオバルビツール酸法で測定する。

線維化モデル (四塩化炭素)

WT マウス、IL-19 KO マウスに IL-19 Tg マウスも解析に加える。マウスに四塩化炭素を、2 mL/kg にて 1 週間に 2 回腹腔内投与する。期間は 3 ヶ月とすることで肝線維化を惹起させる。

【肝障害】上記 ConA モデルと同様に解析する。【組織学的評価】上記 ConA モデルと同様に HE 染色を施し肝細胞などの損傷、炎症性細胞の浸潤、脂肪滴の沈着などを観察する。また、Masson's trichrome 染色および α -SMA 免疫染色を施し線維化を評価する。

線維化モデル (高脂肪・高コレステロール飼料)

WT マウスを高脂肪(60%)・高コレステロール(1.25%)飼料にて 2 ヶ月間飼育することで、脂肪肝に加えて炎症および線維化が生じる (奈良女子大学 市村先生 未発表データ)。本飼料にて WT マウス、IL-19 KO マウス、および IL-19 Tg マウスを飼育する。

【生化学検査】血清中の AST、ALT、トリグリセリド(TG)、総コレステロール(TC)、HDL コレステロール、インスリン、グルコースおよびアディポネクチンを測定する。また、TG と TC は肝組織中の値も測定する。【組織学的評価】HE 染色、Masson's trichrome 染色、および α -SMA 免疫染色を施し、脂肪滴の沈着蓄積、炎症性細胞の浸潤、肝細胞風船様腫大、および線維化を評価する。【代謝関連因子】次の代謝関連因子の発現変動を QPCR により解析する。LDLR・HMGCR・ABCG5 (コレステロール取り込み・合成・分泌)、MTP・FAS・FATP5 (脂肪酸合成・取り込み・VLDL 合成)、FXR・SREBP-1c・SREBP-2 (脂質ホメオスタシスに関わる転写制御因子)、TGF- β 1・COL1A1・COL4A1 (線維形成)。【リンパ球サブセットの解析】フローサイトメトリーを用いて、肝臓内の免疫系細胞の比率を解析する。

4. 研究成果

2018年度

2018年度は、四塩化炭素を用いた急性肝障害モデルを作製し、IL-19 遺伝子欠損 (IL-19KO) マウスと野生型 (WT) マウスの間にて比較解析を行った。WT マウスと IL-19KO マウスに、四塩化炭素を 0.2、0.5、1、および 2 mL/kg の各濃度にて腹腔内に投与した。この濃度変化により、弱い肝障害、中強度の肝障害、強度の肝障害、かなり強度の肝障害を誘発させることができる。投与後の解析時間を 2 4 時間と定めて、投与濃度を 4 段階設定して評価した。まずはじめに、血清中の AST および ALT 値をキットにより測定したところ、4 種類すべての濃度において、WT マウスと IL-19KO マウスの間で、明確な相違を見いだすことはできなかった。次に、HE 染色を施し肝細胞などの損傷を観察したところ、AST や ALT で相違が認められなかったことと一致して、まず WT マウスでは濃度増加に伴い肝細胞の障害が認められたが、IL-19 マウスにおいても同様の変化を示し、WT マウスとの間に顕著な差は認められなかった。続いて、投与量を 2 mL/kg に固定して、評価時間を 4 時間後、8 時間後、16 時間後に定めて解析を加えた。しかしながら、AST 値、ALT 値、および HE 染色による組織評価いずれも、WT マウスと IL-19KO マウスの間に顕著な差異を認めることはできなかった。したがって、四塩化炭素による急性肝障害モデルにおいて、IL-19 は重要な役割は演じていない可能性が示唆された。

2019年度

2019年度は、脂肪肝から肝線維化へと進行するモデルを用いて、慢性肝疾患の病態発症における IL-19 の役割解明を試みた。用いたモデルは、コリン欠乏メチオニン (0.1%) 添加、高脂肪 (60%)、コレステロール (2%) 添加という市販の飼料を改良した研究代表者のオリジナル飼料である。従来の市販飼料はコリン欠乏メチオニン (0.1%) 添加高脂肪 (60%) であるが、肝線維化の形成までに長期間が必要であった。この弱点を克服するため、従来飼料にコレステロールを添加することで、肝線維化形成までの期間短縮を目指した。この飼料を用いて、IL-19 遺伝子欠損 (IL-19KO) マウスと野生型 (WT) マウスを一定期間飼育した。また、対照として、IL-19KO マウスと WT マウス、ともに普通食による飼育群を用いた。WT マウスは普通食と比べて、中等大の比較的揃った脂肪滴がびまん性に分布した。CD68 染色により炎症細胞浸潤は散見されたものの軽微であった。またアザン染色により、線維化はほとんど認められなかった。これに対し IL-19KO マウスでは、WT マウスに比べて ALT が高い値を示した。脂肪変性は WT よりも弱く、炎症細胞浸潤は WT よりも目立っていた。また、炎症性サイトカインである IL-6 および TNF- α は WT マウスよりも IL-19KO マウスで有意に増加していた。さらに、IL-19KO マウスでは明確な線維化が認められ、線維化範囲を定量解析したところ WT マウスに比べて IL-19KO マウスにおいて有意な増加を示した。したがって、IL-19KO マウスでは肝線維化まで進行したことから、IL-19 は線維化を抑制する作用を持つ可能性が示された。

2020年度

2020年度は、脂肪肝から肝線維化へと進行する2019年度とは異なるモデルを用いて、慢性肝疾患の病態発症におけるIL-19の役割解明を試みた。用いたモデルは、特殊飼料を一定期間給餌させることにより作製した。特殊飼料の組成および給餌期間については、特許申請を念頭に置いているため開示はできない。この特殊飼料を用いて、IL-19遺伝子欠損(IL-19KO)マウスと野生型(WT)マウスを一定期間飼育した。また、対照として、IL-19KOマウスとWTマウス、ともに通常食にて飼育した群を用いた。WTマウスは普通食と比べて、中等大の比較的揃った脂肪滴がびまん性に分布した。CD68染色により炎症細胞浸潤は散見されたものの軽微であった。また線維化を評価するために特殊染色であるアザン染色を施したところ、線維化はほとんど認められなかった。これに対しIL-19KOマウスでは、WTマウスに比べて血清中に逸脱した肝酵素であるALTが高い値を示した。しかしながら、同じく血清中に逸脱した肝酵素であるASTに差は認められなかった。また、脂肪変性はWTとほぼ同程度であったものの、CD68染色により評価した炎症細胞浸潤はWTよりも増加していた。さらに、線維化の促進に関与する因子群である-SMA、TGF- β 、およびコラーゲン1 α 1の発現量はWTマウスよりもIL-19KOマウスで有意に増加していた。したがって、IL-19KOマウスは飼料給餌による肝線維化モデルにおいて線維化の悪化が認められたことから、IL-19は線維化を抑制する作用を持つ可能性が示された。

2021年度

前年度までにIL-19遺伝子欠損マウス(IL-19KO)は野生型マウス(WT)と比べて、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)様の線維化が増悪することを報告した。2021年度は、このメカニズムを明らかにする目的で、*in vitro*実験系を用いた解析を実施しIL-19の脂質代謝系における役割を明らかにした。HepG2細胞をパルミチン酸およびIL-19で処置した後、中性脂肪量、コレステロール量、およびATP産生量を測定した。また、定量リアルタイムPCR(QPCR)およびウエスタンブロットティングの解析にも供した。HepG2細胞へのIL-19添加により、パルミチン酸により増加した中性脂肪量およびコレステロール量は減少した。IL-19が脂質生成の抑制または脂肪分解の亢進に関与する可能性が考えられたことから、脂肪酸や脂質生成に関与する因子をQPCRで解析した。IL-19添加はパルミチン酸による、アセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACC)1、脂肪酸合成酵素(FASN)、ステアロイル-CoAデサチュラーゼ(SCD)1および5、ステロール調節要素結合タンパク質(SREBP)-1cおよび2の各mRNA発現量を抑制した。しかしながら、CD36のmRNA発現量には明確な変化は見られなかった。IL-19により脂質生成能が低下する可能性が示されたことから、脂肪酸の利用先として、 β 酸化によるATP産生に対するIL-19の影響を検討したところ、IL-19添加によりATP産生量は増加した。続いて、脂質生成低下および β 酸化亢進へと繋がるIL-19シグナル伝達経路について解析したところ、IL-19添加によりAMPKのリン酸化が促進されることを明らかにした。以上の結果より、脂質代謝におけるIL-19の役割を明らかにした。今後、線維化形成における役割についてもさらに解析を実施することで、肝線維化の病態解明ならびに今後の新規創薬作用点の探索に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Azuma YT, Fujita T, Izawa T, Hirota K, Nishiyama K, Ikegami A, Aoyama T, Ike M, Ushikai Y, Kuwamura M, Fujii H, Tsuneyama K.	4. 巻 10
2. 論文標題 IL-19 Contributes to the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis by Altering Lipid Metabolism.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10123513	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野尚重、三木万梨子、東 泰孝
2. 発表標題 インターロイキン-19は四塩化炭素による肝線維化形成に関与する
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 泰孝
2. 発表標題 The role of IL-19 in liver fibrosis
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牛飼裕美、東 泰孝
2. 発表標題 IL-19の肝線維化における役割
3. 学会等名 第55回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2018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
---------	---------