

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590754

研究課題名（和文） 肝臓に存在する特殊なリンパ球による免疫調節

研究課題名（英文） Immunoregulation by the unique lymphocytes in liver

研究代表者

安保 徹（ABO TORU）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30005079

研究成果の概要：マラリア感染において、肝臓に多く存在し、原虫の排除に重要である NKT 細胞や CD8<sup>+</sup>T 細胞を欠如するマウスにマラリア原虫を感染させたところ、NK 細胞や  $\gamma\delta$  T 細胞がマラリア排除に重要であることが分かった。その中でも特に  $\gamma\delta$  T 細胞が不可欠なエフェクターであることを明らかにした。また、新生児期、加齢期や自己免疫性肝炎発症後しばらくして、独特な自己抗体を産生する B 細胞が増殖してくることを明らかにし、それらの細胞の特性について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：肝臓、リンパ球、NK T細胞、 $\gamma\delta$  T細胞、自己免疫疾患、B細胞、自己抗体

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は、末梢のリンパ臓器とは大きく異なるリンパ球分布を示し、これら肝臓特異的なリンパ球は肝炎などの肝障害、癌の肝転移、肝臓における感染症、肝再生、免疫寛容など、多くの免疫現象に関与している。肝臓は消化・代謝臓器としてのみならず、免疫臓器として注目されている。

(1) 我々は、ヒト及びマウスの肝臓には胸腺外分化 T 細胞が存在することを明らかにした。そして、この胸腺外分化 T 細胞は、肝に独自に存在する c-kit<sup>+</sup> 幹細胞から直接分化・成熟を遂げていることも明らかにしてい

る。その後も肝臓における特殊なリンパ球の性状を解析してきた。マラリア感染では胸腺外分化 T 細胞や NKT 細胞が感染初期の生体防御に重要なファクターであることが解明され、自己抗体産生にも関与していることが示唆された。そこで、本研究において肝臓に存在するリンパ球の基礎的解析や細胞内寄生感染症における免疫機構について解析することにより、肝臓内リンパ球の性質や病原体の排除に関する免疫機構が解明されることが期待された。

(2) 肝臓に存在するリンパ球の活性化による疾患の 1 つとして自己免疫性肝炎が挙げられるが、その病態には不明な点も多い。

我々は、Concanavalin A (Con A) や  $\alpha$ -galactocylceramide ( $\alpha$ -GalCer) の投与により、ヒトの自己免疫性肝炎に類似するマウスモデルを作成し解析してきた。これらのモデルでは、NKT 細胞を活性化し、Fas-FasL 依存性に肝炎を発症する。しかし、この病態には、肝臓に存在する他のリンパ球群や、サイトカインの関与などの点で、不明の点も多く、これらのモデルの病態を解明することが、ヒトにおける自己免疫性肝炎の病態の解明や治療法の開発につながるものと期待された。

## 2. 研究の目的

本研究は、肝臓内に存在するリンパ球の性状や、寄生虫感染および自己免疫性肝炎における肝臓の免疫機構を明らかにすることにより、各疾患の病態の解明をすることを目的とした。それらについて以下の解析により検討を行った。

### (1) マラリアの感染時の生体防御に関わる肝臓の免疫細胞の検討

マラリア感染の blood stage では、CD8<sup>+</sup>T 細胞がマラリア原虫やマラリア感染赤血球の排除に重要な役割を果たしていることが知られている。他にも NKT 細胞や胸腺外分化 T 細胞が関わっていることも報告されている。我々は、この CD8<sup>+</sup>T 細胞や NKT 細胞の重要性について調べるためそれらの細胞を欠損するマウスを用いて調べたところ、マラリア排除に不可欠でないことが明らかとなった。そのため本研究では、マラリアからの生体防御に必要な免疫細胞について明らかにしていく。

### (2) 新生児期や加齢により現れる自己抗体産生細胞の検討

成熟マウスにおいて、肝臓や脾臓の B 細胞は通常 B220<sup>high</sup>B 細胞であり、骨髄の B 細胞では B220<sup>high</sup>B 細胞あるいは B220<sup>low</sup>B 細胞が混合している。しかし、新生児期や加齢により各臓器に B220<sup>low</sup>B 細胞が多く見られることが明らかになったことから、この細胞の性状等を解析し、新生児期の組織障害についての検討を行う。

### (3) Con A 誘導性肝炎における自己抗体産生細胞の検討

Con A 誘導性肝炎は Con A 投与により、自己応答性のリンパ球 (CD4<sup>+</sup>T 細胞、NKT 細胞、マクロファージ) が組織障害に関連する自己免疫性肝炎として知られている。この自己免疫性肝炎に自己抗体が関連するかどうか、これまで自己抗体産生 B-1 細胞について知られていない。本研究では、自己免疫性肝炎の実態を解明するためこの自己抗体産生細胞について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) マラリアの感染時の生体防御に関わる肝臓の免疫細胞の検討

マラリア排除に重要な細胞を調べるために以下の方法で解析を行う。

- ①マウスは C57BL/6(B6) の野生型および CD8<sup>+</sup>T 細胞及び NKT 細胞を欠損した  $\beta$ 2-microglobulin ノックアウト ( $\beta$ 2m<sup>-/-</sup>) マウスを用いる。
- ②マラリア株は非致死株である *Plasmodium yoelii* 17XNL を  $1 \times 10^4$ /mouse を接種して行う。
- ③フローサイトメトリーにて細胞の同定やフェノタイプの検索を行う。
- ④抗体投与により細胞の絞込みを行い、マラリア排除に重要な細胞の同定を行う。

### (2) 新生児期や加齢により現れる自己抗体産生細胞の検討

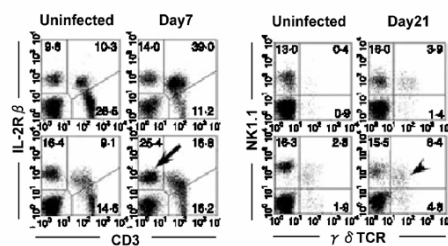
- ①目的とする B220<sup>low</sup>B 細胞をフローサイトメトリーにて解析を行う。
- ②血清中あるいは適宜ソーティングにより得た細胞の培養を行い回収した上清中の自己抗体を HEp-2 での蛍光染色、抗核抗体 (ds-DNA) の ELISA により測定した。
- ③B220<sup>low</sup>B 細胞独特のフェノタイプをフローサイトメトリーにて解析した。
- ④新生児期での肝臓の障害と自己抗体の関係調べるため、ALT、AST、総ビリルビンにて評価を行った。

### (3) Con A 誘導性肝炎における自己抗体産生細胞の検討

Con A を 20mg/kg 投与し、投与日を 0 日目として以下の方法にて、B220<sup>low</sup>B 細胞の検討を行う。

- ①肝障害の程度を評価するために ALT の測定を測定した。
- ②自己抗体産生細胞の出現あるいはその時期の他の細胞の特異性を調べるためフローサイトメトリーを用いて解析した。
- ③自己抗体の検出を行うために、血清を HEp-2 での蛍光染色や抗核抗体の ELISA を用いて解析した。
- ④細胞が産生する自己抗体を検出するために、肝臓細胞を B220<sup>high</sup> と B220<sup>low</sup> の分画でソーティングし、5 日間培養した培養上清について ELISA にて自己抗体の検討を行った。
- ⑤HE 染色及び免疫組織染色を行うことにより、自己抗体の組織障害への関与について検討した。

図 1-1 NK 細胞、 $\gamma$   $\delta$  T 細胞 FACS 図



#### 4. 研究成果

(1) マラリアの感染時の生体防御に関わる肝臓の免疫細胞の検討

①マラリア感染時の Parasitemia (感染血) と肝臓リンパ球数の変化

C57BL/6(B6) マウスにおける *Pyoelli 17XNL* 株接種における Parasitemia は、感染から約 28 日で回復する。マラリア原虫及びマラリア感染赤血球の排除に重要とされる CD8<sup>+</sup>T 細胞や NKT 細胞を欠如する  $\beta_2m^{-/-}$  マウスでは野生型マウスより感受性が高いことが予想されたが、野生型マウスと同等に排除されることが分かった。また肝臓細胞数も  $\beta_2m^{-/-}$  マウスでは野生型マウスより有為に増加していた。このことより CD8<sup>+</sup>T 細胞や NKT 細胞以外の免疫細胞がマラリア排除に関与していることが予想された。

②  $\beta_2m^{-/-}$  マウスでのマラリア排除に関わる細胞の検索

$\beta_2m^{-/-}$  マウスで増加する細胞をフローサイトメトリーで検索したところ、最も増加したリンパ球サブセットが感染初期(day7)のNK細胞(CD3<sup>-</sup>IL-2R $\beta$ <sup>+</sup>)であった(図1-1左)。感染後期では野生型マウスでは $\alpha\beta$ T細胞が増加するのに対して、 $\beta_2m^{-/-}$  マウスでは $\gamma\delta$ T細胞の増加が見られた(図1-2右)。絶対数においても野生型に比べ、 $\beta_2m^{-/-}$  マウスにおいて、感染初期でNK細胞の、感染後期で $\gamma\delta$ T細胞の著しい増加が見られた(図1-2)。これらのことより、 $\beta_2m^{-/-}$  マウスでのマラリア排除にはNK細胞と $\gamma\delta$ T細胞が重要な役割を果たしているのではないかと予想された。

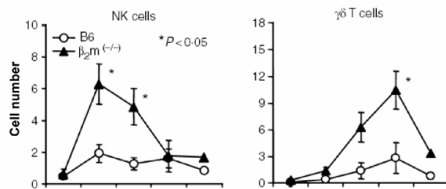


図1-2 NK細胞、 $\gamma\delta$ 細胞数

③NK細胞及び $\gamma\delta$ T細胞によるマラリア排除の解析

NK細胞と $\gamma\delta$ T細胞の感染における重要性について解析するために、 $\beta_2m^{-/-}$  マウスに抗NK1.1抗体投与によりNK細胞を排除したマウスと、抗 $\gamma\delta$ 抗体投与により $\gamma\delta$ T細胞を排除したマウスにマラリア感染させた。その結果、NK細胞を排除した群ではParasitemiaの上昇が見られ、感染期間も遷延するが、回復する個体も見られた(図1-3左)。一方、 $\gamma\delta$ T細胞を排除した群ではParasitemiaの上昇と共に、全個体が死亡した(図1-3右)。これにより、NK細胞及び $\gamma\delta$ T細胞がマラリア排除に重要な細胞であることが明らかとなった。さらに、 $\gamma\delta$ T細胞

の方がマラリア排除により重要な細胞であることが明らかとなった。

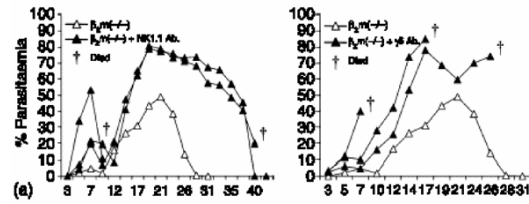


図1-3 NK細胞または $\gamma\delta$ T細胞除去後の parasitemia

④ $\gamma\delta$ T細胞のサブセット解析

マラリア排除に重要な $\gamma\delta$ T細胞について、増加してくる $\gamma\delta$ T細胞のフェノタイプやTCRのレパトアの解析を行った。フェノタイプ解析ではT細胞の活性化マーカー(B220、CD5、CD69)について検討した。未感染マウスの $\gamma\delta$ T細胞は主にB220<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>タイプの細胞であるが、マラリア感染によりB220<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD69<sup>-</sup>タイプの $\gamma\delta$ T細胞が増加してくることが分かり、TCR $\gamma$ 鎖のレパトアはV $\gamma$ 1、V $\gamma$ 2、V $\gamma$ 4、V $\gamma$ 6が使用され、野生型のマラリア感染で使用されるレパトアと同様であった。増加した $\gamma\delta$ T細胞がCD5<sup>-</sup>であったことから、CD5<sup>+</sup>の脾臓由来の $\gamma\delta$ T細胞ではないことが証明されたが、腸管由来の $\gamma\delta$ T細胞の肝臓への移入も考えられた。しかし、腸管由来のV $\gamma$ 7のレパトアが検出されず、さらに腸管型のCD8<sup>+</sup>ではなく、肝臓型のCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>であったことから腸管由来の $\gamma\delta$ T細胞ではなく、肝臓独自の $\gamma\delta$ T細胞が増加していることが明らかとなった。

(2) 新生児期や加齢により現れる自己抗体産生細胞の検討

①週齢によるB220<sup>low</sup>B細胞の変化

胎児期あるいは新生児期(生後2週)の肝臓、脾臓に及び骨髄に多数のB220<sup>low</sup>B細胞が現われた。この細胞は成熟期(9週齢前後)ではほとんど消失するが、加齢により再び増加した(図2-1)。

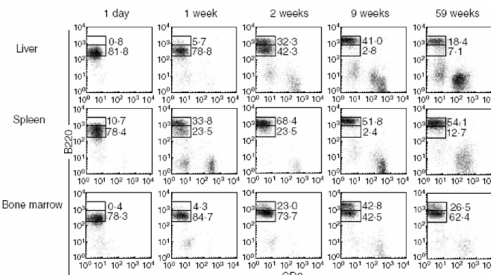


図2-1 CD3/B220のFACS図

②自己抗体産生性の検討

血清中の自己抗体は成熟マウスや生後数日のマウスでは見られないが、生後1~2週および加齢マウスから検出されることが明

らかになり (図 2-2)、さらに脾臓や骨髓細胞を培養したときの培養上清からも自己抗体が産生されることが明らかになった (図 2-3 左)。次いで、 $B220^{high}B$  細胞及び  $B220^{low}B$  細胞からの自己抗体の産生についても細胞ソーティングにより解析を行い、 $B220^{low}B$  細胞から自己抗体が産生することが明らかになった (図 2-3 右)。

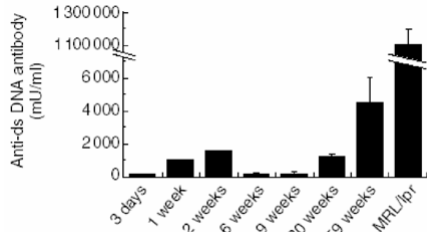


図 2-2 血清中の自己抗体

### ③ $B220^{low}B$ 細胞により産生される自己抗体の組織障害関与の検討

$B220^{low}B$  細胞が自己抗体を産生していることから、この自己抗体が新生児期の組織障害に関与することが考えられた。この組織障害への関与を調べるために、血清中の ALT、AST、ビリルビン濃度を解析し、検討した。その結果、自己抗体の産生する 1~2 週齢ではなく、生後 1 日で肝障害の指標が増加していた。このことより、この新生児期に出現する自己抗体は組織傷害に関与していないことが示唆された。

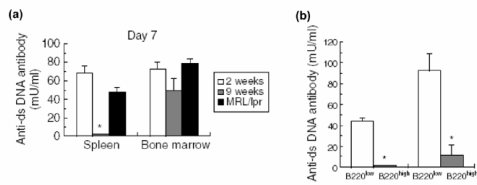


図 2-3  $B220^{low}B$  細胞による自己抗体

### ④ フェノタイプの解析

本研究で解析した  $B220^{low}B$  細胞は自己抗体を産生し、 $CD5^{-}$ であることから、その分類としては  $B-1b$  細胞としての機能があると考えられた。しかし、その他の抗原型としては通常の  $B-1b$  細胞と異なる特殊な  $B-1b$  細胞の 1 つではないかと示唆された (表 2-1)。

B cell	Phenotype				Autoantibody	Site	
B-2	$B220^{H}$	$CD5^{-}$	$IgM^{H}$	$IgD^{H}$	$CD23^{+}$	-	Periphery and BM
B-1a	$B220^{H}$	$CD5^{+}$	$IgM^{H}$	$IgD^{H}$	$CD23^{-}$	+	Peritoneal cavity
B-1b	$B220^{H}$	$CD5^{-}$	$IgM^{H}$	$IgD^{H}$	$CD23^{+}$	+	Peritoneal cavity
B-1b*	$B220^{H}$	$CD5^{-}$	$IgM^{H}$	$IgD^{-}$	$CD23^{-}$	+	Periphery and BM

表 2-1 B-1b フェノタイプ

### (3) Con A 誘導性肝炎における自己抗体産生細胞の検討

#### ① Con A 誘導性の肝障害

Con A による肝障害は Con A 接種後 24 時間頃まで激しく起こるが、3 日目以降は ALT 値も正常範囲となる。

#### ② $B220^{low}B$ 細胞の増加

Con A 接種から 2 週間目でリンパ球に対する割合及び絶対数において、胸腺外分化 T 細胞、NKT 細胞と共に、 $B220^{low}B$  細胞増加していることが確認された (図 3-1)。

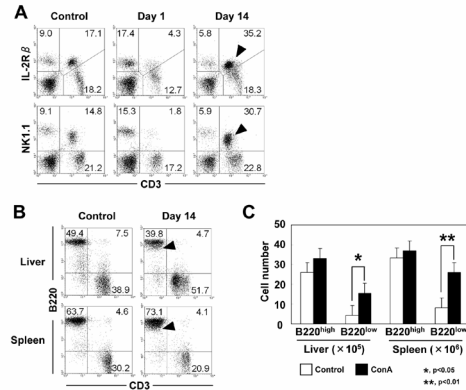


図 3-1  $B220^{low}B$  細胞の FACS 図

#### ③ 自己抗体の検出

HEp-2 により血清中の自己抗体について調べたところ、14 日目で自己抗体が強く現われた (図 3-2A)。これは  $B220^{low}B$  細胞の増加と同調して出現していることが示唆されることから、この自己抗体についてさらに解析したところ、IgG のアイソタイプが産生されていることが明らかとなった (図 3-2B)。同様に、抗核抗体検査(ds-DNA)でも IgG が 14 日目に上昇した (図 3-2C)。

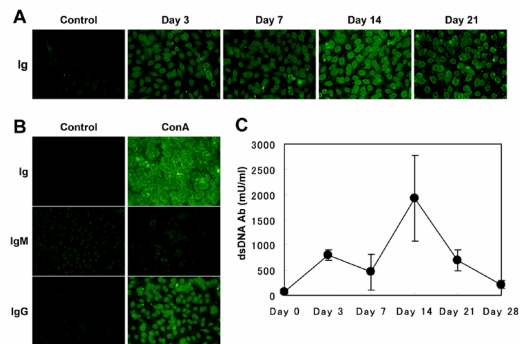


図 3-2 血清中自己抗体

#### ④ 細胞培養による自己抗体の産生の検討

脾臓から細胞分離により得た細胞を 7 日間培養したときの培養上清を HEp-2 により自己抗体を産生することが分かり、この自己抗体が  $B220^{low}B$  細胞で産生されることが明らかになった (図 3-3)。

#### ⑤ 組織染色による肝障害への自己抗体関与の検討

肝臓の HE 染色から 14 日目では炎症が終了していた (図 3-4A)。Con A 投与マウスの脾臓には顆粒球浸潤が多いが、肝臓ではほと

んど浸潤していなかった (図 3-4B)。さらに

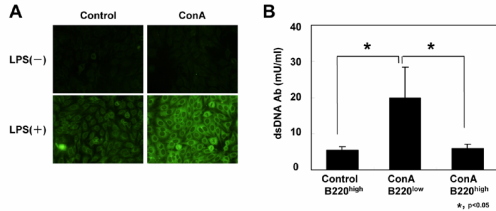


図 3-3 B220<sup>low</sup>B 細胞 in vitro の自己抗体

Con A 投与マウスの脾臓中にヘモジデリンの散在を確認し、Con A 投与初期時に出血が起きていたことが推定された (図 3-4C)。これらることより、Con A 投与 14 日後では自己抗体が産生されているにも関わらず組織障害が起きないことから、出現してくる B220<sup>low</sup>B 細胞から産生される自己抗体は組織障害に関与していないのではないかと推察された。そして、未だに自己抗体の役割は分かっていないが、炎症により傷害された組織の修復に寄与している可能性も考えられるので、今後 B220<sup>low</sup>B 細胞から産生される自己抗体について明らかにしていく必要がある。

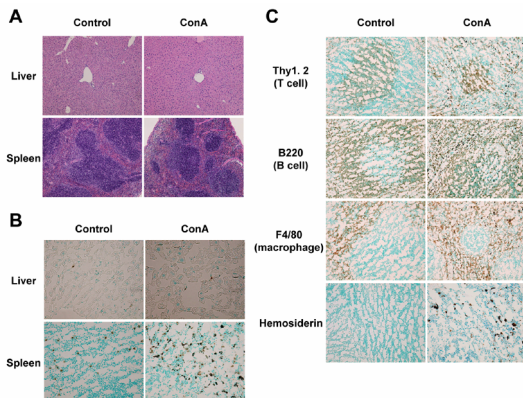


図 3-4 HE 染色と免疫組織染色

## 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 4 件)

- ①太刀川彩保子、川村俊彦、安保徹、他 4 名、Appearance of B220<sup>low</sup> autoantibody-producing B-1 cells at neonatal and older stages in mice, *Clinical and Experimental Immunology*、153、448-455、2008、査読有
- ②安保徹、川村俊彦、川村宏樹、富山 (宮路) 智香子、神田泰洋、Relationship between diseases accompanied by tissue destruction and granulocytes with surface adrenergic receptors、*Immunologic Research*、37、201-210、2007、査読有

- ③谷口委代、神田泰洋、安保徹、他 6 名、Malaria protection in  $\beta 2$ -microglobulin-deficient mice lacking major histocompatibility complex class I antigens: essential role of innate immunity, including  $\gamma \delta$  T cells、*Immunology*、122、514-521、2007、査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ①松本浩晃、正常マウスでの NKT 細胞活性化による自己抗体産生、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日、京都
- ②神田泰洋、IFN- $\alpha$  刺激による in vitro での肝 NK 細胞の活性化、第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、2007 年 11 月 22 日、東京

[図書] (計 1 件)

- ①安保徹、ナツメ社、安保徹の病気を治せる医学、2007、219

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安保 徹 (ABO TORU)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30005079

### (2) 研究分担者

川村 俊彦 (KAWAMURA TOSHIHIKO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70301182

川村 宏樹 (KAWAMURA HIROKI)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：20333495

神田 泰洋 (KANDA YASUHIRO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00436768

### (3) 連携研究者

なし