

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390203

研究課題名(和文) 肝炎ウイルスモデルを用いた抗原特異的リンパ球と肝障害の炎症カスケードの解明

研究課題名(英文) The analysis of inflammatory cascade between antigen specific CTLs and liver injury using hepatitis model

研究代表者

木村 公則 (KIMURA KIMINORI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員

研究者番号：70397339

研究成果の概要(和文)：我々は抗原特異的細胞障害性リンパ球(CTL)がどのようなメカニズムで肝細胞に到達し、肝障害を引き起こすのか検討した。HBs抗原を肝細胞に発現したHBV TgマウスにCTLsを投与することによりヒトの劇症肝炎類似の現象を誘導するマウスモデルを用いて、接着因子であるCD44が、CTLの肝細胞内への浸潤に重要であることを示し、CTLs側のCD44よりも、類洞壁内皮細胞でのCD44の発現がCTLの類洞内の浸潤に重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：There are many uncertain points for regarding with leukocytes movement in the liver, especially interaction between liver sinus endothelial cells (LSECs) and cytotoxic T lymphocytes (CTLs). We examined role of CD44 for these interaction using hepatitis model. CTLs were administered into Hepatitis B virus transgenic mice (HBVTg) mice and HBVTgxCD44 knock out (KO) mice, and alanine aminotransferase activity, number of intrahepatic leukocytes, cytokine and chemokine mRNA level were examined. To determine the number and distribution of CTLs in the liver CFSE-labeled CTLs was administered into HBVTg with or without CD44 mice. sALT activity increased since 12 h though it had declined to 4 h in the CD44KOxHBVTg mice after CTLs injection. Similarly, the levels of Tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ , Interferon (IFN)  $\gamma$ , Macrophage inflammatory protein (MIP)-2 mRNAs reduced in 4 h though it had been increased since 12 h in the CD44KOxHBVTg mice. The number of apoptotic hepatocytes increased intentionally at 24 h in the CD44KOxHBVTg livers, and it thought to be due to lower activity of initial nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B). Although the number of CTLs exhibited lower at 4 h in the CD44KOxHBVTg livers the difference of Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and CD86 expression on LSECs was not detected. CD44 on LSECs exerts important roles for CTLs migration into the hepatocytes. However, since CD44 deficient state was exacerbate hepatic injury, attention is necessary for hepatitis treatment as CD44 target therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	1,7940,000

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：肝臓学、免疫

1. 研究開始当初の背景  
現在国内でB型肝炎ウイルス(HBV)感染者数

は約150万人ともいわれ、これらのウイルス感染者の一部は慢性肝炎を経て肝硬変、肝細

胞癌を生じる。肝細胞癌は最近の調査で男性において癌死原因の3位、女性においては4位をしめ、HCV感染者とともに治療の対策が急務の感染症の一つである。肝炎の進行を防御する効果的な抗ウイルス療法にはウイルス合成阻害というウイルス側の因子とともに宿主側の免疫反応も重要である。ウイルスを排除するには抗原特異的なリンパ球特に、細胞障害性T細胞(CTLs)の働きが重要であり今回我々はCTLsや炎症細胞の肝臓内動態と肝障害機序の関与に注目し抗肝炎治療の新たな可能性について検討した。宿主の効率よいHBVに対する免疫反応を誘導するには、CTLsの機能動態解析が、必須であり今回我々は、今まで不明な点が多いCTLsがどのような機構で肝細胞内に浸潤するかを研究課題とした。炎症細胞が組織局所に浸潤するためには、いくつかのステップがあり1) rolling, activation, arrest 2) adhesion 3) transmigrationの3種類の段階を経て細胞内に浸潤するといわれている。まず最初のrolling, activation, arrestのステップでは炎症細胞上のL-selectinやそのリガンドであるP-selectin glycoprotein ligand(PSGL1)が重要である。Activationの際にはケモカインがarrestの際にはLFA-ICAM-1のintegrinが重要な働きをしている。次のステップであるadhesionには、CD44-ヒアルロン酸が重要である。今回、このような細胞浸潤の過程で重要なケモカインと肝障害の機構に着目し、肝障害の制御を目的として抗肝炎治療の新たなストラテジーとしての可能性を検討した。

## 2. 研究の目的

B型肝炎ウイルス(HBV)による肝障害は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を引き起こし治療法の確立が望まれる感染症の一つである。治療法の開発に向けて肝障害が起こるメカニズムを解析することは必須である。現在までにHBV自身が直接肝障害を引き起こすのではなく、宿主の免疫応答により肝障害が誘導されるといわれている。この免疫反応を引き起こすと考えられているのが抗原特異的細胞障害性リンパ球(CTL)である。CTLがHBVに感染している肝細胞を認識し、Fas-FasL, perforin, granzymeなどにより感染細胞を破壊する。同時に炎症性サイトカインであるIFN-gやTNF-aが細胞を破壊せずにHBVの複製を制御していると報告されている。肝炎ウイルスマウスモデル、今回はHBV Tgマウスを用いて抗原特異的CTLsを投与する肝障害モデルの系を用いてCTLがどのような機構を用いて肝細胞内に浸潤するのか、またこれらの遊走を制御する因子は何かを解析する。今回は、特に接着因子の一つであるCD44とosteopontin(OPN)、CCL2、CCL5

に着目しこれらを制御することで肝障害が抑制されるか検討した。

## 3. 研究の方法

HBs抗原を肝細胞に発現したHBV TgマウスにHBs28-39のエピトープを認識したCTL cloneを投与することによりヒトの劇症肝炎類似の肝障害を誘導するマウスモデルを用いて、CD44, chemokineが肝障害に関与しているか検討する。この劇症肝炎モデルは肝障害の進展が3段階から成り立っており、1)抗原特異的CTLがHBV陽性肝細胞を認識して破壊(apoptosis)2)好中球などの単核球の浸潤3)マクロファージによる広範な肝細胞壊死である。現時点ではどの段階を制御することが肝障害の進展に最も有効であるか不明であり、まず第1段階のCTLが肝細胞に遭遇する前にCD44, ICAM1の制御が有効か検討した。具体的には、CD44KOxHBV TgマウスにCTLを投与し、肝障害、肝臓内のCTL数、分布、肝臓内の炎症細胞浸潤数、各種炎症性cytokineの解析を行った。次のステップとしてCD44KOマウスからHBs抗原特異的CTLを誘導し、HBV Tgマウスに投与しCTLのCD44と肝障害の関与について検討する。またCD44のリガンドの一つであるOPNがこのマウスモデルで肝障害に関与しているか検討し、OPNの中和抗体を投与後、炎症細胞浸潤、肝障害が軽減されるか解析した。

## 4. 研究成果

### 1) CD44KOxHBV Tgマウス

CTLs投与初期(4h)において明らかに、肝臓内の炎症細胞浸潤数が減少しており同時に血清ALT値も低下していた。しかし投与後24h以降では反対に肝臓内の炎症細胞数も増加しており肝障害も悪化していた。特に好中球、マクロファージの細胞数が顕著な変化を示し、早期ではこれらの細胞群は減少していたが後期では増加していた。CFSEをラベルしたCTLを投与することにより、投与後4hでは標識したCTL数が肝臓内で有意に減少していることをFACS解析、免疫組織染色にて示した。しかし24hでは肝臓内のCTL数は差を認めなかった。さらに炎症性サイトカインの解析をRNase protection assayを用いて行い、4hではCD44KOxHBV Tgマウス群でIFN-gやTNF-a, CCL5, CCL2の発現が低下していた。これらの発現も24h以降では逆に上昇していた。肝臓内CTL数が減少している4hに着目し、類洞内皮細胞(LSEC)とCTLの混合培養によるmigration assayを行うことにより、LSECのCD44が重要であることを示した。また投与後24hにおける肝障害の増悪には、肝細胞のアポトーシス数が増加しており、この要因としてCD44が欠失したマクロファージではアポトーシスを生じた肝細胞の貪食能

が低下している点と転写因子の一つである NF- $\kappa$ B の低下が肝細胞のアポトーシスを生じやすくさせる状態にしている点の関与が示唆された。

#### 2) CD44KO 由来の HBV 特異的 CTL

LSEC の CD44 が CTL の肝細胞への遊走に重要であることを示したので、次に CTL に発現している CD44 が肝障害に関与しているか検討した。CD44KO マウスより DNA ワクチンを用いて CD44KO マウス由来の HBV 特異的 CTL を誘導し、HBVTg マウスに投与した。CD44KO マウスから誘導した CTL は抗原に対してサイトカインの産生能は低下していなかったが、複製能の亢進が認められた。CD44KOCTL、CTL 投与の両群において投与後 4、24h 共に肝障害のレベルに差を認めなかった。また肝臓組織像、炎症性サイトカインの発現にも差はなかった。これらの結果は、CTL 側の CD44 は肝障害に関与しないことを示した。

#### 3) OPN の関与

CTL 投与後の CD44 のリガンドのひとつである osteopontin (OPN) が肝臓内で発現が上昇しており、血清中にも増加していた。LSEC の CD44 の counterpart を同定するために、OPN に着目した。CTL には細胞内サイトカイン染色により発現していることを確認した。OPN の中和抗体を前投与し、CTL を投与したところ ALT の低下が認められた。肝臓内の炎症細胞浸潤の減少も見られ、主にマクロファージからの TNF- $\alpha$  の産生能が低下していた。

#### 4) CCL2, CCL5 の関与

CTL 投与後肝臓内 mRNA レベルで CCL2, CCL5 の発現が増加していた。これらのケモカインを中和抗体を用いてブロックすることにより肝障害の程度を解析した。抗 CCL5 抗体を投与しても肝障害の低下は認められなかったが、抗 CCL2 抗体を投与した群では 70% 程度の肝障害の減少が認められた。同時に肝臓内に浸潤するマクロファージ数の減少が認められた。

#### 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 17 件)

① Kimura K and Kohara M. An experimental mouse model for hepatitis C virus. *Exp. Animal.* (査読有) 2011;60(2):93-100.

② Tanaka S, Kimura K, Kawachi t, Inuzuka T. No relapse of neuromyelitis optica during secondary low B lymphocytes. *Neurology* (査読有) 2010 Nov 9;75(19):1745-7.

③ Kimura K, Sekiguchi S, Hayashi S, Hayashi y, Hishima T, Nagaki M, Kohara M. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cells recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* (査読有) 2011 Mar;89(3):433-42

④ Kimura K, Hayashi S, Nagaki M. Roles of CD44 in chemical-induced liver injury. *Curr Opin Drug Discov Devel.* (査読有) 2010 Jan;13(1):96-103. Review.

⑤ Nagaki M, Shimizu M, Sugihara JI, Tomita E, Sano C, Naiki T, Kimura K, Amano K, Sakai T, Ninomiya M, Kojima T, Katsumura N, Fujimoto M, Moriwaki H. Extended treatment duration of peginterferon-alpha2b plus ribavirin for 72 and 96 weeks in hepatitis C genotype 1-infected late responders. *Aliment Pharmacol Ther.* (査読有) 2009 Aug 15;30(4):343-51.

⑥ Kimura K, Nagaki M, Matsura T, Moriwaki H, Kakimi K. Pathological role of CD44 on NKT cells in carbon tetrachloride-mediated liver injury. *Hepatol Res* (査読有) 2009 Jan;39(1):93-105

⑦ Kimura K, Nagaki M, Saio M, Moriwaki M, Kakimi K. Effect of CD44 blocking for CTL-induced acute liver injury in the hepatitis B virus transgenic mice. *J gastroenterology* (査読有) 2009 2009;44(3):218-27

⑧ Hosoi A, Takeda Y, Furuichi Y, Kurachi M, Kimura K, Maekawa R, Takatsu K, Kakimi K. Memory Th1 cell augments tumor-specific CTL following transcutaneous peptide immunization. *Cancer Res.* (査読有) 2008 May 15;68(10):3941-9.

⑨ Hosoi A, Takeda Y, Sakuta K, Ueha S, Kurachi M, Kimura K, Maekawa R, Kakimi K. Dendritic cell vaccine with mRNA targeted to the proteasome by polyubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 2008 Jun 27;371(2):242-6.

⑩ Satake S, Nagaki M, Kimura K, Naiki T, Hayashi H, Sugihara J, Tomita E, Moriwaki H. Significant effect of hepatitis C virus specific CTLs on viral clearance in patients with type C chronic hepatitis treated with antiviral agents. *Hepatol Res.* (査読有) 2007 Nov 22;

⑪ Kimura K, Nagaki M, Kakimi K, Saio M, Saeki T, Okuda Y, Kuwata K, Moriwaki H. Critical role of CD44 in Hepatotoxin mediated liver injury *J hepatol* (査読有) 2008 Jun;48(6):952-61.

⑫ Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes

through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression. Osawa Y, Seki E, Kodama Y, Suetsugu A, Miura K, Adachi M, Ito H, Shiratori Y, Banno Y, Olefsky JM, Nagaki M, Moriwaki H, Brenner DA, Seishima M. FASEB J. (査読有) 2011 Apr;25(4):1133-44.

⑬Is there a delayed gastric emptying of patients with early-stage, untreated Parkinson's disease? An analysis using the 13C-acetate breath test. Tanaka Y, Kato T, Nishida H, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Hayashi Y, Kimura A, Hozumi I, Araki H, Murase M, Nagaki M, Moriwaki H, Inuzuka T. J Neurol. (査読有) 2011 Mar;258(3):421-6.

⑭Role of acid sphingomyelinase of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. Osawa Y, Seki E, Adachi M, Suetsugu A, Ito H, Moriwaki H, Seishima M, Nagaki M. Hepatology. (査読有) 2010 Jan;51(1):237-45.

⑮Extracellular matrix is required for the survival and differentiation of transplanted hepatic progenitor cells. Tsukada Y, Nagaki M, Suetsugu A, Osawa Y, Moriwaki H. Biochem Biophys Res Commun. (査読有) 2009 Apr 17;381(4):733-7.

⑯Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. Sawanobori Y, Ueha S, Kurachi M, Shimaoka T, Talmadge JE, Abe J, Shono Y, Kitabatake M, Kakimi K, Mukaida N, Matsushima K. Blood. (査読有) 2008 Jun 15;111(12):5457-66.

⑰Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, Sugiyama T, Nagasawa T, Imamura M, Matsushima K. Blood. (査読有) 2010 Jul 1;115(26):5401-11.

[学会発表] (計 10 件)

① Kiminori Kimura, Michinori Kohara et al. ;” Hepatitis C virus-mediated pathogenesis is dependent on inflammatory cytokines irrespective of the HCV protein level” keystone symposia 2011. 2. 1 Calgary

② Kiminori Kimura, Satoshi Sekiguchi, et al. ;” Critical role of IL-18 for intrahepatic inflammatory cell recruitment in activated macrophages mediated liver injury” AASLD 2010. 12 Boston

③ Kiminori Kimura, Michinori Kohara et al. ;” Hepatitis C virus-mediated pathogenesis is dependent on inflammatory

cytokines irrespective of the HCV protein level” AASLD 2010. 12 Boston

④ Kiminori Kimura, Michinori Kohara et al. ;” Hepatitis C virus-mediated pathogenesis is dependent on inflammatory cytokines irrespective of the HCV protein level” HCV meeting 2010. 9 Yokohama

⑤ Kiminori Kimura and Masahito Nagaki;” Role of CD44 in chemical induced liver injury” EASL topic conference 2010. 2. 18 Amsterdam

⑥ Kiminori Kimura, Michinori Kohara et al. ;” Interaction of CTLs and CD44 in acute hepatitis model using hepatitis B virus transgenic mice” AASLD 2008. 11. 2 San Francisco

⑦ 木村公則, 小原道法 ;” HCV感染による慢性肝炎の病態形成と炎症性サイトカインの関与” 日本肝臓学会総会シンポジウム 2011. 6 東京

⑧ 木村公則, 小原道法 ;” C型慢性肝炎に対する遺伝子組換えワクチンウイルスによる新たな治療戦略” 日本肝臓学会大会ワークショップ 2010. 10 横浜

⑨ 木村公則, 永木正仁 ;” B型肝炎治療における自然免疫制御の有用性” 日本肝臓学会シンポジウム 2008. 10. 2 東京

⑩ 木村公則, 永木正仁 ;” B型急性肝炎モデルにおける Thioredoxin-1 の関与” 日本肝臓学会東部会シンポジウム 2008. 12. 4 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 公則 (KIMURA KIMINORI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員

研究者番号：70397339

### (2) 研究分担者

垣見 和宏 (KAKIMI KAZUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：80273358

永木 正仁 (NAGAKI MASAHITO)

岐阜大学・医学部附属病院・臨床教授

研究者番号：30293559

齋尾 征直 (SAIO MASANAO)

岐阜大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40242721

倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)

東京大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00396722

上羽 悟史 (UEHA SATOSHI)

東京大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：00447385

### (3) 連携研究者

松島鋼治 (MATSUSHIMA KOUJI)

東京大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50222427