

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591272

研究課題名 (和文) 小児期における肝臓内リンパ球の特殊性と肝疾患との関連

研究課題名 (英文) The specificity of liver lymphocytes in childhood and its relationship to liver diseases

研究代表者

川村 俊彦 (KAWAMURA TOSHIHIKO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70301182

研究成果の概要 (和文)：新生児期のマウス肝臓には、自己抗体産生能を持つ B220<sup>low</sup> B-1 細胞が存在すること、またこれらの B-1 細胞は、NKT 細胞の活性化に伴い、自己抗体を産生することを明らかにした。NKT 細胞に発現される CD94/NKG2A レセプターが急性の肝障害を抑制する機能をもつこと、また、このレセプターを発現する NKT 細胞が、小児期の肝臓に多いことを見出した。

研究成果の概要 (英文)： Autoantibody-producing B220<sup>low</sup> B-1 cells were abundantly found in the liver of neonatal mice. These B-1 cells were found to produce autoantibodies upon NKT cell activation. We also found that CD94/NKG2A inhibits NKT cell activation in hepatic injury, and that higher proportions of NKT cells express NKG2A in young mice than in adult mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：小児科学・小児消化器病学

キーワード：小児、肝臓、リンパ球、肝臓病、免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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、免疫臓器として最近注目されている。肝臓に多くみられるリンパ球としては、NK 細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$  T 細胞、胸腺外分化 T 細胞が挙げられるが、これらリンパ球群は、肝臓におけ

る免疫反応の中心的役割を果たす。最近、肝臓の免疫学的特徴が明らかになりつつある。長い間、リンパ球が肝組織に見出されても、他の免疫臓器から浸潤してきたものと考えられていた。しかし、肝に見出されるリンパ球の約半数は肝で独自に分化した T 細胞 (つまり胸腺外分化 T 細胞) であることがわかってきた。胸腺のメインストリームで分化・成熟する通常の T 細胞は negative selection が行われていて、禁止クローンを保有したまま成熟する機会はない。このため、構成されるクローンは外来抗原向けとなっていて、これ

は進化した上陸生物が多様な外来抗原にそなえるための新しいシステムだったといえる。一方、肝 T 細胞は、禁止クローンの **negative selection** が不完全で、これがむしろ **innate immunity** を支えるバックボーンと成っているのではないと思われる。このように、上陸した高等生物は古いリンパ球（腸管リンパ球も含まれる）システムと新しい胸腺リンパ球システムの二重構造によって、適切に生体防御を行うことができるようになってきているものと思われる。

(2) これまでの研究は、主に成人の肝臓に焦点をあてており、小児の肝臓に関する免疫学的研究はあまりなされてこなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 小児期から成人へ成長する過程において、末梢血中のリンパ球群の割合およびそれらの機能が変化することはよく知られている。肝疾患の病態を理解するうえで、肝臓内に存在するリンパ球の解析が重要であることは疑いの余地はなく、本研究の大きな目的である。新生児期～成人に成長する過程で、肝臓内のリンパ球がどのように変化するか、の解析が最重要課題である。

(2) まず初めに、正常な状態における小児期の肝リンパ球の表面抗原の性状、機能に関して、成人の肝リンパ球との違いを明らかにする。

(3) 次に、疾患における小児肝臓リンパ球の関与についての研究を行う。われわれは、肝臓に存在するリンパ球と、種々の免疫現象との関連の研究を行ってきており、その中のひとつとして、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。申請者らは、ヒトの自己免疫性肝炎に類似するマウスモデルを確立した (Osman et al. *Eur J Immunol* 2000)。このモデルでは、マウスに、NKT 細胞のリガンドのひとつである  $\alpha$ -galactocylceramide を投与すると、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信じている。また、われわれは、マウスのみならず、ヒト（成人）の肝臓に存在するリンパ球の解析も行っており、**CD57<sup>+</sup> T 細胞**や、**CD56<sup>+</sup> T 細胞**が、肝臓に存在する胸腺外分化 T 細胞であることを見出し、肝疾患との関わりに関する研究も行ってきた。

(4) 本研究においては、これまで行われてきた肝臓リンパ球の研究を小児期の肝臓にまで範囲を広げて行う。

## 3. 研究の方法

(1) 新生児期～成人に成長する過程で、肝臓内のリンパ球がどのように変化するか、小児期の肝リンパ球の表面抗原の性状、機能に関して、成人の肝リンパ球との違いを明らかにする。各週齢のマウスより肝臓を分離し、はさみにて細切し、ステンレススチールメッシュを通す。その後、コラゲナーゼ処理し、更に、パーコールによって比重遠心を行う。この操作により、肝実質細胞と、非実質細胞を分離することができる。非実質細胞の分画はほとんどがリンパ球である。このリンパ球の表面抗原の性状をフローサイトメーターで解析した。

(2) 疾患マウスモデルとしては、自己免疫性肝炎モデルである  $\alpha$ -galactosylceramide 誘導性肝炎および **concanabalin A** 誘導性肝炎を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 新生児期の肝臓に存在する自己抗体産生 B-1 細胞の解析

自己免疫疾患に重要な役割を果たす自己抗体およびその産生細胞である B-1 細胞について、加齢によってどのような変化を示すかを解析した。6～10週齢マウスの肝臓において、B細胞の大部分は **B220<sup>high</sup>**であるが、新生仔マウスの肝臓においては、B細胞の大部分は **B220<sup>low</sup>**であった。表面抗原の解析により、この新生仔マウスに見られる **B220<sup>low</sup>**の B細胞は、自己抗体産生細胞である B-1細胞に類似した表面抗原を発現していることが明らかになった。さらに、この B-1 like 細胞は、*in vitro*での LPS 刺激に対して自己抗体を産生することも明らかになった。実際、新生仔マウスの血清中には、自己抗体が高濃度で存在していることも明らかになった。以上より、新生仔マウスの肝臓には自己抗体産生 B-1 like 細胞が存在し、新生時期の免疫能の調整に関与している可能性が示唆された。

(2) 自己免疫性肝炎における NKG2A の役割

NKT 細胞は肝臓に多く存在し、肝臓における免疫反応に深く関与している。マウスに、

植物由来のレクチンである concanavalin A (Con A)を投与すると、T細胞依存性の肝炎が発症する。この肝炎は、ヒトの自己免疫性肝炎と類似しているため、自己免疫性肝炎のマウスモデルとして研究されている。Con Aによる肝炎発症には、NKT細胞が必須である。申請者は、このCon A肝炎モデルにおけるNKT細胞の活性化抑制にNKG2Aが関与しているかどうかを解析した。今回用いた抗NKG2A/C/E抗体(クローン:20d5)は、マウスNKG2A/C/Eに対するアンタゴニスト抗体であり、NKG2A/C/Eの機能を阻害する。マウスのNK細胞、NKT細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞上に発現されるNKG2のうち、この20d5で認識されるNKG2は、大部分がNKG2Aである。したがってこの20d5による機能阻害は、NKG2Aに対するものと考えられる。抗NKG2A/C/E抗体(20d5)をあらかじめ投与しておいたマウスにConAを投与し、血清中のASTおよびALT値を測定したところ、コントロール抗体投与群に比べて有意に高かった。つまり、NKG2Aを介した抑制シグナルを阻害することにより肝障害が悪化することがわかった。CD94/NKG2AはNK細胞やCD8<sup>+</sup>T細胞にも発現されるため、これらの細胞をそれぞれ、抗アシアロGM1抗体および抗CD8抗体投与によって除去しておいたマウスに20d5を前投与してからConAを投与しても、同様に肝障害の悪化が見られたため、NK細胞やCD8<sup>+</sup>T細胞の関与は小さいことがわかる。このことから、ConA肝炎モデルにおいては、NKG2Aの抑制シグナルがNKT細胞の活性化を抑制していることが示唆された。T細胞レセプターとしてVα14JaQを発現しCD1d依存性のNKT細胞はinvariant NKT (iNKT)細胞と呼ばれる。iNKT細胞は、CD1d/α-GalCer テトラマーによって同定され、多くはNK1.1を発現するが、NK1.1を発現しないものも含まれる。肝臓のiNKT細胞におけるNKG2Aの発現を調べてみると、NK1.1<sup>-</sup>のiNKT細胞のうちNKG2Aを発現するものは63.5%であるのに対し、NK1.1<sup>+</sup>のiNKT細胞のうちNKG2Aを発現するものは16.3%であった。つまり、iNKT細胞のうち、NK1.1<sup>+</sup>iNKT細胞がより多くNKG2Aを発現していることがわかる。ConA投与によって、これらのiNKT細胞およびNKG2Aの発現の変化を調べてみた。ConA投与4時間後の肝臓において、NK1.1<sup>+</sup>iNKT細胞の割合は著明に減少したのに対し、NK1.1<sup>-</sup>iNKT細胞の割合は相対的に増加した。また、ConA投与後に残っているNK1.1<sup>+</sup>iNKT細胞においてはNKG2Aの発現するものが正常マウスのそれと比べて増加していた。つまり、ConA投与後は、NKG2Aを発現するiNKT細胞が残存しやすいことがわかった。次に、20d5をあらかじめ

投与しておいたマウスにConAを投与すると、iNKT細胞の割合がコントロール抗体投与群に比べて減少し、特にNKG2Aをより多く発現するNK1.1<sup>-</sup>iNKT細胞の割合が著明に減少した。つまり、NKG2Aの抑制シグナルを阻害することによって、活性化に伴うiNKT細胞の消失がより顕著となる。アメリカのジャクソン研究所で飼育されているDBA/2Jというストレインのマウスにおいて、NK細胞上に本来発現されるはずのCD94/NKG2A抑制レセプターが発現されていないことが報告された。日本クレア株式会社のDBA/2JJclはもともとジャクソン研究所由来あるが、CD94/NKG2Aの発現が見られる。ジャクソン研究所のDBA/2JがCD94/NKG2Aを発現しない理由の詳細は不明であるが、1980年代にCD94の遺伝子が自然に欠損したことであると考えられている。このCD94/NKG2Aを発現しないジャクソン研究所のDBA/2Jを用いてConA肝炎の解析を行った。CD94/NKG2Aを発現しないDBA/2Jは、CD94/NKG2Aを発現するDBA/2JJclに比べて、ConAによって誘導される肝障害がより悪化していた。この結果は、NKG2A/C/Eに対するアンタゴニスト抗体(20d5)を用いた実験を裏付ける。

糖脂質であるα-galactosylceramide (α-GalCer)はNKT細胞を活性化する。筆者らはα-GalCerをマウスに投与することにより、急性肝障害が起こることを報告した。このα-GalCer誘導性肝炎は、ConA肝炎に比べて、肝障害の程度は小さいものの、NKT細胞を特異的に活性化するため、NKT細胞依存性の肝炎モデルとして解析されている。α-GalCer誘導性肝炎は、活性化したNKT細胞がFasLの発現を強め、肝細胞を傷害することにより起こり、TNF-αやINF-γも肝炎発症に関与している。このα-GalCer誘導性肝炎におけるNKG2Aの役割を解析した。CD94/NKG2Aを発現しないDBA/2Jにα-GalCerを投与すると、CD94/NKG2Aを正常に発現するDBA/2JJclに比べて血清ALT値の著しい上昇を伴う激しい肝炎が引き起こされ、60%が死亡した。この傾向は、抗NKG2A/C/E抗体(20d5)を前投与し、NKG2Aのシグナルを阻害した場合でも同様に見られた。すなわち、NKT細胞を特異的に活性化するα-GalCer誘導性肝炎においてもNKG2AがNKT細胞の活性化を抑制していることが示唆される。

以上によりNKG2AがNKT細胞の活性化および肝炎の発症を抑制することが明らかになったが、次に、NKT細胞におけるNKG2Aの発現を新生児期～成人期にわたって調べたところ、小児期の肝臓NKT細胞は、成人

期のものと比較し、NKG2を発現する割合が多いことが明らかになった。この結果は、肝障害抑制機能をもつNKG2Aレセプターの発現の差が、小児と成人における肝障害の程度の差の一因になることが示唆された。

#### 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7件)

1. Matsumoto H, Kawamura T, Kobayashi T, Kanda Y, Kawamura H, Abo T. Coincidence of autoantibody production with the activation of natural killer T cells in  $\alpha$ -galactosylceramide-mediated hepatic injury. *Immunology* 133, 21-28, 2011. 査読有
2. Sato K, Kawamura T, Abo T. "Senobi" stretch ameliorates asthma symptoms by restoring autonomic nervous system balance. *J Investig Med* 58, 968-970, 2010. 査読有
3. Sato K, Kawamura T, Yamagiwa S. The "Senobi" breathing exercise is recommended as first line treatment for obesity. *Biomed Res* 31, 259-262, 2010. 査読有
4. Kanda Y, Kawamura H, Matsumoto H, Kobayashi T, Kawamura T, Abo T. Identification and characterization of autoantibody-producing B220low B-1 cells appearing in malarial infection. *Cell Immunol* 263, 49-54, 2010. 査読有
5. Fujii Y, Kawamura H, Kawamura T, Kanda Y, Matsumoto H, Kobayashi T, Yamamoto T, Aoyama T, Abo T. Co-appearance of autoantibody-producing B220low B cells with NKT cells in the course of hepatic injury. *Cell Immunol* 260, 105-112, 2010. 査読有
6. Kawamura T, Takeda K, Kaneda H, Matsumoto H, Hayakawa Y, Raulet DH, Ikarashi Y, Kronenberg M, Yagita H, Kinoshita K, Abo T, Okumura K, Smyth MJ. NKG2A inhibits invariant NKT cell activation in hepatic injury. *J Immunol* 182, 250-258, 2009. 査読有
7. Tachikawa S, Kawamura T, Kawamura H, Kanda Y, Fujii Y, Matsumoto H, Abo T. Appearance of B220low autoantibody-producing B-1 cells at neonatal and older stages in mice. *Clin Exp Immunol* 153, 448-455, 2008. 査読有

[学会発表] (計2件)

1. 神田泰洋、川村宏樹、川村俊彦、安保徹. IFN- $\alpha$ による肝NK細胞の活性化. 第39回日本免疫学会総会・学術集会. 2009年12月3日. 大阪.
2. 松本浩晃、川村俊彦、川村宏樹、安保徹. 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.

[図書] (計5件)

1. 川村俊彦. 医学書院. NK細胞の機能(病態のしくみがわかる免疫学). 2010. 71-74.
2. 川村俊彦. 医学書院. 皮膚(病態のしくみがわかる免疫学). 2010. 71-74.
3. 川村俊彦. 医学書院. 神経疾患:重症筋無力症、多発性硬化症(病態のしくみがわかる免疫学). 2010. 185-186.
4. 川村俊彦. 医学書院. 妊娠(病態のしくみがわかる免疫学). 2010. 246-247.
5. 川村俊彦、安保徹. 丸善出版. 健康の維持:自然免疫および獲得免疫による健康管理(リッピンコットシリーズ イラストレイテッド免疫学). 2009. 179-208.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川村 俊彦 (KAWAMURA TOSHIHIKO)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号: 70301182

##### (2) 研究分担者

川村 宏樹 (KAWAMURA HIROKI)  
新潟大学・医歯学系・講師  
研究者番号: 20333495

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: