

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790882

研究課題名（和文）肝内免疫細胞を標的とした糖尿病、メタボリックシンドローム治療法の開発

研究課題名（英文）the hepatic immune therapy for metabolic disease

研究代表者

入江 潤一郎（IRIE JUNICHIRO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70306687

研究成果の概要（和文）：

非アルコール性脂肪肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)）は肥満と独立した糖尿病発症の一因と考えられているが、その詳細な機序は明らかではない。本研究において研究代表者は免疫細胞が NAFLD の発症に重要であり、特に獲得免疫が重要であることを明らかとした。獲得免疫は様々なサイトカインを介して代謝異常症の形成に関与していることが判明し、これらを阻害することが肝臓から生じる代謝異常症の新規治療となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) is recently recognized as not only the consequence but also the cause of metabolic disorders, but the precise mechanisms of NAFLD remain unclear. Here we have shown that the immune systems are essential for the development of NAFLD and the cytokines could be the therapeutic targets of NAFLD leading to the improvement of metabolic syndromes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、脂肪肝

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease (以下 NAFLD)）は肝障害を惹起する程度のアルコール摂取歴がなく、その他ウイルス性肝炎など原因の明らかなものを除外した、肝への脂肪沈着を認める肝疾患である。NAFLD は一般臨床では脂肪肝と称され、昨今メタボリックシンドロームの

一つの表現系であると考えられるようになっている。実際に BMI25 以上 30 未満の 1 度肥満者の 30%、BMI30 以上の 2 度肥満者の 70% に NAFLD を認めるとされており、肥満が NAFLD と密接に関係していることはほぼ間違いないと考えられる。NAFLD でメタボリックシンドロームを合併するものは 40%にも及ぶ。

NAFLDは健診受診者でも20-30%に認めるとされ、日本人に急増している病態である。現在まではNAFLDは肝臓に余剰な栄養が蓄積した状態“脂肪肝”であり、疾病とは捉えられてこなかった。ところが昨今このNAFLDが糖尿病発症の独立した誘因であるとする疫学調査が相次いでいる

(Diabetes56;984,2007,Diabetes care31;1138,31;1230,2008)。すなわち肝臓に脂肪蓄積が生じることこそが、その後の糖代謝異常に寄与する因子であることを欧米人と日本人でともに明らかにしており、さらに糖尿病の改善は内臓脂肪よりも肝臓の脂肪蓄積量の減少とよく相関することも明らかになっている(Diabetes54;603,2005)。

一方でNAFLDの成因については必ずしも明らかではない。肥満を代表とする余剰なエネルギーが肝臓に貯留することが主因であるが、肥満でも脂肪肝を呈さない症例も経験される。また逆に非肥満例でも脂肪肝のみを認める症例もあり、肝脂肪蓄積は全身の代謝状態とは独立して制御されている可能性が想定された。

## 2. 研究の目的

研究代表者はマウス新規炎症性肝臓疾患の治療法を検討する中で、Tリンパ球抗体(抗T細胞受容体抗体(anti-TCR antibody, 以下aTCRと略す))の投与でマウスにNAFLDを誘導しうることを見出した(Irie Jら, J Exp Med;203:1209,2006)。脂肪肝は過剰なエネルギー摂取にて生じるとする現在の概念と全く異なるものである。現在までにTリンパ球抗体の投与が、肝内免疫細胞の活性化を通じてNAFLDを引き起こすということを明らかとした(2007年度~2008年度若手研究B)。さらに本抗体の投与で耐糖能障害が発症するという知見を得た。肥満と独立して免疫刺激

で肝脂肪蓄積および糖尿病が発症するという極めて重要な新知見であり、先述の肝脂肪蓄積と糖尿病発症が関連するという疫学調査の分子生物学的機序の解明につながる可能性があるものである。そこで本研究ではTリンパ球を介して発症する脂肪肝と耐糖能障害の機序の解明、およびその治療応用を目的とした。

## 3. 研究の方法

雄C57BL/6マウスに抗T細胞受容体抗体を静脈内に投与し3、6、12、24、48、72時間後に肝臓を摘出し肝臓内免疫細胞を抽出する。併せて脾臓、末梢リンパ節細胞も抽出しフローサイトメーターでCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NKT細胞、B細胞の数、割合、活性化状態を検討する。また同時に血清を採取し、催炎症性サイトカイン

(TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6)の血中濃度の変化をELISA法にて測定する。本検討は各時間で抗体投与群、対照群5匹ずつ以上検討する。

次に雄C57BL/6マウスに免疫担当細胞抗体(抗NK1.1抗体、抗CD4抗体、抗TCR抗体)を500 $\mu$ g事前に2回投与しNK細胞、NKT細胞、CD4陽性細胞、T細胞を除去しておく。前処置を施した本マウスに抗T細胞受容体抗体を投与し、NAFLDの発症が予防可能である否かを検討する

続いて上記の検討で重要と考えられた細胞群を脾細胞より磁気分離システムを用いて抽出し、リンパ球を有さないscidマウスに移植した後、そのマウスに抗体を投与しNAFLD発症への影響を検討する。

さらに抗サイトカイン抗体(抗TNF $\alpha$ 抗体、抗IL-1 $\beta$ 抗体、抗IL-6抗体)を500 $\mu$ g事前に2回投与しサイトカイン作用を阻害した上で、抗T細胞受容体抗体を投与しNAFLDの発症が予防可能であるか否かを検討する。

また抗体投与時に同時に肝臓の一部を分離し脂質と mRNA を抽出する。前者より肝臓内中性脂肪、コレステロール量を測定し、後者は cDNA を作成し脂肪合成、糖代謝にかかわる遺伝子の発現量を測定する。

次に抗体の投与によって NAFLD が生じた状況の下で耐糖能を評価する。すなわち C57BL/6 マウスに抗 T 細胞受容体抗体を投与し 3 日後に、腹腔内に体重 1g あたり 2mg のグルコースを投与し 15 分おきに血糖値を測定する。

#### 4 . 研究成果

まず病態の経時的変化を明らかにするため、雄 C57BL/6 マウスに抗リンパ球抗体を投与し 3、6、12、24、48、72 時間後に肝臓を摘出し肝臓内脂質を抽出し解析を行った。その結果 4 - 8 時間後より肝内脂肪蓄積が生じ始め、72 時間後まで持続することが判明した。

次に脾臓、末梢リンパ節細胞を抽出しフローサイトメーターで細胞数、T 細胞の活性化状態を検討したところ、6 時間後より T 細胞の活性化が認められていた。また血清中の炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ 、IL-6) も同様に増加を認めた。

本現象に重要な細胞分画を除去抗体を用いて検討した。抗 NK1.1 抗体、抗 CD4 抗体、抗 TCR 抗体を用いて検討したところ、NK マーカー陽性の細胞群が本現象の発症に必須であるとの結果を得た。

引き続き、特定の細胞群を脾細胞よりソーティングシステムを用いて抽出し、リンパ球を有さない scid マウスに移植した後、そのマウスに抗体を投与し NAFLD 発症への影響を検討した。除去抗体を用いた検討に合致するように、NK マーカー陽性の細胞を移入すると NAFLD の発症が認められた。したがって本病態の発症に NKT 細胞が重要と考えられた。

また本現象に必須の免疫担当細胞分画は肝臓特異的に存在するわけではなく、全身に存在する免疫担当細胞が関与していることが明らかとなった。

本細胞分画が重要であることを確認すべく、肝臓に多く認められる NKT 細胞を刺激するガラクトシルセラミドを投与して本病態への影響を検討した。その結果、本物質の投与によって病勢が悪化することが判明した。

また脂肪蓄積を生じた肝臓の遺伝子発現を検討したところ TNF $\alpha$ 、IL-6 等の炎症性サイトカインが増加していた。

これまでの結果に基づき、病態形成に重要と考えられた炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ 、IL-6 等) に対する中和抗体を事前に投与し、その後に抗体の投与によってマウスに肝脂肪蓄積を誘導し、病勢抑制の程度を評価した。TNF- $\alpha$  に対する中和抗体を用いた検討で、脂肪肝の形成が抑制される傾向が確認された。また同様に IL-6 に対する中和抗体を用いた検討では脂肪肝の形成の抑制が認められなかった。すなわち病態の形成には TNF- $\alpha$  が重要と考えられ、これは現在までの肝脂肪蓄積の報告に合致するものであったが、病態形成にリンパ球も関与するという新規概念が導かれた。

本病態において蓄積した肝脂肪の組成を検討したところ、中性脂肪とコレステロールともに増加を認めた。また脂肪合成にかかわる ACC や脂肪酸伸長に関わる酵素の遺伝子発現が亢進していた。

最後に抗体の投与によって脂肪肝が生じた状況の下で耐糖能を評価した。C57BL/6 マウスに抗リンパ球抗体を投与後に、腹腔内に体重 1g あたり 2mg のグルコースを投与し 15 分おきに血糖値を測定した。その結果抗体投与群では耐糖能の悪化を認めた。また血清イ

ンスリン値を測定したところインスリン抵抗性を呈していた。すなわちリンパ球抗体の投与でメタボリックシンドローム、糖尿病が誘導されたと考えられた。

以上の結果より、肝脂肪蓄積の形成には旧来考えられていた食細胞を中心とする免疫機構のみならず獲得免疫も重要な役割を担っていることが示された。

## 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 1 件 )

( 1 ) Hirotsune Tagawa, Junichiro Irie, Arata Itoh, Yukie Soeda, Satoru Yamada, Hiroshi Itoh. The Role of Hepatic T Lymphocytes in the Induction of Fatty Liver and Diabetes. Clinical and Experimental Hypertension 33(1);15, 2011, 査読あり

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

( 1 ) 伊藤新, 入江潤一郎, 田川裕恒, 加藤麻里, 添田幸恵, 山田悟, 伊藤裕. 肝脂肪蓄積・糖脂質代謝異常を引き起こす肝内 T リンパ球の検討. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011 年 5 月 21 日, 札幌

( 2 ) 伊藤新, 入江潤一郎, 田川裕恒, 添田幸恵, 伊藤裕. 肝内免疫担当細胞の制御による肝脂肪化と糖脂質代謝の調節. 第 53 回日本糖尿病学会, 2010 年 5 月 29 日, 岡山

( 3 ) 田川裕恒, 入江潤一郎, 伊藤新, 添田幸恵, 山田悟, 伊藤裕. T リンパ球の糖脂質代謝・肝脂肪蓄積への影響の検討. 第 45 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2009 年 9 月 5 日, 東京

( 4 ) 田川裕恒, 入江潤一郎, 伊藤新, 添田

幸恵, 山田悟, 伊藤裕. T リンパ球の糖脂質代謝への影響の検討. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009 年 5 月 23 日, 大阪

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

入江 潤一郎 ( IRIE JUNICHIRO )

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 70306687