

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590721

研究課題名（和文） 肝臓に存在する自然免疫系リンパ球の肝障害における関与

研究課題名（英文） Role of hepatic innate lymphocytes at the liver injury

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（和文）：肝臓における自然リンパ球と肝障害におけるリンパ球の機能について解析した。肝 NK 細胞の解析では、他の臓器由来の NK 細胞に比べ、肝 NK 細胞特異的な活性化を見出し、肝臓での独特な免疫応答を明らかにした。また、 α -galactocylceramide 誘導性肝炎において、NKT 細胞が B-1 細胞活性化を促進し、自己抗体産生による自己応答による病態形成を明らかにした。肝肉芽腫形成においては NKT 細胞が抑制的に調節することを見出し、病態形成における肝リンパ球の機能について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the activation of the natural lymphocytes and the function of the hepatic lymphocyte on hepatitis. We found that hepatic NK cells activated strongly than other NK cells. This finding indicated hepatic natural lymphocytes had unique immunoresponses. In α -galactocylceramide-mediated hepatic injury, NKT cell promoted B-1 cell activation and autoantibody production. NKT cells also suppressed zymosan A-mediated granuloma formation in the liver.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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、自己免疫性肝炎、自然リンパ球、肝障害、NKT 細胞

1. 研究開始当初の背景

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。他の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、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、肝移植時の拒絶反応・免疫寛容など、多くの免疫現象に関与している。肝臓に多く存在するリンパ球としては、NKT 細胞、NK 細胞、胸腺外分化

T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞などが挙げられ、これらは、肝臓における免疫反応の鍵を握っている。そのため、これらの自然リンパ球の解析を進めることにより、肝臓が担う種々の免疫現象の解明が期待できる。

特に代表者らは、自己免疫性肝炎や感染による肝臓疾患におけるリンパ球の関与について研究を行っている。ヒトの病態に類似するマウスモデルにおける自己免疫性肝炎では、NKT 細胞が活性化し、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、不明の点も多い。また、肝臓の感染モデルとしては、真菌由来成分の投与により、肝肉芽腫形成における NKT 細胞の関与が示唆されている。本研究では、これらの病態における肝リンパ球の解析を進め、肝臓における免疫反応を明らかにすることにより、肝リンパ球による急性および慢性肝障害などの病態形成メカニズムを解明し、免疫系を介した病態調節や治療法の確立に貢献することが考えられる。

2. 研究の目的

肝臓に存在する自然リンパ球の解析により、肝疾患発症メカニズムを解明することを目的とし、検討を行った。まず、肝臓は独特の免疫環境を有することから、肝臓の自然リンパ球の機能解析を行い、肝臓特異的なリンパ球の活性化メカニズムを検討した。そして、肝疾患での免疫メカニズムを解明するために、肝障害モデルマウス等を用い、肝疾患発症時のリンパ球の詳細について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 肝 NK 細胞機能の検討

肝臓の自然リンパ球の機能解析として NK 細胞の機能について解析を行った。NK 細胞の活性化を促進するため、IFN- α の投与を行い、肝臓と脾臓の NK 細胞について比較を行った。

(2) α -GalCer 誘導性肝炎における肝リンパ球の検討

肝臓に豊富に存在する NKT 細胞は、MHC クラス I 様分子である CD1d を介して α -galactosylceramide(α -GalCer) を認識し、特異的に活性化されることが知られている。この α -GalCer による活性化により、NKT 細胞は自己応答性を示し、自己免疫性の肝障害が誘導される。本検討では、この肝炎モデルマウスを作製し、肝臓内リンパ球や自己抗体と病態形成の関係について解析した。

(3) 肝肉芽腫形成に対する NKT 細胞の検討

Zymosan A は酵母型真菌の細胞壁成分で、 β -グルカンを主成分とする不溶性の粒子である。

Zymosan A の投与により、肝臓や肺に肉芽腫が形成されることが知られている。本検討では、NKT 細胞が欠損する CD1d ノックアウト(KO)マウスを用いて、Zymosan A 誘導性の肉芽腫病変における NKT 細胞の役割や NKT 細胞に活性化される細胞、そして産生されるサイトカインについて解析し、病態形

成や真菌排除について検討した。

4. 研究成果

(1) 肝 NK 細胞機能の検討

① IFN- α による肝 NK 細胞の細胞傷害活性

肝 NK 細胞の特異的な活性化機構を解析するために、IFN- α 投与による NK 細胞の細胞傷害活性について検討した。NK 細胞特異的な細胞傷害作用を有する YAC-1 腫瘍細胞に対する傷害活性を肝臓由来および脾臓由来の NK 細胞で比較した結果、肝 NK 細胞の細胞傷害活性の有意な増強が確認された。一方、脾 NK 細胞には有意な差は確認されなかった。このことから、肝 NK 細胞の独特な活性化機構の存在が示唆された。

② 肝 NK 細胞特異的な性状の検討

肝 NK 細胞が特に活性化されやすい要因について解析するため、IFN- α 投与時の NK 細胞の性状の違いについて検討した。NK 細胞表面に発現する、活性化レセプター、および抑制レセプター、共刺激レセプターの発現を解析したところ、共刺激レセプターである 2B4 の発現が肝 NK 細胞で特に増強が見られた。無刺激時の IFN- α レセプターについてもリアルタイム PCR にて解析したところ、肝 NK 細胞で IFN- α レセプターの発現が他の NK 細胞より多く発現していることが分かった (図 1)。このことより、肝 NK 細胞は他臓器由来の NK 細胞に比べ、レセプターの発現が元々高いことから、特に活性化されることが示唆された。

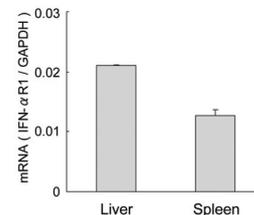


図 1
NK 細胞における
IFN- α レセプター
発現量

③ NK 細胞によるサイトカイン産生の検討

α -GalCer は NKT 細胞を特異的に活性化するが、 α -GalCer 存在下では NK 細胞は早期に IFN- γ を産生する。このことから、IFN- α 投与後に α -GalCer で刺激したときの NK 細胞の IFN- γ 産生能について検討した。その結果、肝 NK 細胞による IFN- γ 産生が脾臓由来の NK 細胞に比べ特に増強することが分かった (図 2)。

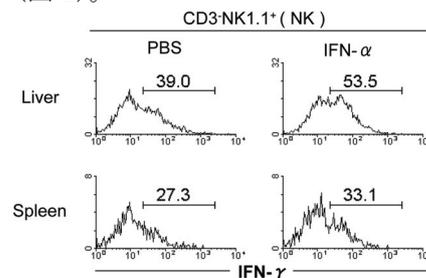


図 2 NK 細胞の IFN- γ 産生

この結果から、肝 NK 細胞が NKT 細胞の作用による経路によっても増強されていることが示され、肝臓の免疫細胞の環境が肝臓独特の NK 細胞活性化に寄与することが示唆された。

①～③により、肝臓特有の免疫細胞の活性化が独特な肝臓免疫応答に関与していることが示唆された。

(2) α -GalCer 誘導性肝炎における肝リンパ球の検討

① α -GalCer 肝炎による自己抗体の産生

マウスの肝リンパ球の増加や肝障害は α -GalCer 投与後 3 日目に増大していた。そして、HEp-2 蛍光抗体法や二本鎖 DNA に対する自己抗体価を測定したところ、自己抗体は 14 日目をピークとして 3 日目から出現した。そのとき増加した自己抗体は IgG タイプであった。

② 自己抗体産生細胞の解析

自己抗体が血清中に増加する α -GalCer 投与後 3 日目では、NKT 細胞の活性化とともに B220^{low} 細胞が増加していることが分かった。このような B220^{low} を示す B-1 細胞は腹腔内にも存在しているが、 α -GalCer 投与で腹腔内でも B220^{low} 細胞の割合が増加することが示された。この肝 B-1 細胞と腹腔内 B-1 細胞に着目し、LPS 刺激下で培養したところ、培養上清中に自己抗体が検出され、肝リンパ球が自己抗体産生能を有することが確認された (図 3)。

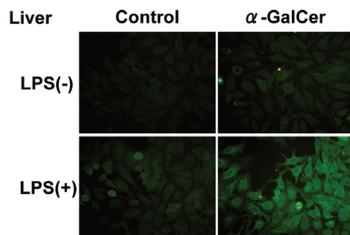


図 3 肝リンパ球培養上清中の自己抗体

これらの結果より、 α -GalCer による肝障害は他の急性自己免疫性肝炎と同様に、NKT 細胞が自己応答性を示すとともに、自己抗体産生性 B-1 細胞活性化による自己応答に深く関与していることが明らかになった。

(3) 肝肉芽腫形成に対する NKT 細胞の検討

① CD1d KO マウスにおける肝肉芽腫形成

肝肉芽腫形成に対する NKT 細胞の影響を検討するため、NKT 細胞が欠損する CD1d KO マウスに zymosan A を投与して野生型マウスと比較した。その結果、野生型マウスに比べ、CD1d KO マウスの肝肉芽腫数が有意に増加した。このことから、何らかの作用で

NKT 細胞が肉芽腫形成に抑制的に作用することが示唆された (図 4)。

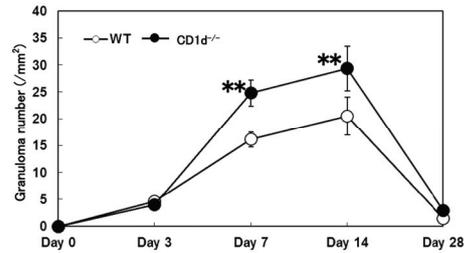


図 4 肉芽腫形成数の変化

② 肉芽腫形成および抑制に関与する肝白血球の解析

zymosan A 投与による肝白血球数について解析を行ったところ、投与により全白血球数が増加した。野生型マウスと CD1d KO マウスの比較すると、CD1d KO マウスではマクロファージが有意に増加していることから、NKT 細胞がマクロファージを抑制することにより、肉芽腫抑制に関与していることが示唆された。また、zymosan A は TLR(Toll-like receptor)2 のリガンドであることから、zymosan A 投与後の NKT 細胞およびマクロファージ表面上の TLR2 発現量について検討した。その結果、マクロファージでの発現が増強されたのみならず、NKT 細胞でも発現が増強された。このことから、NKT 細胞も直接的に zymosan A を認識することでマクロファージ抑制に関与することが示唆された。

③ 肉芽腫形成に関与するサイトカインの測定

IFN- γ や TNF- α はマクロファージの類上皮細胞への分化や肉芽腫形成の作用を促進するサイトカインである。このため、これらのサイトカインについての検討を行った。zymosan A 投与後の血清 TNF- α は野生型マウスと CD1d KO マウスで有意差はなかったが、一方、血清 IFN- γ は CD1d KO マウスで増加していた。肝白血球の培養でも同様の結果が得られた (図 5)。このことから、NKT 細胞が IFN- γ 産生を抑制し、肉芽腫形成を抑制的に制御していることが示唆された。また、IFN- γ KO マウスへの zymosan A 投与による肉芽腫形成の解析により、IFN- γ が肉芽腫形成を抑制することを確認した。

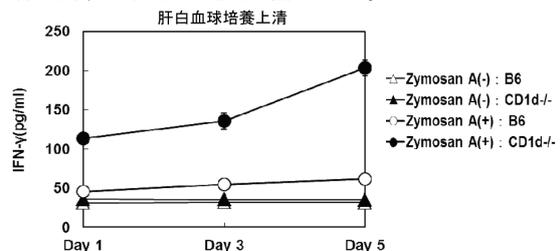


図 5 肝白血球培養上清中の IFN- γ

④肉芽腫形成抑制機構の解析

NKT 細胞の存在下で IFN- γ 産生が抑制される機構を調べるため、抑制性サイトカインである IL-10 の産生について検討した。血清中の IL-10 は CD1d KO より野生型マウスで有意に増加していた。さらに、肝白血球の IL-10 産生を PCR およびリアルタイム PCR により解析すると、同様に野生型マウスの肝白血球で有意に発現が見られた (図 6)。このことから、IL-10 により IFN- γ の産生が抑制されることが示唆された。

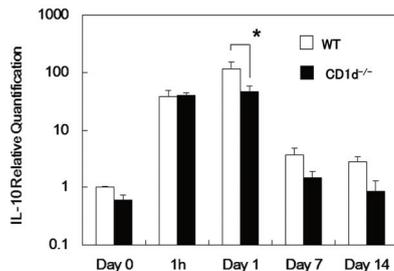


図 6 肝白血球の IL-10 mRNA 発現量

以上の結果より、NKT 細胞が直接あるいは間接的に、IL-10 産生に関与することで、IFN- γ 産生を抑制し、肉芽腫の形成を抑制的に制御することが分かった。また、真菌感染において NKT 細胞が肉芽腫促進ではなく抑制的に制御していることから、NKT 細胞は感染防御を促進するというより、肉芽腫過形成の調節に関与していることが明らかになった。

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 8 件)

- ① Abo T, Tomiyama C, Watanabe H. Biology of autoreactive extrathymic T cells and B-1 cells of the innate immune system. *Immunol Res*, 52, 224-230, 2012, 査読有, DOI:10.1007/s12026-012-8324-4.
- ② Kobayashi T, Kawamura H, Kanda Y, Matsumoto H, Saito S, Takeda K, Kawamura T, Abo T. Natural killer T cells suppress zymosan A-mediated granuloma formation in the liver by modulating interferon- γ and interleukin-10. *Immunology*, 136, 86-95, 2012, 査読有, DOI:10.1111/j.1365-2567.2012.03562.x.
- ③ 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

α -galactosylceramide-mediated hepatic injury. *Immunology*, 133, 21-28, 2011, 査読有, DOI:10.1111/j.1365-2567.2011.03405.x.

- ④ Kanda Y, Kawamura H, Matsumoto H, Kobayashi T, Kawamura T, Abo T. Identification and characterization of autoantibody-producing B220^{low} B (B-1) cells appearing in malarial infection. *Cell Immunol*, 263, 49-54, 2010, 査読有, DOI:10.1016/j.cellimm.2010.02.015.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Kobayashi T, Abo T, NKT cells suppress zymosan A-mediated granuloma formation in the liver by modulating IFN γ and IL-10, 日本免疫学会、2012年12月7日、神戸
- ② Kawamura H, Abo T, Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration, 日本免疫学会、2012年12月5日、神戸
- ③ Kanda Y, Abo T, Identification and characterization of autoantibody-producing B220^{low} cells appearing in malaria infection, 日本免疫学会、2011年11月27日、千葉
- ④ Matsumoto H, Abo T, Coincidence of autoantibody production with the activation of natural killer T cells in alpha-galactosylceramide-mediated hepatic injury, 日本免疫学会、2011年11月27日、千葉

[図書] (計 2 件)

- ① 安保徹、三和書籍、安保徹の免疫学講義、2010、245
- ② 安保徹、他、医学書院、病態のしくみがわかる免疫学、2010、284

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