

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：32612
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590744
 研究課題名(和文) 肝臓-腸管自然免疫細胞サーキュラーの破綻による自己免疫性肝臓炎症の本体
 研究課題名(英文) Pathogenesis of autoimmune hepatic injury through the migration of immunocompetent cells into the liver
 研究代表者
 中本 伸宏 (NAKAMOTO NOBUHIRO)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：40383749

研究成果の概要(和文)：

マウス Concanavalin A 惹起急性肝障害においてケモカイン受容体の一つである CCR9 陽性マクロファージが肝臓内に遊走し、IFN- γ 産生 Th1 細胞や NKT 細胞の誘導を介して病態形成に重要な役割を果たす。さらに急性肝炎患者末梢血を用いた検討においても TNF- α 産生能を有する CCR9 陽性 CD14+CD16+単核球が増加していた。今後のさらなる検討が必要であるが CCR9/CCL25 経路は、劇症肝炎を含めた急性肝炎の選択的治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Liver-infiltrating CCR9⁺ macrophages play a key role in promoting proliferation of CD4⁺ T cells and generation of IFN- γ -producing Th1 cells as well as NKT cell activation in Concanavalin A-induced acute hepatitis. In terms of the clinical relevance, not only the efficacy of anti-CCL25 mAb for the prevention of Con A-induced hepatitis, but also the presence of human counterpart cells of murine CCR9⁺ macrophages, CCR9⁺CD14⁺CD16^{high} cells, in human peripheral blood of acute hepatitis patients clearly indicate that blockade of CCR9-CCL25 pathway would provide a feasible strategy for treating acute hepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染における T 細胞の機能不全(免疫寛容)の研究に従事し、その原因として制御性 T 細胞 (Ebinuma H, Nakamoto N et. al. J Virol

2008)、IL-10 産生 T 細胞 (Kaplan DE, Nakamoto N et. al. J Hepatol 2008)、肝内浸潤 HCV 特異的 CD8 T 細胞における抑制性補助シグナルを介した exhaustion (Nakamoto N et. al. Gastroenterology 2008. Nakamoto et.

al. PLoS Pathog 2009)の関与を報告してきた。HCV 特異的 CD8 T 細胞は末梢血と比較し特に肝臓内において深い機能不全に陥っており、肝臓内抗原提示細胞側にも免疫寛容を司る根幹的な機序が存在し各病態に関与しているのではないかと考え本研究に着手した。肝臓内には、樹状細胞、macrophage、類洞内皮細胞、肝星細胞をはじめとする様々な抗原提示能力を有する免疫細胞が存在し、免疫寛容・応答時の役割について様々な報告が散見されるが、その詳細な機序に関しては一定の見解が得られていない(Crispe IN. Annu Rev Immunol, 2009)。近年、抑制性樹状細胞の一つとしてケモカイン受容体である CCR9 陽性 Plasmacytoid Dendritic cell (pDC)が腸管内に存在し制御性 T 細胞の誘導を介して腸管免疫寛容に寄与していることが報告された(Hadeiba H et.al. Nat Immunol 2008)。そこで我々は腸管へのホーミング受容体である CCR9 に着目し、肝臓-腸管を循環する免疫ネットワークが存在し、免疫寛容・破綻に寄与しているという仮説のもと本プロジェクトを立案した。

2. 研究の目的

本研究において以下の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) CCR9 を介した肝臓-腸管循環自然免疫細胞による免疫寛容破綻機序の解明
- (2) CCR9 欠損マウスを用いた、Con A 惹起急性肝障害発症に関与する責任細胞の同定
- (3) マウスの検討で同定された病因性 CCR9 陽性マクロファージのヒト急性肝炎病態への関与の検討
- (4) 肝臓免疫寛容における腸内細菌の果たす役割の解明

3. 研究の方法

(1) 正常マウスにおける基礎的検討

本研究における基礎的な検討として、無処置

C57BL/6 マウスの肝臓、脾臓より比重遠沈法により単核球を分離し、細胞表面染色後フローサイトメトリー (以下 FCM)にて解析する。既知の報告では CD11b-11c+分画を pDC、CD11b+CD11c+分画を mDC、CD11b+CD11c-分画を macrophage と定義するものが多いが、各細胞群の特異的マーカーとされる B-220, CD317 (PDCA), CD8 α , F4/80, Ly-6G などとの多重染色により慎重な検討を行う。pDC, mDC, macrophage 各分画を FCM にて sorting 後、a) サイトスピン法による形態解析、b) マイクロアレイ法による遺伝子発現の検討、c) CCR9 を含むケモカイン受容体の発現、d) 補助刺激分子の発現、e) 細胞内染色、ELISA 法による Th1/Th2/Th17 サイトカインの産生能、f) T 細胞との共培養による制御性 T 細胞の誘導能等の機能解析を詳細かつ網羅的に行う。

(2) 自己免疫応答性急性肝障害モデル (Con A 投与)マウスにおける検討

次に抗原提示細胞と NKT 細胞、T 細胞の相互作用により急性肝障害が惹起される Con A 投与急性肝障害モデルマウスを用いて、経時的な自然免疫担当細胞の数、分布、機能変化を(1)と同様に肝臓、脾臓間で比較検討する。本モデルの肝障害発症における macrophage の関与については、macrophage を特異的に除去した塩化ガドリニウム前処置マウスにおいて Con A 惹起肝障害が軽減することを確認している。本研究パートではさらに正常および Con A 投与マウスにおける CCR9 陰性 pDC, CCR9 陽性 pDC, CCR9 陰性 macrophage, CCR9 陽性 macrophage の抗原提示機能の違いを追究する。

(3) CCR9 欠損マウスを用いた Con A 惹起急性肝障害病態形成における責任細胞の同定

徳島大学疾患ゲノムセンターより供与頂いた CCR9 欠損マウスを用いて、Con A 投与急性肝障害における CCR9 陽性自然免疫担当細胞の役割を解明する。具体的には野生型マウス、CCR9 欠損マウス、MCP-1 欠損マウスに Con A 急性肝障害を惹起し、血清学的、組織学的に

肝障害の程度を比較する。さらに病態形成に関わる責任細胞を同定する目的で、CCR9 陰性 pDC, CCR9 陽性 pDC, CCR9 陰性 macrophage, CCR9 陽性 macrophage を各々 CCR9 欠損マウスに前移入した後に Con A を投与し、肝障害の再現によりその責任細胞を明らかにする。また α -Galactosylceramide (α -Galcer) や四塩化炭素など Con A 以外のマウスの急性肝障害モデルにおける本細胞の病態への関与を検証する。

(4) CCL25 中和抗体による Con A 惹起急性肝障害抑制効果の検討

今後の臨床応用を目指して Con A 投与直前に抗 CCR9 抗体/抗 CCL25 抗体を投与し、肝障害抑制効果を血清学的、組織学的側面から検討する。さらに CCL25 添加による、各免疫担当細胞の Th1/Th2 サイトカイン産生能、遊走能を *in vitro* で検討する。

(5) ヒト末梢血を用いた検討

上記のマウスで得られた結果のヒト急性肝障害病態における関与を検討するために以下の検討を行う。インフォームドコンセントを得た健常人、急性肝炎患者、慢性肝炎患者より末梢血を分離し、CD14+CD16+炎症性単球の頻度、表現型、サイトカイン産生能を比較検討する。

(6) 急性肝障害病態形成における腸内細菌の関与

肝臓は常に消化管由来の腸内細菌に暴露されている。広く提唱されている衛生仮説に立脚し、無菌状態では腸管から肝臓への日常的な抗原暴露が存在しないために結果として免疫寛容が破綻していると予想した。具体的な研究計画として生来無菌環境下で飼育された Germ-free マウスを用いて、Con A 投与後の肝障害の程度、抗原提示細胞の数、分布、CCR9 を含めたケモカイン受容体や補助シグナル等の表現型、サイトカイン産生能を野生型 SPF マウスと比較検討する。

4. 研究成果

(1) 野生型無処置マウスの検討では、肝臓内には脾臓と比較し pDC が有意に多く存在している一方 cDC, macrophage の頻度は両臓器間で差を認めなかった。さらに多重染色による各細胞群の phenotype の検討の結果、pDC は既知の報告どおり B220, PDCA-1, CCR9 を高発現し、CD80, CD86 などの補助刺激分子を発現しない免疫寛容な細胞群であった。これらの結果より肝臓内 pDC は免疫寛容に関与している可能性が示唆された。

(2) 次に Con A 惹起 T 細胞応答性急性肝障害モデルにおける免疫担当細胞の動態を検討した。Con A 投与により肝臓内の pDC 分画は減少し、逆にマクロファージが著増することを確認した。一方脾臓では Con A 投与により両細胞数の変化は認められなかった。さらに興味深いことに肝臓内の pDC 分画では CCR9 の発現は減少し、逆に macrophage 分画で CCR9 陽性細胞数が著明に増加した。各細胞の機能解析を詳細に検討したところ CCR9 陽性 pDC は CD80 陰性、CD86 陰性、TNF- α 産生に乏しい免疫抑制性の細胞集団であるのに対し、Con A 投与後誘導される CCR9 陽性 macrophage は CD80 陽性、CD86 陽性 TNF- α 産生能を有する病因性のマクロファージであった。重要なことに CCR9 のリガンドである CCL25 の肝組織内での発現は CCR9 同様に Con A 投与 24 時間をピークに増加した。さらに RT-PCR の検討で CCR9 陽性 macrophage は TLR4, TLR6, TNF- α の発現を有する一方 CCR9 陽性 pDC は TLR7, TLR9, TGF- β および IL-10 の発現を有していた。OVA transgenic mice より分離した naive CD4 T 細胞との共培養の結果、CCR9 陽性 macrophage は高い抗原提示能、Th1 細胞への分化能を有する一方 CCR9 陽性 pDC は制御性 T 細胞への分化能を有していた。以上の結果より、Con A 投与後肝臓内に増加する CCR9 陽性

macrophage が Th1 細胞の誘導を介して急性肝障害病態形成に深く関与している可能性が示唆された。

(3)次に CCR9 欠損マウスを用いた検討を行った。予想どおり CCR9 欠損マウスにおいて Con A 投与後認められるマクロファージの肝臓への集積が野生型マウスと比較し有意に抑制された。一方マクロファージの重要な遊走因子である MCP-1 欠損マウスでは Con A 投与後野生型同様に CCR9 陽性 macrophage が肝臓内に集積しており CCR9/CCL25 axis が急性肝障害病態形成に重要であることが示唆された。その結果組織学的、血清学的いずれにおいても CCR9 欠損マウスにおいて肝障害は劇的に軽減した。さらに CCR9 欠損マウスに Con A 投与直前に CCR9 陰性 pDC, CCR9 陽性 pDC, CCR9 陰性 macrophage, CCR9 陽性 macrophage を各々経静脈的に移入したところ、CCR9 陽性 macrophage を移入した群でのみ肝障害が部分的に再現された。以上の検討より、マウス Con A 惹起急性肝障害モデルにおいて CCR9 陽性 macrophage が病態形成に重要な役割を果たすことが証明された。さらに他のマウス急性肝障害モデルである a-GalCer、四塩化炭素投与マウスにおいても同様の現象が確認され、CCR9 陽性 macrophage は様々な急性肝障害の病態形成に寄与している可能性が示唆された。

(4)次に今後の臨床応用を目指して CCL25 中和抗体による Con A 惹起急性肝障害の抑制効果を検討した。CCL25 中和抗体の投与により、コントロール抗体と比較し、有意に肝臓内へのマクロファージの集積が抑制され、肝障害の程度も血清学的、組織学的何れにおいても軽微だった。さらに興味深いことに、CCL25 中和抗体の投与により CCR9 陽性 macrophage の TNF- α 産生も有意に抑制された。以上の結果より肝臓炎症状態において CCL25 は CCR9

陽性 macrophage の遊走のみならず活性化にも関与していることが示唆された。

(5)ヒト末梢血を用いた検討の結果、急性肝炎患者群において健常群、慢性肝炎患者群と比較して有意に末梢血中 CD14+CD16+炎症性単球の数、頻度、および CCR9 発現が上昇していた。重要なことにマウス同様 CCR9 陽性 CD14+CD16+単球は TNF- α 産生能を有しており、急性肝炎の病態に関与している可能性が示唆された。

(6)急性肝障害の病態形成における腸内細菌の関与については今回の研究期間内に結論を導くことはできず、今後の研究課題にする。現在までの検討において無菌マウスにおいて肝臓内のマクロファージ浸潤、および肝障害が軽減することを確認しており、今後その免疫学的機序の解明、およびプロバイオティクスによる病態の制御を目指したいと考えている。

以上の結果より、我々は炎症時に CCL25 の発現が上昇し、その結果 CCR9 陽性 macrophage が肝臓内に集積し、本細胞の TNF- α 産生を介した Th1 細胞の誘導により急性肝障害が惹起されることを世界に先駆けて発表した (図 1)。今後本細胞の急性肝障害以外の肝硬変などの病態への関与、および CCR9/CCL25 経路をターゲットとした急性肝炎患者への臨床応用を目指したいと考えている。

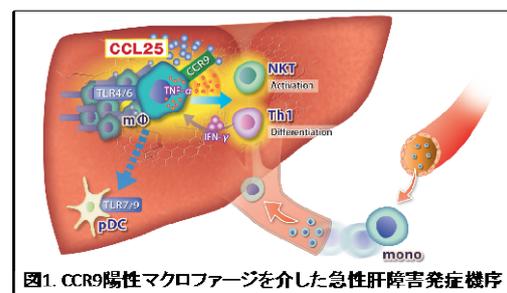


図1. CCR9陽性マクロファージを介した急性肝障害発症機序

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 2 件)

1. Nakamoto N, Ebinuma H, Kanai T, Chu PS, Ono Y, Mikami Y, Ojiro K, Lipp M, Love PE, Saito H, Hibi T. CCR9+ macrophages are required for acute liver inflammation in mouse models of hepatitis. *Gastroenterology* (査読有)142: 366-376, 2012
2. Mizuno S, Kanai T, Mikami Y, Sujino T, Ono Y, Hayashi A, Handa T, Matsumoto A, Nakamoto N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Hibi T. CCR9(+) plasmacytoid dendritic cells in the small intestine suppress development of intestinal inflammation in mice. *Immunol Lett* (査読有) 146: 64-69, 2012

[学会発表] (計 3 件)

1. Nobuhiro Nakamoto et. al,
Newly identified TNF- α -producing CCR9+ macrophages induce acute liver inflammation in mice
62nd Annual Meeting of the AASLD
2011. 11. 8、San Francisco, USA,
2. 中本伸宏他, 自己免疫応答性急性肝障害の病態形成における CCR9 陽性マクロファージの役割
第 97 回日本消化器病学会総会
2011. 5. 14、東京
3. 中本伸宏他、マウス Plasmacytoid DC の肝臓免疫寛容への関与
第 38 回日本肝臓学会東部会
2010. 12. 3、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

中本 伸宏 (NAKAMOTO NOBUHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40383749

(2)研究分担者

金井 隆典 (KANAI TAKANORI)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：24390190

(3)連携研究者

該当なし