

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590973

研究課題名(和文) 新規の致死性自己免疫性肝炎モデルを用いた肝炎劇症化に関わる腸内細菌免疫応答の解析

研究課題名(英文) Immune mechanisms involved in the development of fatal autoimmune hepatitis in mice

研究代表者

渡部 則彦 (Watanabe, Norihiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：50419446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：劇症肝炎の多くは、肝免疫制御機構の破綻から劇症化に至ると想定されるがそのメカニズムは明らかではなく、腸内細菌叢とそれに対する消化管免疫応答が、門脈血を介して肝炎劇症化に関与している可能性がある。本研究では、感染病原因子がない飼育環境下で劇症肝炎を自然発症する自己免疫性肝炎マウスモデルを用いて、肝炎劇症化にいたる分子機構の解析を行った。そして、肝炎の劇症化は、細菌由来のToll様受容体リガンドにより誘導されるInterleukin(IL)-18によって惹起され、IL-18に依存した活性化T細胞のCXCR3発現エフェクター細胞への分化誘導と肝炎局所への移行が劇症化に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Some of the patients with autoimmune hepatitis (AIH) manifest liver failure at initial presentation. However, it is unknown how the progression to fulminant hepatitis occurs. We developed a mouse model of fulminant AIH by inducing a concurrent loss of Foxp3+ regulatory T cells and PD-1-mediated signaling. During AIH progression in these mice, T-bet together with IFN-gamma and CXCR3 were highly expressed in the inflamed liver, and T cells in the spleen and inflamed liver dominantly expressed CXCR3. Expression of one CXCR3 ligand, CXCL9, was elevated in the liver; in vivo administration of anti-CXCL9 suppressed AIH progression. In addition, serum levels of IL-18 were elevated during progression, and dendritic cells in the spleen and liver highly produced IL-18. In vivo administration of anti-IL-18R suppressed the increase of splenic CXCR3+ T cells and the fatal progression of hepatitis. These data suggest that in our model, IL-18 is critical for the progression to fulminant hepatitis.

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：内科学 肝臓病学 免疫学 劇症肝炎 自己免疫性肝炎 消化管免疫 サイトカイン ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎は、様々な原因によって生じうるが、薬剤などによる直接的な肝細胞毒性以外では、肝免疫制御機構の破綻が関与して劇症化に至ることが想定される。しかし、その劇症化に至るメカニズムは十分に明らかではない。一方近年、腸内細菌叢とそれに対する消化管免疫応答が、門脈血を介して肝免疫制御機構に直接関与することが明らかとなってきた。たとえば、Toll 様受容体リガンドなど消化管の腸内細菌叢由来の細菌因子は、肝免疫担当細胞の活性化を誘導し、肝局所での免疫応答に対して抑制的にも促進的にも働くことが示されている。しかし、腸内細菌叢とそれに対する消化管免疫応答が、肝炎の劇症化に至る病態過程に対して、どのように関与するのかは明らかではない。

胸腺由来の Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞 (regulatory T cell : Treg) は胸腺で分化した後、末梢に移行し、様々な免疫現象において活性化 T 細胞の制御を行い、自己免疫疾患の発症の抑制に重要な役割を担っている。一方、抑制性共刺激分子 programmed cell death-1 (PD-1) は活性化したリンパ球上に発現する抑制性共刺激分子であり、抗原提示細胞などが発現する PD-1 リガンドからのシグナルが入るとリンパ球の活性化を抑制し、自己応答性 T 細胞の活性化制御に重要な役割を担っている。

これまでの研究で報告者らは、PD-1 遺伝子を欠損したマウス (PD-1<sup>-/-</sup> マウス) や、胸腺由来の Treg の除去目的に新生仔期胸腺摘除 (neonatal thymectomy: NTx) を施行したマウス (NTx マウス) では自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis: AIH) は発症しないが、PD-1<sup>-/-</sup> マウスに NTx を施行することで、高ガンマグロブリン血症と抗核抗体産生を伴う重度の AIH が発症することを明らかにしている。このマウスでは、ほぼ全例約 2 週齢で AIH を発症し、CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞を中心とする炎症細胞浸潤から肝炎が劇症化し、約 4 週齢までに、高度の肝細胞壊死から死に至る。

このマウスの解析から 1) CD4<sup>+</sup>T 細胞の存在が、CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化と肝浸潤誘導をも含む劇症型 AIH の発症惹起に必須であること、2) 脾臓が劇症型 AIH の発症の場であること、3) 脾臓では、感染免疫などが活性化されない飼育環境にも関わらず通常免疫応答後に形成される 2 次濾胞 (活性化し分化した B 細胞による胚中心が形成されている) が形成され、CD4<sup>+</sup>T

細胞はこの 2 次濾胞内に局在し、濾胞ヘルパー T 細胞 (T follicular helper cell ; T<sub>FH</sub> 細胞) としての形質をもつこと、4) T<sub>FH</sub> 細胞の機能と分化に必須である ICOS および IL-21 に対する中和抗体投与で劇症型 AIH の発症が抑制されること、5) 劇症型 AIH 発症に関与する活性化 T 細胞の脾臓から肝臓への移行には、ケモカインである CCL20 とその単一のケモカイン受容体である CCR6 系が必須であることが明らかとなっている。

## 2. 研究の目的

今回私たちは、劇症肝炎を自然発症する自己免疫性肝炎マウスモデルを用いて、致死性自己免疫性肝炎の劇症化にいたる分子機構の解析を行い、その免疫学的機序を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

BALB/c 系統の新生仔期胸腺摘除 PD-1 遺伝子欠損マウス (NTx-PD-1<sup>-/-</sup> マウス) の 3 週齢前後の劇症期において、肝臓・脾臓の組織学的解析、免疫担当細胞についての免疫組織学的解析を行った。また、肝組織での PCR を用いた遺伝子発現解析、血清の ELISA 解析を行った。また、肝臓・脾臓の免疫担当細胞を単離しフローサイトメトリーによる解析を行い、さらに、各免疫担当細胞群をセルソーティングし PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。また、種々の中和抗体の *in vivo* 投与を行い、肝炎の抑制効果を検証し、肝炎劇症化に関与する免疫担当細胞の同定と、劇症化に必須のサイトカインやケモカインの特定を行った。

## 4. 研究成果

免疫組織学的解析とフローサイトメトリー解析から、劇症期の肝炎組織では、T 細胞、特に CD8<sup>+</sup>T 細胞が優位に浸潤していることが明らかとなった。肝炎発症後に抗 CD8 抗体を経時的に *in vivo* に投与し、末梢の CD8<sup>+</sup>T 細胞を除去すると、肝組織に浸潤する CD4<sup>+</sup>T 細胞は遺残するものの CD8<sup>+</sup>T 細胞の肝浸潤が消失し致命的な肝細胞障害が抑制され、肝炎劇症化に CD8<sup>+</sup>T 細胞の存在が必須であることが明らかとなった。

次に、肝炎劇症期の肝組織での PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。t-bet、IFN- $\gamma$ 、IL-18 受容体、CXCR3 の発現が上昇しており、単離した CD4<sup>+</sup>T 細胞においても t-bet、IFN- $\gamma$ 、IL-18 受容体、CXCR3 の発現上昇が確認され、肝炎劇症期の肝組織では、Th1 型の免疫応答が優位であることが示唆された。

一方、肝組織では、CXCR3のリガンドの一つであるCXCL9の発現が上昇し、血清を用いたELISA解析で血中のCXCL9濃度も上昇していることが明らかとなった。そして、CXCR3の別のリガンドであるCXCL10に対する中和抗体と比較して、抗CXCL9中和抗体を*in vivo*に投与した場合のみ肝炎の劇症化が抑制でき、CXCR3発現細胞のCXCL9に依存した肝への移行が肝炎劇症化に必須であることが明らかとなった。

次に、肝炎劇症化に必要とされる炎症性サイトカインの同定を行った。肝臓・脾臓のT細胞をセルソーティングしPCRを用いた遺伝子発現解析を行うとIL-18受容体発現が上昇していることが明らかとなった。そして、このモデルの肝炎劇症化時期に、血清IL-18濃度が上昇しており、炎症性サイトカインであるIFN- $\gamma$ 、IL-1、IL-6、IL-12、IL-18の活性中和抗体の*in vivo*投与を行うと、抗IL-18受容体抗体でのみ劇症肝炎が抑制できることが明らかとなった。さらに、IL-18受容体抗体投与下でのT細胞の解析から、Th1型細胞への分化が抑制され、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞ともにCXCR3発現が抑制されていることで明らかとなった。

次に、劇症化病態に必須であるIL-18の産生細胞の同定のため、各免疫担当細胞群をセルソーティングしPCRを用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、IL-18を産生する主な細胞はT細胞活性化を担う樹状細胞であることが明らかとなった。IL-18を産生する樹状細胞は、自らIL-18受容体を発現し、IL-18がautocrineにその産生誘導に働くことが示唆された。また、腸内細菌叢に起因するToll様受容体リガンドによるIL-18産生誘導を介した免疫応答が、肝炎の劇症化に関与している可能性を見いだした。

一方、肝組織でのCXCL9発現細胞は免疫組織学的解析から、クッパー細胞/マクロファージであることが明らかとなり、これらの細胞のCXCL9発現誘導がIFN- $\gamma$ ではなく、TNF- $\alpha$ によって誘導され、腸内細菌叢に起因するToll様受容体リガンドによってTNF- $\alpha$ 発現誘導が生じる可能性が考えられた。また、この劇症肝炎モデルにおいては、血清TNF- $\alpha$ 濃度が上昇しているが、抗TNF- $\alpha$ 中和抗体による治療的アプローチは有効ではなく、肝臓局所でマクロファージや活性化T細胞からautocrineあるいはparacrineで産生されるTNF- $\alpha$ によるCXCL9の発現誘導が、抗TNF- $\alpha$ 抗体治療によって十分に抑制できないことがその原因として考え

られた。

さらに、劇症型AIHに対する治療法を検証し、ステロイドが治療的に劇症型AIHの抑制に有効であること、ステロイド治療では肝炎の発症に関わる脾臓での胚中心を形成した濾胞と濾胞ヘルパーT細胞が遺残し、ステロイド治療中止にて劇症肝炎が再燃すること、ステロイド治療を行なったマウスの脾臓CD4<sup>+</sup>T細胞を免疫不全マウスに移入すると肝炎が誘導できること、ステロイド治療後に肝炎発症の誘導臓器である脾臓を摘出するとステロイドを中止しても劇症型AIHの再燃が抑制できること、そして、脾摘は単独でも治療的に劇症型AIH抑制が可能であることが明らかとなった。

## 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 11 件)

- 1) Ikeda A, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Chiba T, Watanabe N. Progression of autoimmune hepatitis is mediated by IL-18-producing dendritic cells and hepatic CXCL9 expression in mice. *Hepatology*. 査読有 2014. 2014 Feb 23. [Epub ahead of print]. doi: 10.1002/hep.27087.
- 2) Maruoka R, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Ikeda A, Chiba T, Watanabe N: Splenectomy prolongs the effects of corticosteroids in mouse models of autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 査読有 145: 209-220: 2013. doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.011.
- 3) Nishiura H, Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Maruoka R, Ikeda A, Chiba T, Watanabe N: Interleukin-21 and TNF- $\alpha$  are critical for the development of autoimmune gastritis in mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読有 28: 982-991: 2013. doi: 10.1111/jgh.12144.
- 4) Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, Okazaki T, Chiba T, Watanabe N. TNF- $\alpha$  is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression. *Clin Immunol*. 査読有 146: 15-25: 2013. doi: 10.1016/j.clim.2012.10.008.

- 5) Nakajima S, Igyarto B, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Hara-Chikuma M, Watanabe N, Ziegler SF, Tomura M, Miyachi Y, Kaplan DH, Kabashima K: Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via TSLP receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 査読有 129: 1048-1055: 2012.  
doi: 10.1016/j.jaci.2012.01.063.
- 6) Nishiura H, Kido M, Aoki N, Iwamoto S, Maruoka R, Ikeda A, Chiba T, Ziegler SF, Watanabe N: Increased susceptibility to autoimmune gastritis in thymic stromal lymphopoietin receptor-deficient mice. *J Immunol*. 査読有 188:190-197: 2012.  
doi: 10.4049/jimmunol.1003787.
- 7) Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, Okazaki T, Chiba T, Watanabe N: IFN- $\gamma$  is reciprocally involved in the concurrent development of organ-specific autoimmunity in the liver and stomach. *Autoimmunity* 査読有 45:186-198: 2012.  
doi: 10.3109/08916934.2011.616559.
- 8) Nakamura S, Sugiyama T, Matsumoto T, Iijima K, Ono S, Tajika M, Tari A, Kitadai Y, Matsumoto H, Nagaya T, Kamoshida T, Watanabe N, Chiba T, Origasa H, Asaka M; for the JAPAN GAST Study Group: Long-term clinical outcome of gastric MALT lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*: a multicentre cohort follow-up study of 420 patients in Japan. *Gut* 査読有 61:507-513: 2012.  
doi: 10.1136/gutjnl-2011-300495.
- 9) Kido M, Watanabe N, Aoki N, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, Azuma T, Chiba T: Dual roles of CagA protein in *Helicobacter pylori*-induced chronic gastritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 412:266-272: 2011.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.081.
- 10) Miyamoto S, Konda Y, Matsui M, Sawada K, Ikeda K, Watanabe N, Kawanami C, Chiba T: Acute airway obstruction in a patient with achalasia. *Intern Med*. 査読有 50: 2333-2336: 2011.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/50/20/50\\_20\\_2333/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/50/20/50_20_2333/_article)
- 11) Takata K, Okada H, Ohmiya N, Nakamura S, Kitadai Y, Tari A, Akamatsu T, Kawai H, Tanaka S, Araki H, Yoshida T, Okumura H, Nishisaki H, Sagawa T, Watanabe N, Arima N, Takatsu N, Nakamura M, Yanai S, Kaya H, Morito T, Sato Y, Moriwaki H, Sakamoto C, Niwa Y, Goto H, Chiba T, Matsumoto T, Ennishi D, Kinoshita T, Yoshino T: Primary gastrointestinal follicular lymphoma involving the duodenal second portion is a distinct entity: a multicenter, retrospective analysis in Japan. *Cancer Sci*. 査読有 102: 1532-1536. 2011.  
doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01980.
- 〔学会発表〕(計 16 件)
- 1) 渡部則彦 新たに確立した動物モデルを用いた自己免疫性肝炎の病態解明と新規治療法の開発 難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班 平成 25 年度 第 2 回総会 2013.12.19. 東京ステーションコンファレンス
- 2) 渡部則彦, 丸岡隆太郎, 池田亜希. 慢性から劇症まで多様な病態を呈する自己免疫性肝炎(AIH)モデルでの病態解析 JDDW 2013 (第 55 回日本消化器病学会大会) 2013.10.9. グランドプリンスホテル新高輪 東京
- 3) 渡部則彦, 丸岡隆太郎, 青木信裕, 木戸正博, 池田亜希, 岩本諭, 西浦尚代, 千葉勉 自己免疫性肝炎モデルではマウスの系統の違いから同一の免疫機構の破綻によって慢性肝炎から劇症肝炎まで発症する 第 24 回 The Meeting of Liver and Immunology 2013.9.7. 京都国際ホテル 京都
- 4) 渡部則彦, 池田亜希, 丸岡隆太郎, 西浦尚代, 岩本諭, 青木信裕, 木戸正博, 千葉勉 慢性から劇症まで多様な病態を呈する自己免疫性肝炎モデルを用いた AIH 病態形成機構の解明 第 50 回日本消化器免疫学会総会 2013.8.1. ホテルグランドヒル市谷 東京
- 5) 渡部則彦 新たに確立した動物モデルを用いた自己免疫性肝炎の病態解明と新規治療法の開発 難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班 平成 25 年度 第 1 回総会 2013.6.27. 東京ステーションコンファレンス 東京.
- 6) 渡部則彦, 丸岡隆太郎, 青木信裕 自然発症型自己免疫性肝炎モデルを用いたステロイド治療にかわる新規治療法の

- 探索 第 49 回日本消化器免疫学会総会 2012.7.5. 城山観光ホテル 鹿児島.
- 7) 青木信裕、丸岡隆太郎、渡部則彦 自己免疫性肝炎(AIH)新規モデルマウスの病態から重症・難治性 AIH の治療をさぐる 第 48 回日本肝臓学会総会 2012.6.7. ANA クラウンプラザホテル 金沢 金沢.
  - 8) Maruoka R, Aoki N, Watanabe N. Splenectomy overcomes therapeutic insufficiency of corticosteroids and induces prolonged remission. DDW2012 2012.5.21. San Diego, USA.
  - 9) 青木信裕、木戸政博、渡部則彦. 新規致死性自己免疫性肝炎(AIH)モデルにおける AIH 劇症化機序の解明 第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4.20. 京王プラザホテル 東京
  - 10) Watanabe N Fatal immune-mediated liver injury is triggered by dysregulated follicular-helper T cells in the spleen of mice Splenectomy overcomes therapeutic insufficiency of corticosteroids and induces remission. EASL Monothematic Conference: Immune Mediated Liver Injury. 2012.1.20. Stratford-Upon-Avon, United Kingdom
  - 11) 青木信裕、渡部則彦 致死性自己免疫性肝炎マウスモデルの発症における脾臓 TFH 細胞の関与 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011.11.28. 幕張メッセ 千葉
  - 12) Aoki N, Watanabe N. Mechanisms involved in fatal progression of autoimmune hepatitis in mice. AASLD The Liver Meeting 2011 2011.11.7. San Francisco, USA
  - 13) Aoki N, Watanabe N. Mechanisms involved in fatal progression of autoimmune hepatitis in mice. UEGW Stockholm 2011 2011.10.24. Stockholm, Sweden
  - 14) 青木信裕、渡部則彦 新規自己免疫性肝炎(AIH)モデルにおける AIH 劇症化機構の解明 第 19 回日本消化器関連学会週間 2011.10.20 福岡国際会議場 福岡
  - 15) 青木信裕、渡部則彦 新規致死性自己免疫性肝炎(AIH)モデルにおける発症機構の解明と新たな免疫療法の開発 第 48 回日本消化器免疫学会総会 2011.7.21. 金沢エクセル東急 石川
  - 16) 青木信裕、渡部則彦 新規モデルマウスを用いた自己免疫性肝炎(AIH)発症機序の解明 第 47 回日本肝臓病学会総会

2011.6.3. ホテル グランパシフィック  
LE DAIBA 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡部 則彦(WATANABE NORIHIKO)  
京都大学・医学研究科・非常勤講師  
研究者番号：50419446

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし