

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670022

研究課題名(和文) 移植するだけでNASHを発症させるNKT細胞の発見、その機能解析と創薬への挑戦

研究課題名(英文) Investigation of the immunological function of the NASH-inducing transplanted NKT, and drug discovery

研究代表者

小泉 桂一 (Koizumi, Keiichi)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：10334715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：NASH(非アルコール性脂肪性肝炎)は肝硬変、さらには肝がんへと移行する重篤な疾患であるが、NASH発症・進展機序の詳細は不明である。最近我々は、移植するだけで、マウスにNASHを発症させる特殊なNKT細胞集団を発見した。本研究は、この特殊なNKT細胞の免疫学的機能解析を詳細に行い、治療困難なNASHに対する創薬に挑戦することである。本結果から、NASHの初期状態は、CXCL16欠損マウスに2週間CDAA食摂食によって観察された。さらに、NKT細胞による肝単核細胞から産生されるIFN- およびTNF- は、肝細胞における脂質蓄積のためのエフェクター分子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：NASH (nonalcoholic steatohepatitis) is a serious disease, which goes to liver cirrhosis and liver cancer. However, NASH progression mechanism is still unknown. Recently, we interestingly found a NASH-inducing transplanted NKT into the recipient of NKT cell-deficient mice. The purpose of this study is following two; 1. Analysis of the immunological function of the NKT cells. 2. Development of the new drug against NASH. As a result of our investigation, initial condition of NASH was observed by taking of CDAA diet for 2-weeks in CXCL16-deficient mice. Furthermore, it was clear that IFN- and TNF- produced from hepatic mononuclear cells by the NKT cells is a effector molecule for lipid accumulation in liver cells.

研究分野：代謝学

キーワード：ケモカイン CXCL16 NASH NKT

### 1. 研究開始当初の背景

1980年 Mayo Clinic の Ludwig らの報告以来、脂肪肝はもはや良性・可逆性疾患ではなく慢性炎症の温床として認識されており、さらに本病態は悪化に伴い非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) に進行することが明らかとなってきた。しかしながら、NASH の疾患概念が病理診断所見から生まれた概念であるため、その病理所見の変化は臨床一般にコンセンサスが得られているものの、その詳細な分子病態機構についての詳細は未だ明らかになっておらず、従って、効果的な治療法や診断法は未だ確立されていないのが現状である<sup>2)</sup>。したがって、同じ生活習慣病でも喫煙に伴う肺癌やアルコール過飲に伴う肝細胞癌の場合には、発癌の危険性や定期検査の必要性が周知されており早期発見が可能である一方、NASH の場合は、早期発見および早期治療を行うことが困難である。この事は、増加の一途をたどる生活習慣病に関しての多大な懸念となってきている。

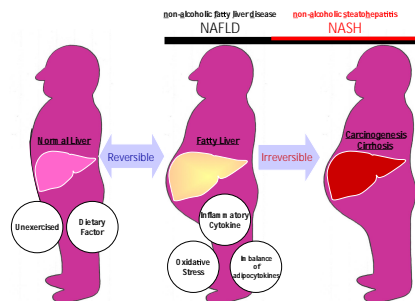


Figure 2. Illustration of "two-hit theory" in pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis.

### 2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの代表的な表現型である可逆性な脂肪肝は、病態の悪化に伴って非可逆性の肝慢性炎症疾患である NASH (nonalcoholic steatohepatitis: 非アルコール性脂肪性肝炎) に進行することが明らかになってきたが、その発症・進展機序の詳細は不明である。一方で、ケモカインは免疫細胞の動態を制御するサイトカイン群であるため、特に炎症性疾患との関連性が強い。なかでも、ケモカイン CXCL16 は iNKT 細胞 (invariant natural killer T) の肝臓内での動態・機能制御を行うことで、肝免疫系の恒常性維持や肝炎症性疾患に関わっていることが知られている。しかしながら、NASH との関連性は全く報告がない。そこで、本研究は、NASH の発症・進展に対する CXCL16、および CXCL16 介在性の iNKT 細胞の役割を免疫学的な視点から解析し、新規病態メカニズムの解明を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) CXCL16 欠損マウスにコリン欠乏食 (CDAA 食) を摂食させることで食餌誘導性 NASH を発症させた後、病理組織学および生化学的解析、ならびに肝組織プロテオーム解析を行うことで、NASH 動物モデルとしての

有用性を評価した。

(2) 上記モデルで NASH を発症と共にポピュレーションが変化する肝 iNKT 細胞の存在を FACS 解析で確認した。さらに iNKT 細胞に特異的なリガンドである  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) を用いて、機能解析を行った。

(3) iNKT 細胞と病態との関連性を、養子移植実験による直接的な方法論で検証した。iNKT 細胞と肝単核球の *ex vivo* 共培養系を用いて、iNKT 細胞機能変化を起点とした肝免疫系の偏重による病態形成機構を検討した。

### 4. 研究成果

CXCL16 欠損マウスはわずか 2 週間の CDAA 食摂食によって NASH 初期病態を呈することが明らかとなった。

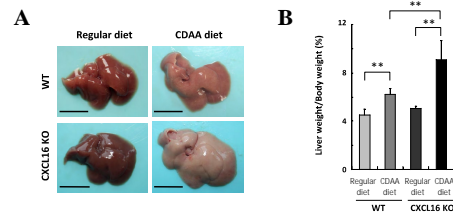


Figure 3-1. Relative liver weight is increased in CDAA diet-fed CXCL16 KO mice. (A) Morphology of freshly isolated liver specimens. Scale bar=1 cm. (B) Ratio of liver weight/body weight (%). Data are represented as mean  $\pm$  SD of fifteen mice in each group; \*\**p*<0.01.

さらに、肝組織プロテオーム解析の結果から酸化ストレスの負荷が示唆され、NASH 病態形成における CXCL16 の関与と共に、有用な NASH モデルとして利用できることが明らかとなった。

Down-regulated proteins	Protein expression ratio (vs. CXCL16 KO Regular diet)	Up-regulated proteins	Protein expression ratio (vs. CXCL16 KO Regular diet)
Selenium binding protein 1	-3.99	Serum albumin precursor	2.03
Selenium binding protein 2	-3.72	Protein disulfide-isomerase precursor	2.01
Major urinary protein 2 precursor	-2.78	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial precursor	1.87
Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial precursor	-1.95	Protein disulfide-isomerase A6 precursor	1.59
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochond.	-1.68	Rho guanine nucleotide exchange factor 10-like protein	1.54
Regucalcin	-1.58	Apolipoprotein A-IV precursor - Mus musculus	1.54
Sulfite oxidase, mitochondrial precursor	-1.52		
ATP synthase subunit d, mitochondrial	-1.52		
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor	-1.5		

Table 2. Proteomic analysis of liver samples of regular diet- vs CDAA diet-fed CXCL16 KO mice. Whole liver lysate was deployed by 2D-DIGE and each protein expression level were assessed by fluorescence intensity. Mitochondria related proteins are shown in green color.

またこの時、肝 CD4<sup>+</sup> iNKT 細胞の増多に加えて、 $\alpha$ -GalCer 依存的なサイトカイン産生を指標とした機能的変化が認められ、さらにこの機能変異 iNKT 細胞を養子移植すると肝臓への炎症、中性脂肪蓄積が誘導されることが示された。共培養実験の結果、この機能変異 iNKT 細胞は、肝単核球を介して IFN- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  を強く誘導させることが明らかになり、これらサイトカインが肝細胞への脂質蓄積のエフェクター分子として機能していることが示唆された。また、CDAA 食餌 CXCL16 欠損マウスの肝臓では TNF- $\alpha$  産生 Kupffer 細胞の増加が認められ、機能変異 iNKT を起点

とした肝免疫攪乱が慢性炎症惹起、脂質蓄積を誘導する新規 NASH 発症・進展機構が考えられた。現在、本邦における慢性肝炎・肝発癌の 9 割近くがウイルス性肝炎に起因するが、最近 10 年間では非ウイルス性肝癌が倍増し、肝癌全体の 10% を超すようになってきている。この最大の要因が、近年の NASH 罹患人口の増加である。ウイルス性肝炎は治療法の確立と感染予防対策によって今後罹患人口は縮小していくため、その傾向にはさらに拍車がかかり、将来的には NASH が慢性肝炎における 1 番の原因疾患になると予想される。

従来、メタボリックシンドロームは内臓脂肪の蓄積に伴うインスリン抵抗性により惹起される『代謝性疾患』として考えられてきた。現に、メタボリックシンドロームの代表ともいえる糖尿病にはインスリン抵抗性改善、また脂質異常症に対しては HMG-CoA 還元酵素阻害薬など、病態を反映する患者の代謝性化学的プロファイルに固執した診断法および治療薬が現在のゴールドスタンダードとして適応されている。そして、このような病態の理解は、NAFLD/NASH においてもその延長のように存在し、先に述べた治療薬や酸化剤を用いた多くの臨床研究報告がなされている。すなわち、臨床現場では NAFLD や NASH も、あくまでも『代謝性疾患』としてとらえざるを得ないというのが現状である。

その一方、NASH 病態形成における慢性炎症や自然免疫の重要性を示唆する基礎実験報告が近年急速に蓄積されている。

本研究では、脂肪肝病態における CXCL16 欠損によって、iNKT 細胞のポピュレーションおよび機能変化が生じ、特に、TNF- $\alpha$  産生性 iNKT 細胞という過去の報告にはない異常 iNKT 細胞が誘導される可能性を示唆した。さらにこの細胞により異常活性化を誘導された周囲の免疫担当細胞たちは IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  など Th1 サイトカインの誘導を強いられ、このような肝免疫系の偏重による新規 NASH 病態機構を提案した。

現在我々は、この現象の普遍性を確認するために、ヒト臨床 NASH 病態を反映する monosodium glutamate-injected (MSG) マウスを用いた NASH 初期病変における iNKT 細胞のポピュレーション、機能解析を目下検討中であるが、NASH 初期病態時では肝臓における CXCL16 の発現低下と共に、CD4<sup>+</sup> iNKT 細胞の増加、TNF- $\alpha$  産生能の亢進を見出しつつあり、進行性 NASH において今後この異常 iNKT 細胞が時系列的にどのような挙動を示すのかについては興味を尽きない。

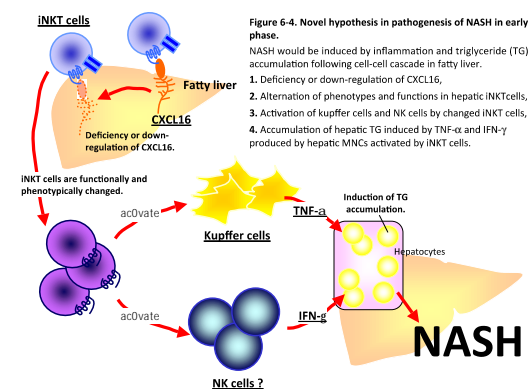
特に、近年では、自然免疫系のみならず獲得免疫系までもが、この慢性炎症を制御することが分かってきており、自然免疫系と獲得免疫系をつなぐ細胞である iNKT 細胞は慢性炎症の進行において重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、iNKT 細胞が機能したイベントの前後に動く自然免疫系や獲得免疫系細胞が慢性炎症を惹起し、

NASH 病態を形成すると想定される。このような観点から、iNKT 細胞の挙動のみならず他の免疫担当細胞の動態を時系列的に観察することは極めて重要な点だといえる。

また、NASH の発症・進展には「Two-hit theory」が提唱されているが、「Two-hit theory」はあくまでも NASH の病態を 2 段階に分けて捉えるための概念であり、実際に NASH を導く刺激は多くの因子が複雑に絡み合っていて生じていると考えられる。しかし本研究により、我々は CXCL16 が NASH への進行を制御し、分子機構として初めて「Two-hit」を規定する候補分子になりうるのではないかと考えている。

その証明のためには、肝臓特異的 CXCL16 コンディショナルノックアウトマウスなどを用いることで、CXCL16 が脂肪肝から NASH への進行を制御しているかどうかを詳細に検討する必要があるが、本検討における NAS のスコア値から判断すると、CXCL16 は脂肪肝から脂肪性肝炎への進行を制御していると判断できる。また CDAА 食を長期間摂食させても、繊維化、発癌などの後期病態は促進されない。したがって CXCL16 は脂肪性肝炎への進行を規定する、「Two-hit theory」の候補分子となりうる。

NASH 病態時において、CXCL16 はどのように発現制御を受けるのか、そして iNKT 細胞の機能・動態変化はいかにして誘導されるのか。これらを明らかにしていくことが、今後の NASH 新規治療戦略の構築には必要である。



## 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 3 件)

1. Ji- Ye Kee, Aya Ito, Shozo Hojo, Isaya Hashimoto, Yoshiko Igarashi, Koichi Tsuneyama, Kazuhiro Tsukada, Tatsuro Irimura, Naotoshi Shibahara, Ichiro Takasaki, Akiko Inujima, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Hiroaki Sakurai, Ikuo Saiki and Keiichi Koizumi: CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer by promoting TNF- $\alpha$ -induced

apoptosis by tumor-associated macrophages. BMC Cancer., 14:1471-1472.2014

2. Keiichi Koizumi: Where do cancer cells go? Cancer cells' chemokine receptors and the development of a new therapy for cancer metastasis. Seikagaku.,85:1099-1102.2013

3. Ji-Ye Kee, Aya Ito, Shozo Hojo, Isaya Hashimoto, Yoshiko Igarashi, Kazuhiro Tsukada, Tatsuro Irimura, Naotoshi Shibahara, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Hiroaki Sakurai, Ikuo Saiki and Keiichi Koizumi: Chemokine CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer via augmentation of tumor-infiltrating NKT cells in a murine model. Oncol.Rep.,29:975-82.2013

〔学会発表〕(計2件)

1. 五十嵐喜子、戸辺一之、小泉桂一：脂肪組織の形成に対するケモカイン CXCL16 の関与.第 35 回日本肥満学会，2014，10，24-25，宮崎.

2. 小泉桂一，奇知芸，櫻井宏明，入村達郎，濟木育夫：がん微少環境におけるケモカイン CXCL16 の二面性 - がん免疫監視分子とがん細胞シグナル分子としての役割 - . 第 22 回がん転移学会総会・学術集会，2013，7，11-12，松本.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 小泉 桂一 (KOIZUMI KEIICHI)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授  
研究者番号：10334715