

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460643

研究課題名(和文) 女性ホルモンと肝樹状細胞の変化が自己免疫性肝炎発症へ与える影響について

研究課題名(英文) The effects of estrogen and hepatic dendritic cells on the onset of autoimmune hepatitis.

研究代表者

富山 智香子 (Tomiyama, Chikako)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80359702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲンの低下する中年女性に自己免疫性肝炎は好発する。そこで、エストロゲンの増減が自己免疫性肝炎の発症及び進展にどのように影響するかについて、肝樹状細胞に焦点を当てて検討した。その結果、エストロゲンはエストロゲン受容体鎖を介して肝形質細胞様樹状細胞のIL-10産生を増加させ自己免疫性肝障害を抑制した。一方、エストロゲン受容体阻害および閉経により抑制作用が減弱したと同時に、肝骨髄系樹状細胞が活性化し、IL-12p70およびTNF産生が増大し肝障害増悪を誘導した。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune hepatitis is often found in middle-aged women whose estrogen level is low. Therefore, we investigated the effects of estrogen level on the onset or the progression of autoimmune hepatitis. We examined hepatic dendritic cells (DCs) with mice model. Our results showed that estrogen can suppress autoimmune liver injury because hepatic plasmacytoid DCs (pDCs) increase IL-10 production by estrogen receptor chain. On the other hand, an estrogen blockade or an ovariectomy decreased such effects of estrogen. At the same time, hepatic myeloid DCs (mDCs) were activated and they increased production of IL-12p70 as well as TNF. In this way, it is considered that estrogen affords the key to understand the onset of autoimmune hepatitis and its progression. From the view point of DCs, a shift of two types of hepatic DC subpopulations, pDCs or mDCs in the liver, could provide another clue to autoimmune hepatitis.

研究分野：免疫学

キーワード：エストロゲン 自己免疫性肝炎 肝樹状細胞 IL-10

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis: AIH) は、中高年の女性に好発して慢性に経過し、肝硬変に進行する肝炎で、急性肝不全を呈することや肝細胞癌の合併もある疾患である。AIH の肝細胞障害の成立には免疫寛容機構の破綻による自己免疫応答の関与が想定されているものの、原因解明に至っていないため、原因に基づいた診断と治療が難しいとされている。そのため、診断には除外診断や多くの自己免疫疾患に共通の抗核抗体や病理組織学的検索が必要とされている。現在の診断方法では場合によっては診断の遅れにより、ステロイド抵抗性で治療に困難となる症例や、急性肝不全に進行し治療が肝移植による手段のみとなる症例もあるため、早期発見が重要である。また、治療法についても、ステロイド著効例が多いものの非特異的免疫抑制療法のため、易感染性、生活習慣病や骨粗鬆症等の副作用があるため、原因療法の開発が待たれている。現在、いくつかの特異的免疫療法の開発が試みられている。

AIH の発症機構として、自己肝細胞への免疫寛容破綻がいわれているものの、まだ原因解明にまでは至っていないが、徐々に研究データが蓄積されてきている。発症原因として、1) 組織適合抗原である HLA-DR4 が感受性因子であること (Seki T, et al, *Gastroenterol*, (1992) 103: 1041-47)、2) AIH 患者血中の Th17 関連サイトカインが治療後に低下すること (Kamijo A, et al, *Hepatol Res*, (2011) 41: 350-57)、3) AIH 患者やモデルマウスにおいて制御性 T 細胞の細胞数減少や増殖能低下がみられること (Longhi MS, et al, *J Immunol*, (2006) 176: 4484-91, Erhardt A, et al, *Hepatol*, (2007) 45: 475-485)、4) 抗炎症作用や免疫抑制作用を有する NKT 細胞が AIH では減少している (Ferri S, et al, *Hepatol*, (2010) 52: 999-1007)、といった報告がされている。しかし、免疫応答を調節する主要細胞である抗原 (自己抗原含む) を提示する樹状細胞 (dendritic cell: DC) に焦点を当てた報告は少なく、AIH の標的臓器である肝臓内の DC となると更に報告は少ない。

DC は骨髄系 DC (myeloid DC: mDC) と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC: pDC) に大きく分けられ、前者は従来の抗原提示細胞であり異物を排除する免疫応答を担い、後者は IFN- $\alpha$  産生や免疫寛容誘導に関与するといわれている。マウス肝臓には pDC が多く存在し、ヒト生体部分肝移植において肝 DC が T 細胞の免疫寛容を誘導し、移植片生着に関わっていることが報告されている (Lau AH, et al, *Gut*, (2003) 52: 307-14, Castellaneta A, et al, *J Immunol* (2009) 183: 6922-6932)。

## 2. 研究の目的

我々は、AIH モデルマウスを用いて、1) 肝内 pDC の減少により肝障害が誘発され、2) 活

性化 mDC の炎症性サイトカイン産生により肝障害が誘導されることを明らかにした。しかし、他の自己免疫性疾患と同様に AIH も女性に好発し、妊娠・出産や閉経など性ホルモンの大きな変化がその発症・病態の進展に影響すると言われているものの、原因解明までには至っていない。そこで、我々が明らかにした AIH の発症・肝障害の進展に免疫応答の司令塔である DC の性質変化の事実を基に、女性ホルモンの免疫寛容や自己応答性への直接的影響を標的臓器である肝臓の樹状細胞に焦点を当てて明らかにすることで、AIH の特異的診断・治療の基盤作りを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

6 ~ 12 週齢の雌性 C57BL/6NCrI (B6N, Charles River) マウスを使用した。全ての動物実験は、新潟大学の動物実験倫理委員会の審査・承認を経て行った。

### (2) 試薬の *in vivo* 投与

Concanavalin A (Con A, type ) は、15mg/kg を静脈内投与 (i.v.) した。また、17 $\beta$ -estradiol はエストラジオールプロピオン酸エステルを用いて 1.25mg/kg/日 を 3 回、fulvestrant は、10mg/kg を 1 回皮下投与 (s.c.) した。

### (3) 卵巣摘出

6 ~ 12 週齢の雌性 B6N マウスの両側卵巣を麻酔下において卵管部より結索後切除した。

### (4) 肝障害の程度測定

Con A 投与後経時的に血清採取し、血清中 ALT を POP・TOOS 法 (比色法) で測定した。

### (5) フローサイトメーター

CD11c, I-A, CD80, CD86, CD40, CD274, CD11b, CD317, estrogen receptor 鎖 (ER ) 及び estrogen receptor 鎖 (ER ) に対する抗体で染色後、FACSCalibur にて解析した。

### (6) DC のサイトカイン産生

各種マウスの肝及び脾の DC を抗 CD11c 抗体および magnetic cell sorting を用いて純化し、 $1 \times 10^6$ /mL の濃度にて 24 時間培養 (37 , 5%CO<sub>2</sub>) 後、その細胞上清を回収し、各種サイトカイン産生を ELISA 法にて測定した。

### (7) 各種サイトカイン測定

各種マウスの血清および細胞上清を採取し、ELISA キットにて IL-10, IL-12(p70), IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  の測定をした。

### (8) 統計学的処理

Student ' s *t*-test、ANOVA、および Scheffe の検定を用い、P < 0.05 を有意差有りとした。

#### 4. 研究成果

(1) 各臓器における免疫担当細胞のエストロゲン受容体の局在

エストロゲン受容体(estrogen receptor; ER)は鎖及び鎖の2種類存在し、それら発現について解析した結果、ERは肝I-A<sup>high</sup>及びI-A<sup>low</sup> DCの両サブセットの陽性率は20%以下で、差も認められなかった。しかし、17 $\beta$ -estradiol単独投与群およびCon Aを投与したAIH誘導群については両DCサブセットのER陽性率は半減した。一方、17 $\beta$ -estradiol投与後AIHを誘導した群では両DCサブセットのER陽性率は70%程度に増加した。ERについては、肝、脾共にいずれの群においても陽性率は10%以下であった。

(2) 17 $\beta$ -estradiol投与はAIHの肝DCのIL-10産生を増強し、IL-12(p70)を抑制する

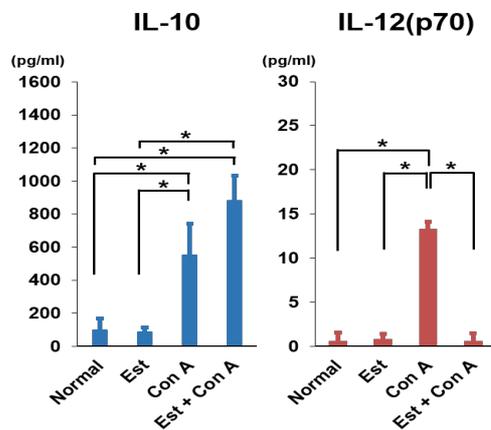


図1 各群の肝CD11c<sup>+</sup>細胞のIL-10およびIL-12(p70)産生の比較

肝DCのサイトカイン産生についてはIL-10の産生増強が17 $\beta$ -estradiol投与+AIH誘導群(Est+Con A)に認められた。IL-12p70については、17 $\beta$ -estradiol投与+AIH誘導群(Est+Con A)において対照群(Normal)と同様なレベルまで低下した(図1, \*p<0.05)。

(3) ER阻害はAIH肝障害を増悪する

Fulvestrantの皮下投与によるER阻害後にCon A肝障害を誘導し肝障害について検討し

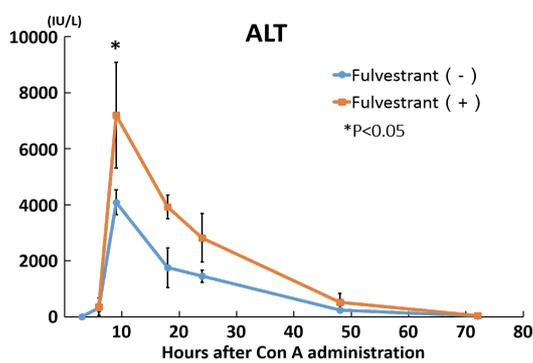


図2 血清中ALTの経時的変化

た(図2)。その結果、ERを阻害したCon A

投与群はCon A単独投与群に比してALTの有意な増加を認め、さらにER阻害したCon A投与群の死亡率は20%であった(Con A単独投与群: 0%)。しかし、ER阻害のみでは肝障害を認めなかった。

(4) ER阻害によるAIH肝障害マウスの肝内DCへ与える影響

ER阻害したCon A投与マウスでは肝内の主要DC分画であるI-A<sup>low</sup>CD317<sup>+</sup>CD80<sup>-</sup>CD86<sup>low</sup>が減少した一方で、I-A<sup>high</sup>CD40<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>DC分画の割合が増加した。

(5) 閉経モデルマウスにおけるAIH肝障害の程度と肝内DCへの影響

卵巣摘出による閉経モデルマウスにCon Aを投与しAIH肝障害を誘導した結果、ER阻害時と同様に増悪したものの、死亡例は認めなかった。また、DCの動態についてもI-A<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>DCが増加した一方で、CD317<sup>+</sup>DCの絶対数が減少した。

以上から、AIH肝障害は17 $\beta$ -estradiolで抑制され、その抑制機序としてER鎖を介した肝DCのIL-10産生増強とIL-12(p70)の産生抑制によるeffector細胞の細胞障害抑制の可能性が示唆された。また、ER阻害あるいは実験的閉経によるエストロゲン枯渇状態はAIH肝障害を増悪し、原因の1つとして増加した肝mDCが関わっている可能性が示唆された。これらのことでAIHの病態進展および抑制にはエストロゲンの量の変動と肝DCの性質変化が関係することが明らかとなった。今後、AIHにおいてエストロゲン値と肝DCの動態を組合せることで新たな診断および治療方法へ繋がる可能性が期待される。

#### 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6件)

Watanabe M, Kainuma E, Tomiya C. Repetitive manual acupuncture increases markers of innate immunity in mice subjected to restraint stress. *Acupunct Med.* 2015, 33(4):312-8. (査読有)

Tomiya C, Watanabe M, Honma T, Inada A, Hayakawa T, Ryufuku M, Abo T. The effect of repetitive mild hyperthermia on body temperature, the autonomic nervous system, and innate and adaptive immunity. *Biomed Res.* 2015, 36(2): 135-42. (査読有)

Shimaya M, Watanabe M, Azumi M, Shichiri K, Tomiya C, Tanabe M, Sato S, Akazawa K. A questionnaire survey in kidney

transplantation outpatients: factors associated with good self-management. Health, 2015, 7: 589-595. (査読有)

Watanabe M, Kainuma E, Tomiyama C, Oh Z, Koshizawa J, Nagano G. Does East Meet West? – The Association between Oriental Tongue Inspection and Western Clinical Assays of White Blood Cell Subsets. Health, 2015; 7: 801-808. (査読有)

Abo T, Watanabe M, Tomiyama C, Kanda Y. On/off switching of capillary vessel flow controls mitochondrial and glycolysis pathways for energy production. Med Hypotheses. 2014, 83(1): 99-100. (査読有)

Aso-Ishimoto Y, Yamagiwa S, Ichida T, Miyakawa R, Tomiyama C, Sato Y, Watanabe H, Aoyagi Y. Increased activated natural killer T cells in the liver of patients with advanced stage primary biliary cirrhosis. Biomed Res. 2014, 35(2):161-9. (査読有)

[学会発表](計2件)

富山智香子、渡部久実、The blockade of estrogen receptors on dendritic cells exacerbates autoimmune hepatitis. 第45回日本免疫学会総会・学術集会、2016年12月5日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

五十島亜美、富山智香子、渡部久実、Estrogen inhibited liver injury in Concanavalin A-induced hepatitis mice. Focused on dendritic cells in the liver、第43回日本免疫学会総会・学術集会、2014年12月10日、国立京都国際会館(京都府京都市)

[その他]

ホームページ等

[http://www.clg.niigata-u.ac.jp/kyoin/chikako\\_tomiyama/](http://www.clg.niigata-u.ac.jp/kyoin/chikako_tomiyama/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

富山 智香子 (TOMIYAMA, Chikako)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：80359702

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

渡邊 香奈子 (WATANABE, Kanako)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：80626094

渡部 久実 (WATANABE, Hisami)  
新潟大学・医歯学系・特任教授  
研究者番号：50143756

(4)研究協力者

なし