

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460990

研究課題名(和文) NKT細胞依存性肝炎における肝細胞障害の抑制メカニズムの解析

研究課題名(英文) Regulation of NKT cell-mediated hepatic injury in mice

研究代表者

川村 俊彦 (Kawamura, Toshihiko)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：70301182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖脂質 alpha-galactosylceramideによって誘導されるNKT細胞依存性肝炎において、肝細胞障害の制御メカニズムを明らかにするため、本研究においては、以下の2つのファクターに注目して解析を行った。

1. Ras GAP protein であるRASAL3が、NKT細胞に発現することを見出し、RASAL3欠損マウスを作製することにより、RASAL3がNKT細胞のサイトカイン産生能などの機能を制御することにより、NKT細胞依存性肝炎を増悪させることが明らかになった。
2. 肝炎とともに肝臓に増加するMDSC(骨髄由来抑制細胞)が、NKT細胞依存性肝炎を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Treatment of mice with alpha-galactosylceramide, a specific agonist for NKT cells, induces liver injury. To investigate the mechanisms of a-GalCer induced liver injury, we focused on two factors, RASAL3 and MDSC(Myeloid-derive suppressor cells).

1. RASAL3 which is a hematopoietic RasGAP protein, was found to be predominantly expressed in liver NKT cells. Analysis of RASAL3-deficient mice demonstrated that RASAL3 contributes to aggravation of liver injury by regulating NKT cell function.
2. The number of myeloid-derive suppressor cells (MDSC) was increased in the liver of a-GalCer treated mice. These MDSCs were found to suppress liver injury by regulating NKT cell activation through the production of inhibitory cytokines.

研究分野：肝臓病学

キーワード：NKT細胞 肝炎 alpha-galactosylceramide RASAL3 骨髄由来抑制細胞

## 1. 研究開始当初の背景

NKT 細胞は、T 細胞、B 細胞、NK 細胞に次ぐ第 4 のリンパ球であり、通常の T 細胞とは異なり、糖脂質を認識する T 細胞である。人工的に合成された糖脂質である alpha-galactosylceramide (a-GalCer) は NKT 細胞を強力に活性化するが、これをマウスに投与すると、肝臓の NKT 細胞が活性化し、その自己反応性により正常な自己の肝細胞を攻撃し、肝障害が起こることを応募者は報告した (Eur J Immunol 30: 1919, 2000, 被引用回数: 217 回)。また、このモデルにおいて、B-1 細胞の活性化に伴う自己抗体産生が起こることも明らかにしている (Immunology 133: 21, 2011)。このモデルは、a-GalCer 誘導性肝炎あるいは NKT 細胞依存性肝炎と呼ばれ、自己免疫性肝炎マウスモデルとして研究

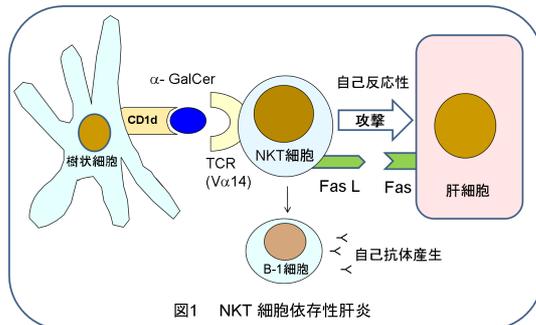


図1 NKT 細胞依存性肝炎

されている (図 1)。

この a-GalCer によって誘導される NKT 細胞依存性肝炎においては、活性化 NKT 細胞上に発現される FasL や TNF-a などが、肝細胞障害の誘導に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。最近、応募者は、この肝炎モデルにおいて、肝細胞障害の負の調節因子として、つまり肝細胞障害を抑制する因子として、CD94/NKG2A に注目して解析を行った。CD94/NKG2A は NK 細胞抑制レセプターのひとつであり、NK 細胞以外にも、NKT 細胞にも発現される。このレセプターからのシグナルが伝達されると、細胞の活性化が抑制される。このレセプターを欠損するマウスにおいて、あるいは抗体でこのレセプターの機能を抑制した状態で、肝炎を発症させると、過剰な NKT 細胞の活性化が起こり、劇症型の肝炎を発症し、約半数のマウスは死亡することが明らかとなった。つまり、CD94/NKG2A は、NKT 細胞の過剰な活性化を抑制し、肝炎発症のブレーキ役として機能することを見出した (Kawamura et al. J Immunol 182: 250, 2009)。この論文は、注目すべき論文として、掲載誌である Journal of Immunology の巻頭 "In This Issue" で紹介された。このように、CD94/NKG2A 抑制レセプターは、NKT 細胞による肝細胞障害が過剰にならないよう、また炎症を速やかに終息させる機能を果たすと考えられる。この研究によって、NKT 細胞活性化で誘導される肝炎において、肝細胞障害を抑制するメカニズムの一部が初めて

明らかとなった。しかしながら、この a-GalCer によって誘導される NKT 細胞依存性肝炎のメカニズムは完全には解明されていない (図 2)。

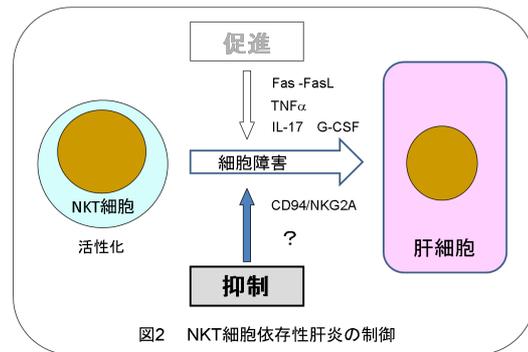


図2 NKT細胞依存性肝炎の制御

## 2. 研究の目的

NKT 細胞依存性肝炎は、NKT 細胞の活性化に伴い、肝炎が誘導されるが、その過程においては、肝細胞障害を促進あるいは抑制する要因によって制御され、それらのバランスによって肝細胞障害の程度が決定されると考えられる。肝細胞障害を促進する要因として、Fas-FasL、TNFα、IL-17、G-CSF などが挙げられ、また、抑制する要因として、応募者らが報告したとおり CD94/NKG2A が挙げられる。さらに解析を進める過程で、まだ他にも、この肝細胞障害抑制に關与する要因が存在することを示唆する以下の予備実験結果を得ている。

1. 我々が同定した新規の RasGAP protein である RASAL3 が、造血系細胞に発現され、そのなかでも、特に肝臓の NKT 細胞に強い発現が見られた。
2. a-GalCer を投与したマウスの肝臓で、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> 骨髄由来抑制細胞の増加が顕著である

これらの結果から、RasGAP protein RASAL3 および CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> 骨髄由来抑制細胞が、NKT 細胞依存性肝炎における肝細胞障害の抑制に關与しているのではないかと、この着想にいたった。

このような背景のもとに、本研究では、a-galactosylceramide によって誘導される NKT 細胞依存性肝炎において、肝細胞障害を抑制するメカニズムについて、以下の項目に焦点を当てて解析を行う。

1. 肝臓 NKT 細胞に強い発現が見られる RASAL3 が、NKT 細胞の機能を制御することにより、NKT 細胞依存性肝炎における肝細胞障害を抑制あるいは増悪する可能性。
2. 免疫抑制機能を持つ CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> 骨髄由来抑制細胞が、NKT 細胞の活性化に伴う肝細胞障害を抑制する可能性。

## 3. 研究の方法

糖脂質 a-galactosylceramide (a-GalCer) を

マウスに投与すると、肝臓の NKT 細胞が活性化し、その自己反応性により肝細胞障害を誘導する。この NKT 細胞依存性肝炎マウスモデルにおける肝細胞障害の制御機構について、肝細胞障害を抑制する要因を、これまでの予備実験の結果をもとに解析を進めた。応募者らが確立した a-GalCer 誘導性肝炎モデルを用いた。マウスに 2ug/匹の a-GalCer を静脈内投与し、肝炎を誘導した。肝炎の程度は、血清中 ALT 値および組織学的観察により判定した。

1. RASAL3 による NKT 細胞依存性肝炎の制御 RASAL3 の役割を明らかにするため、RASAL3 欠損マウスを作成した。RASAL3 欠損マウスに a-GalCer を投与し、NKT 細胞のサイトカイン産生能を、野生型マウスと比較した。また、その際、肝障害の程度に差があるかどうかを決定した。

2. 骨髄由来抑制細胞 MDSC による NKT 細胞依存性肝炎の制御

骨髄由来抑制細胞 MDSC は、CD11b と Gr-1 を共発現し、担癌状態や炎症状態で増加し、NK 細胞や T 細胞による免疫反応を抑制する機能を持つ。予備実験の結果、a-GalCer を投与したマウスの肝臓において、MDSC が著明に増加することを確認しており、病態への関与が予想された。MDSC が NKT 細胞の活性化を抑制し、肝細胞障害を抑制しているのではないかと仮説を立てた。

・ MDSC による NKT 細胞活性化の抑制

MDSC が、in vitro で NKT 細胞の活性化を抑制するかどうかを調べた。樹状細胞と NKT 細胞を分離し、a-GalCer を加えて NKT 細胞の活性化を誘導した。MDSC 存在下での NKT 細胞の活性化が抑制されるかどうかを、NKT 細胞より産生される培養上清中の IFN- $\alpha$  および IL-4 を ELISA により測定した。

・ MDSC による NKT 細胞の肝細胞殺傷抑制

a-GalCer によって活性化した NKT 細胞は、in vitro で自己の正常な肝細胞を殺傷する。MDSC の存在下で、NKT 細胞による肝細胞殺傷が抑制されるかどうかを、肝細胞を標的細胞とした LDH 放出細胞傷害試験により調べた。

・ MDSC によるサイトカイン産生能

肝炎で増加する MDSC が、どのようなサイトカインを産生するか。特に炎症抑制サイトカインである IL-10 の産生能を細胞内サイトカイン染色によるフローサイトメトリーで解析した。

・ MDSC の細胞移入による肝炎抑制効果

肝炎で増加する MDSC をセルソーターで分離し、細胞移入を行って肝炎が抑制されるかどうかを解析した。

#### 4 . 研究成果

我々が同定した新規の RasGAP protein であ

る RASAL3 が、造血系細胞に発現され、そのなかでも、特に肝臓の NKT 細胞に強い発現が見られた。RASAL3 の役割を明らかにするため、RASAL3 欠損マウスを作成した。RASAL3 欠損マウスに a-GalCer を投与し、NKT 細胞のサイトカイン産生能を、野生型マウスと比較したところ、RASAL3 欠損マウスでは、野生型マウスと比べて、IL-4、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の産生能が低下していた。また、RASAL3 欠損マウスでは、野生型マウスと比べて、NKT 細胞依存性肝炎の軽症化が見られた。これらの結果より、RASAL3 は、NKT 細胞の機能を制御し、NKT 細胞依存性肝炎を悪化させることが明らかとなった。

NKT 依存性肝炎マウスモデルにおいて、顆粒球系マーカーと単球/マクロファージ系マーカーを同時に発現する骨髄由来抑制性細胞 (myeloid derived suppressor cells: MDSC) が、肝臓や脾臓などで著明に増加することを見出した。さらに、この MDSC が NKT 細胞依存性肝炎の病態にどのように関与するかを調べた。NKT 細胞依存性肝炎で増加する MDSC は、Gr-1 の発現により、Gr-1 を高発現する Gr-1-high と、Gr-1 を中等度に発現する Gr-1-low の2つのサブセットに分けることができた。セルソーターでこの2つのサブセットの MDSC をソーティングし、NKT 細胞依存性肝炎を発症したマウスに移入したところ、Gr-1-high の MDSC は、NKT 細胞依存性肝炎を悪化させ、一方、Gr-1-low の MDSC は、NKT 細胞依存性肝炎を抑制することが明らかになった。さらにそのメカニズムを追及したところ、それぞれの MDSC は、TNF- $\alpha$  の産生を制御することにより、NKT 細胞依存性肝炎の病態を制御してい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2件)

1. Saito S, Kawamura T, Higuchi M, Kobayashi T, Yoshita-Takahashi M, Ymamazaki M, Abe M, Sakimura K, Kanda Y, Kawamura H, Jiang S, Naito M, Yoshizaki T, Takahashi M, Fujii M. RASAL3, a novel hematopoietic RasGAP protein regulates the number and functions of NKT cells. Eur J Immunol. 2015; 45: 1512-1523. (査読有) doi: 10.1002/eji.201444977.

2. Kanda Y, Kawamura T, Kobayashi T, Kawamura H, Watanabe H, Abo T. Reactivity of autoantibodies against not only erythrocytes but also hepatocytes in sera of mice with malaria. Cell Immunol. 2014; 289: 162-166. (査読有) doi: 10.1016/j.cellimm.2014.04.008.

[学会発表](計1件)

1. Kubo M, Satoh T, Ishiyama H, Tabata K, Tsumura H, Iwamura M, Baba S, Hayakawa K, Obata F, Kawamura T. Analysis of immune responses in prostate cancer patients received iridium-192 high-dose-rate prostate brachytherapy. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2017.

〔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：  
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) 研究代表者

川村 俊彦 (KAWAMURA, Toshihiko)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号：70301182

### (2) 研究分担者

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

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )