

令和元年6月18日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09376

研究課題名(和文) iNKT細胞による非アルコール性脂肪性肝炎の免疫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of immune therapy for non-alcoholic fatty liver disease with iNKT cells

研究代表者

高梨 正勝 (Takanashi, Masakatsu)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：80312007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は近年増加傾向にあり、肝硬変や肝細胞がんへの進行が高く、効果的な治療法がないため治療法の開発が望まれる。NSAHの治療に免疫療法を応用することにした。脂肪を標的とするiNKT細胞に着目し、NASHにおけるiNKT細胞の分布を確認するため、モデルマウスの作成を試みた。動物は高週齢マウス及び、ストレプトゾトシン投与によりインスリン低分泌による糖代謝異常を誘導したマウスで試みた。ストレプトゾトシン処理と高脂肪飼料給餌群において、脂肪による組織変性した肝臓を得た。このマウスの肝臓では無処置群と比較してiNKT細胞は少なく、NASHに伴い減少することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHは進行すると肝硬変、肝細胞がんを発症する増加傾向にある疾患で、効果的な治療法が未だ開発されていない。治療法の開発に必要なモデル動物の作成を試みた。マウスの作成には高脂肪飼料を給餌したのみの群ではNASH用の組織像は認められなかったインスリンの分泌を抑制することで糖代謝異常を誘導させたマウスに、高脂肪食を給餌すると脂肪による肝臓組織の変性が認められた。血清生化学測定でも肝臓の機能障害が認められた。この組織中のiNKT細胞の存在は無処置群に対して減少した。この結果からiNKT細胞を導入することでNASHによる病変の改善が予想される。現在、自己細胞からiNKT細胞の誘導法を検討している。

研究成果の概要(英文)： The patients with Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) increase in recent years. NASH progresses to be cirrhosis and hepatocellular carcinoma at a high rate. Because there is no effective treatment yet, development of therapy for NASH is desired. We tried to apply immunotherapy to the treatment of NSAH. We focused on fat-targeted iNKT cells and tried to make model mice to confirm the distribution of iNKT cells in NASH-liver. Model mice were used in high-week-aged mice and mice in which glucose metabolism abnormalities were induced by suppressing the secretion of insulin by the administration of streptozotocin (STZ). Degenerative livers were obtained in STZ and high-fat diet treatment mice. iNKT cells in the liver on NASH were decreased compared with that in non-treatment mice.

研究分野：実験病理学

キーワード：NASH 肝臓

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は診断および、その治療法についての開発が望まれており、現在、増加傾向にある疾患である。また、NASH の 20% は肝硬変、肝がんにまで進行することが報告されており、治療法の開発は急務である。原因はメタボリックシンドロームにあると考えられ、肝臓に蓄積した脂肪の代謝が必要である。NASH を含む脂肪性肝炎は蓄積された脂肪を減らすことにより肝機能を回復させることで進行を食い止めることが可能となる。肝臓中に蓄積された脂肪細胞の成長が炎症を誘発し、進行することで重篤な肝疾患に到達する。脂肪組織に長期間存在し、炎症の制御を担うインバリアント (iNK) T 細胞が明らかになりつつある。iNK 細胞は脂肪組織に多く存在し肥満が誘発する炎症やグルコース不耐性を防ぐ役割を担っている。肥満の発症の際には内臓脂肪中の iNK 細胞が減少することが報告されている。脂肪組織中に存在する iNK 細胞は CD1d 拘束性 T 細胞で、脂肪細胞膜上の CD1d にリガンドである脂質を標的とし、活性化することで脂肪組織中の炎症を防ぐ働きがあることが報告された。脂肪組織中に存在する iNK 細胞は CD1d 拘束性で、脂肪細胞膜上の CD1d にリガンドである脂肪細胞を標的とし、活性化することで IL-4 や IL-10 を産生することで抗炎症性マクドフェージの維持や抑制性 T 細胞の調製を行うことで脂肪組織中の炎症を防ぐ働きがあると考えられている。

2. 研究の目的

近年、増加傾向にある NASH 治療法の開発について脂肪を標的とする iNK 細胞を応用することで NASH の改善が可能か検討するため、NASH モデル動物を作成し、iNK 細胞の分布及び、その効果を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

脂肪組織炎症反応に対する iNK 細胞を応用した NASH の治療法を開発するために、NASH モデルマウスの作成を行った。

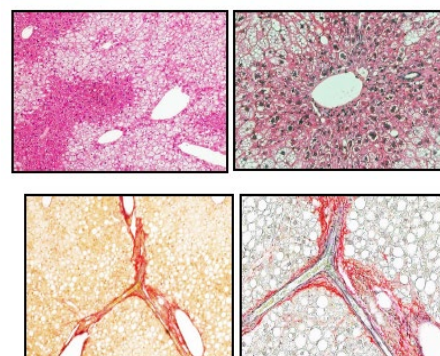
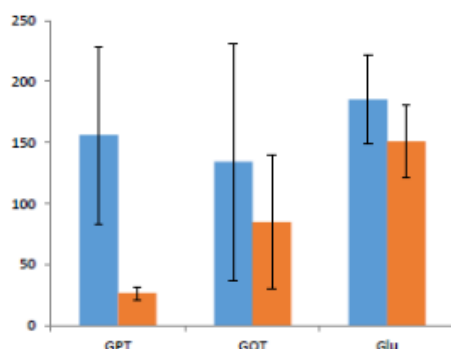
NASH 組織中の iNK 細胞の分布について確認を行った。

間葉系幹細胞からの iNK 細胞の誘導の条件検討を試みた。

4. 研究成果

NASH モデルマウスの作成のための条件検討を行った。

- 1) C57BL/6J 高週齢マウスへの高脂肪飼料の給餌は高週齢マウスに高脂肪飼料の給餌により NASH の誘導を試みた。給餌開始 4 週間目から肝臓への脂肪の蓄積が見られた。更に、長期間での高脂肪飼料の給餌は肝臓組織内の脂肪蓄積量に増加は認められたが、組織形態学的な NASH 特有の形態は認められなかった。また、動物の血清中の生化学的手法による肝臓逸脱酵素 (GOT、GPT) は正常飼料給餌群と比較して顕著な差は認められなかった。研究結果から C57BL/6J 高週齢マウスへの高脂肪飼料の給餌は単純性脂肪肝には誘導することが可能であるが、NASH までの発症には至らないと結論した。
- 2) 次に、ストレプトゾトシン (STZ) による耐糖能異常を誘導した C57BL/6J マウスに個脂肪食を給餌し、NASH モデルマウスの誘導を試みた。生後 3 日目のマウスの皮下に STZ を投与し、8 週間目から高脂肪飼料を給餌し、経時的に肝臓の変化と血液中の肝臓逸脱酵素について観察を行った。高週齢マウス同様に肝臓組織中での脂肪含有量が高いことは確認されたが、肝臓の組織形態は単純性脂肪肝用の状態を示し NASH で見られる偽小葉や肝線維化は認められなかった。また、血清中の肝逸脱酵素 (GOT、GPT) についても、正常飼料給餌群と比較して際だった変化は認められなかった。この実験系での条件では NASH 動物モデルの誘導は困難と考え、血管に対する疾患を誘導可能なマウスに着目し、C57L/J マウスは高コレステロール飼料を給餌することにより動脈硬化症を発症することが知られているため、このマウスを導入して、準備を進めている。
- 3) 再度、NASH モデルマウスの作成に STZ による誘導の条件を変え、検討をおこなった。生後 3 日目の C57BL/6J マウスに STZ を皮下に投与し、3 週間目より高脂肪飼料を給餌し、24 週間目まで観察を行った。経時的に肝臓の形態と血清中の肝臓逸脱酵素 (GOT、GPT) を測定して肝機能を確認した。8 週から 10 週間目までは前回同様な単純性脂肪肝様の組織形態を示し



た。12 週目後からの肝臓組織に脂肪を取り込んだ肝細胞のバルーン化が認められた。さらに、処置後の時間経過を伸ばし、16 週目ではバルーン化した肝細胞の壊死が確認され、血管周辺での線維化が確認された。血清中の肝臓逸脱酵素 (GOT、GPT) は高脂肪飼料給餌群と正常飼料給餌群との比較により、STZ と高脂肪飼料による肝機能の障害を伴うことを確認した。

- 4) NASH 肝臓組織中における iNKT 細胞の分布について、上記モデルマウスの肝臓凍結切片を用いて iNKT 細胞表面マーカーと考えられる抗 TCR 抗体、抗 CD4、CD8 が陽性な細胞を計測し、正常飼料給餌群との比較により、陽性細胞が低いことを確認した。このことから脂肪組織において減少すると考えられている iNKT 細胞は NASH 様モデルマウスの肝臓組織においても、存在する細胞数が減少すると考えられる。この細胞は炎症抑制機構に関与すると考えられており、制御性 T (Treg) 細胞の関与が考えられている。Treg 細胞の組織中の存在をマーカーである CD3 抗体と FoxP3 抗体で染色したところ、NASH 様のモデルマウスでは陽性細胞数は対照群の正常飼料給餌群より少ない結果を得た。NASH 組織中では iNKT 細胞の減少とこれに伴う、Treg 細胞の減少により、脂肪の肝細胞への脂肪の蓄積が炎症を制御する Treg 細胞を減少させることにより肝臓での炎症が発症すると考えられる。
- 5) NASH の発症を抑制するために、iNKT 細胞の誘導を試みた。C57BL/6J マウスの骨髄より骨髄細胞を採取し、IL-3 及び GM-CSF 茂樹により樹状細胞の誘導を行った。この細胞を抗原提示細胞とするために、 α -Gal Cer を添加して活性化した。さらに、iNKT 細胞として同系マウスの脾臓から V α 14iNKT-tetramer で精製した細胞を抗原提示細胞と共培養を行っているが、現条件では細胞の増殖が見られないため、条件検討を行っている。この方法で iNKT 細胞を大量に得ることにより、先に作成した NASH モデルマウスへの投与に寄る肝臓組織及び機能の改善効果を確認する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Umehara R, Kurata A, Takanashi M, Hashimoto H, Fujita K, Nagao T, Kuroda M. Fascin as a Useful Marker for Identifying Neural Components in Immature Teratomas of Human Ovary and Those Derived From Murine Embryonic Stem Cells. *Int J Gynecol Pathol*. 2018 May 30. doi: 10.1097/PGP.0000000000000528. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29851865. (査読有)
- ② Ikehata N, Takanashi M, Satomi T, Watanabe M, Hasegawa O, Kono M, Enomoto A, Chikazu D, Kuroda M. Toll-like receptor 2 activation implicated in oral squamous cell carcinoma development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 15;495(3):2227-2234. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.098. (査読有)
- ③ Kurata A, Yamada M, Ohno SI, Inoue S, Hashimoto H, Fujita K, Takanashi M, Kuroda M. Expression level of microRNA-200c is associated with cell morphology in vitro and histological differentiation through regulation of ZEB1/2 and E-cadherin in gastric carcinoma. *Oncol Rep*. 2018 Jan;39(1):91-100. doi:10.3892/or.2017.6093. (査読有)
- ④ Yamada Y, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ohno SI, Kuroda M. Novel form of miR-29b suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2017 Feb 24;12(2):e0171957. doi: 10.1371/journal.pone.0171957. eCollection 2017. (査読有)
- ⑤ Oikawa K, Mizusaki A, Takanashi M, Ozaki T, Sato F, Kuroda M, Muragaki Y. PRG4 expression in myxoid liposarcoma maintains tumor cell growth through suppression of an antitumor cytokine IL-24. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Mar 25;485(1):209-214. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.055. (査読有)
- ⑥ Kumagai K, Takanashi M, Ohno SI, Kuroda M, Sudo K. An improved Red/ET recombineering system and mouse ES cells culture conditions for the generation of targeted mutant mice. *Exp Anim*. 2017 May 3;66(2):125-136. doi: 10.1538/expanim.16-0075. Epub 2016 Nov 25. PMID (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Dendritic cell derived-exosomes activate immune systems by transferring exosome-involved factors to T cells. Masakatsu Takanashi, Shinobu Ueda, Katsuko Sudo, Masahiko Kuroda 第 77 回日本癌学会学実総会 2018 年 9 月 27 日~29 日 (大阪)
- ② Dendritic cell derived exosomes are suppressed tumor growth. Masakatsu Takanashi,

Shinobu Ueda, Hiroshi Mitsuda, Katsuko Sudo, Akio Ishikawa, Masahiko Kuroda. 第76回日本癌学会学術総会 平成29年9月28日～30日 (横浜)

- ③ Cancer for research Associate/conference on Tumor Immunology and Immunotherapy
Masakatsu Takanashi, Shinobu Ueda, Masahiko Kuroda. Analysis of dendritic cells derived exosomes suppress tumor growth. American Association 2018年10月2日～10月5日 (ボストン/米国)
- ④ Analysis of Dendritic Cells Derived exosomes That Suppressed Tumor Growth.
Masakatsu Takanashi, Yojiro Makino, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda, Masahiko Kuroda
World IASLC 18th World Conference on Lung Cancer 2017年10月15日～10月18日 (横浜)

[図書] (計3件)

- ① 最新医学 2018年73巻9号 p1237-p1242
エクソソームを用いた疾患治療と標的とした核酸医薬の現状と開発 高梨正勝 黒田雅彦
- ② パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線 第2節エクソソームの臨床応用について 2017年 p195-206 黒田雅彦 高梨正勝
- ③ 治療の Decision Making 脳神経外科診療プラクティスV 将来の標準治療の基盤となる再沈脳腫瘍学 4. 脳腫瘍バイオマーカーとしての microRNA 2017年 p260-261 上田しのぶ 黒田雅彦

[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：
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：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：上田 しのぶ

ローマ字氏名：Ueda Shinobu

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：助手

研究者番号 (8桁)：00521874

研究分担者氏名：須藤 カツ子

ローマ字氏名：Sudo Katsuko

所属研究機関名：東京医科大学
部局名：医学部
職名：兼任講師
研究者番号（8桁）：50126091

研究分担者氏名：村上 善基
ローマ字氏名：Murakami Yoshiki
所属研究機関名：大阪市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：00397556

研究分担者氏名：梅澤 明弘
ローマ字氏名：Umezawa Akihiro
所属研究機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター
部局名：再生医療センター
職名：副所長/再生医療センター長
研究者番号（8桁）：70213486

研究分担者氏名：黒田 雅彦
ローマ字氏名：Kuroda Masahiko
所属研究機関名：東京医科大学
部局名：医学部
職名：主任教授
研究者番号（8桁）：80251304

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。