

平成22年 5月17日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007年度～2009年度  
 課題番号：19790394  
 研究課題名（和文）自己免疫性肝炎における肝樹状細胞に着目した早期診断とその病態解明

研究課題名（英文）The analysis of the dendritic cells in liver is useful for the condition clarification and the earlier detection of the autoimmune hepatitis.

研究代表者 富山 智香子 (TOMIYAMA CHIKAKO)  
 新潟大学・医歯学系・助教  
 研究者番号：80359702

研究成果の概要(和文):自己免疫性肝炎の発症機序と早期特異的診断法の基礎的研究のために、モデルマウスの肝内樹状細胞の動態について検討を行った。その結果、モデルマウスの肝では活性化骨髄系樹状細胞が増加し、多量な炎症性サイトカイン産生を認めた。また、この肝障害を制御するには肝臓内の形質細胞様樹状細胞が部分的に必要な事が明らかとなった。さらに肝障害抑制には調節性T細胞も一部関連する可能性があり、血中においてTh2サイトカイン産生を認めた。このことから、自己免疫性肝炎における肝障害のコントロールには肝臓内の形質細胞様樹状細胞と制御性T細胞の連携が必要であり、これらをもとにした自己免疫性肝炎の早期発見及び新たな治療方法への基盤作成の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):We examined whether there was relationship between the proportional change of dendritic cells in the liver of model mouse and the condition of the autoimmune hepatitis. We hypothesized that these results were useful for the clarification of the early diagnostics and underlying mechanism of the autoimmune hepatitis. The plasmacytoid dendritic cells in liver decreased at early stage of liver injury. Activated conventional dendritic cells increased with the liver of the model mouse and produced a large amount of inflammatory cytokines. It explained that the intrahepatic plasmacytoid dendritic cells were necessary to prevention of liver damage. In this situation, the regulatory T cell also increased in liver of the mice. The prevention of the autoimmune hepatitis is necessary for the association between intrahepatic plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells. It was suggested that these findings were useful for the early diagnosis of autoimmune hepatitis and the new method of treatment in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	510,000	3,610,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：自己免疫性肝炎・肝臓・樹状細胞・調整性 T 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性肝炎は、肝障害の原因が自己免疫異常による慢性肝炎であるといわれている肝炎である。この疾患の国内における年間推定患者数は1400症例と少ないものの、特定疾患に認定されている難治性肝疾患の1つであり、欧米では日本と異なりウイルス性肝炎が少ないため、慢性肝炎の重要な原因の一つとされている。自己免疫性肝炎の発症機構、および肝炎の持続機構ともいまだに不明であるが、自己肝細胞に対する免疫寛容破綻が原因であることが言われてきている。また、特異的な診断方法がないために、診断や治療の遅れにより肝障害が急速に進行し肝硬変に至ると予後不良で、特に劇症肝炎は極めて予後が悪いといわれている。そのため早期の診断が重要であり、また特異的な診断方法の開発も今後重要となってくると考えられる。

樹状細胞は免疫機構においてはT細胞の活性化など橋渡しの役割を持つ非常に重要な細胞であり、自己免疫性肝炎においては、自己に対して攻撃をするような何らかの刺激を与えている可能性も考えられる。また、樹状細胞についての研究は、基礎や臨床の分野を問わず多くの研究者が精力的に取り組んでいる課題であり、最近肝臓から直接樹状細胞を採取、研究を行っているグループも出始めてきているものの、まだその数は少なく、多くの研究は末梢血あるいは骨髄などからサイトカインで誘導された樹状細胞が用いられている。申請者らはマウス肝より効率よく樹状細胞を分離する方法を樹立し、いくつかの基礎的な知見を得ているのみならず、種々の病態モデルマウスでも並行して実験を始めており、さらにはヒト肝臓検体をも用いての実験も行っている。これらの研究成果の一部は、日本免疫学会総会、樹状細胞研究会や日本肝臓学会などですでに報告している。本研究は、特異的な免疫応答を示す肝臓の樹状細胞の動態を解明し、臨床でのDC療法の基盤となるようにという点にて研究を進めるものであり、特にマウスとヒトDCの比較検討をも視野に入れるこのような研究は国内外で見られていない。

これらのことから、自己免疫性肝炎の樹状細胞に着目した病態解明は新たな治療法の基盤となるだけでなく、特異的な診断方法の開発にも役立つことが十分考えられることが本研究の背景と動機である。

## 2. 研究の目的

自己免疫性肝炎モデルであるconcanavalin A (Con A)誘導肝炎マウスの肝内樹状細胞に着目し、その動態と特異的な免疫応答が病態制御にどのように関連しているかについて、以下の点を検討しその機構を明らかにするとともに、検査診断学、および臨床応用免疫学としての樹状細胞療法の基盤研究の展開を目指す。

- (1) Con A誘導肝炎マウスの肝内樹状細胞の性状と肝障害の程度を示すトランスアミナーゼや自己抗体との相関性を明らかにする。
- (2) Con A誘導肝炎マウスと正常マウスの肝内樹状細胞の性状・機能を比較解析し、その差異を明らかにする。
- (3) Con A誘導肝炎マウスに正常マウスの肝や他の臓器の樹状細胞移植を行い、その発症を抑制できるかどうかを調べると共に、その機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 自己免疫性肝炎における肝内樹状細胞の性状解析

肝臓内の樹状細胞は非常に少数であり、解析困難であると各研究グループから報告されているが、申請者らは独自の酵素処理・比重遠心法を用いて効率よく分離する方法を樹立しており、本研究ではこの方法を用いる。また、自己免疫性肝炎モデルについては、いくつか知られているが、最も効率的に自己免疫性肝炎を誘導できる Concanavalin A (Con A)の静脈的投与(15mg/kg)を用いる。これらの方法を用いて標的臓器である肝と、対照として末梢リンパ臓器である脾の樹状細胞を採取し、その細胞表面抗原の違いをフローサイトメトリーにて解析する。また、その際に血清を採取し、トランスアミナーゼと自己抗体についても測定を行う。すでに正常樹状細胞についての解析はほぼ終了しており、肝樹状細胞は脾のそれは成熟型であるのに対し、未熟型、あるいは抑制型である。しかし、自己免疫性肝炎では

- ① 肝障害が起こる前に肝内樹状細胞が激減し、肝内に残存する樹状細胞は機能的分子の発現低下を認める
- ② 肝障害の極期には肝内樹状細胞が増加し、この樹状細胞は機能的分子の発現低下を認める

という2点の予備的検討結果が得られており、この点をさらに追究することは、自己免疫性肝炎の早期発見において重要な意義があると思われる。

#### (2) 正常肝樹状細胞の機能解析

正常肝樹状細胞の抗原提示能は、卵白アルブミン(OVA)抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローンによる増殖応答、および異種リンパ球混合反応で検討しているものの、脾樹状細胞と比してその能力は低い。性状解析と同様に機能的に未熟とも考えられるが、抑制機能(サイトカインやネガティブシグナル)を有する可能性も考えられ、この点に焦点を当てて解析を行う。一般的に、抑制性サイトカインに関してはIL-10が、ネガティブシグナルについてはCD22、CD72やFcγR II Bの関与が報告されているので、この点に焦点を当てる。サイトカイン産生について、

- ① 肝樹状細胞の方がIFN $\alpha$ の産生が多い
- ② IL-12は肝、脾の樹状細胞とも同程度の産生量を有する
- ③ 肝樹状細胞はIL-10のmRNAの発現が高いという予備的解析結果が得られているため、さらにこの点について追究する。

#### (3) 正常肝樹状細胞移入によるモデルマウス(Con A肝炎マウス)の肝障害抑制の解析

実験でCon A肝炎マウスに正常マウスの肝、及び脾樹状細胞を移入しその肝障害が抑制されるかどうかについて検討を行う。抑制を認めた場合には、以下の点について検討を行う。

- ① 肝樹状細胞のサイトカイン産生能：IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IL-4、IL-10、TGF $\beta$ 、IL-17など
- ② 樹状細胞を移入したときの制御性T細胞の割合変化：FoxP3陽性細胞の検討
- ③ 樹状細胞の免疫寛容誘導能

以上の3点に焦点を当てて解析を行うことにより、自己免疫性肝炎における樹状細胞の機能を制御し治療するという新たな樹状細胞療法の基礎的研究となることが示唆される。

#### 4. 研究成果

免疫寛容破綻の原因として樹状細胞の副シグナル発現異常、及び制御性T細胞の減少が知られていることから、自己免疫性肝炎でこの2つの細胞群が関連している可能性が十分考えられたため、当該研究ではモデルマウスを用いて標的臓器である肝臓に着目して検討を行った。その結果、自己免疫性肝炎モデルマウスの肝では肝障害初期から形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell: pDC)が減少し、肝障害が終息する24時間後になっても回復しなかった。次に、肝臓及び脾臓において骨髓系樹状細胞

(conventional dendritic cell: cDC)が増加し、更にはMHC class II分子、CD80、CD86といった副刺激因子の発現が増強し、活性化を認めた。この活性化cDCは、IL-12p70、TNF $\alpha$ 、IL-6、MCP-1を多量に産生していた。また、この肝障害を制御するには肝臓内のpDCが部分的に必要な事を移入実験により明らかにした。この肝障害抑制機構を解明するために、NKT細胞のアポトーシス抑制について検討した。このNKT細胞は肝障害の主たるエフェクター細胞であるが、これは肝細胞を攻撃する時に自身もアポトーシスを起こす事が知られている。正常マウスから採取してきた肝臓のpDCを移入し、肝障害が抑制された群のマウスの肝臓内のNKT細胞は減少し、アポトーシスを起こしていたため、この結果からは、pDCの抑制機構にはNKT細胞のアポトーシスを防ぐことはできなく、この機構にはNKT細胞以外のエフェクターを抑制している可能性が示唆された。さらに肝障害抑制が見られた樹状細胞移入群において、肝臓内での調節性T細胞の増加傾向を認め、この時には血中においてIL-10産生を認めた。このことから、自己免疫性肝炎の肝障害の調節には肝樹状細胞、その中でもpDCが部分的に必要なであり、その抑制機構には調節性T細胞やIL-10も関わっている可能性が示唆された。よって、当該研究結果から自己免疫性肝炎における肝障害のコントロールには肝臓内のpDCと制御性T細胞の連携が必要であり、これらをもとにした自己免疫性肝炎の早期発見及び新たな治療方法への基盤作成の可能性が示唆された。

#### 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0件)

[学会発表] (計2件)

(1) 富山智香子: Possible role of hepatic dendritic cells in preventing liver injury induced by concanavalin A. 第38回日本免疫学会・学術総会、2008年12月1~3日、京都

(2) 富山智香子: Proportional change of liver dendritic cells in concanavalin A-induced hepatitis. 第37回日本免疫学会・学術総会、2007年11月20~22日、東京

[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

[http://www.clg.niigata-u.ac.jp/~tomiya  
a/tomiHP/toppage.html](http://www.clg.niigata-u.ac.jp/~tomiya<br/>a/tomiHP/toppage.html)

## 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・助教

研究者番号：80359702

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

渡部久実 (WATANABE HISAMI)

琉球大学熱帯生物圏研究センター・分子

生命科学研究施設・感染免疫制御学分

野・教授

研究者番号：50143756