

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860248

研究課題名(和文)肝免疫細胞における核内受容体LXRの機能解析

研究課題名(英文)Effects of LXR on innate immune responses in hepatic mononuclear cells

研究代表者

梅田 香織 (ENDO-UMEDA, Kaori)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：10445744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Liver X receptor (LXR)は体内でコレステロール代謝調節センサーとして働く一方、免疫細胞において炎症抑制作用を有することが知られている。本研究では、LXRが高発現及び機能する主要臓器である肝臓に着目し、肝臓に常在する免疫細胞におけるLXRの機能を解析した。野生型に対し、LXR欠損マウスでは肝臓総免疫細胞数が増加した。高炎症誘導能を有する骨髄由来マクロファージが増加しており、リポ多糖などへの感受性が増強した。一方、ナチュラルキラーT細胞は減少し、サイトカイン産生能を消失した。以上の知見より、LXRは肝常在免疫細胞の分布及び機能において重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The liver X receptor (LXR) plays a role in regulation of cholesterol homeostasis. LXR is also involved in inflammation and immunity. However, a role of LXR in liver immune cells remains unclear. In this study, we investigated effects of LXR on distribution and function of mouse hepatic mononuclear cells. As compared with wild-type mice, the total cell number and the proportion of bone marrow derived macrophages were increased in the liver of LXR-deficient mice. Proinflammatory cytokine production induced by lipopolysaccharide was also enhanced in LXR-deficient mice. On the other hand, the proportion of hepatic natural killer T cells was decreased and their cytokine production capacity was defected in LXR-deficient mice. We showed that LXR may be an important mediator that regulates hepatic immune cell population and cytokine production.

研究分野：生化学

キーワード：liver X receptor 炎症 肝臓 マクロファージ NKT細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)核内受容体 liver X receptor (LXR)はオキシステロールをリガンドとして認識する転写因子であり、肝臓や脂肪組織などの代謝臓器に局在する LXR α 及び全身に発現する LXR β の2種類のアイソフォームが存在する。LXR欠損マウスを用いた解析により、LXRはコレステロール代謝調節センサーとして働くことが明らかとなった (Peet et al., Cell, 93:693-704, 1998)。さらに、初代培養マクロファージを用いた検討により、LXRがNF- κ Bプロモーターの活性を抑制するメカニズムで抗炎症作用を有することが報告された (Joseph et al., Nat Med, 9:213-219, 2003)。以上の報告より、LXRは抗動脈硬化作用などの代謝調節因子としての働きだけではなく、炎症抑制因子としても注目されている。しかし、これまでのLXRの抗炎症作用による報告は上記初代培養マクロファージや細胞株などの単一培養系での報告に限定されており、多様な細胞が混在する生理的条件下でのLXRの自然免疫調節機構の検討としては未だ不十分である。

(2)肝臓にはマクロファージやナチュラルキラー (natural killer, NK)細胞、NKT細胞、T細胞、B細胞などの多数の免疫細胞が存在し、外来異物の排除や炎症制御を行っている。近年、肝臓に存在するマクロファージには肝常在 Kupffer 細胞及び骨髄由来マクロファージの2種類の細胞が存在すること、前者は食能及び活性酸素産生能に特化し F4/80 及び CD68 陽性の表面抗原パターンを有すること、一方、後者は高炎症性サイトカイン産生能を保持し F4/80 及び CD11b 陽性の表面抗原パターンの特徴を有することが報告された (Kinoshita et al., J Hepatol, 53:903-910, 2010)。このうち、骨髄由来マクロファージはマウスに高コレステロール食もしくは高脂肪及び高コレステロール食を付加すると、肝臓へのコレステロール蓄積に伴い増加し、慢性炎症惹起に関与することが報告された (Shono et al., Shock, 36:484-493, 2011)。

(3)以上、先述の(1)及び(2)の知見より、LXRが脂質代謝及び自然免疫調節に関与すること、肝臓はLXRが高発現し機能する主要な臓器であること、マウスへの高コレステロール食付加による肝脂質代謝系の変化が肝常在免疫細胞組成及び機能に影響することに着目し、肝臓免疫細胞におけるLXRが肝免疫恒常性に重要な役割を担う可能性を予想した。

2. 研究の目的

本研究ではコレステロール代謝調節センサーとして働くLXRが抗炎症作用を有することに着目し、(1)野生型マウスとLXR欠損マウスの肝常在免疫細胞組成の比較、(2)野生型またはLXR欠損由来肝臓免疫細胞における炎症反応の比較を行うことにより、肝臓免疫細胞

におけるLXRの選択的機能を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)野生型またはLXR欠損由来肝臓免疫細胞の分布の比較。C57BL/6J(野生型)、Lxr α (-/-)(LXR α 欠損)、Lxr β (-/-)(LXR β 欠損)、Lxr α (-/-);Lxr β (-/-)(LXR α/β ダブル欠損)マウスの肝臓よりコラゲナーゼ消化、パーコールを用いた比重分画法により免疫細胞を単離した。単離した細胞を用いて肝常在 Kupffer 細胞、骨髄由来マクロファージ、NK細胞、NKT細胞、B細胞などの各免疫細胞分布をフローサイトメトリーを用いて評価した。

(2)全肝臓または肝臓免疫細胞における遺伝子発現解析。野生型またはLXR α/β 欠損マウスより全肝臓または肝臓免疫細胞を単離し、マクロファージマーカー遺伝子、炎症マーカーなどの遺伝子発現をリアルタイムPCR法を用いて定量した。

(3)初代培養肝臓免疫細胞におけるToll様受容体(Toll like receptor, TLR)リガンド誘導性サイトカイン産生能に対するLXRの影響。
①LXR欠損の影響。野生型またはLXR α/β 欠損マウスの肝臓より単離した免疫細胞に Kupffer 細胞や骨髄由来マクロファージを刺激する、TLR4リガンドであるリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS)またはTLR9リガンドであるCpG-DNAでそれぞれ刺激し、リアルタイムPCR法またはELISAを用いてサイトカイン発現量を定量した。
②LXR活性化の影響。野生型マウスの肝臓より免疫細胞を単離し、LXRの合成アゴニストであるT0901317またはGW3965を添加し一晩培養した。LPSで刺激後、①と同様にサイトカイン発現量を定量した。

(4)LPS投与による*in vivo*急性炎症モデルにおけるLXR欠損の影響。野生型、LXR α 欠損、LXR β 欠損、LXR α/β ダブル欠損マウスにLPSを尾静脈投与し、経時採血を行った。血中トランスアミン値の測定及びELISAを用いた炎症性サイトカイン値の定量を行った。

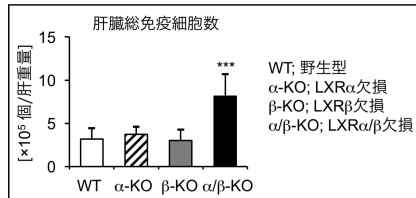
(5)肝臓由来初代培養免疫細胞におけるインバリエントNKT(invariant NKT, iNKT)細胞リガンド誘導性サイトカイン産生能に対するLXR欠損の影響。野生型またはLXR α/β 欠損マウスの肝臓より単離した免疫細胞にiNKT細胞を特異的に活性化する α -ガラクトシルセラミド(α -Galactosylceramide, α -Gal Cer)を用いて刺激し、リアルタイムPCR法を用いてサイトカイン発現量を定量した。

(6)全ての実験は2~4ヶ月齢の雄マウスを用いて実施した。また、遺伝子組換え実験についてはカルタヘナ法及び日本大学遺伝子組

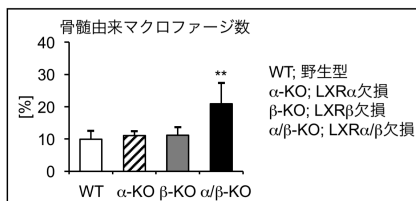
換え実験規程に基づいて実施した。動物実験については日本大学動物実験内規に定める手続きを踏まえた上で実施した。

4. 研究成果

(1) 野生型、LXR α 欠損、LXR β 欠損、LXR α/β ダブル欠損マウスの肝臓より免疫細胞を単離した結果、LXR α/β 欠損マウスにおいて肝重量あたりの総免疫細胞数が約 2 倍増加していた(下図)。

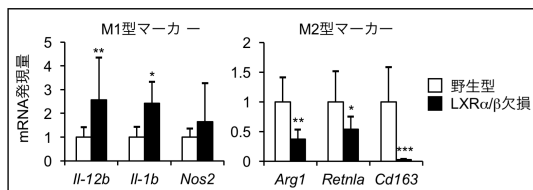


各免疫細胞分布を評価したところ、LXR α/β 欠損マウスにおいて骨髄由来マクロファージ (F4/80 及び CD11b 陽性細胞) が増加していた(下図)。



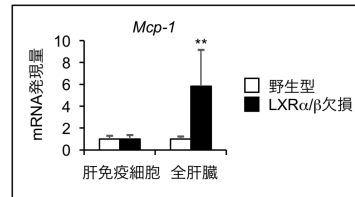
その一方で iNKT 細胞の顕著な減少を認めた。肝常在 Kupffer 細胞 (F4/80 及び CD68 陽性細胞)、NK 細胞、T 細胞、B 細胞の分布はいずれも野生型との変化を認めなかった。以上の結果から、LXR 欠損により肝臓に常在するある種の免疫細胞組成が変化することが明らかとなった。また、LXR α または LXR β シングル欠損マウスにおいては野生型との変化を認めなかったことから、肝臓における免疫細胞分布の維持には LXR α 及び LXR β 両方が関与することが明らかとなった。

(2) 野生型または LXR α/β 欠損マウスより全肝臓または肝免疫細胞を単離し、遺伝子発現解析を行った。その結果、LXR α/β 欠損マウス由来全肝臓及び肝免疫細胞において、マクロファージの一般的な表面マーカー (*Emr1*, *Itgam*, *Cd68*) の発現が増加していた。また、肝免疫細胞において炎症誘導性 M1 型マクロファージのマーカー遺伝子群 (*Il-1b*, *Il-12b*, *Nos2*) の発現増加、一方で抗炎症性 M2 型マクロファージのマーカー遺伝子群 (*Arg1*, *Cd163*, *Retnla*) の発現低下を認めた(下図)。



次に、先述 (1) の通り、LXR α/β 欠損の肝臓において骨髄由来マクロファージの増加を認めたことから、骨髄からの単球/マクロファージの流入に関するケモカイン *Mcp-1*

の発現を評価した。その結果、LXR α/β 欠損由来全肝臓で顕著な増加を認めた(下図)。

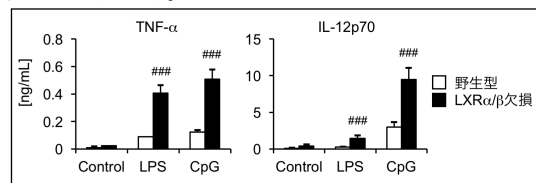


一方、肝免疫細胞では変化を認めなかったことから、LXR α/β 欠損マウスの肝臓において、免疫細胞以外の間葉系星細胞や類洞内皮細胞などが *Mcp-1* を高発現している可能性が示唆された。

以上の結果より、LXR α/β 欠損マウスの肝臓では M1 型骨髄由来マクロファージが増加し、炎症を惹起しやすい環境に変化していることが示唆された。

(3) マウスの肝臓から単離した初代培養免疫細胞に TLR リガンドである LPS または CpG-DNA 刺激後のサイトカイン産生能を評価した。

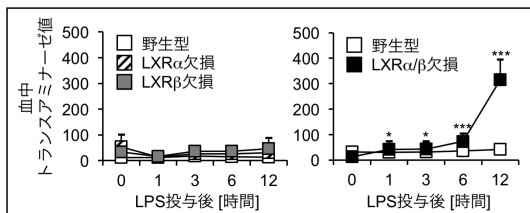
① 野生型または LXR α/β 欠損マウス由来肝免疫細胞に LPS または CpG-DNA で刺激した結果、野生型、LXR α/β 欠損共に *Tnf*, *Il-12b*, *Il-1b*, *Nos2* などの炎症性サイトカイン遺伝子の有意な発現増加を認めた。上記 TLR リガンド刺激により *Lxr α* または *Lxr β* それぞれの遺伝子発現変化は認めなかった。LXR α/β 欠損由来細胞では上述のサイトカイン遺伝子の産生量は野生型と比較し顕著な増加を認めた(下図)。



本実験で得られた結果は、LXR α/β 欠損マウスの肝臓において高炎症誘発能を有する骨髄由来マクロファージ数が増加している (1) の知見と一致した。また、これまで報告による、チオグリコレート培地投与により単離した初代培養マクロファージで得られた知見とも一致しており (Joseph et al., Nat Med, 9:213-219, 2003)、非誘導性の肝常在性免疫細胞においても LXR 欠損細胞は高炎症誘発能を有することが示された。

② 野生型マウスの肝臓より単離した免疫細胞に LXR の合成アゴニストである T0901317 または GW3965 を用いて前刺激したところ、LPS 誘導性の *Tnf*, *Il-12b*, *Il-1b*, *Nos2* などの炎症性サイトカイン遺伝子の発現が低下した。先述①、及びチオグリコレート培地投与により単離した初代培養マクロファージを用いた過去の報告と相関し (Hong et al., J Lipid Res, 52:531-539, 2011)、肝臓常在性免疫細胞においても LXR の活性化により炎症性サイトカイン産生能が抑制される知見を見出した。

(4) 肝臓免疫細胞における LXR の影響を個体レベルで検討するため、LPS 尾静脈投与による急性炎症モデルを構築した。野生型、LXR α 欠損、LXR β 欠損または LXR α/β ダブル欠損マウスに LPS を投与したところ、LXR α/β 欠損マウス群のみにおいて、LPS 投与 24 時間以内に全ての個体がエンドトキシンショックにより死亡した。投与 12 時間後までに採取した血漿を用いて血中炎症性サイトカイン値を定量したところ、野生型、LXR α 欠損、LXR β 欠損において同等レベルの TNF- α 、IFN- γ 、IL-12p70 及び CCL2 の一過性産生増加を認めた。一方、LXR α/β ダブル欠損マウスにおいてはこれらのサイトカイン濃度は顕著に増加しており、先述(3)の肝免疫細胞初代培養系における検討で得られた知見が *in vivo* においても観察された。血中トランスアミナーゼ値を測定したところ、野生型、LXR α 欠損及び LXR β 欠損においては LPS 投与による変化を認めなかったが、LXR α/β ダブル欠損においては LPS 投与 1 時間後より有意に増加した(下図)。



(5) 野生型または LXR α/β 欠損由来免疫細胞を α -GalCer で刺激し、*Il-4* または *Ifn-g* の mRNA 発現量を定量することにより NKT 細胞の活性を評価した。野生型では α -GalCer 刺激 6 時間後に *Il-4*、*Ifn-g* または *Tnf* 遺伝子の有意な発現増加を認めた。一方、LXR α/β 欠損由来細胞では、これらのサイトカイン発現誘導は完全に消失した。以上の結果より、LXR 欠損マウスの肝臓において、NKT 細胞は細胞数の減少のみならず、サイトカイン誘導活性を消失するという新しい知見が得られた。

(6) 以上、(1)から(5)の検討により、LXR は肝臓免疫細胞の分布及び炎症反応を制御する重要な分子であることを明らかにした。LXR α/β ダブル欠損マウスにおいて骨髄由来 M1 型マクロファージが増加し、炎症反応を増悪させること、その原因として肝臓における Mcp-1 発現増加が骨髄からの単球/マクロファージの流入を増加させる知見を得た。また、一方で肝臓に豊富に存在する iNKT 細胞数は減少し、リガンド誘導性サイトカイン産生能を消失するという興味深い知見が得られた。NKT 細胞については細胞自身の分化、成熟化過程の異常、または Kupffer 細胞、マクロファージなどの他の免疫細胞とのコミュニケーション変化の影響が予想されるが、メカニズムの解明は今後の課題である。肝免疫恒常性には肝脂質代謝調節系が密接

に参与しており、LXR が両シグナル間の機能連関に重要な役割を担うことが予想される。現在、LXR α 欠損マウスへの西洋食付加による慢性肝障害モデルの解析を進めており、肝免疫細胞における LXR の重要性をさらに追求していく予定である。

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 1 件)

- ① 梅田 (遠藤) 香織、中島弘幸、関修司、槇島誠. 肝免疫系細胞における脂質代謝及び自然免疫調節機構に対する核内受容体 LXR の影響. 日本大学医学部総合医学研究所紀要、査読無し、2 巻、2014、61-62

[学会発表] (計 5 件)

- ① 梅田 (遠藤) 香織、中島弘幸、関修司、槇島誠. 肝免疫細胞における自然免疫調節機構に対する核内受容体 LXR の影響. 第 1 回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会、2015 年 8 月 28 日、大津プリンスホテル (滋賀県・大津市)
- ② Endo-Umeda K, Nakashima H, Seki S, Makishima M. Liver X receptor modulates innate immune response in hepatic mononuclear cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ③ 梅田 (遠藤) 香織. 肝臓免疫系細胞の自然免疫調節機構に対する核内受容体 LXR の役割. 細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会、2014 年 12 月 5 日、生理学研究所 (愛知県・岡崎市)
- ④ 梅田 (遠藤) 香織、中島弘幸、関修司、槇島誠. 高脂肪高コレステロール付加肝障害モデルにおける核内受容体 LXR の脂質代謝及び自然免疫調節機構の解明. 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑤ 梅田 (遠藤) 香織、中島弘幸、関修司、槇島誠. 肝免疫系細胞における自然免疫調節機構に対する核内受容体 LXR の影響. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 香織 (ENDO-UMEDA, Kaori)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：1 0 4 4 5 7 4 4