

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08977

研究課題名(和文) 脂質代謝と肝樹状細胞を組合せた自己免疫性肝炎の早期診断法の開発

研究課題名(英文) Exploration of early diagnosis for autoimmune hepatitis by combining lipid metabolism and liver dendritic cells.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性肝炎において脂質代謝と肝樹状細胞を介した免疫寛容破綻と発症との関連を明らかにすることを目的とした。本研究に、脂質代謝異常モデルとして卵巣摘出および高脂肪食摂取マウスを用いた。その結果、卵巣摘出モデルにおいて、肝CD11b+cDCの数的増加と産生されたTNF- α によりAIHが増悪する可能性が示唆された。一方、高脂肪食摂取マウスにおいては、AIH肝障害は増悪するものの、肝臓より脾臓にXCR1+cDCの集積を認め、卵巣摘出モデルとは異なる機序である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患は免疫寛容の破綻が原因とされているがその発症については未だ解明されていないものが多い。自己免疫性肝炎についても同様であり、近年中年女性だけでなく男性患者の増加や診断時年齢の高齢化の報告もあることから、性差だけではない発症原因が予想される。今回、低エストロゲンモデルと実験的高脂血症モデルを用いて免疫応答を始動する樹状細胞の動態から発症原因を探索することは複雑化している発症原因と免疫寛容破綻との関連性を解明できるため、AIHだけでなく自己免疫性疾患の診断や治療法の基盤作成に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the relationship between immune tolerance disruption and onset of AIH through lipid metabolism and hepatic dendritic cells. In this study, ovariectomized and high fat diet-fed mice were used as a model of lipid metabolism disorder. It was suggested that liver injury may be exacerbated by a large amount of TNF- α producing hepatic CD11b+ cDCs in OVX mice induced AIH. On the other hand, it was observed that XCR-1+ cDCs accumulate in spleen of high-fat diet mice induced AIH. It was suggested that the mechanism of exacerbation of AIH in high fat diet-fed mice may be different from that in the ovariectomized model.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫性肝炎 樹状細胞 脂質 低エストロゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性肝炎(autoimmune hepatitis: AIH)は、中年以降の女性に好発する慢性でかつ進行性の肝障害である。しかし近年、男性患者の増加および診断時年齢の高齢化傾向の報告があることから、AIHの発症原因には複数の因子が関与することが予想され、発症機構の解明をより複雑にしている。さらに肝障害成立の原因解明にも至っていないため、診断には除外診断、一般的な抗核抗体および病理組織学的診断が使用されている。治療においても副腎皮質ホルモンを主体とした非特異的免疫抑制療法がとられているが、一部には診断の遅れによるステロイド抵抗性症例や肝移植による治療のみとなる重症例もあるため、早期診断は重要である。

AIHの発症機序として、制御性T細胞の数的減少・質的異常[Ferri S, et al, Hepatol, 52, 999 (2010), Longhi MS, et al, J Immunol, 176, 4484 (2006)]、および抑制調節解除状態におけるIL-18産生樹状細胞(dendritic cell; DC)とCXCR3-CXCL9ケモカインシグナルを介したAIH様肝障害の惹起などが報告されている[Ikeda A, et al, Hepatol, 60, 224 (2014)]。これらのことは、AIH発症に自己肝細胞の免疫寛容の破綻が関与することを強く示唆するが、AIHにおけるこの破綻の引き金となる因子についても分かっていない。

そこで、破綻の引き金となる因子を解明するため、我々はAIHモデルにおいて、1)肝障害は肝形質細胞様樹状細胞の消失と活性化した骨髄系樹状細胞の炎症性サイトカイン産生を誘導して起こること[Clin Exp Immunol, 166, 258 (2011)]、2)これら動態変化はエストロゲンを介したシグナル伝達により抑制・増悪する可能性について報告している。

2. 研究の目的

近年AIHは男性患者および重症例の増加など女性だけではなく発症・病態進展要因も出てきている。そこで、本研究では低エストロゲンモデル、並びにエストロゲン低下でも起こり男女共通する脂質代謝異常と肝形質細胞様樹状細胞との免疫寛容破綻への直接的影響を解明することを目的とし、複数因子を焦点とすることでAIHの早期診断・新規治療法の開発の基盤となる可能性を追究する。研究の前半では低エストロゲンマウスの系によるAIH肝障害への肝樹状細胞の影響について検討を行い、後半では高脂肪食摂取マウスの系による検討を行った。

3. 研究の方法

(1)マウス

6~12週齢の雌性C57BL/6NCrI (B6N, Charles River)マウスを各種実験に用いた。全ての動物実験は、新潟大学動物実験倫理委員会の審査・承認を経て行った。

(2)各種モデルマウスの作製

低エストロゲン状態の誘導には卵巣摘出術を用い、麻酔下において両側卵巣を卵管部より結紮後切除し、術後2週間飼育し実験に用いた。対照群として偽手術マウスを実験に用いた。高脂肪食摂取マウスは、糖尿病・肥満研究用高脂肪飼料(粗脂肪含量32%、総エネルギー中の脂肪由来のカロリー比(Fat kcal%)約60%)を4週間自由摂取させ実験に用いた。通常食(粗脂肪含量4.5%)摂取マウスを対照群とした。AIH肝障害誘導には、Concanavalin A (Con A, type) 10mg/kgを静脈内投与し解析に用いた。

(3)フローサイトメーター解析

DCおよびT細胞の解析は、各種蛍光色素標識抗体で細胞を染色後、FACS Caliburで解析した。

(4)DCおよび血清中のサイトカイン解析

磁気ビーズ法により純化したDCを一晩培養(37℃、5%CO₂)した後に上清を回収した。また、各種モデルマウスにAIHを誘導し、血清採取を行った。培養上清および血清中の各種サイトカイン量についてELISAキットを用いて測定した。

(5)統計学的解析

データは全て有意差検定を行い、P < 0.05を有意差有りとした。

4. 研究成果

(1)低エストロゲンとAIH肝障害の程度との関連

低エストロゲンマウスと偽手術マウスにAIH肝障害を誘導し、血清中のALT、AST値測定を行った。その結果、血清中ALT、AST値共に低エストロゲン状態マウスの方が有意に高値であった。

(2)低エストロゲンにおけるAIH肝障害時のDC動態変化

低エストロゲンマウスにAIH肝障害を誘導し、DCの動態変化について検討を行った。その結果、AIH肝障害において低エストロゲンでは肝CD11b⁺cDCの割合、絶対数とも有意に増加した。一方、PDCA-1⁺pDCおよびCD103⁺cDCにおいては低エストロゲンの影響を認めなかった。さらに、

DC サブセットのうちエストロゲン低下により増加を認めた CD11b⁺cDC における機能的分子の発現を検討した結果、CD86、CD40 共に影響は認められなかった。

(3) 低エストロゲン AIH マウスの DC および血清サイトカインアッセイ

AIH を誘導した低エストロゲンマウスから肝 DC を純化・培養し、そのサイトカイン産生について検討を行った。その結果、低エストロゲン状態では IL-12 産生が有意に増加したものの、TNF- α はエストロゲンの有無に関係なく高値であった。一方、エストロゲン存在下での AIH 誘導時には肝 DC の IL-10 産生増強を認めるものの、低エストロゲン状態ではその増強を認めなかった。また、血清中のサイトカイン量については AIH を誘導した低エストロゲンマウスの TNF- α および IFN- γ 濃度が有意に高値であった。

(4) AIH における effector 細胞への低エストロゲンの影響

前述の AIH 誘導低エストロゲンマウスの血清 IFN- γ 高値の結果から、effector 細胞に対する低エストロゲンの影響が予想されたため、検討を行った。その結果、CD69 陽性 CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞の絶対数増加を認めた。この変化はエストロゲン存在下で認めなかった。

(5) 高脂肪食摂取マウスを用いた AIH 肝障害の検討

高脂肪食摂取マウスに AIH 肝障害を誘導し、血清中の ALT, AST 値測定を行った。その結果、血清中 ALT, AST 値共に高脂肪食摂取マウスの方が通常食摂取マウスに比して有意に高値であり、かつ死亡例も認めた。DC の総数については、高脂肪食摂取マウスに AIH を誘導することで標的臓器である肝臓よりも脾臓への集積を認めた。さらに DC の分画変化においては、脾臓での XCR1⁺cDC の増加が顕著であった。一方、SIRP α ⁺cDC は微増、PDCA-1⁺pDC は減少していた。

これらの成果から、低エストロゲン条件下では、1)肝 T 細胞の活性化、2)肝 CD11b⁺cDC の数的増加と DC の産生するサイトカインが肝障害を誘導し、AIH が増悪する可能性が示唆された。これらの発見により中年女性における AIH の早期特異的診断や治療の基盤作りへの可能性を見出した。一方、脂質と AIH 肝障害の関連する可能性は低エストロゲン状態での傷害機序とは異なる可能性が示唆され、今後さらに検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Maekura Ryoji, Kitada Seigo, Osada Oka Mayuko, Tateishi Yoshitaka, Ozeki Yuriko, Fujicawa Takeya, Miki Mari, Jyunko Ogawa, Mori Masahide, Matsumoto Sohkiichi	4. 巻 63
2. 論文標題 Serum antibody profiles in individuals with latent Mycobacterium tuberculosis infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 130 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Loewen Jaycie L., Albertini Giulia, Dahle E. Jill, Sato Hideyo, Smolders Ilse J., Massie Ann, Wilcox Karen S.	4. 巻 318
2. 論文標題 Genetic and pharmacological manipulation of glial glutamate transporters does not alter infection-induced seizure activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 50 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2019.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hayakawa Takayoshi, Watanabe Mayumi, Tomiyama Chikako, Sasagawa Ayaka, Honma Takashi, Inada Akihiro, Abo Toru	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of Mild Hyperthermia Treatment Using Nano-Mist Sauna on Blood Gas Parameters and Skin Appearance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Health	6. 最初と最後の頁 577 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/health.2018.105046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Mami, Kusumi Ryosuke, Hamashima Shinji, Kobayashi Sho, Sasaki Satoru, Komiyama Yuhei, Izumikawa Takuji, Conrad Marcus, Bannai Shiro, Sato Hideyo	4. 巻 8
2. 論文標題 The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system xc- and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 968-977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19213-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Sho, Hamashima Shinji, Homma Takujiro, Sato Mami, Kusumi Ryosuke, Bannai Shiro, Fujii Junichi, Sato Hideyo	4. 巻 78
2. 論文標題 Cystine/glutamate transporter, system x c ⁻ , is involved in nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 32~40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2018.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohara Yukiko, Ozeki Yuriko, Tateishi Yoshitaka, Mashima Tsukasa, Arisaka Fumio, Tsunaka Yasuo, Fujiwara Yoshie, Nishiyama Akihito, Yoshida Yutaka, Kitadokoro Kengo, Kobayashi Haruka, Kaneko Yukihiko, Nakagawa Ichiro, Maekura Ryoji, Yamamoto Saburo, Katahira Masato, Matsumoto Sohkichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Significance of a histone-like protein with its native structure for the diagnosis of asymptomatic tuberculosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0204160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0204160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Manabu, Niki Mamiko, Ozeki Yuriko, Nagi Sachio, Chadeka Evans Asena, Yamaguchi Takehiro, Osada-Oka Mayuko, Ono Kenji, Oda Tetsuya, Mwende Faith, Kaneko Yukihiko, Matsumoto Makoto, Kaneko Satoshi, Ichinose Yoshio, Njenga Sammy M., Hamano Shinjiro, Matsumoto Sohkichi	4. 巻 8
2. 論文標題 High-density lipoprotein suppresses tumor necrosis factor alpha production by mycobacteria-infected human macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24233-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Savitskaya Anna, Nishiyama Akihito, Yamaguchi Takehiro, Tateishi Yoshitaka, Ozeki Yuriko, Nameta Masaaki, Kon Tomohiro, Kaboso Shaban A., Ohara Naoya, Peryanova Olga V., Matsumoto Sohkichi	4. 巻 8
2. 論文標題 C-terminal intrinsically disordered region-dependent organization of the mycobacterial genome by a histone-like protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26463-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Kenta, Iida Mayumi, Ikeda Naoki, Moriyama Shigetaka, Hamada Michito, Takahashi Satoru, Kitamura Hiroshi, Watanabe Takashi, Hasegawa Yoshinori, Hase Koji, Fukuhara Takeshi, Sato Hideyo, Kobayashi Eri H., Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki, Tanaka Masato, Asano Kenichi	4. 巻 201
2. 論文標題 Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 635 ~ 651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Merckx Ellen, Albertini Giulia, Paterka Magdalena, Jensen Cathy, Albrecht Philipp, Dietrich Michael, Van Liefferinge Joeri, Bentea Eduard, Verbruggen Lise, Demuyser Thomas, Deneyer Lauren, Lewerenz Jan, van Loo Geert, De Keyser Jacques, Sato Hideyo, Maher Pamela, Methner Axel, Massie Ann	4. 巻 14
2. 論文標題 Absence of system xc- on immune cells invading the central nervous system alleviates experimental autoimmune encephalitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-016-0787-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kang Eun Sil, Lee Jaeyong, Homma Takujiro, Kurahashi Toshihiro, Kobayashi Sho, Nabeshima Atsunori, Yamada Sohsoke, Seo Han Geuk, Miyata Satoshi, Sato Hideyo, Fujii Junichi	4. 巻 51
2. 論文標題 xCT deficiency aggravates acetaminophen-induced hepatotoxicity under inhibition of the transsulfuration pathway	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 80 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2017.1282157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bentea Eduard, Van Liefferinge Joeri, Verbruggen Lise, Martens Katleen, Kobayashi Sho, Deneyer Lauren, Demuyser Thomas, Albertini Giulia, Maes Katrien, Sato Hideyo, Smolders Ilse, Lewerenz Jan, Massie Ann	4. 巻 290
2. 論文標題 Zonisamide attenuates lactacystin-induced parkinsonism in mice without affecting system x c-	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 15 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2016.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Dang Duy-Khanh, Shin Eun-Joo, Tran Hai-Quyen, Kim Dae-Joong, Jeong Ji Hoon, Jang Choon-Gon, Nah Seung-Yeol, Sato Hideyo, Nabeshima Toshitaka, Yoneda Yukio, Kim Hyoung-Chun	4. 巻 108
2. 論文標題 The role of system Xc- in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 254 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2017.04.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamashima Shinji, Homma Takujiro, Kobayashi Sho, Ishii Naoki, Kurahashi Toshihiro, Watanabe Ren, Kimura Naoko, Sato Hideyo, Fujii Junichi	4. 巻 51
2. 論文標題 Decreased reproductive performance in xCT-knockout male mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 851 ~ 860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2017.1388504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lee Jaeyong, Kang Eun Sil, Kobayashi Sho, Homma Takujiro, Sato Hideyo, Seo Han Geuk, Fujii Junichi	4. 巻 361
2. 論文標題 The viability of primary hepatocytes is maintained under a low cysteine-glutathione redox state with a marked elevation in ophthalmic acid production	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 178 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2017.10.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Enany Shymaa, Yoshida Yutaka, Tateishi Yoshitaka, Ozeki Yuriko, Nishiyama Akihito, Savitskaya Anna, Yamaguchi Takehiro, Ohara Yukiko, Yamamoto Tadashi, Ato Manabu, Matsumoto Sohkiichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Mycobacterial DNA-binding protein 1 is critical for long term survival of Mycobacterium smegmatis and simultaneously coordinates cellular functions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06480-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomiyama C, Hirama H, Yamamoto H, Watanabe H.
2. 発表標題 Exacerbation mechanisms of autoimmune hepatitis under low estrogen status and its relationship with hepatic dendritic cells.
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomiyama C, Yamamoto H, Watanabe H.
2. 発表標題 Relationship between dendritic cell modulation and autoimmune hepatitis exacerbation during high fat feeding.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomiyama C, Watanabe M, Hayakawa T, Honma T.
2. 発表標題 The effects of a long-term repetitive mild hyperthermia treatment on the host defense mechanism and the autonomic nervous system.
3. 学会等名 The 83rd Annual Meeting of the Japanese Society of Balneology, Climatoligy and Physical Medicine.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirama H, Tomiyama C, Watanabe H, Yamamoto H.
2. 発表標題 Possible factors which exacerbate autoimmune hepatitis in low-level estrogen.
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirama H, Tomiyama C, Watanabe H.
2. 発表標題 The effects of ovariectomy on autoimmune hepatitis and hepatic dendritic cells.
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤茉美、鈴木亜美、小沼邦重、尾崎充彦、坂内四郎、岡田太、佐藤英世
2. 発表標題 シスチン/グルタミン酸輸送体は細胞内グルタチオンの維持を通じてがん細胞の遊走・浸潤・転移に寄与する
3. 学会等名 ConBio2017生命科学系合同年次大会（第90回日本生化学会、第40回日本分子生物学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久住亮介、鈴木悠、小沼邦重、尾崎充彦、坂内四郎、岡田太、佐藤英世
2. 発表標題 ヒト由来骨肉腫細胞の浸潤能とグルタチオン合成系との関連性
3. 学会等名 ConBio2017生命科学系合同年次大会（第90回日本生化学会、第40回日本分子生物学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	尾関 百合子 (Ozeki Yuriko) (00169301)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

