

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07487

研究課題名(和文) マウス急性肝炎を制御するホルモンの同定—レプチンによる急性肝細胞障害の調節

研究課題名(英文) Regulation of acute hepatic injury in mice by leptin

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖脂質 α -galactosylceramideの Maus への投与により誘導される NKT 細胞依存性肝炎において、食欲調節ホルモンであるレプチンの血中濃度が上昇した。レプチン欠損 (ob/ob) Maus およびレプチンレセプター欠損 (db/db) Maus、また、抗レプチン抗体および抗レプチンレセプター抗体を用いた解析により、レプチンは肝炎を悪化させた。そのメカニズムとして、NKT細胞がレプチンレセプターを発現し、レプチンにより直接活性化され TNF- α の産生が誘導されること、また、肝細胞もレプチンレセプターを発現し、レプチンが作用すると肝細胞のアポトーシスを誘導すること、が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプチンが、直接あるいは間接的に NKT 細胞を活性化し、あるいは、肝細胞の細胞死感受性を調節し、肝炎の悪化に働くことが明らかになった。この急性肝炎モデルの治療法として抗レプチン抗体や抗レプチンレセプター抗体が候補となりうる。Maus のみならず、ヒトにおいても、免疫機序による急性肝炎が存在し、肝細胞破壊が大規模に起こると、劇症肝炎につながる場合もある。本研究は、臨床医学の観点からも、これらヒト急性肝炎の病態解明・治療法開発にもつながる。さらに、ホルモンによる急性炎症の制御など、ホルモンの新たな機能を探る契機にもなり、内分泌学・免疫学・炎症学・病理学の観点からも、学術的波及効果が大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model of NKT cell-dependent liver injury which is induced by α -galactosylceramide administration, serum levels of leptin were found to be significantly elevated. Using leptin deficient (ob/ob) or leptin receptor deficient (db/db) mice and anti-leptin Ab or anti-leptin receptor Ab, it was demonstrated that leptin contributed to the aggravation of liver injury. NKT cells expressed high levels of leptin receptor and produced TNF- α which aggravates liver injury in response to leptin. Hepatocytes also expressed leptin receptors and apoptosis was induced in these cells in response to leptin. These results suggest that leptin directly or indirectly contributed to aggravation of NKT cell-dependent liver injury.

研究分野：実験病理学

キーワード：NKT細胞 肝臓 肝炎 α -galactosylceramide レプチン レプチンレセプター

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、NK細胞とT細胞の両方の性質を合わせ持つが、通常のT細胞と異なり、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 α -ガラクトシルセラミド (α -galactosylceramide: α -GalCer) はNKT細胞を特異的かつ強力に活性化する糖脂質のひとつであるが、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、急性の肝障害が起こることを研究代表者らは報告した (*Eur J Immunol*, 2000, 被引用回数: 233回)。このモデルは、 α -GalCer誘導性肝炎あるいはNKT細胞依存性肝炎と呼ばれ、免疫学的機序が関与する急性肝炎マウスモデルとして研究されている (図1)。

この α -GalCer によって誘導される NKT 細胞依存性肝炎のメカニズムとして、肝炎誘導に必要な因子 (Fas-FasL、TNF- α)、肝炎を悪化させる因子 (IL-17、G-CSF、好中球)、肝炎を抑制する因子 (CD94/NKG2A、RASAL3、骨髄由来抑制細胞: MDSC) などが明らかにされてきたが、様々な条件・要因により肝炎の程度が変化することが知られ、その病態は完全には解明されていない。これまでは、免疫学的な因子に注目して解析が行われてきたが、視点を変えたアプローチが必要である。最近、ある種のホルモンが、炎症の病態を制御することが注目されており、これを基に、「NKT細胞依存性肝炎における急性肝細胞障害の程度が、ホルモンに制御されているのではないか？」との着想に至った。これが本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。ヒトにおいても、本研究でみられる免疫機序による急性肝炎が存在し、致死的な劇症肝炎に結びつく場合もあり、本モデルのメカニズムの解明が期待される。

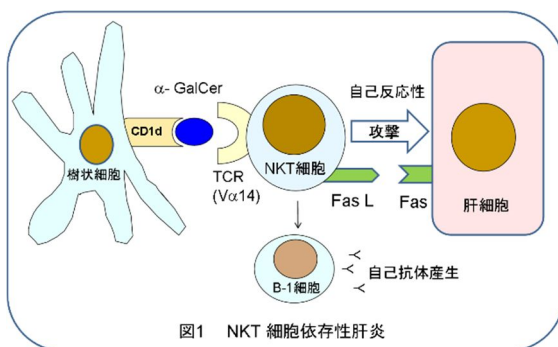


図1 NKT細胞依存性肝炎

2. 研究の目的

最近、食欲を調節するホルモンが、炎症を促進あるいは抑制する作用を持つことが注目されている。応募者は、肝炎の病態にも、これらの食欲調節ホルモンが関与しているのではないかと推測し、様々な肝炎マウスモデルの解析を行ったところ、それらの病態に食欲調節ホルモンであるレプチン、グレリン、オレキシンなどが関与することを示唆するデータを得た。肝炎マウスモデルのうち、 α -GalCerによるNKT細胞依存性肝炎では、特にレプチンが、病態形成に何らかの役割を果たすことを推測させる、以下の予備実験結果を得た。

α -GalCerを投与し肝炎を誘導したマウスでは、(他の肝炎モデルで見られるよりも) 血中のレプチン濃度が肝炎発症後、早期から著しく上昇する。

マウスの各臓器(脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄、肝臓など)の免疫組織染色を行ったところ、肝臓の様々な細胞(免疫細胞以外も)がレプチンレセプターを発現する。

これらの結果から、 α -GalCerによりNKT細胞が活性化すると、レプチンの産生が誘導されそれが肝炎を悪化させるのではないかと、この仮説に至った(図2)。この仮説を検証し、NKT細胞依存性肝炎の病態にレプチンが関与しているかどうか、また、そのメカニズムを明らかにすることが、本研究の目的である。レプチンは視床下部のレプチンレセプターに結合して食欲調節に関与するが、それ以外に免疫細胞等にもレプチンレセプターが発現され、炎症などにも関与することが示唆されており、急性肝炎モデルの病態を悪化させることを予想した。

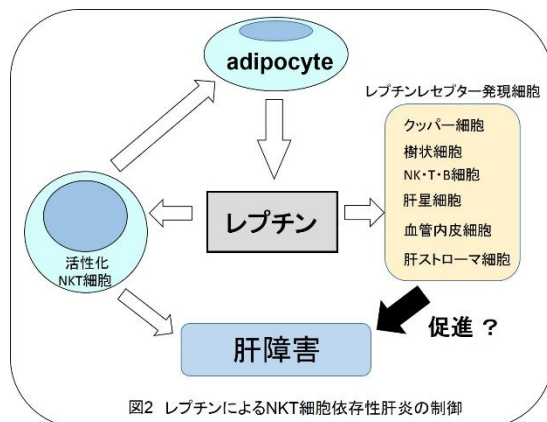


図2 レプチンによるNKT細胞依存性肝炎の制御

3. 研究の方法

糖脂質 α -galactosylceramide (α -GalCer) によって誘導される NKT 細胞依存性肝炎において、レプチンがその病態に与える影響を、以下の ~ の項目に焦点を当て解析した。NKT 細

胞依存性肝炎は、研究代表者らが確立した方法（マウスに2 μ g/匹の α -GalCer を静脈内投与）により、誘導した。肝炎の程度は、血清 AST・ALT 値および組織学的観察によって評価した。

・レプチンが急性肝炎を悪化させるか？

レプチン欠損 (ob/ob) マウスおよびレプチンレセプター欠損 (db/db) マウスを用いた解析

レプチンが機能しないマウス (ob/ob 及び db/db) において肝炎の程度が軽いかどうかを調べた。これらのマウスは、過食により、肥満をきたすが、肥満ではなくレプチン自体の影響を解析するために、食事制限により体重をコントロールして解析した。

レプチン、抗レプチン抗体、抗レプチンレセプター抗体の肝炎に対する影響の解析

レプチン (レプチン過剰状態)、抗レプチン抗体および抗レプチンレセプター抗体 (レプチンが機能しない状態) を予めマウスに投与してから肝炎を誘導し、肝炎が悪化するか改善するかを解析した。

・レプチンが急性肝炎を悪化させるメカニズム

レプチン産生を誘導する NKT 細胞由来のサイトカインの解析

NKT 細胞は活性化に伴い、IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、IL-21 など様々なサイトカインを産生する。これらのうち、脂肪細胞からのレプチン産生を誘導するものの同定を試みた。これらのサイトカインの欠損マウス、また、サイトカインに対する中和抗体を予め投与した野生型マウスに、 α -GalCer を投与して肝炎を誘導し、血清中にレプチンが増加するかどうかを ELISA により解析した。

肝臓におけるレプチンレセプター発現細胞の同定とそれらのレプチンに対する反応性の解析

肝臓におけるレプチンレセプター発現細胞を免疫組織染色により同定し、その発現強度、発現細胞の局在を解析した。また、肝臓を酵素処理することにより、リンパ球、クッパー細胞、樹状細胞、肝細胞、肝星細胞、血管内皮細胞、肝ストローマ細胞等を分離し、フローサイトメトリーによりレプチンレセプター発現レベルを解析した。また、それらのレプチンレセプター発現細胞のレプチンに対する反応性 (細胞増殖、アポトーシス、サイトカイン産生) を *in vitro* で解析した。

4. 研究成果

2019 年度は、レプチンの NKT 細胞依存性肝炎の病態に与える影響を調べるため、レプチン欠損 (ob/ob) マウスおよびレプチンレセプター欠損 (db/db) マウスを用いた解析を行った。ob/ob マウスおよび db/db マウスに α -GalCer を投与し、NKT 細胞依存性肝炎を発症させたところ、血清 AST 値および ALT 値が、対照群と比較し、有意に低下していた。また、組織学的に、これらのマウスでは、肝臓において炎症細胞の数が、対照群と比較し、有意に低下していた。つまり、ob/ob マウスおよび db/db マウスでは、肝炎の程度が軽いことがわかった。これらの結果は、レプチンが機能しない状況では、肝炎の軽症化が見られ、レプチンが NKT 細胞依存性肝炎の病態を調節することを示唆した。

2020 年度は、正常マウスに予めレプチンを投与し、レプチン過剰状態を誘導し、また、正常マウスに予め抗レプチン抗体および抗レプチンレセプター抗体を投与し、レプチンが機能しない状態での解析を行った。予めレプチンをマウスに投与しておき、24 時間後に α -GalCer を投与したところ、NKT 細胞依存性肝炎の程度が悪化することが判明した。また、予め抗レプチン抗体または抗レプチンレセプター抗体をマウスに投与しておき、24 時間後に α -GalCer を投与したところ、NKT 細胞依存性肝炎の程度が軽症化することが判明した。これらの結果から、レプチンは NKT 細胞依存性肝炎を悪化する要因であることが明らかになった。

2021 年度は、レプチンが肝炎を悪化させるメカニズムの解析を行った。まず、リンパ球におけるレプチンレセプターの発現を FACS 解析したところ、特に NKT 細胞に強い発現がみられた。また、マウスに α -GalCer や IL-12 を投与することにより NKT 細胞を活性化すると、NKT 細胞上のレプチンレセプターの upregulation がみられた。ソーティングした活性化 NKT 細胞に *in vitro* でレプチンを作用させたところ、NKT 細胞依存性肝炎の誘導に必要な TNF- α 産生の強い増強がみられた。以上より、レプチンは、NKT 細胞に直接作用し、TNF- α の産生を誘導し、急性肝炎を悪化させていると推測された。

2021 年度までの結果により、レプチンが NKT 細胞を直接刺激し、TNF- α の産生を誘導して肝炎を悪化させることが明らかになった。しかし、NKT 細胞上のレプチンレセプターの発現を解析した際、肝臓の組織全体におけるレプチンレセプターの発現を免疫組織染色で調べたところ、NKT 細胞などの白血球よりも、むしろ肝細胞に強い発現がみられた。このことから、レプチンが肝細胞に作用する可能性も排除できなかった。肝細胞がレプチンレセプターを発現することから、レプチンが肝細胞に作用し、細胞死を誘導している可能性について追及した。正常マウス

の肝臓より、酵素処理によって肝細胞を分離した。分離した肝細胞の培養系にレプチンを添加したところ、肝細胞のアポトーシスが誘導された。更に、このアポトーシス誘導は、抗レプチンレセプター抗体添加によって阻害された。また、レプチンレセプター欠損 (db/db) マウスの肝細胞では、レプチン添加によってアポトーシスは誘導されなかった。以上により、レプチンレセプターを発現する肝細胞は、レプチンによってアポトーシスが誘導されることが明らかになった。

以上の結果より、 α -GalCer 投与により誘導される NKT 細胞依存性肝炎において、レプチンが NKT 細胞を直接あるいは間接的に活性化することにより、更に、肝細胞の細胞死感受性を調節することにより、肝炎の悪化に関与することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rahman Md. Azizur, Kanda Yasuhiro, Ozawa Madoka, Kawamura Toshihiko, Takeuchi Arata, Katakai Tomoya	4. 巻 355
2. 論文標題 Transdermal entry of yeast components elicits transient B cell-associated responses in skin-draining lymph nodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 104159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellimm.2020.104159	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新井まやの、小田島日向子、杉浦菜月、醍醐ひなた、長田真奈、川村俊彦
2. 発表標題 -galactosylceramideによる肝NK細胞の活性化
3. 学会等名 第35回北里大学バイオサイエンスフォーラム・第24回北里微生物アカデミー研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦菜月、新井まやの、小田島日向子、醍醐ひなた、長田真奈、川村俊彦
2. 発表標題 -galactosylceramide気管内投与によるマウス肺リンパ球の活性化
3. 学会等名 第35回北里大学バイオサイエンスフォーラム・第24回北里微生物アカデミー研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小田島日向子、新井まやの、杉浦菜月、醍醐ひなた、長田真奈、川村俊彦
2. 発表標題 マウス小腸上皮内リンパ球におけるNK細胞レセプターCD244の発現
3. 学会等名 第35回北里大学バイオサイエンスフォーラム・第24回北里微生物アカデミー研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 醍醐ひなた、新井まやの、小田島日向子、杉浦菜月、長田真奈、川村俊彦
2. 発表標題 腎臓特異的リンパ球の解析
3. 学会等名 第35回北里大学バイオサイエンスフォーラム・第24回北里微生物アカデミー研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長田真奈、新井まやの、小田島日向子、杉浦菜月、醍醐ひなた、川村俊彦
2. 発表標題 唾液腺特異的リンパ球の解析
3. 学会等名 第35回北里大学バイオサイエンスフォーラム・第24回北里微生物アカデミー研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山琴美、新井まやの、本間咲芳里、川村俊彦
2. 発表標題 肝再生における骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の関与
3. 学会等名 第34回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井まやの、杉山琴美、本間咲芳里、川村俊彦
2. 発表標題 マウス急性肝炎モデルで増加する骨髄由来抑制細胞
3. 学会等名 第34回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間咲芳里、日下ありさ、新井まやの、杉山琴美、川村俊彦
2. 発表標題 マウス臍臓のリンパ球の解析
3. 学会等名 第34回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山琴美、新井まやの、本間咲芳里、川村俊彦
2. 発表標題 肝再生における骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の出現
3. 学会等名 第15回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井まやの、杉山琴美、本間咲芳里、川村俊彦
2. 発表標題 NKT細胞依存性肝炎における骨髄由来抑制細胞 (Myeloid derived suppressor cells: MDSC) の役割
3. 学会等名 第15回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間咲芳里、日下ありさ、新井まやの、杉山琴美、川村俊彦
2. 発表標題 マウス臍臓特異的リンパ球の解析
3. 学会等名 第15回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢島悠介、山森有紗、川村俊彦
2. 発表標題 鉄過剰マウスモデルにおいて肝臓NKT細胞が選択的に減少する
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山森有紗、矢島悠介、川村俊彦
2. 発表標題 T細胞の分化・維持におけるLRRK2の役割
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢島悠介、山森有紗、川村俊彦
2. 発表標題 抗癌剤シスプラチンに対するリンパ球サブセットの抵抗性
3. 学会等名 第32回 北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山森有紗、矢島悠介、川上文貴、市川尊文、川村俊彦
2. 発表標題 LRRK2 欠損マウスにおける T 細胞サブセットの異常
3. 学会等名 第32回 北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢島悠介、山森有紗、川村俊彦
2. 発表標題 肝臓の自然リンパ球は抗癌剤シスプラチンによる細胞死に対して抵抗性をもつ
3. 学会等名 第30回 日本生体防御学会学術總會
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 川村俊彦、縣保年、東みゆき、生田宏一、樽木俊聡、岡田随象、金山剛士、河上裕、高橋秀実、田中稔之、友藤嘉彦、中島裕史、馬場義裕、廣松賢治、藤尾圭志、三宅幸子、宮坂信之、宮坂昌之、森尾友宏	4. 発行年 2023年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 382
3. 書名 リップンコットシリーズ イラストレイテッド免疫学 原書3版	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------