

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03466

研究課題名(和文) 2型自己免疫性肝炎とその関連肝臓疾患の発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of Type 2 Autoimmune Hepatitis and related liver diseases

研究代表者

齋藤 伸一郎 (Saitoh, Shin-Ichiroh)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：90361625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：今まで自己免疫性肝炎(AIH)と原発性胆汁性胆管炎(PBC)を発症するオーバーラップ症候群の発症機構は全く分かっていない。これはAIHとPBCを発症するオーバーラップ症候群のモデルマウスがないためである。本研究では研究代表者が作製した樹状細胞特異的Rab7a欠損マウスがAIHとPBCを発症するオーバーラップ症候群を発症する世界初のモデルマウスであることを明らかにした。また樹状細胞のエンドソーム異常が抗原提示の増強からAIHやPBCの発症につながる可能性を示唆した。このような発症機構は今までにない報告である。さらに T細胞がPBCの発症に関与していることを解明した初の報告である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでいくつかの自己免疫疾患の発症機構が報告されている。本研究結果では樹状細胞のエンドソーム異常が自己免疫疾患の発症に関与している可能性を新たに示している。今後免疫担当細胞のオルガネラ異常と自己免疫疾患の発症とを結びつける研究が発展して行くものと考えられる。そして免疫細胞にオルガネラ異常が起こる機構に関しても研究を進める必要がある。また本研究結果は全く分かっていなかった自己免疫肝疾患のオーバーラップ症候群の理解に大きな前進となる。さらに原発性胆汁性胆管炎の発症に T細胞が関与することが明らかになったことで新規の治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Until now, the pathogenesis of autoimmune hepatitis (AIH) and primary biliary cholangitis (PBC) has been largely unknown. Much less is known about overlap syndrome, in which both AIH and PBC occur. This is because there is no mouse model of overlap syndrome that develops AIH and PBC. In this study, we clarified that the dendritic cell (DC)-specific Rab7a-deficient mouse produced by the principal investigator is the world's first model mouse that develops such overlap syndrome. We also suggested that endosomal abnormalities in DCs may lead to the development of AIH and PBC through enhanced antigen presentation. This is an unprecedented report on the onset mechanism that endosomal abnormalities in DCs are involved in autoimmune diseases. Furthermore, this is the first report to elucidate that T cells are involved in the development of PBC.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 Rab7a 自己免疫性肝炎 原発性胆汁性胆管炎

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 (AIH) と原発性胆汁性胆管炎 (PBC) の発症機構は未だ明らかではない。抗核抗体または抗平滑筋抗体の濃度が高値となると 1 型 AIH、抗 LKM-1 抗体などの濃度が上昇すると 2 型 AIH と診断される。また抗ミトコンドリア抗体が高値となり、胆道の酵素が血液中に漏れ出した状態の場合 PBC として診断される。このことから AIH や PBC の発症においては CD4T 細胞や B 細胞が関与することは間違いないと考えられている。またいくつかの論文では肝臓では CD8T 細胞が活性化しており細胞障害性 T 細胞であることが報告された。しかし、AIH と PBC の発症機構は殆ど分かっておらず、T 細胞が何故活性化しているのか、T 細胞以外に病気の発症に関与している細胞はあるのか解明されていなかった。PBC の発症に関しては *N.aromaticivorans* をマウスに接種することで抗ミトコンドリア抗体の産生が起こり、NK T 細胞の関与による PBC の発症が報告されているがその後の進展があまりない。AIH と PBC を発症する患者はオーバーラップ症候群と診断される。しかしオーバーラップ症候群の発症機構は全く分かっていない。我々は何故 T 細胞が強く活性化して AIH と PBC を発症するのかに注目した。そして抗原提示細胞の異常による T 細胞の活性化を想定した。そして抗原提示細胞の中でも免疫の司令塔である樹状細胞に注目した。エンドソームは抗原提示において重要な役割を果たしている。そのため樹状細胞のエンドソーム異常による抗原提示異常が病気の発症に関わるのではと考えた。そこでエンドソーム成熟を制御する Rab7a を樹状細胞特異的に欠損させたところ、プレ実験の結果から 2 型 AIH と 2 型 AIH 以外の肝臓疾患が発症していることが明らかとなったため本研究を進めた。

2. 研究の目的

研究代表者が作製した 2 型 AIH を発症するマウスモデルを用いて 2 型 AIH と 2 型 AIH 以外の肝臓疾患の発症機構の解明を目的とした。具体的には T 細胞が何故強く活性化しているのか、どの細胞が病気の発症に関与しているのかを解明することを目的にした。

3. 研究の方法

病気の診断

2 型自己免疫性肝炎の発症を診断した。肝臓障害を調べるために血清の AST や ALT の濃度を検討した(オリエンタル酵母)。血清中の胆道系酵素は ALP と LAP の濃度を検討した(オリエンタル酵母)。血清中のアルブミン濃度を検討した(オリエンタル酵母)。マウスの脾臓の重さは電子天秤にて計測を行った。

マウスの生存率と血小板濃度の調査

コントロールマウス 3 2 匹と樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウス 4 7 匹を 5 2 週齢近く飼育、マウスの生存率を検討した。コントロールマウス 7 5 匹と樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウス 8 7 匹から血液を EDTA 管に採血し、血小板の濃度を日本光電の全自動血球計数器 MEK-6558 セルタックを用いて計測した。

血清の抗体価と自己抗体の濃度の測定

血清中の IgM や IgA、IgG のサブタイプは Thermo Fisher Scientific の Ready-Set-Go ELISA KIT を用いて ELISA にて計測を行った。自己抗体で 1 型 AIH のマーカーである抗核抗体は MBL 社の FLUORO HEPANA TEST にて発色し、蛍光を Thermo Fisher Scientific の EVOS Cell Imaging systems にて解析した。得られた蛍光強度は ImageJ ソフトウェアで 1 細胞あたりの蛍光強度データを取得した。もう一つの 1 型 AIH のマーカーである抗平滑筋抗体は WUHAN HUAMEI BIOTECH 社の抗平滑筋抗体 ELISA Kit にて計測した。2 型 AIH のマーカーである抗 LKM-1 抗体は MBL 社の MESACUP LKM-1 TEST の ELISA にて計測を行った。PBC のマーカーである抗ミトコンドリア M2 抗体は MBL 社の MESACUP-2 AMA M2 TEST にて ELISA にて計測した。

肝臓の組織染色

肝臓の組織の状態を確認するために肝臓を摘出後に和光純薬の 20% 中世緩衝ホルマリン液 (pH 7.4) にて固定し、パラフィン包埋後にヘマトキシリンエオシン染色やシリウスレッド染色を行った。組織における T 細胞、CD8T 細胞と樹状細胞の局在を明らかにするために抗 CD3 抗体と抗 CD11c 抗体、抗 CD8 抗体にて染色を行った。T 細胞の組織における局在を明らかにするために凍結切片を抗 TCR 抗体にて染色した。

肝臓の浸潤細胞の解析

肝臓に浸潤している細胞は PBS にて還流したのちに肝臓を摘出し Miltenyi Biotec 社の Liver Dissociation kit と Gentle MACS を用いて細胞を採取した。採取した細胞は抗 CD 3 抗体、抗

CD11c 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 CD8 抗体、抗 TCR 抗体、抗 NK1.1 抗体、抗 CD19 抗体、抗 B220 抗体、抗 CD69 抗体、抗 CD80 抗体、抗 I-A/I-E 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 CD26 抗体、抗 CD172a 抗体、抗 XCR1 抗体、抗 H-2Kb/Db 抗体にて染色して BD FACS Calibur や BD LSR Fortessa X-20 にて Data を取得し Flowjo にて解析を行った。細胞障害性 T 細胞や制御性 T 細胞、Th1 細胞や Th2 細胞、Th17 細胞を染色するために細胞は BD Bioscience の Cytotfix や Cytotfix/Cytoperm にて処理し、Perm/Wash にて透過処理を行った。その後抗 GranzymeB 抗体、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-4 抗体、抗 IL-17A 抗体にて染色を行った。制御性 T 細胞は eBioscience の Foxp3/Transcription Factor staining buffer set を使用して抗 Foxp3 抗体にて染色を行った。

樹状細胞のエンドソームの解析

樹状細胞のエンドソーム異常を明らかにするために骨髄由来の樹状細胞を 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1M sodium phosphate buffer にて固定後に Zeiss Axioskop microscope にて電子顕微鏡解析を行った。さらにコントロールマウスと樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウスの骨髄由来樹状細胞と肝臓から精製した樹状細胞を 4% paraformaldehyde にて固定後、0.2% saponin-PBS にて細胞膜を処理し初期エンドソームマーカーである EEA-1、リサイクリングエンドソームのマーカーである Rab11、ライソソームのマーカーである Lamp2、MHC- I 、MHC- II を染色して超解像顕微鏡 N-SIM にて解析を行った。

MHC-I の分解速度の計測

樹状細胞における MHC- I の分解は骨髄由来の樹状細胞の細胞表面を EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin にて膜蛋白質をビオチン化したのちに細胞培養を 0 時間、2 時間、4 時間、6 時間と行い、細胞を回収後に MHC- I に対する抗体である抗 H-2Kb 抗体にて免疫沈降後にストレプトアビジン HRP にてウェスタンブロッティングを行った。細胞内コントロールとしてアクチンのプロットを行った。得られたバンドは ImageJ で検出され、H-2Kb/Actin で計算された。

クロスプレゼンテーション実験

CD8T 細胞への抗原提示であるクロスプレゼンテーションが増強しているのかを調べるために OT-1 トランスジェニックマウスの脾臓から CD8⁺ T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec 社) を用いて CD8T 細胞を精製し 2×10^5 /well で丸底 96 ウェルプレートに播いた。コントロールマウスまたは樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウスの骨髄由来樹状細胞を 5×10^4 /well で同じ 96 ウェルプレートに播いた。その後 OVA を 0, 2.5, 10, 25, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 2 日間刺激を行った。刺激後 CD8T 細胞を Granzyme B と IFN- γ に対する抗体にて染色した。細胞の上清中の IFN- γ と IL-2 は ELISA kit (R&D Systems) にて測定した。

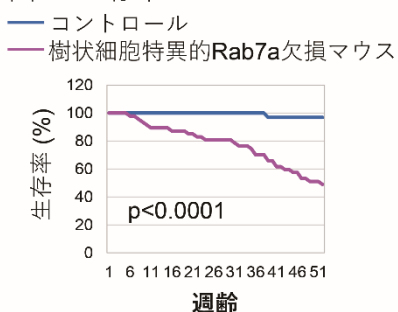
抗 CD8 抗体の投与実験

CD8T 細胞が実際に病気の発症に関与しているのかどうかを明らかにするために抗 CD8 抗体 (53-6.7) とコントロール抗体を腹腔に 300 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で 1 週間の間隔をおいて 13 週間投与した。そして血液の血小板数と肝臓の組織染色 (H&E 染色とシリウスレッド染色) にて解析を行った。

4. 研究成果

研究代表者が作製した樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウスは週齢と共に死亡し、1 年で約 50% が死亡した (図 1)。樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウスは樹状細胞において Rab7a は約 80% 減少している状態であることがウェスタンブロットによる解析で分かった。血清中の AST や ALT は高値で、アルブミン濃度も低いことから、肝炎により肝臓の機能が低下している可能性が示唆された。脾腫も認められ、血小板減少症も発症していることから肝臓の線維化が疑われた。樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウスの肝臓は不整となり、組織染色の結果は肝炎であった。血清の抗体価を測定すると IgM と IgA、IgG1、IgG2c が高濃度に存在していることから自己免疫性肝炎 (AIH) であることが診断された。AIH は 1 型 AIH と 2 型 AIH の 2 つのタイプが存在するが血清の自己抗体を検査すると抗核抗体陰性で抗平滑筋抗体陽性、抗 LKM-1 抗体陽性の 1 型 AIH と 2 型 AIH のいずれも発症していることが明らかとなった。さらに詳細に検査すると抗ミトコンドリア M2 抗体が高濃度に存在しており、血清中の胆道系酵素 ALP と LAP が高値であり原発性胆汁性胆管炎 (PBC) を発症していることが示唆されたため、肝臓組織を調べると胆管周囲に炎症と線維化が認められた。そしてこれら病気の症状はメスマウスで悪化していた。このように 1 型 AIH、2 型 AIH と PBC を発症するマウスは今ままでになく、AIH と PBC を発症する世界初のモデルマウスと考えられた。肝臓には門脈や中心静脈周囲に樹状細胞と T 細胞が浸潤しており、炎症性細胞などの多くの細胞が肝臓に浸潤していた。特に CD8T 細胞は強く活性化しており、granzyme B を発現している細胞障害性 T 細胞であった。反対

図 1. 生存率



滑筋抗体陽性、抗 LKM-1 抗体陽性の 1 型 AIH と 2 型 AIH のいずれも発症していることが明らかとなった。さらに詳細に検査すると抗ミトコンドリア M2 抗体が高濃度に存在しており、血清中の胆道系酵素 ALP と LAP が高値であり原発性胆汁性胆管炎 (PBC) を発症していることが示唆されたため、肝臓組織を調べると胆管周囲に炎症と線維化が認められた。そしてこれら病気の症状はメスマウスで悪化していた。このように 1 型 AIH、2 型 AIH と PBC を発症するマウスは今ままでになく、AIH と PBC を発症する世界初のモデルマウスと考えられた。肝臓には門脈や中心静脈周囲に樹状細胞と T 細胞が浸潤しており、炎症性細胞などの多くの細胞が肝臓に浸潤していた。特に CD8T 細胞は強く活性化しており、granzyme B を発現している細胞障害性 T 細胞であった。反対

に肝臓において CD4T 細胞はあまり活性化しておらず、Th1, Th2, Th17, 制御性 T 細胞のいずれもコントロールマウスと変わりがなかった。このように CD8T 細胞の活性化が強く起こるのには樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウスの樹状細胞のクロスプレゼンテーションが増強している可能性が考えられたため、OT-1 トランスジェニックマウスの脾臓から CD8T 細胞を精製してオボアルブミン (OVA) にて刺激したところクロスプレゼンテーションの増強が確認された。また OT-1 の CD8T 細胞が細胞障害性 T 細胞にまで分化していた。肝臓においては MHC- の発現が顕著に高く CD80 の発現増強も確認された。樹状細胞の MHC- の分解を調べてみると、MHC- の分解速度が遅れることが明らかになった。MHC- と Lamp2 を染色して超解像顕微鏡で観察すると MHC- と Lamp2 の共局在は Rab7a の欠損により低下しており、MHC- のライソソームへの移行の停滞が MHC- の分解速度の遅れを生み、MHC- の細胞表面発現の増強につながっているものと考えられた。このような樹状細胞の異常がエンドソームの異常によるものなのかオートファジーの異常によるものなのかを明らかにするため電子顕微鏡で観察を行うとエンドソームの肥大化が顕著に認められ、オートファジーの異常はあまりはっきりと認められなかった。そのため、エンドソームの肥大化に焦点をあてて超解像顕微鏡にて観察すると、Rab7a 欠損樹状細胞では初期エンドソームや後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームも肥大化していた。そして肥大化したエンドソームに MHC- や MHC- が集積していた。このようなエンドソームの肥大化は Rab7a の欠損により Vps34 の酵素反応を抑制できなくなったことが原因の可能性が高く、Vps34 の阻害剤を添加したところ Rab7a の欠損によるエンドソームの肥大化は消失した。またエンドソームの肥大化の消失に伴って、クロスプレゼンテーションの増強も消失した。これらの結果は Rab7a 欠損樹状細胞によるエンドソームの肥大化が Vps34 の持続的な活性化により起こっている現象であることを示唆するとともに、Vps34 を介したエンドソームの肥大化がクロスプレゼンテーションの増強に参与していることを示唆している。

実際に樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウスにおいて CD8T 細胞が AIH や PBC の発症に参与しているのかを解析するために抗 CD8 抗体の腹腔投与を 1 回あたり 300 μ g/mouse で 1 週間間隔で 13 週間行った。すると血小板減少症が消失し、肝臓の線維化が減少することが明らかになった。この結果から CD8T 細胞は樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウスにおいて少なくとも肝臓の線維化に参与していることが明らかになった。CD4T 細胞と CD8T 細胞は T 細胞である。その T 細胞を欠損するマウス TCR KO マウスと樹状細胞特異的 Rab7a 欠損マウスを交配したところ、AIH の発症は認められず PBC の発症がある程度認められた。次に T 細胞以外にどの細胞が肝臓で活性化しているのか調べたところ T 細胞が活性化して Granzyme B を発現している細胞障害性であることが明らかとなった。更に T 細胞は肝臓組織において胆管周囲に局在していることから、T 細胞と T 細胞を欠損する TCR x KO マウスと交配したところ、AIH と PBC の発症が消失した。このように AIH の発症には主に T 細胞が参与し、PBC の発症には主に T 細胞が参与していることを解明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyake Kensuke, Shibata Takuma, Fukui Ryutaro, Sato Ryota, Saitoh Shin-Ichiroh, Murakami Yusuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Nucleic Acid Sensing by Toll-Like Receptors in the Endosomal Compartment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 941931-941937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.941931	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 Miyake Kensuke, Saitoh Shin-Ichiroh, Fukui Ryutaro, Shibata Takuma, Sato Ryota, Murakami Yusuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Dynamic control of nucleic-acid-sensing Toll-like receptors by the endosomal compartment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 835 ~ 840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab037	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 R, Reuter T, Hiranuma R, Shibata T, Fukui R, Motoi Y, Murakami Y, Tsukamoto H, Yamazaki S, Liu K, Saitoh SI, Latz E, Miyake K	4. 巻 32
2. 論文標題 The impact of cell maturation and tissue microenvironments on the expression of endosomal Toll-like receptors in monocytes and macrophages.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 785-798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa055.	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 Chowdhury Sajid Iftekhar, Inui Masanori, Yamazaki Tatsuya, Tomono Susumu, Takagi Hidekazu, Biswas Mrityunjyoy, Saitoh Shin Ichiroh, Miyake Kensuke, Akashi Takamura Sachiko	4. 巻 597
2. 論文標題 The anti-TLR4 monoclonal antibody Sa15-21 enhances inflammatory cytokine production in LPS-stimulated macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1246 ~ 1260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14619	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 齋藤 伸一郎
2. 発表標題 樹状細胞のエンドソーム異常による2型自己免疫性肝炎と原発性胆汁性胆管炎の発症
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 伸一郎
2. 発表標題 樹状細胞のエンドソーム異常により T細胞と T細胞を活性化することで自己免疫性肝炎と原発性胆汁性胆管炎を引き起こす
3. 学会等名 第27回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin-Ichiroh Saitoh, Kenichi Harada, Yoshiko Mori Saitoh, Ge-Hong Sun-Wada, Tamami Denda, Yasunori Ota, Hiroshi Sagara, Yuji Watanabe, Yoh Wada, and Kensuke Miyake
2. 発表標題 Endosomal abnormalities in dendritic cells cause autoimmune liver diseases
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin-Ichiroh Saitoh, Yoshiko Mori Saitoh, Ge-Hong Sun-Wada, Yoh Wada, Kensuke Miyake.
2. 発表標題 Loss of Rab7a in dendritic cells causes type 2 autoimmune hepatitis
3. 学会等名 The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin-Ichiroh Saitoh, Yoshiko Mori Saitoh, Kensuke Miyake.
2. 発表標題 Loss of Rab7a in dendritic cells causes type 2 autoimmune hepatitis and primary biliary cholangitis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin-Ichiroh Saitoh, Kenichi Harada, Yoshiko Mori Saitoh, Ge-Hong Sun-Wada, Tamami Denda, Yasunori Ota, Hiroshi Sagara, Yuji Watanabe, Yoh Wada, and Kensuke Miyake
2. 発表標題 Loss of Rab7a in dendritic cells causes autoimmune hepatitis and primary biliary cholangitis
3. 学会等名 JSICR/MMCB 2023 Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野 https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/kanseniden/ 東京大学医科学研究所 アニュアルレポート https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/about/publication/annualreport/list.html</p>

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
---------	---------