

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17000

研究課題名(和文) ペア型免疫受容体による肝臓虚血再灌流障害の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms by which paired immune receptors regulate hepatic ischemia reperfusion injury

研究代表者

殷 恩智 (Yin, Enzhi)

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤助教

研究者番号：70844786

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)：肝臓虚血再灌流障害のマウスモデルを利用して、野生型マウス、特定の抑制型受容体欠損マウス、特定の活性化型受容体欠損マウスの病態を比較解析した。解析した抑制型受容体の欠損は肝臓虚血再灌流障害に明らかな影響を及ぼさなかった。他方、解析した活性化型受容体の欠損により、再灌流後の肝臓へ集積する好中球数や肝臓組織における炎症性サイトカイン量は低下し、肝臓障害も軽減した。従って、好中球に限局して発現する特定の活性化型受容体は肝臓虚血再灌流障害を悪化させる働きがあ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

本研究により、ペア型免疫受容体ファミリーに属する特定の活性化型受容体が肝臓虚血再灌流障害を悪化させる働きをもつことが明らかになった。好中球に特異的に発現する活性化型受容体が虚血再灌流した肝臓への好中球集積を促進し、炎症を誘導し、肝臓障害を悪化させると考えられた。これらの研究成果は、肝臓虚血再灌流障害の病態機序の解明と予防・治療法の開発につながり、学術的意義と社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We used murine models of hepatic ischemia reperfusion injury in wild-type, an inhibitory receptor-deficient, and an activating receptor-deficient mice. Loss of an inhibitory receptor tested did not significantly influence hepatic ischemia reperfusion injury. In contrast, loss of an activating receptor tested reduced the numbers of neutrophils recruited to and the levels of inflammatory cytokines in the liver following ischemia-reperfusion, thereby alleviating the hepatic damage. Thus, the deficiency of an activating receptor tested, specifically expressed in neutrophils, exacerbated hepatic ischemia reperfusion injury.

研究分野：免疫学

キーワード：虚血再灌流障害 肝臓 ペア型免疫受容体

1. 研究開始当初の背景

肝臓移植や腫瘍切除の成功には虚血再灌流障害の制御が不可欠である。疾患モデルの研究から肝臓虚血再灌流障害の病態解明は進んだが、分子機序の解明は不十分である。肝臓虚血により障害を受けた肝細胞は damage-associated molecular patterns (DAMPs) を放出する。DAMPs は肝臓の常在性マクロファージであるクッパー細胞を活性化して炎症惹起分子 (サイトカインやケモカインなど) を放出する。この過程は再灌流により著しく促進され、ケモカインは局所に単球/マクロファージや好中球を動員する。クッパー細胞は細胞死により減少する一方、活性化した単球/マクロファージや好中球がさらに炎症惹起分子を放出して炎症を増強する。一方、時間経過とともに動員された単球/マクロファージは組織修復型マクロファージへ変化する。このように、局所のクッパー細胞・単球/マクロファージ・好中球の動態が肝臓虚血再灌流障害を制御すると考えられている。leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor (LMIR) (別名: CD300) は細胞外領域に一つの免疫グロブリン様ドメインをもつペア型免疫受容体ファミリーである。申請者のグループは、LMIR3 は immunoreceptor tyrosine-based inhibitory and switch motif (ITIM and ITSM) をもつ抑制型受容体でありミエロイド系細胞に幅広く発現すること、一方、LMIR4 は immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM) をもつ FcRgamma と会合する活性化型受容体であり好中球と一部の単球/マクロファージに限局して発現することを示した。さらに、LMIR3 は脂質セラミドを認識してマスト細胞の活性化を抑制してアレルギー反応を抑えることを明らかにした。LMIR3 と LMIR4 の細胞外領域の相同性は高いが、LMIR4 のリガンドや生体内機能は不明のままである。研究代表者は、LMIR4 が虚血再灌流により肝臓で放出される何らかの生体内脂質を認識し、好中球や単球/マクロファージを活性化させて肝臓障害を促進すると仮説を立てた。他方、LMIR3 は LMIR4 のカウンターレセプターとして肝臓虚血再灌流障害を抑える可能性も考えられた。これらを踏まえて、研究課題の核心をなす学術的「問い」として、ペア型免疫受容体は肝臓虚血再灌流障害をどのように制御するか? を掲げた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、単球/マクロファージや好中球に発現する LMIR3 と LMIR4 に着目して肝臓虚血再灌流障害の分子機序を解明することである。最終的な目標は、肝臓の虚血再灌流障害を抑えるための標的分子を同定して治療法を開発することである。これまでの知見に基づき、「活性化型 LMIR4 と抑制型 LMIR3 が肝臓の再虚血再灌流障害を正と負に制御する」と仮説を立て、その立証を試みる。また、LMIR が脂質を認識するペア型受容体であると想定されていることに注目し、虚血再灌流障害に伴い肝臓組織から放出される脂質の中に LMIR4 リガンドが存在すると考えてその同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) 野生型・LMIR3欠損・LMIR4欠損マウスに対して肝臓虚血再灌流障害モデルを施行した。一定時間後に採取した血液や肝臓を解析した。免疫細胞 (好中球・単球/マクロファージなど) の数・分画・細胞表面分子 (LMIR3・LMIR4・活性化マーカーなど) の発現量・アポトーシスやネクローシスの比率を解析した (フローサイトメトリー)。血清中の GOT・GPT・LDH 値を測定した (自動分析器)。血清・肝臓組織中のサイトカイン (TNFalpha など) のタンパク量 (ELISA) や mRNA 量 (qPCR) を測定した。肝臓組織切片を各種染色して炎症の程度を評価した。

(2) LMIR4 の細胞外領域を利用する結合アッセイとレポーターアッセイにより LMIR4 の脂質リガンド候補の同定を試みた。結合アッセイとして LMIR4-Fc (LMIR4 の細胞外領域とヒト IgG1 の Fc 領域の融合タンパク)、LMIR3-Fc (LMIR3 の細胞外領域とヒト IgG1 の Fc 領域の融合タンパク) あるいはコントロール Fc とプレートに固相化された各種脂質との結合能を評価した (ELISA)。レポーターアッセイとして、転写因子 NFAT の活性化により GFP の発現が誘導されるコントロールレポーター細胞株 (2B4-GFP)、2B4-GFP 細胞株に LMIR4 と FcRgamma を発現させたレポーター細胞株 (2B4-GFP-LMIR4) あるいは 2B4-GFP 細胞株に LMIR3 の細胞外・膜貫通領域及びヒト CD3zeta の細胞内領域を融合させた受容体を発現させたレポーター細胞株 (2B4-GFP-LMIR3) を利用した。脂質が固相化されたプレート上でこれらの細胞株を培養して GFP の発現誘導能を解析した (flow cytometry)。

4. 研究成果

(1) 野生型と LMIR3 欠損マウスに対して肝臓虚血再灌流障害モデルを施行したところ、再灌流後に上昇する血清 GPT・GPT 値 (肝細胞障害を反映する) に有意な差は認められなかった。この結果と一致した、両者で肝臓に集積する好中球数や肝臓組織における炎症性サイトカイン量に有意な差は認められなかった。肝臓組織の染色でも、両者に炎症細胞浸潤や肝細胞死の程度に有意な差は認められなかった。LMIR3 は好中球を含むミエロイド系細胞に広く発現する抑制型受容体であるが、これらの結果は、LMIR3 が肝臓虚血再灌流障害に影響しないことを示唆した。

(2) 野生型と LMIR3 欠損マウスに対して肝臓虚血再灌流障害モデルを施行したところ、野生型マウスと比較して LMIR4 欠損マウスの(再灌流後に上昇する)血清 GPT・GPT 値は有意に低かった。虚血再灌流後の肝臓に集積する好中球数も野生型マウスと比較して LMIR4 欠損マウスで有意に少なかった。虚血再灌流後の野生型マウスに集積する好中球や単球・マクロファージ系細胞を分離して解析した結果、単球・マクロファージ系細胞と比較して好中球で LMIR4 の発現は高いことが確認された。注目すべきことに、野生型マウスと比較して LMIR4 欠損マウスの(虚血再灌流後の)肝臓組織ではアポトーシス・ネクローシスをおこした肝細胞の割合が著しく低かった。これらの結果から、好中球に特異的に発現する活性化型 LMIR4 が欠損すると虚血再灌流による肝臓への好中球集積やそれに伴う炎症性サイトカインの産生が低下して、肝細胞死を伴う肝障害が強く抑えられると考えられた。

(3) LMIR3-Fc はプレートに固相化されたセラミドに結合するが、コントロール Fc 及び LMIR4-Fc がプレートに固相化されたセラミドに結合しないことを確認した。また、プレートに固相化されたセラミドは 2B4-GFP-LMIR3 細胞株における GFP 発現を誘導したが、2B4-GFP-LMIR4 細胞株やコントロール 2B4-GFP 細胞株における GFP 発現を誘導しないことを確認した。一方、LMIR4 に対する抗体を固相化したプレート上で 2B4-GFP-LMIR4 細胞株は GFP の発現を誘導したが、コントロール 2B4-GFP 細胞株は GFP の発現を誘導しなかった。そこで、セラミドに類似した様々な脂質(スフィンゴミエリンなど)をスクリーニングしたが、コントロール Fc と比較して LMIR4-Fc は(プレートに固相化された)これらの脂質に結合しなかった。また、(プレートに固相化された)これらの脂質は(2B4-GFP 細胞株と比較して)2B4-GFP-LMIR4 細胞株における有意な GFP の発現誘導能を示さなかった。これらの結果は、購入したセラミド類似脂質の中に LMIR4 リガンドが存在しないことを示唆した。

(4)肝臓虚血再灌流障害により肝臓に集積する好中球に LMIR4 が高発現すること、LMIR4 が肝臓虚血再灌流障害を悪化させることを考慮すると、LMIR4 リガンドは虚血再灌流後の肝臓に存在する可能性が高いと考えられた。そこで、定常状態及び虚血再灌流障害の肝臓から脂質を分離して、結合アッセイ及びレポーターアッセイを実施した。定常状態及び虚血再灌流障害の肝臓から分離した総脂質を固相化したプレート上で LMIR4-Fc あるいはコントロール Fc の結合能を解析したが、固相化した総脂質への結合能は両者で有意な差が認められなかった。次に、定常状態及び虚血再灌流障害の肝臓から分離した総脂質を固相化したプレート上で 2B4-GFP 細胞株と 2B4-GFP-LMIR4 細胞株を培養した。その結果、固相化した総脂質は(2B4-GFP 細胞株と比較して)2B4-GFP-LMIR4 細胞株における有意な GFP の発現誘導能を示さなかった。これらの結果は、定常状態あるいは虚血再灌流障害の肝臓から分離した総脂質の中に LMIR4 リガンドが存在しない可能性を示唆する一方、総脂質の中に LMIR4 リガンド脂質が埋もれている可能性も高いと考えられた。現在、クロマトグラフィーを利用して総脂質を分画し、そこに含まれる脂質を再抽出して結合・レポーターアッセイを繰り返すことを計画している。LMIR4 リガンドの存在する分画を見出し、上記の工程を繰り返して LMIR4 リガンドの同定を目指している。他方、LMIR4 リガンドが脂質ではない可能性も考慮して、定常状態及び虚血再灌流障害の肝臓からタンパク質などを分離して同様のアッセイで解析を試みる必要もある。

(5) これまでの結果を総合すると、好中球に発現する LMIR4 は虚血再灌流障害により肝臓で発現の上昇する分子(脂質の可能性は高いが、タンパク質など他の分子も否定できない)を認識して、好中球の局所への遊走や活性化を促進させると考えられた。また、LMIR4 シグナルは好中球遊走因子(ケモカインや LTB4 など)によるシグナルや好中球活性化分子(TLR リガンドや DAMPs など)によるシグナルと協調する可能性が強いと考えられた。実際、人工的な系を利用して好中球の LMIR4 を架橋刺激すると TLR4 シグナルを増強させることを確認している。従って、(虚血再灌流障害により局所で産生される)好中球遊走因子による好中球遊走及び(虚血再灌流障害により局所で産生される)DAMPs などによる好中球の活性化が(虚血再灌流障害により肝臓で発現上昇する)リガンド分子と LMIR4 の結合により促進されると考えられた。好中球の LMIR4 にそのリガンド分子が結合して LMIR4 の細胞外領域が架橋されると、LMIR4 と会合する FcRγ の ITAM のチロシンリン酸化を介して活性化シグナルが伝わると想定される。

他方、抑制型 LMIR3 の発現の有無は虚血再灌流障害に影響しなかったため、好中球に発現する LMIR3 が認識するリガンド脂質は虚血再灌流障害を受けた肝臓組織に豊富に存在しない可能性が示唆された。好中球や他のミエロイド系細胞に発現する LMIR3 は、少なくとも肝臓の虚血再灌流障害による好中球の遊走・活性化に影響しないことが判明した。一方、好中球に発現する LMIR3 は異なる臓器・組織における別の原因による炎症に関与する可能性は高いと考えられた。

これらの結果から、ペア型免疫受容体 LMIR ファミリーに属する個々の分子は、炎症の原因や付随するリガンド分子の局所における発現レベルに依存して、炎症を制御すると考えられた。また、LMIR4 が肝臓の虚血再灌流障害を促進するという結果は、LMIR4 と未知のリガンド分子の結合を阻害する LMIR4 抗体や LMIR4-Fc 融合タンパク質が肝臓虚血再灌流障害を抑える可能性を示唆しており、本研究成果は今後の予防・治療法開発へつながる可能性を有する。他の臓器における虚血再灌流障害において LMIR4 が果たす役割をマウスモデルで解析することも極めて重要で

ある。今後、LMIR4 リガンド分子の同定と好中球に発現する LMIR4 の生体内機能の全貌を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yin E, Fukuhara T, Takeda K, Kojima Y, Fukuhara K, Ikejima K, Bashuda H, Kitaura J, Yagita H, Okumura K, Uchida K	4. 巻 11
2. 論文標題 Anti-CD321 antibody immunotherapy protects liver against ischemia and reperfusion-induced injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85001-2	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 Fujimoto K, Uchida K, Yin E, Zhu J, Kojima Y, Uchiyama M, Yamamoto Y, Bashuda H, Matsumoto R, Tokushige K, Harada M, Inomata T, Kitaura J, Murakami A, Okumura K, Takeda K.	4. 巻 67
2. 論文標題 Analysis of therapeutic potential of monocytic myeloid-derived suppressor cells in cardiac allotransplantation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transpl Immunol.	6. 最初と最後の頁 101405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.trim.2021.101405.	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田浩一郎, 殷 恩智, 場集田 寿, 竹田和由, 奥村 康.
2. 発表標題 CD321 mAb (90G4) protects liver via inhibiting neutrophil infiltration in murine hepatic ischemia reperfusion model.
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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