

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17063

研究課題名（和文）加齢に伴うNKT・NK細胞による自然免疫制御の変化と脂肪性肝疾患の増悪機序の解明

研究課題名（英文）Age-related changes in innate immune regulation by NKT / NK cells and exacerbation mechanism in fatty liver disease

研究代表者

中寺 英介（Nakadera, Eisuke）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20596225

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）：加齢による脂肪肝炎増悪の機序解明のため、type I NKT細胞ノックアウトマウスおよびtype I/II NKT細胞ノックアウトマウスの高齢マウスを用いて高脂肪・高コレステロール食（HFHC）による脂肪肝炎動物モデルを作成して研究を行った。その結果、HFHC摂取後の加齢による炎症性サイトカインの発現亢進および肝線維化の亢進にはtype I NKT細胞が主要な役割を果たしていることが明らかになった。type II NKT細胞は主に一部のケモカインの発現亢進に寄与しており、若年マウスで生じる軽度の脂肪肝炎には一定の影響がみられたが、加齢マウスの脂肪肝炎においては役割が相対的に低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病態解明は急務であり、本研究の結果は加齢によるNASHの増悪プロセスにおけるNKT細胞の役割を解明した、学術的に重要なものである。今後type I NKT細胞の活動性を指標としたNASHの高リスク群の囲い込み、NASHの病態進展リスク評価、type I NKT細胞を標的としたNASHの新規治療法の確立につながることを期待できる。世界的に罹患数が増加し、肝硬変、肝がんの背景因子として重要なNASHの診断、治療法の確立に貢献しうる、将来の医療に貢献しうる意義の大きな結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the exacerbation mechanism of steatohepatitis with aging, we developed steatohepatitis animal models induced by high-fat, high-cholesterol diet (HFHC) using aged type I NKT cell knockout mice and type I/II NKT cell knockout mice. As a result, it was revealed that type I/II NKT cells play a major role in the age-related upregulation of inflammatory cytokines and liver fibrosis after HFHC. In addition, it was shown that Type II NKT cells mainly contribute to the upregulation of some chemokines and have some effect on mild steatohepatitis in young mice, but their impact on development of steatohepatitis are relatively decreased in aged mice.

研究分野：肝臓病学

キーワード：NKT細胞 老年学 非アルコール性脂肪肝炎 非アルコール性脂肪性肝疾患

## 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎・C型肝炎の治療が確立されたポストウイルス時代において、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)とアルコール性肝障害(ALD)の治療法の確立は最も大きな未解決問題の一つである。NASHとALDはそれぞれ肥満・メタボリックシンドロームとアルコール多飲とで背景因子は全く異なるが、脂肪肝炎の病理像を呈する点が酷似するだけでなく、病態も共通の部分があり、両疾患ともに発症増悪に自然免疫の活性化が重要な役割を果たしていると考えられている。

ナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)はNK細胞とT細胞の両方の特徴を持つTリンパ球亜群である。NKT細胞はさらにI型NKT(V14依存型)とII型NKT(V14非依存型)に細分化できる。NASHとの関連では、NASHモデルマウスでNKT細胞の増加が報告されていたが(1)、申請者が所属する研究グループでは、肥満マウスではNKT細胞の量的には増加を示したがINFの分泌能は低下しており、量的には増加しても質的には減弱していることを明らかにした(2)。さらに、成熟NKT細胞が完全に欠損するCD1dノックアウトマウスは、チオアセトアミド誘導肝障害が抑制されたことを示した(3)。ところが、I型NKT細胞のみが欠損するV14ノックアウトマウスではチオアセトアミド肝障害は抑制されず、NKT細胞のサブタイプによって肝障害における役割が大きく異なることが示唆された(4)。一方、アルコール性肝障害モデルマウスでは、CD1dノックアウトマウスとV14ノックアウトマウスで同程度に肝障害が抑制されたと報告されている(5)。これらの報告から、NKT細胞は肝の病態毎に異なる形で相補的な役割を果たしていることが想定された。

加齢はNASHおよびALDの独立した増悪因子であることが、主に疫学的な研究で示されており、申請者の所属する研究グループでは、高齢マウスでは若年マウスと比較して高脂肪食による脂肪肝炎が増悪することを示して報告した(Ishizuka K et al. Hepatology Supple 1. 2019)しかしながら、加齢によるNASHの増悪機序へのNKT細胞の関与は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では「高齢者ではNKT細胞の免疫制御機能にアンバランスが生じることにより自然免疫が賦活化・過剰反応が生じ、NASHが増悪する」との仮説を立てた(図1)。本研究の目的は若年・加齢両群のCD1DノックアウトマウスとV14ノックアウトマウスを用いてNASHモデルを作成し、この仮説を立証することである。

## 3. 研究の方法

8週齢(若年)および55週齢(高齢)の野生型C57Bl/6マウス、type I NKT細胞KOマウス(V14KO)、type I+type II NKT細胞KOマウス(CD1dKO)に、それぞれ高脂肪高コレステロール食(HFHC)もしくは対照食を8週間摂餌させて実験に供した。

肝脂肪化および炎症をHE染色で評価し、肝線維化をSirius Red染色で評価した。血清ASTおよびALTを酵素法で測定した。肝組織中のmRNAの発現をRT-PCR法で評価した。

## 4. 研究成果

HFHC野生型若年マウスの肝組織は軽微な脂肪滴沈着のみを認め、血清ALT値 $54 \pm 11$  IU/Lと軽度の上昇を認めたのに対して、HFHC加齢マウスでは著明な大滴性の脂肪肝炎を生じ、ALT値は $406 \pm 46$  IU/Lに上昇した(図1)。

若年マウスの血清ALT値はV14KOでは野生型と変化なく、CD1dKOで有意に低下した( $41 \pm 5$  IU/L)のに対して、加齢マウスではV14KOでは $268 \pm 45$  IU/Lと有意に低下し、CD1dKOでは $159 \pm 23$  IU/Lとさらに有意な低下を認めた。このことから、高齢マウスにおけるHFHC誘導脂肪肝炎ではtype I NKT細胞と

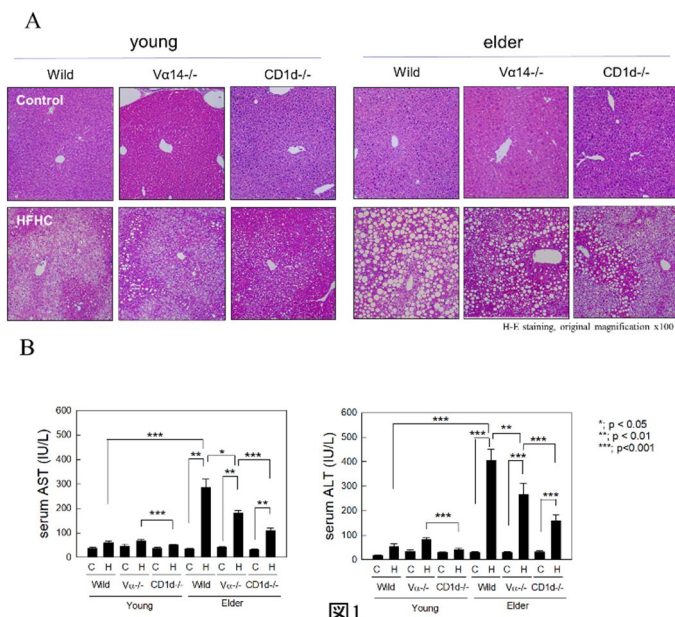


図1

type II NKT 細胞はいずれも脂肪肝炎の増悪に寄与していることが示唆された。

HFHC で肝組織中の TNF $\alpha$ ・TLR4 の mRNA 発現は上昇したが、HFHC 加齢マウスではいずれも HFHC 若年マウスの約 2 倍の発現亢進を認めた。また、TNF $\alpha$ 、TLR4、IFN $\gamma$  の HFHC による発現亢進は、全て若年・加齢マウス共に V 14KO/CD1dKO で有意に抑制された(図 2)

Sirius Red 染色では、HFHC 加齢マウスにおいて中心静脈周囲の線維化形成を認め、V 14KO、CD1dKO のいずれでも線維化形成を生じなかった。TGF $\beta$  mRNA の発現は HFHC 加齢マウスでのみ亢進し、V 14KO/CD1dKO 両方で発現が有意に抑制された(図 3)。この結果からは、Type I NKT 細胞が炎症の亢進のみならず、その後の肝線維化進展にも寄与したことが示唆された。

一方、Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2) と C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2)といったケモカインについては、V 14KO では有意な低下を生じず、CD1dKO で有意に低下した。CXCL2 の発現は若年マウスと加齢マウスで HFHC に対する反応性がほぼ同等であり、若年マウスにおける脂肪肝炎で主たる役割を果たしている可能性が考えられた。一方、CCL2 の発現は HFHC を与えた加齢マウスで有意な亢進を生じ、type II NKT 細胞に制御されていることが示された(図 4)。これらの結果からは、type II NKT 細胞はケモカインの発現亢進を介して若年マウスにおける脂肪肝の進展で重要な役割を担っているが、加齢マウスでは type I NKT 細胞の影響がより強くなると考えられた。

HFHC 誘導脂肪肝炎の病態において、加齢マウスでは若年マウスよりも type I NKT 細胞の影響が優位になり、TLR4-TNF $\alpha$  経路が亢進し、脂肪肝炎の増悪および線維化の進展に寄与したと考えられた。一方、若年マウスでは加齢マウスよりも HFHC 誘導脂肪肝炎は軽度であったが、V 14KO では脂肪肝炎の抑制が有意ではなく、type II NKT 細胞が脂肪肝炎の病態形成に有意な働きを果たしていることが示唆された。これらの結果を合わせて考えると、加齢に伴い HFHC に対する type I NKT 細胞の反応性が亢進し、炎症性サイトカインの発現亢進に寄与するものと考えられた(作業仮説)。

<引用文献>

1. Elinav E, Pappo O, Sklair-Levy M, Margalit M, Shibolet O, Gomori M, et al.

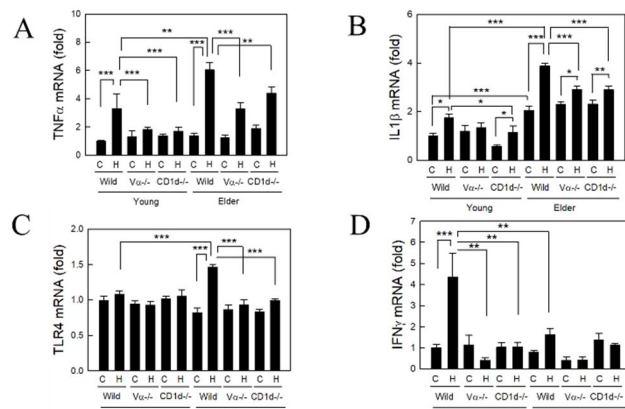
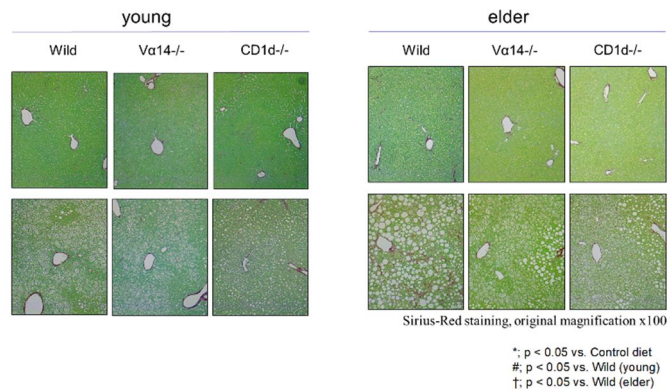


図2



Sirius-Red staining, original magnification x100

\*: p < 0.05 vs. Control diet  
#: p < 0.05 vs. Wild (young)  
†: p < 0.05 vs. Wild (elder)

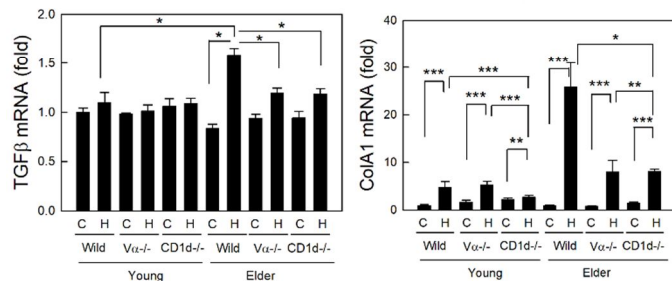


図3

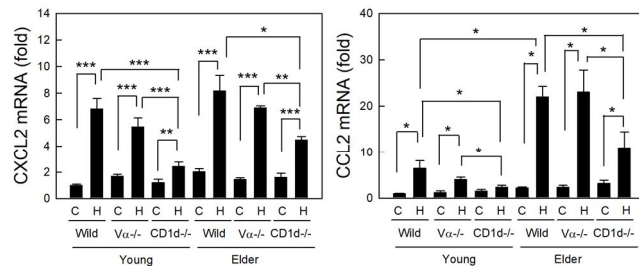
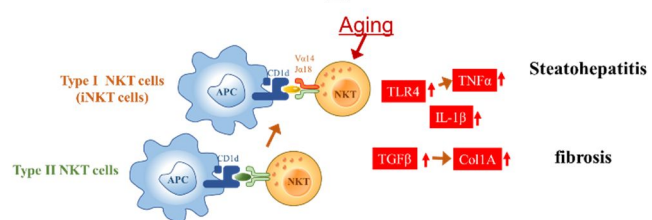


図4



作業仮説

Amelioration of non-alcoholic steatohepatitis and glucose intolerance in ob/ob mice by oral immune regulation towards liver-extracted proteins is associated with elevated intrahepatic NKT lymphocytes and serum IL-10 levels. *J Pathol.* 2006;208(1):74-81.

2. Yamagata H, Ikejima K, Takeda K, Aoyama T, Kon K, Okumura K, et al. Altered expression and function of hepatic natural killer T cells in obese and diabetic KK-A(y) mice. *Hepatol Res.* 2013;43(3):276-88.

3. Ishikawa S, Ikejima K, Yamagata H, Aoyama T, Kon K, Arai K, et al. CD1d-restricted natural killer T cells contribute to hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. *J Hepatol.* 2011;54(6):1195-204.

4. Ikejima K, Ishikawa S, Watanabe S. Reply to: "NKT cells in liver fibrosis: Controversies or complexities". *J Hepatol.* 2011;55(5):1166-7.

5. Mathews S, Feng D, Maricic I, Ju C, Kumar V, Gao B. Invariant natural killer T cells contribute to chronic-plus-binge ethanol-mediated liver injury by promoting hepatic neutrophil infiltration. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(2):206-16.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakadera E, Kon K, Arai K, Fukada H, Uchiyama A, Yamashina S, Ikejima K.
2. 発表標題 Type I and type II NKT cells additively exacerbates steatohepatitis caused by high-fat and high-cholesterol diet in aged mice.
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) The Liver Meeting, (Web) (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------