

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17630

研究課題名（和文）肝NKT細胞を基軸とする肝修復制御機構の解明

研究課題名（英文）Underlying mechanism of liver repair mediated by iNKT cells

研究代表者

西澤 伸恭（NISHIZAWA, NOBUYUKI）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60566925

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）：肝虚血再灌流障害後の肝組織修復過程においてNKT細胞が果たす役割を調べた。 α -galactosylcerimide 投与により活性化したNKT細胞はマクロファージと相互作用することでIL-4やIFN- γ を産生して、肝臓に集積するマクロファージの形質転換を加速させて肝修復を促進した。NKT細胞とマクロファージ共培養系でも相互作用がサイトカイン産生に必要であることが示された。活性化NKT細胞は急性肝障害後の肝組織修復を促進す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

肝虚血再灌流後の肝組織修復が障害されると肝不全に至り患者予後は不良となる。これまでマクロファージの形質転換が肝修復に必須であるがその機序は不明であった。本研究において、NKT細胞とマクロファージの相互作用がマクロファージ形質転換に寄与して肝修復を促進することが明らかになった。NKT細胞を標的とした新しい肝再生治療開発に結びつく可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：The role of NKT cells in liver tissue repair after hepatic ischemia-reperfusion injury was investigated. α -galactosylcerimide-treated activated NKT cells interacted with macrophages and produced IL-4 and IFN- γ , which accelerated the differentiation of macrophages accumulating in the liver and promoted liver repair. This interaction was demonstrated to be crucial for cytokine synthesis in the NKT cell-macrophage co-culture system. Activated NKT cells have the potential to enhance liver tissue repair after acute liver injury.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：肝 虚血再灌流障害 NKT細胞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

肝虚血再灌流 (Ischemia/reperfusion, I/R) 障害は、肝切除や肝移植の際に生じる肝障害の主な原因である。肝組織の修復過程が阻害されることで肝障害の遷延化や肝不全に至り、患者の予後は不良となる。そのため、急性肝障害後の肝組織修復の制御機構の解明は重要な課題である。急性肝障害時の肝組織内では、単球が障害肝に集積し、マクロファージに分化する。マクロファージは虚血再灌流障害などの急性肝障害後の肝修復に重要な役割を担っている。さらにマクロファージの表現型が炎症性から修復性へと変化することは、肝組織修復に極めて重要である。しかし、マクロファージの形質転換のメカニズムについては、未だ明らかになっていない。

ナチュラルキラー細胞 (Natural Killer T, NKT) 細胞は抗原提示細胞の CD1d 分子に提示された内因性および外因性の糖脂質抗原を認識する。活性化した NKT 細胞は、インターフェロン (IFN)- γ やインターロイキン (IL)-4 などのサイトカインを生産し、その後の免疫反応を形成することが知られている。他の臓器に比較して肝臓には NKT 細胞が豊富に分布する。また NKT 細胞が産生する炎症性サイトカイン IFN- γ や抗炎症性サイトカイン IL-4 は、マクロファージの形質転換に深く関与するメディエーターであることが分かってきた。さらに最近、心臓虚血再灌流障害後の心組織修復に NKT 細胞が関与することが報告された。これらの所見から肝虚血再灌流障害後の肝組織修復に活性化 NKT 細胞が関与する可能性があるかと推察される。

2. 研究の目的

本研究では肝虚血再灌流障害モデルを用いて肝修復における活性化 NKT 細胞の果たす役割とその制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物には 8 週令の雌性 C57BL/6 マウスを用いた。麻酔下に肝臓の 70% を支配する血管を 60 分間遮断し、その後遮断解除により再灌流させた。再灌流後 6, 24, 48, 72, および 96 時間に血液を採取し、また肝臓を摘出した。NKT 細胞活性化のために alpha-Galactosylceramide (α -GalCer) を再灌流直後に投与した。IL-4 や IFN- γ の作用を検討するためにそれぞれの中和抗体を投与した。

肝障害ならびに肝修復を評価するために血清 ALT 値と肝壊死面積を測定した。さらに肝細胞増殖能を評価するために増殖細胞核抗原 (PCNA) 発現を免疫染色で評価した。免疫細胞としてマクロファージ、NKT 細胞などを免疫染色、フローサイトメトリー、PCR などで解析した。NKT 細胞とマクロファージとの相互作用を調べるために細胞培養による解析をおこなった。NKT 細胞は肝臓から、マクロファージは骨髄から分離し共培養系で検討した。

4. 研究成果

活性化 NKT 細胞の肝修復にもたらす効果

血清 ALT 値を測定すると、 α -GalCer 投与群およびベークル投与群のいずれも肝 I/R 後 6 時間でピークを認め、徐々に減少した (図 1A)。肝 I/R 後 6 時間と 24 時間の血清 ALT 値には、両群間に統計的な有意差は認めなかった。肝 I/R 後 48 時間で、 α -GalCer

投与群の血清 ALT 値は、ピークル投与群と比較して有意に低値を示した。

また肝壊死面積は血清 ALT 値と同様に肝 I/R 後 24 時間で両群間に有意な差は認めなかったが、肝 I/R 後 48 時間における -GalCer 投与群の壊死面積は、ピークル投与群よりより低値であった (図 1B)。また、肝 I/R 障害後の肝細胞の増殖を調べるために、PCNA の免疫染色を施行した。ピークル投与群では、PCNA+肝細胞の割合が肝 I/R 後 48 時間で増加した。一方、-GalCer 投与群では、PCNA+肝細胞の割合が肝 I/R 後 24 時間より増加し、ピークル投与群と比較し高値を示した (図 1C)。これらの結果から、-GalCer の投与による iNKT 細胞の活性化は、肝 I/R 障害後の肝修復を促進すると考えられた。

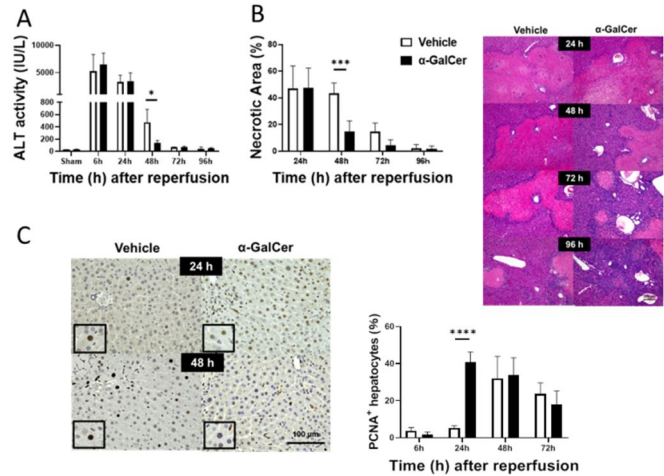


図1. 肝虚血再灌流障害後の肝修復効果

肝 I/R 障害後の NKT 細胞の経時的変化

肝 I/R 障害後の NKT 細胞をローサイトメトリーを用いて測定した (図 2A)。-GalCer-およびピークル投与マウスの両群で、肝 I/R 後 6 時間の CD45+細胞における iNKT 細胞の割合は減少しはじめ、肝 I/R 後 24 時間および 48 時間で顕著に減少した (図 2B)。ピークル投与群における iNKT 細胞は、肝 I/R 後 72 時間では低いままであったが、肝 I/R 後 96 時間ではわずかに上昇した。一方、-GalCer 投与群では、肝 I/R 後 72 時間および 96 時間における iNKT 細胞の割合が、ピークル投与群よりも大きかった。

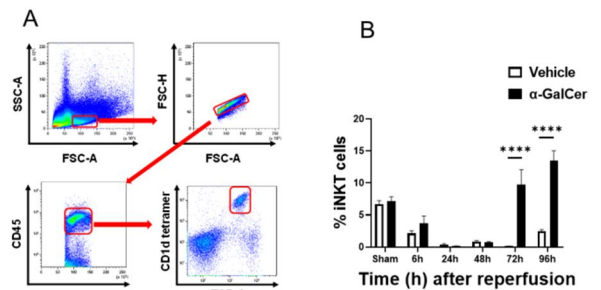


図2. 肝虚血再灌流障害後の肝修復効果

肝 I/R 障害後の集積マクロファージ

肝組織に集積するマクロファージのサブタイプを調べるために、フローサイトメトリーを行った。マクロファージの亜集団を調べたところ、2 つの異なる表現型のマクロファージを認め、Ly6G-/Ly6Chigh/CD11bhigh/F4/80high の細胞集団を炎症性マクロファージ (: Ly6Chigh マクロファージ)、Ly6G-/Ly6Clow/CD11bhigh/F4/80high の細胞集団を修復性マクロファージ (Ly6Clow マクロファージ) と定義した。

フローサイトメトリー解析の結果、ピークル投与群の肝臓では、Ly6Chigh マクロファージの割合が肝 I/R 後 6 時間で増加し、96 時間まで持続した (図 3)。-GalCer 投与群では、肝 I/R 後 6 時間および 24 時間における Ly6Chigh マクロファージ

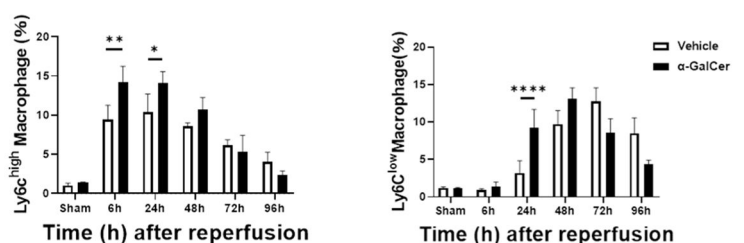


図3. 集積マクロファージの経時的変化

の割合が、ベークル投与群と比較し増加した。 -GalCer 投与群における Ly6Chigh マクロファージの時間的変化は、ベークル投与群と同様であった(図3)。ベークル投与群の肝臓では、Ly6Clow マクロファージの割合は肝 I/R 後 24 時間から増加し、72 時間で最大となった。ベークル投与群と比較して、 -GalCer 投与群の Ly6Clow マクロファージの割合は、肝 I/R 後 24 時間で有意な増加を示し、48 時間で最大となった。これらの結果は、 -GalCer 投与が、炎症性マクロファージと修復性マクロファージの両方を増加させ、肝 I/R 障害時に炎症性マクロファージから修復性マクロファージへの形質転換を早期に誘導することを示している。

NKT 細胞由来の IL-4 と IFN- γ 産生

急性肝損傷後の肝修復には、肝損傷部に集積したマクロファージ形質転換が関与する。炎症性から修復性マクロファージへの形質転換には、IL-4、IL-13、IFN- γ などのサイトカインが関与する。iNKT 細胞がこれらのサイトカインを産生し、マクロファージの形質転換に関与しているかどうかを調べるために、肝 I/R 後 6 時間において、活性化された iNKT 細胞が産生するサイトカインのレベルを測定した(図 4)。 -GalCer 投与群において、肝 I/R 後 6 時間で、iNKT 細胞由来の IL-4 と IFN- γ が上昇したが、IL-13 は低値であった。ベークル投与群では、iNKT 細胞のこれらのサイトカインレベルは低値であった。

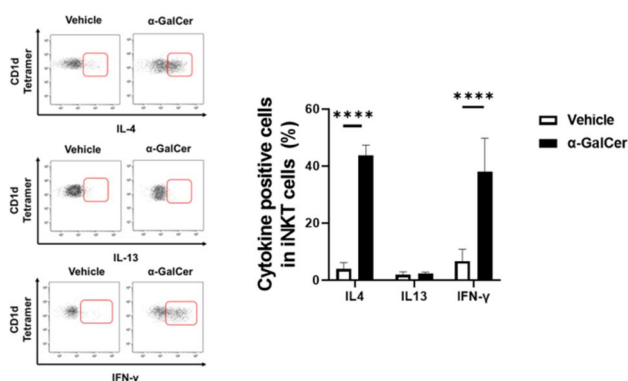


図4. 肝虚血再灌流6時間後のiNKT細胞由来サイトカイン

IL-4 および IFN- γ 阻害によるマクロファージ分化と肝修復に及ぼす効果

IL-4 および IFN- γ が肝修復に関連するマクロファージの表現型の変化に関与しているかどうかを検討した。まず、IL-4 の役割について抗 IL-4 中和抗体を用いて検討すると、肝 I/R 後 24 時間および 48 時間における Ly6Chigh マクロファージの割合が増加し、Ly6Clow マクロファージの割合が減少した。また肝 I/R 後 48 時間で、血清 ALT 値と壊死面積を増加させ、PCNA+肝細胞を減少させた。これらの結果より、IL-4 は炎症性から修復性マクロファージへの形質転換を促進することで肝修復に寄与していることが示唆された。

次に、 -GalCer 投与マウスにおいて、IFN- γ 中和抗体を投与すると、IFN- γ が炎症性マクロファージへの形質転換に関与している可能性が示唆されそれが肝臓の炎症の増強や肝細胞増殖の抑制に関連していることが示唆された。

共培養系による iNKT 細胞とマクロファージの相互作用評価

活性化した iNKT 細胞がマクロファージの分化に影響を与えるかどうかを、骨髄由来のマクロファージと肝臓由来の iNKT 細胞の共培養実験系を用いて検討した。

NKT 細胞がマクロファージ形質転換を促進するかどうかを調べた。骨髄由来マクロファージは、 -GalCer 存在下で炎症性および修復性マクロファージ表現型に関連する mRNA の発現を上昇させなかった。また、 -GalCer 非存在下で NKT 細胞と共培養した骨髄由来マクロファージにおいても、炎症性および修復性マクロファージ表現型に関

する mRNA の発現を上昇させなかった。一方で、 α -GalCer 存在下で NKT 細胞と共培養した骨髄由来マクロファージは、炎症性マクロファージ表現型 (Il1b, Il6, Ifng) と修復性マクロファージ表現型 (Mrc1, Retn1a, Il4, Il13) に関する遺伝子の発現を増強させた。これらの結果から、 α -GalCer で活性化された iNKT 細胞はマクロファージと相互作用して、マクロファージを炎症性および修復性マクロファージに分化させることが示唆された。

NKT 細胞が、骨髄由来マクロファージの表現型を変化させる IL-4 と IFN- γ を産生するかどうかを検討した。iNKT 細胞は、共培養実験系でこれらのサイトカインの mRNA とタンパク質レベルを著しく増加させた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Goto T, Ito Y, Nishizawa N, Kuroda Y, Nakamoto S, Hosono K, Naitoh T, Hiki N, Amano H.	4. 巻 36
2. 論文標題 Expansion of iNKT Cells Promotes Liver Repair Following Hepatic Ischemia Reperfusion Injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2604-2614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12995	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 Woo J, Haradome H, Adachi K, Iwai T, Nishizawa N, Murakumo Y, Kusano C, Kumamoto Y, Inoue Y, Ojiri H	4. 巻 -
2. 論文標題 A case of solid-type pancreatic hamartoma presenting high apparent diffusion coefficient value: histopathological correlation and literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Abdom Radiol	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) 10.1007/s00261-022-03442-3	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 Ushiku H, Sakuraya M, Washio M, Hosoda K, Niihara M, Harada H, Miura H, Sato T, Nishizawa N, Tajima H, Kaizu T, Kato H, Sengoku N, Tanaka K, Naitoh T, Kumamoto Y, Sangai T, Yamashita K, Hiki N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Pancreas-contactless gastrectomy for gastric cancer prevents postoperative inflammation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surg Endosc.	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) 10.1007/s00464-021-08961-6	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 Goto T, Ito Y, Satoh M, Nakamoto S, Nishizawa N, Hosono K, Naitoh T, Eshima K, Iwabuchi K, Hiki N, Amano H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Activation of iNKT Cells Facilitates Liver Repair After Hepatic Ischemia Reperfusion Injury Through Acceleration of Macrophage Polarization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 754106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.754106.	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 Otaka F, Ito Y, Nakamoto S, Nishizawa N, Hyodo T, Hosono K, Majima M, Koizumi W, Amano H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Macrophages contribute to liver repair after monocrotaline-induced liver injury via SDF-1/CXCR4.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Ther Med.	6. 最初と最後の頁 668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2021.10100.	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 Harada H, Soeno T, Nishizawa N, Washio M, Sakuraya M, Ushiku H, Niihara M, Hosoda K, Kumamoto Y, Naitoh T, Sangai T, Hiki N, Yamashita K.	4. 巻 112
2. 論文標題 Prospective study to validate the clinical utility of DNA diagnosis of peritoneal fluid cytology test in gastric cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1644-1654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14850	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 Nakamoto Shuji, Ito Yoshiya, Nishizawa Nobuyuki, Goto Takuya, Kojo Ken, Kumamoto Yusuke, Watanabe Masahiko, Majima Masataka	4. 巻 23
2. 論文標題 Lymphangiogenesis and accumulation of reparative macrophages contribute to liver repair after hepatic ischemia/reperfusion injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angiogenesis	6. 最初と最後の頁 395 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10456-020-09718-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 -

1. 著者名 Nakamoto Shuji, Ito Yoshiya, Nishizawa Nobuyuki, Goto Takuya, Kojo Ken, Kumamoto Yusuke, Watanabe Masahiko, Narumiya Shuh, Majima Masataka	4. 巻 34
2. 論文標題 EP3 signaling in dendritic cells promotes liver repair by inducing IL 13 mediated macrophage differentiation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 5610 ~ 5627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901955R	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 Fujiyama Yoshiki, Kumamoto Yusuke, Nishizawa Nobuyuki, Nakamoto Shuji, Harada Hiroki, Yokota Kazuko, Tanaka Yoko, Igarashi Kazuharu, Oiki Hironobu, Okuwaki Kosuke, Iwai Tomohisa, Kajita Sabine, Takahashi Hiroyuki, Tajima Hiroshi, Kaizu Takashi, Sasaki Jiichiro, Watanabe Masahiko, Yamashita Keishi	4. 巻 27
2. 論文標題 Promoter DNA Hypermethylation of the Cysteine Dioxygenase 1 (CD01) Gene in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 4007 ~ 4016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08291-2	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 Harada Hiroki, Soeno Takafumi, Yokoi Keigo, Nishizawa Nobuyuki, Ushiku Hideki, Hosoda Kei, Hiki Naoki, Yamashita Keishi	4. 巻 256
2. 論文標題 Prediction of Efficacy of Postoperative Chemotherapy by DNA Methylation of CD01 in Gastric Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 404 ~ 412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2020.07.001	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西澤 伸恭, 田島 弘, 贅 裕亮, 岡本 光祈子, 久保 任史, 三浦 啓壽, 加藤 弘, 海津 貴史, 仙石 紀彦, 細田 桂, 比企 直樹, 佐藤 武郎, 三階 貴史, 内藤 剛, 田中 潔, 隈元 雄介
2. 発表標題 膵癌に対する腹腔鏡下尾側膵切除術の手術手技と短期成績
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中本 修司, 伊藤 義也, 後藤 卓也, 西澤 伸恭, 古城 憲, 隈元 雄介, 馬嶋 正隆
2. 発表標題 樹状細胞のEP3シグナル伝達はマウスの虚血再灌流障害後の肝修復を促進する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西澤 伸恭, 山下 継史, 藤山 芳樹, 中本 修司, 久保 任史, 田島 弘, 海津 貴史, 隈元 雄介
2. 発表標題 CD01遺伝子DNAメチル化による膵癌新規診断法の有用性の検討
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海津 貴史, 田島 弘, 西澤 伸恭, 久保 任史, 隈元 雄介
2. 発表標題 腹腔鏡下肝切除における亜区域以上肝切除の安全性 単施設450例の検討
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤山 芳樹, 海津 貴史, 永 滋教, 中本 修司, 西澤 伸恭, 久保 任史, 田島 弘, 隈元 雄介
2. 発表標題 大腸癌肝転移症例に対する腹腔鏡下手術の安全性 117例の検討
3. 学会等名 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
---------	---------