

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790669

研究課題名（和文） 自然免疫シグナルと肝樹状細胞の特性を利用した免疫療法の開発

研究課題名（英文） Development of immunotherapy using features of innate immunity and liver dendritic cells

研究代表者

阿部 雅則 (ABE MASANORI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：40432786

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝樹状細胞の免疫応答と自然免疫シグナルを用いた免疫療法の開発に向けた基礎的研究を行った。肝樹状細胞は自然免疫シグナルに対する応答性が他臓器の樹状細胞と比べてが低い、その原因にエンドトキシンに対する低反応性が関与していることを *in vitro*, *in vivo* の系で明らかにした。これらの結果から、肝疾患に対する免疫療法の開発にはエンドトキシン耐性の維持と破綻のバランスを考慮する必要があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted basic research for the development of immunotherapy using liver dendritic cells (DC) and innate immunity. We found that, due to the hyporesponsiveness to endotoxin, liver DC stimulated by innate immune signal had less immunogenicity compared to DC from other organs both *in vitro* and *in vivo*. These data indicate that it is necessary to consider the balance between maintenance and break endotoxin tolerance for the development of immunotherapy in liver diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学・肝臓学

キーワード：樹状細胞、肝臓、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎、肝細胞癌などの難治性の肝疾患においては、現存の治療では十分な治療効果が得られていない患者が多数存在している。一方で、これらの疾患に対しては、免疫療法が有用である可能性が示唆されている。

樹状細胞(DC)は、自然免疫に加え、獲得免疫の橋渡しおよび獲得免疫の反応指向性をコントロールするという重要な役割を担っ

ている。申請者らは、肝臓の免疫応答、とくに DC に関する研究を一貫して行ってきた。本研究が開始される前に、肝臓に存在する DC は他臓器に比し、①未成熟であるが、抗原特異的免疫応答を誘導できること、②サブセットにより機能が異なること、③各種肝疾患モデルで機能低下がみられること、を報告してきた。また、ウイルス性肝炎や自己免疫性肝炎の発症や進展に DC の機能低下が関わっており、DC の活性化が肝疾患の治療に有

用であることを報告してきた。これらの研究結果をもって、申請者らの教室ではウイルス性肝炎、肝細胞癌に対する免疫療法の臨床応用を行ってきたが、その効果はまだ十分とはいえない。

肝臓が他臓器と免疫環境が大きく異なっている。その中で、肝臓に門脈を介して流入しているエンドトキシン (LPS) に着目した。申請者は、肝 DC では LPS の認識に必要な Toll-like receptor 4 (TLR4) の発現が脾臓に比べて低いこと、LPS に対する反応性が低下していることを報告してきた。これらの結果から、肝臓という場の特性により自然免疫に関する免疫関連分子の発現やシグナル伝達に違いがあり、肝 DC の機能特性を規定しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は肝免疫の特性を利用した免疫療法の開発・臨床応用であるが、本研究期間内には、肝局所に局在する DC の自然免疫シグナルによる免疫応答を解析し、その結果をもとに動物モデルでの治療に最適な DC の調整方法の確立を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝 DC の単離

C57BL/6 マウスの肝臓から比重遠心法を用いて肝非実質細胞 (NPC) を単離した。NPC から MACS を用いて CD11c 陽性細胞を単離し、肝 DC として実験に用いた。また、サブセット別の解析では、CD11c⁺B220⁻細胞をミエロイド DC (mDC)、CD11c⁺B220⁺細胞をプラズマサイトイド DC (pDC) として単離した。コントロールとしては、同じマウスの脾臓から単離した DC を用いた。

(2) 肝 DC の TLR 刺激に対する反応の解析 (in vitro)

申請者は、肝 DC の TLR の発現についてはすでに報告している。今回は、肝 DC の各種 TLR リガンド刺激による DC の機能変化の解析を行った。

① TLR リガンド刺激後の DC 上の共刺激分子と共抑制分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。

② TLR リガンド刺激後の DC のサイトカイン産生能について ELISA とフローサイトメトリーで解析した。また、NF- κ B の発現についてウェスタンブロット法で解析した。

③ TLR リガンド刺激 DC による T 細胞増殖補助能について、allogeneic MLR の系で解析した。T 細胞は C3H/HeN マウスから単離した。T

細胞増殖能は [³H]サイミジンの取り込み能で評価した。

④ T 細胞のサイトカイン産生誘導能については、ELISA とフローサイトメトリーで解析した。また、T 細胞から RNA を抽出し、T-bet、GATA-3 の発現を RT-PCR で解析した。

⑤ TLR リガンドは、2 種類以上のリガンドが相乗的あるいは拮抗的に働くことが報告されている。そこで、2 種類の TLR リガンドを添加して、肝 DC の機能解析を行った。

⑥ 肝 DC の CC ケモカインレセプターの発現を RNase protection assay で解析した。また、ケモカインに対する遊走能については Transwell® を用いた in vitro migration assay で評価した。

(3) 肝 DC の TLR 刺激に対する反応の解析 (in vivo)

C57BL/6 マウスに TLR リガンドを投与 (静脈注射) した。投与 16 時間後に肝臓・脾臓から DC を単離した。

① DC のサブセットの変化をフローサイトメトリーで解析した。

② DC のサイトカイン産生能、T 細胞増殖誘導能、T 細胞に対するサイトカイン産生誘導能については、上記の 2) ②、③と同様に行った。

(4) 疾患マウスモデルにおける肝 DC の機能解析

C57BL/6 マウスに 20%エタノールを 8 週間投与することにより、エンドトキシン濃度が上昇するアルコール性肝障害マウスモデルを作成した。このマウスにおける肝臓および脾臓 DC の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 肝 DC の TLR 刺激による反応の解析 (in vitro)

① 肝 DC は、CD80/CD86 が低発現であり、CD274 の発現もきわめて弱かった。CpG-ODN による刺激後には、肝 DC 上の CD80/CD86、CD274 の発現が増強した。その発現レベルの上昇は、CD274 で最も強くみられた (CD274/CD86 発現比 1.17 ± 0.28)。一方、脾 DC では CD86 の発現増強が強かった (CD274/CD86 発現比 0.62 ± 0.11)。DC のサブセットでは、特に肝 pDC 上の CD274 の発現レベルの上昇がみられた。

② 肝 DC の IL-12 産生能は脾 DC に比べて低かった。この低反応性は、TLR リガンド (LPS, CpG-ODN, R837) の添加によっても改善しな

った。一方、IL-10 の産生能については差がなかった。また、TLR リガンド刺激後の肝 DC の NF- κ B の活性化は脾 DC に比べて低かった。この結果は mDC と pDC に単離して行った解析でも同様な結果が得られた。

③ 肝 DC の T 細胞増殖誘導能は、脾 DC に比較して低かった。しかし、DC をサブセットに分けて解析すると、未刺激の mDC, pDC では差がみられなかった。

TLR リガンド (LPS, CpG-ODN) 刺激後の肝 mDC の T 細胞増殖誘導能は脾 mDC に比べて有意に低かった。同様の結果は pDC においても観察された。

④ 肝 DC の T 細胞に対する IFN- γ 産生誘導能は脾 DC に比べて低かった。また、T 細胞の T-bet の発現誘導についても脾 DC に比較して肝 DC で低かった。mDC を単離して行った検討でも、同様の結果が観察された。この低反応性は、TLR リガンド (LPS, CpG-ODN) 刺激後の DC を用いても改善しなかった。一方、IL-4 や IL-10 の産生誘導能には差がみられなかった。

次に、C3H/HeN マウスと TLR4 mutant マウスである C3H/HeJ マウスから DC を単離して、CpG-ODN 刺激 DC の T 細胞に対する IFN- γ 産生誘導能を解析した肝 DC と脾 DC では差がみられなかった。すなわち、LPS-TLR4 の系が肝 DC の免疫応答の特性に必須であることが明らかとなった。

⑤ 肝臓と脾臓から単離した mDC を LPS 存在下あるいは非存在下で CpG-ODN と *in vitro* で共培養した。脾 mDC の CpG-ODN 刺激による IL-12 産生能は、LPS の有無により変化がみられなかった。一方、肝 mDC では LPS が存在すると、濃度依存性に IL-12 産生能が低下した。この結果は、④の結果を反映しているものと考えられた。

⑥ 肝 DC は未刺激の状態では CCR1, CCR2, CCR5 を高発現していたが、CCL3, CCL5 に対する遊走能はみられなかった。TLR リガンド刺激後には肝 DC の CCR7 発現が増強し、CCL19, CCL21 に対する遊走能がみられるようになった。pDC では mDC に比較して CCL19, CCL21 に対する遊走能が低かった。肝 DC は常に LPS に暴露されている状況にあり、そのために DC のケモカインに対する反応性が低下していることが推察された。

(2) 肝 DC の TLR 刺激に対する反応の解析 (*in vivo*)

① C57BL/6 マウスに CpG-ODN を投与した後、肝臓および脾臓の DC のサブセットを解析した。脾臓では mDC, pDC サブセットの割合に

変化はみられなかったが、肝臓では pDC の割合が増加した。このことは、(1)⑥の現象を反映しているものと推察された。すなわち、mDC は TLR 刺激に反応してリンパ組織に遊走する能力が強いため、結果として pDC の割合が増加したと考えられた。

② CpG-ODN を投与したマウスから DC を単離し、IL-12 産生能を解析したところ、脾 DC に比べて肝 DC で有意に低かった。mDC を用いた解析でも、肝 DC の IL-12 産生能は低かった。この結果は *in vitro* の結果 ((1)②) を反映しているものと考えられた。

③ CpG-ODN を投与したマウスの肝 DC の T 細胞増殖誘導能は、脾 DC に比較して低かった。ところが、mDC を単離して解析を行うと、T 細胞増殖誘導能に差はみられなかった。この結果は *in vitro* の結果 ((1)③) を反映しているものと考えられた。

④ LPS を投与したマウスの肝臓・脾臓から mDC を単離し、*in vitro* で CpG-ODN により刺激した。LPS 投与マウスの肝 mDC は脾 mDC に比較して CpG-ODN 刺激に対する IL-12 産生能が低かった。また、LPS 投与マウスの肝 mDC は CpG-ODN 刺激を加えても、T 細胞に対する IFN- γ 産生誘導能が低かった。

(3) 疾患マウスモデルにおける肝 DC の機能解析

20%エタノール摂取を 8 週間投与した段階では、LPS 濃度の上昇はみられるが、肝障害は惹起されていなかった。

① エタノール投与群とコントロール群で DC の細胞表面マーカー (MHC class I, II, CD80, CD86, CD40) の発現には差がなかった。

② CpG-ODN 刺激による共刺激分子の細胞表面の発現増強は脾 DC ではエタノール群で有意に低かったのに対し、肝 DC ではエタノール摂取の影響がほとんどみられなかった。

③ エタノール摂取マウスでは肝・脾 DC の T 細胞増殖誘導能がコントロール群に比し低下していた。

④ CpG-ODN 投与したエタノール群の脾 DC の T 細胞増殖誘導能はコントロール群に比して有意に低下した。一方、肝 DC ではエタノール摂取による差はみられなかった。

エタノール摂取マウスでは肝 DC の TLR 刺激に対する反応性がみられなくなっていた。この原因としては、エタノール摂取に伴うエンドトキシン濃度の増加による endotoxin tolerance の破綻が関与していると考えられ

た。

上記の結果から、肝 DC の免疫応答は TLR リガンド刺激に対する反応が脾臓と異なっており、特に LPS の影響を強く受けていることが明らかとなった。したがって、肝疾患に対する免疫療法の開発にはエンドトキシン・トレランスの維持と傷害・破綻のバランスを考慮する必要があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Miyake T, Akbar SMF, Yoshida O, Chen S, Hiasa Y, Matsuura B, Abe M, Onji M. Impaired dendritic cells functions disrupt antigen-specific adaptive immune responses in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 45: 859-867, 2010.
2. Yoshida O, Akbar SMF, Chen S, Miyake T, Abe M, Murakami H, Hiasa Y, Onji M. Regulatory natural killer cells in murine liver and their immunosuppressive capacity. *Liver Int* 30: 906-912, 2010.
3. Akbar SMF, Horiike N, Chen S, Michitaka K, Abe M, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. Mechanisms of restoration of immune responses of chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy: increased antigen processing and presentation by dendritic cells. *J Viral Hepat* 18: 200-205, 2011.
4. Akbar SMF, Furukawa S, Horiike N, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Safety and immunogenicity of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2010 May 17 [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 阿部雅則、濱田麻穂、川崎敬太郎、多田藤政、三宅映己、松浦文三、日浅陽一、恩地森一 アルコール性肝障害モデルにおける肝樹状細胞の機能 第 46 回日本肝臓学会総会 (2010. 5. 28 山形)
2. 阿部雅則、ファズレ アクバル、恩地森一 HBs 抗原+HBc 抗原パルス樹状細胞を用いた治療ワクチンの開発 第 96 回日本消化器病学会総会 (2010. 4. 22 新潟)
3. 阿部雅則、恩地森一、Angus W. Thomson エンドトキシンによる肝樹状細胞の低反応性の誘導 第 13 回日本肝臓学会大会 (2009. 10. 15, 京都)

4. 阿部雅則、吉田理、恩地森一 HBs 抗原パルス DC 投与による肝臓内への HBs 抗原特異的なリンパ球の誘導 第 13 回日本肝臓学会大会 (2009. 10. 14, 京都)

5. 時田大輔、阿部雅則、Angus W. Thomson 肝形質細胞様樹状細胞は制御性 T 細胞存在下にアロ T 細胞に低刺激性を誘導する 第 46 回日本消化器免疫学会総会 (2009. 7. 23 松山)

6. 阿部雅則、吉田理、濱田麻穂、道堯浩二郎、堀池典生、日浅陽一、恩地森一 肝樹状細胞の共刺激/共抑制分子が免疫応答に与える影響 第 45 回日本肝臓学会総会 (2009. 6. 5 神戸)

7. 阿部雅則、吉田理、濱田麻穂、三宅映己、多田藤政、日浅陽一、恩地森一 TLR リガンドが肝樹状細胞の遊走能に与える影響 第 95 回日本消化器病学会総会 (2009. 5. 9 札幌)

8. 阿部雅則、時田大輔、恩地森一 肝移植後の免疫抑制剤離脱における樹状細胞と制御性 T 細胞の役割 第 95 回日本消化器病学会総会 (2009. 5. 8 札幌)

〔図書〕(計 3 件)

1. 阿部雅則、SMF Akbar、恩地森一 B 型肝炎治療の最新戦略 HBs 抗原+HBc 抗原パルス樹状細胞を用いた治療ワクチンの開発 消化器科 52: 120-124, 2011.
2. 阿部雅則、吉田理、恩地森一 肝疾患領域の臨床と樹状細胞 B 型慢性肝炎 肝胆膵 58: 225-231, 2009.
3. 吉田理、阿部雅則、恩地森一 B 型肝炎に対する免疫療法の今後の展望 肝胆膵 58: 613-620, 2009.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 雅則 (ABE MASANORI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授

研究者番号: 40432786