

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790659

研究課題名（和文） NASH 病態における炎症性マクロファージ/クッパー細胞と制御性 T 細胞の関与の解明

研究課題名（英文） Role of regulatory T cells and inflammatory macrophage / Kupffer cells in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

横川 順子 (YOKOKAWA JUNKO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00453019

研究成果の概要（和文）：メタボリックシンドロームモデルマウスを用いた肝制御性 T (Treg) 細胞の発現および機能解析により、ob/ob マウス、db/db マウスでは脂肪性肝炎の進展に関わる炎症性マクロファージ (M1) や CD8+T 細胞の肝発現が促進しているにも関わらず、Treg 細胞の抗炎症作用が十分機能しないために炎症が拡大進展している可能性が示唆された。更にこれらがレプチン欠損、受容体欠損マウスに特異的に生じていることから、レプチンがこれらの病態に深く関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated numbers and function of regulatory T cells (Tregs) in liver tissue in mouse model for metabolic syndrome. We found that the numbers of Tregs in KK-Ay mice were increased, whereas the numbers of Tregs in ob/ob mice and db/db mice were not increased compared to control C57Bl/6 mice. mRNA expression of the anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-10, TGF- β in Tregs were decreased in KK-Ay mice, ob/ob mice and db/db mice compared to control C57Bl/6 mice. Large numbers of CD8⁺ effector T cells and inflammatory macrophage (M1) infiltrated liver tissue in ob/ob mice and db/db mice. Our findings suggest that the reduced anti-inflammatory effect of Tregs develop steatohepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：肝臓学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎、制御性 T 細胞、NASH、Treg、クッパー細胞、炎症性マクロファージ、肝免疫

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの肝表現型で

ある非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、なかでも非アルコール性肝炎 (NASH) は肝硬

変、肝癌へ進展しうる病態である。肝内での免疫応答による炎症反応が NASH 病態の中心であり、肝マクロファージであるクッパー細胞や脂肪組織内マクロファージの炎症化 (M1 化) が関与していることが推察されている (*J Clin Invest* 116:1491, 2006, *J Clin Invest* 116:115, 2006, *Hepatology* 42:880, 2005)。しかし、なぜマクロファージが炎症化するのか、他の免疫担当細胞とどのように関与しているのかは不明である。

我々はこれまで、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺制御性 T 細胞 (Treg) による免疫制御機能について報告してきたが (*Clin Cancer Res* 14:1032, 2008, *DDW* 2009)、Treg は炎症状態下では、抗炎症サイトカインを産生し (*Nature Medicine* 15:192, 2009)、また免疫担当細胞への直接作用により (*J Immunol* 177:40, 2006)、抗炎症作用を示す。肝臓でも Treg は作動しており、ウイルス性肝炎やマウス肝炎モデルでは、肝内の Treg が強い抗炎症作用を示すことが報告される (*J Immunol* 177:739, 2006, *Hepatology* 45:475, 2007)。更にヒト Treg はマクロファージの分化に関わることも報告され、炎症性マクロファージ (M1) または非炎症性マクロファージ (M2) への分化に対し、炎症化 (M1 化) を抑制し、非炎症化 (M2 化) を促進する (*PNAS* 104:19446, 2007)。しかし、NASH では炎症性マクロファージ (M1) が誘導されており、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-12、IL-6 を強く産生し (*J Clin Invest* 117:175, 2007)、これが肝細胞の壊死・炎症とそれに伴う線維化を惹起して NASH の病態進展をもたらしている。しかし、これら慢性炎症反応に対し、なぜ Treg による抗炎症作用や、マクロファージの炎症化 (M1 化) 抑制作用が働かないのかは、解明されていない。

これらの背景から、①NASH では Treg の減

少や抑制機能低下が存在するために、②マクロファージの炎症化 (M1 化)、③Treg の抗炎症作用の低下が生じ、肝炎が持続することが NASH の病態進展に関与するのではないか、という仮説を立てた。

2. 研究の目的

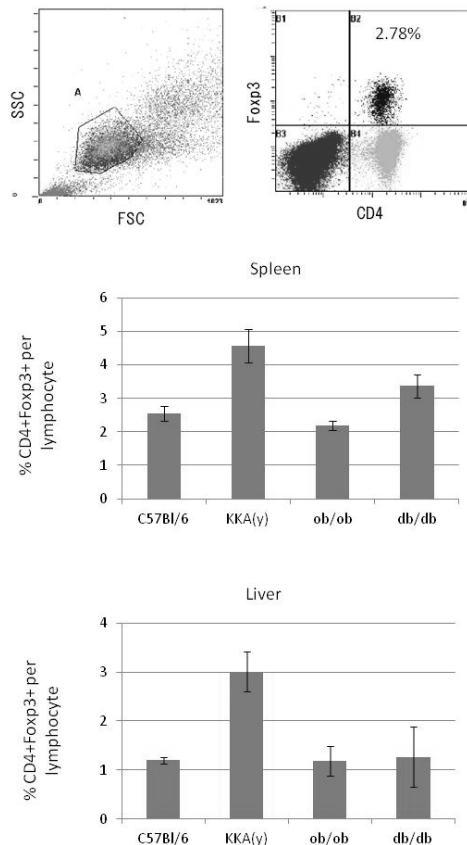
本研究は、非アルコール性脂肪性肝炎の病態進展の中心となる炎症性マクロファージ/クッパー細胞に対する Treg の関与を明らかにし、NASH における免疫応答機序を中心とした病態の解明と新たな治療法の開発に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) メタボリックシンドロームモデル動物である ob/ob マウス、db/db マウス、KK-Ay マウス、コントロールとして C57B1/6 マウスを用いた。
- (2) 肝臓から単核球を採取し、フローサイトメトリーで CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 細胞、CD11c⁺F4/80⁺細胞である炎症性マクロファージ (M1)、CD8⁺T 細胞の細胞分画を評価した。
- (3) 磁気分離により Treg 細胞を分離し、サイトカイン発現について real time PCR 法を用いて定量的に比較した。

4. 研究成果

- (1) Treg 細胞分画の評価を行うため、KK-Ay マウス、ob/ob マウス、db/db マウス、C57B1/6 マウスの肝臓から単核球を採取し、フローサイトメトリーで CD4⁺FoxP3⁺Treg 細胞を解析した。KK-Ay マウスではコントロールの C57B1/6 マウスと比較して Treg 細胞分画が有意に増加していたのに対し、ob/ob マウス、db/db マウスでは増加を認めなかった。また、脾臓から採取したリンパ球でも同様の傾向にあった。



(2) Treg 細胞のサイトカイン発現について評価した。肝臓から採取した単核球から MACS で Treg 細胞を分離し、抗炎症性サイトカイン発現 (IL-4, IL-10, TGF- β) について real time PCR 法を用いて定量的に比較した。ob/ob マウス、db/db マウス、KK-Ay マウスにおける IL-4, IL-10, TGF- β の発現は、コントロールの C57Bl/6 マウスと比較して低下していた。

(3) ob/ob マウス、db/db マウス、KK-Ay マウスの肝組織では CD11c⁺F4/80⁺細胞である炎症性マクロファージ (M1) が誘導されていることがフローサイトメトリーで確認された。興味深いことに、ob/ob マウス、db/db マウスでは CD3⁺T 細胞分画における CD4⁺T 細胞分画の割合が C57Bl/6 マウスと比較して有意に減少していたのに対し、CD8⁺T 細胞分画の割合は有意に増加していた。KK-Ay マウスではこれらの変化を認めなかった。

以上より、ob/ob マウス、db/db マウスでは脂肪性肝炎の進展に関わる炎症性マクロファージ (M1) や CD8⁺T 細胞の肝発現が促進しているにもかかわらず、Treg 細胞の抗炎症作用が十分機能しないために炎症が拡大進展している可能性が示唆された。さらに、CD4⁺T 細胞と Treg 細胞分画の減少は、レプチン欠損である ob/ob マウス、レプチン受容体欠損である db/db マウスに特異的に生じていることから、レプチンがこれらの病態に深く関与していると考えられた。

(総括)

メタボリックシンドロームでは脂肪組織炎症があり、炎症性マクロファージ (M1) が主なエフェクターであるとの報告が多数される (*J Biol Chem* 278:46660, 2003, *J Clin Invest* 112:1796, 2003)。NASH でも肝マクロファージであるクッパー細胞が炎症表現型 (M1 化) を示しており (*Hepatology* 31:633, 2000, *Hepatology* 42:880, 2005)、以前から指摘されているクッパー細胞機能異常 (炎症性サイトカイン産生、食能低下など) を反映している。脂肪組織内では Treg 数が減少しており、脂肪組織炎症に関与していることが報告されている (*Nature Med* 15:930, 2009)。

今回の結果では、脂肪性肝炎の肝組織内に浸潤する Treg 細胞分画も減少し、更に個々の Treg の抑制機能が減弱していることが示され、メタボリックシンドロームでは、肝組織においても Treg の減少・機能低下が肝炎の病態進展に関与している可能性が示された。Treg 細胞分画の減少は、レプチン欠損である ob/ob マウス、レプチン受容体欠損である db/db マウスに特異的に生じていることから、レプチンがこれらの病態に深く関与していると考えられたが、今後レプチンと Treg の関係についても更に検討を加える必要があ

る。

5. 主な発表論文等；なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 順子 (YOKOKAWA JUNKO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00453019