

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510345

研究課題名(和文)性差に基づいた自己免疫性肝炎の発症と肝内樹状細胞との関連性について

研究課題名(英文)Relationship between the onset of autoimmune hepatitis and hepatic dendritic cells by gender devise.

研究代表者

富山 智香子(TOMIYAMA, Chikako)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80359702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性肝炎は、妊娠や閉経など性ホルモンの変動で誘発されることが報告されているが、その発症機構について解明に至っていない。このことから、エストロゲンの自己応答性への影響について自己免疫性肝炎モデルを用いて樹状細胞に焦点を当てて検討した。その結果、エストロゲン投与により自己免疫性肝障害が抑制され、これらマウス肝内にCD274陽性で未熟な樹状細胞の増加を認めた。また、これら肝内樹状細胞のみにIL-10産生能の増強を認め、血清中のIL-12量が減少していた。以上から、エストロゲン暴露によって肝内に増加した抑制能を持つ樹状細胞が、自己免疫性肝障害を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that autoimmune hepatitis is induced by the drastic change of sex hormone, such as pregnancy and menopause. However, its pathogenic mechanism is not well-known. In this study, we focused on the hepatic dendritic cells. We used the mouse model of autoimmune hepatitis to investigate the effect of the autologous reactivity of estrogen. As a result, it was shown that the autoimmune liver injury of the mice was inhibited by the administration of estrogen. At the same time, the number of CD274+ immature dendritic cells was increased in the liver of those autoimmune hepatitis mice. Moreover, only these dendritic cells showed the elevated ability to produce IL-10. At the same time they indicated the decreased serum level of IL-12. These results suggested that the inhibitory dendritic cells, which were increased in the liver by estrogen exposure, suppressed the autoimmune liver injury.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：ジェンダー

キーワード：肝樹状細胞 自己免疫性肝炎 エストロゲン CD274 IL-10 免疫調節

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性肝炎(autoimmune hepatitis: AIH)は、他の自己免疫性疾患と同様、罹患者の男女比は1:7と女性に多い。また、日本において閉経期である50~60歳代とエストロゲンの大きく低下する年代が好発年齢である。一方、罹患者でエストロゲンの産生量が増加する妊娠中では軽快例もあるため、本疾患の病態とエストロゲンとの関連性は深い。しかし、エストロゲンと自己免疫性疾患との関連性については、SLEやRAにおいてエストロゲンがB細胞に作用し、自己抗体を含む抗体産生能の増加が見られること、またマクロファージに作用してIL-1, IL-6, TNF- α といった炎症性サイトカインの産生増強が関与することは報告されている(Cutolo M et al, *Ann NY Acad Sci*, 1089:538-47, 2006)が、自己免疫性肝炎での報告は少ない。

AIHの発症および肝炎持続の原因として自己肝細胞への免疫寛容破綻や過剰な免疫応答がいわれているものの、まだ原因解明にまでは至っていない。しかし、ヒトでは組織適合抗原であるHLA-DR4やDR3が感受性遺伝子であること、モデルマウスにおいてCD4⁺CD25⁺の細胞表面抗原を持つ制御性T細胞やIL-10の減少により自己に対する免疫寛容が破綻し肝障害が起こるとの報告もある(Erhardt A, et al, *Hepatology*, 45:475-485, 2007)。このように従来の報告では、肝細胞を直接傷害する細胞群や液性因子などEffector phaseでの報告が多く、抗原(自己抗原含む)を提示する樹状細胞(dendritic cell: DC)に焦点を当てた報告は少なく、AIHの炎症臓器である肝臓内のDCとなると更に報告は少ない。

DCは抗原を取り込みT細胞へ提示して異物を排除するといった免疫応答や、逆に自己に対して攻撃しないよう免疫寛容に働くといったT細胞の反応を左右する非常に重要な細胞の一つである。DCは骨髄系DC(myeloid DC: mDC)と形質細胞様DC(plasmacytoid DC: pDC)に大きく分けられ、前者は従来の抗原提示細胞であり異物を排除する免疫応答を担い、後者はIFN- α 産生や免疫寛容誘導に関与するといわれている。マウス肝臓にはpDCが多く存在し、それらがT細胞に対して免疫寛容を誘導し、肝移植における移植片生着に関わっている事が報告されている(Lau AH, et al, *Gut*, 52: 307-14, 2003, Castellaneta A, et al, *J Immunol* 183:6922-6932, 2009)。

このことから、自己免疫性肝炎の病態形成とエストロゲンとの関連性について樹状細胞を中心とした免疫応答を研究することは、自己免疫性肝炎だけでなく今後の自己免疫性疾患全般の治療の基盤になることが十分考えられる。

2. 研究の目的

AIHモデルであるConcanavalin A (Con A)誘導性肝炎マウスの肝内樹状細胞を中心と

した免疫応答に着目してエストロゲンが病態制御にどのように影響しているかについて、以下の点を検討しその機構を明らかにする。

- (1)エストロゲン投与量とAIHへの有効性について; 血中のトランスアミナーゼと自己抗体との関連性
- (2)エストロゲン投与が正常マウス免疫担当細胞の性状及び機能に及ぼす影響
- (3)エストロゲン投与がAIHモデルマウスの肝障害及び病態調節能へ与える影響

3. 研究の方法

(1)エストロゲン投与量とAIHへの有効性について; 血中のトランスアミナーゼと自己抗体との関連性

自己免疫性肝炎モデルとしてConcanavalin A (Con A)の静脈的投与(15mg/kg)したマウスを用いて、エストロゲン投与量を変えて経時的に血清を採取し、トランスアミナーゼ及び自己抗体について測定を行う。これにより、エストロゲンの有効投与量と自己免疫性肝炎の肝障害と自己抗体との関連性が明らかになることが予想される。

(2)エストロゲン投与が正常マウスの免疫担当細胞の性状及び機能に及ぼす影響

正常マウスに(1)で決定した有効エストロゲン量を投与し、そのマウスの肝臓から定法によりNKT細胞を含むT細胞を分離し、表面抗原の変化をフローサイトメトリーにて検討を行う。また、機能(alloに対するT細胞増殖応答、マイトジェンに対するT細胞増殖応答、細胞傷害活性、サイトカイン産生能など)についても同様に検討を行う。樹状細胞(Dendritic cell: DC)については、各臓器から独自の酵素処理・比重遠心法を用いて直接分離する方法を樹立しているため、その方法を用いてNKT細胞と同様に細胞表面抗原と機能について検討を行う。これにより、エストロゲンが免疫担当細胞及び免疫応答に与える影響について、抗原を提示する側の樹状細胞と、抗原提示を受けてeffector細胞として反応するNKT細胞を含むT細胞の両面から追究できる。

(3)エストロゲン投与がAIHモデルマウスの肝障害及び病態調節能へ与える影響

AIHモデルマウスにエストロゲンを投与したときの、肝障害の程度(トランスアミナーゼ)、自己抗体の測定を行う。同時に肝臓のリンパ球及びDCを採取し、その細胞表面抗原をフローサイトメトリーで解析を行う。また、サイトカイン産生、細胞傷害活性など機能についても検討を行う。このような実験を行うことは、自己免疫性肝炎の肝障害抑制

の解明につながる可能性を十分に含んでいる。

4. 研究成果

(1) エストロゲンの AIH への有効性

エストロゲンが自己免疫性肝炎の肝障害の程度および自己抗体産生に与える影響について検討した。マウスに各濃度(5 μ g, 25 μ g, 250 μ g/mouse/day)のエストロゲンを3日間皮下注射した後、Con A を静脈的に投与し自己免疫性肝炎を誘導した。各マウスから経時的に血清を採取し、肝障害の程度と自己抗体価について検討した。その結果、エストロゲン濃度依存的に肝障害が抑制されたものの、最大投与量においては胸腺萎縮を認めた。このことからエストロゲンは Con A 誘導性肝炎を抑制することが明らかとなり、投与量は胸腺萎縮がなく、かつ Con A 誘導性肝障害を抑制する 25 μ g/mouse/day とすることとし、以下すべての実験にて同量の投与を行うこととした。次に、自己抗体価(ss-DNA)については、肝障害が抑制された個体に対しては低下傾向にあったものの、エストロゲン投与量と抗体価の関連性については不明であった。

(2) エストロゲン投与が正常マウスの免疫担当細胞の性状及び機能へ及ぼす影響

次にエストロゲン投与マウスの DC の性状・動態解析(*in vivo*)について検討した。Con A 誘導性肝障害を抑制し、かつ胸腺萎縮のないエストロゲン量の 25 μ g を正常マウスに3日間投与し、肝臓及び脾臓 DC の性状解析を行った。その結果、エストロゲン投与マウスの DC 絶対数は、肝臓、脾臓ともに正常マウスに比して変化を認めず、また、DC 分画の変化も認めなかった(図 1)。

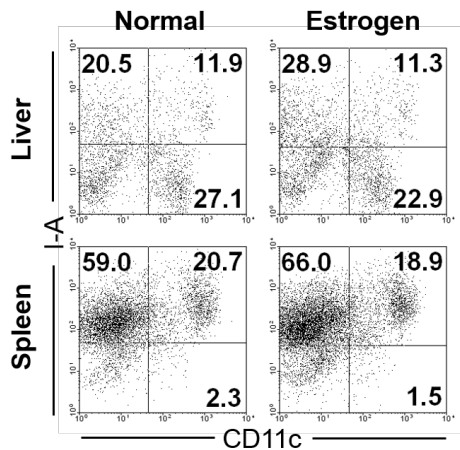


図1 エストロゲン投与マウスの肝・脾における樹状細胞分画

さらに、DC 機能分子である CD80, CD86, CD40, CD273, CD274 について三重染色し、フローサイトメトリー解析を行ったものの、正常マウスに比して発現の変化のある分子は認められなかった。

(3) エストロゲン投与が AIH モデルマウスの肝障害及び病態調節能へ与える影響

エストロゲンが AIH モデルマウスの Con A 誘導性肝障害へ与える影響について検討を行った。その結果、エストロゲンは Con A 誘導性肝障害を抑制した(図 2)。

次に、エストロゲン投与が Con A 誘導性肝障害マウスの樹状細胞分画に与える影響につ

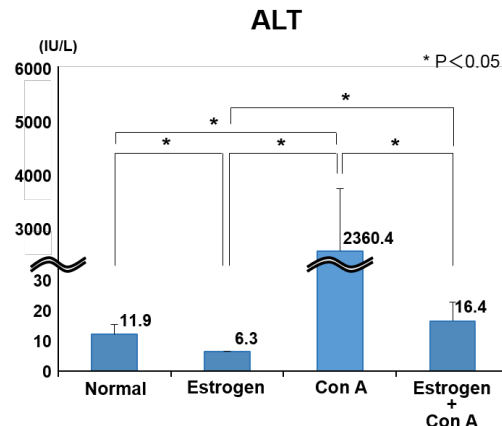


図2 エストロゲン投与が Con A 誘導性肝障害へ及ぼす影響

いて検討を行った。その結果、Con A 誘導性肝障害マウスの肝臓において pDC が多く占める I-A^{low}CD11c^{low} 分画の減少を、一方脾臓では mDC が多く占める I-A^{high}CD11c⁺ 分画増加を認めた。エストロゲン投与により Con A 誘導性肝障害が抑制されたマウスの肝臓では、I-A^{low}CD11c^{low} 分画の割合は回復しなかったものの I-A^{high}CD11c⁺ 分画の割合は正常と同じレベルとなった。一方脾臓では、Con A 誘導性肝障害マウスで増加していた I-A^{high}CD11c⁺ 分画の割合がエストロゲン投与によりやや減少した(図 3)。

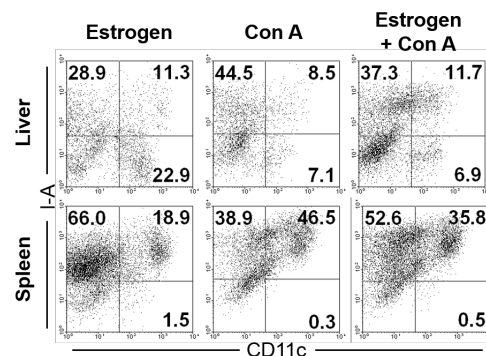


図3 Con A 誘導性肝障害マウスにエストロゲンを投与した時の肝臓および脾臓における樹状細胞分画への影響

続いて、肝 DC 上の機能分子の発現率変化を詳細に検討するために三重染色を行った。その結果、Con A 誘導性肝障害マウスにエストロゲン投与することにより、肝臓の I-A^{low}CD11c^{low} 分画において CD80, CD40 の発現増強を認め、CD274 では発現がやや減少した(表 1)。その他の機能分子である CD86,

CD273 についてはエストロゲンによる影響を認めなかった。

表1 エストロゲン投与による Con A 誘導性肝障害マウスの肝 pDC 分画における細胞表面抗原の発現率変化(%)

Exp. group	Liver pDC (I-A ^{low} CD11c ⁺)		
	CD80	CD40	CD274
Normal	37.0 ± 9.7	18.3 ± 4.0	82.9 ± 6.3
Estrogen	17.2 ± 10.1	9.5 ± 1.9	82.4 ± 2.9
Con A	18.6 ± 9.7	10.3 ± 9.1	96.8 ± 1.6
Estrogen + Con A	37.0 ± 10.7	27.8 ± 9.9	91.8 ± 6.4

最後に、DC の IL-10 産生能について検討を行った(図 4)。エストロゲン単独投与マウスの肝 DC は正常マウスのそれに比べ、産生量が著しく増加する傾向を認めた。一方で、脾 DC の IL-10 産生量は検出限界以下にまで減少する傾向を認めた。エストロゲン投与後に Con A 肝障害を誘導したマウスにも同様の変化が起こり、その量は倍増した。

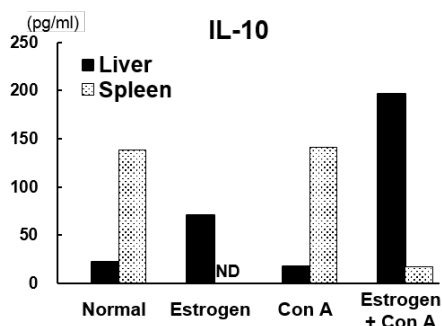


図4 エストロゲン投与が各臓器DCのIL-10産生能へ与える影響

当該研究において、エストロゲンは Con A 誘導性肝障害を抑制した。その抑制機構の可能性として、肝 DC の IL-10 産生能増強、及び肝内で I-A^{low}CD11c^{low}CD80⁺ 分画および I-A^{low}CD11c^{low}CD274⁺ 分画が増加することにより IL-12 が抑制され、NKT 細胞やその他の effector 細胞の細胞傷害活性が抑えられていることが示唆された。また、肝 DC は脾臓のそれに比してエストロゲン受容体鎖が優位に発現していることから、エストロゲンが DC に直接的作用を有する可能性も示唆された。しかし、エストロゲンと自己抗体産生や産生細胞との関連性は明らかにできなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Tomiyama C, Watanabe H, Izutsu Y, Watanabe M, Abo T. Suppressive role of Concanavalin

A-induced hepatitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 査読有, Vol.166, 2011, pp.258-68

DOI:10.1111/j.1365-2249.2011.04458.x

Tomiyama C, Watanabe H, Watanabe M, Abo T. Immunosuppressive function of dendritic cells existed in the liver. *Current Research in Immunology*, 査読有, Vol.6, 2012, pp. 1-7

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

<http://www.clg.niigata-u.ac.jp/~tomiyama/tomiHP/toppage.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富山 智香子 (TOMIYAMA, Chikako)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 80359702

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

井筒 ゆみ (IZUTSU, Yumi)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号: 20301921

渡部 久実 (WATANABE, Hisami)
琉球大学熱帯生物圏研究センター・分子生命科学研究所
感染免疫制御分野・教授
研究者番号: 50143756