

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790791

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎およびその動物モデルにおける免疫寛容破綻の役割

研究課題名(英文)Steatohepatitis as altered immune metabolism by Regulatory T cell

研究代表者

濱口 真英 (Hamaguchi, Masahide)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：80350883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：高レプチン血症は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病因の一つと考えられているがレプチンがどのような機序で慢性炎症であるNASHを引き起こすかについては十分に理解されていない。リンパ球系のみレプチン受容体を発現させるマウスを作製したところ、高脂肪食負荷により重度のNASHが発症した。また、高脂肪食負荷下に一過性に制御性T細胞を除去したところ、NASHが発症することを病理組織学的に確認した。つまり、高レプチン環境により制御性T細胞の免疫抑制機能が傷害されるとヘルパーT細胞の活性化とそれに続く肝在住マクロファージの活性化が起こりNASH発症の一因となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation is now considered to have a pivotal role in the metabolic abnormality. In liver, steatohepatitis has been recognized as the hallmarks of chronic inflammation. However, the mechanisms underlying the progression from simple steatosis to steatohepatitis have not clarified yet. Here, we showed that immune suppressive activity by Treg cells were impaired under high leptin condition and steatohepatitis was observed under the condition of temporally liver regulatory T (Treg) cells depletion combined with high fat diet (HFD). Taken together, altered immune metabolism by Regulatory T cell due to leptin resistance in subjects with over nutrition or obesity could be a pathogen for the development of Steatohepatitis.

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

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 非アルコール性脂肪疾患 制御性T細胞 慢性炎症 インスリン抵抗性 レプチン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

明らかな飲酒歴がないにもかかわらず、アルコール性肝障害に類似した大滴性の脂肪沈着を特徴とする肝疾患が非アルコール性脂肪肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) である (日本肝臓学会編 NASH・NAFLD の診療ガイド 文光堂)。NAFLD はインスリン抵抗性を基盤とし、予後良好と考えられている単純性脂肪肝と進行性の非アルコール性脂肪肝炎 (Non alcoholic steatohepatitis : NASH) を含む疾患概念である。近年の肥満人口の急増により、NAFLD の有病率は 10~30% と、最も高頻度な肝疾患として注目されている (Hamaguchi M et al. Ann Intern Med. 2005)。NASH は有病率の高さに加え、肝硬変へと進展し肝細胞癌の発生母地になりうることから重要な疾患として認識されている。肝細胞癌は、わが国における悪性腫瘍の全死亡者のうち、男性で 14.3% (第 3 位)、女性で 8.6% (第 4 位) を占める重要な悪性疾患である。この事実に加え、研究代表者らは、NAFLD が心血管事故の新しい危険因子となることを世界に先駆けて示した (Hamaguchi M et al. World J Gastroenterol. 2007, Akabame S, Hamaguchi M et al. Circ J. 2008)。また、研究代表者らは、NAFLD の自然史について世界に先駆けた報告を行い、NAFLD の予防・治療に貢献している (Hamaguchi M et al. Am J Gastroenterol. 2007, Hamaguchi M et al. Ann Intern Med. 2005)。

一方、内臓脂肪の蓄積では肥満細胞からの炎症性サイトカイン・アディポサイトカインが放出され、慢性炎症、インスリン抵抗性は生じることが知られている。このことに加え、内臓脂肪の蓄積およびインスリン抵抗性を基盤とする慢性炎症には、制御性 T 細胞の障害による免疫寛容の破綻が関与する可能性も報告され始めた (Mathis D et al. Nat Med. 2009)。制御性 T 細胞は、坂口志文教授によって発見された T 細胞サブセットの一つであり、免疫寛容の維持の中心的役割を果たしている (Sakaguchi S et al. J. Immunol. 1995, Sakaguchi S et al. Nature. 2007)。制御性 T 細胞の減少・機能障害により免疫寛容が維持できなくなり、自己免疫疾患を発症することが知られている。

NAFLD の基盤はインスリン抵抗性であり、同じくインスリン抵抗性を基盤とするメタボリックシンドロームでは、内臓脂肪組織における制御性 T 細胞の数的減少、機能障害が報告されている (Mathis D et

al. Nat Med. 2009)。一方、制御性 T 細胞とは異なる T 細胞サブセットであるが、NAFLD の動物モデルで natural killer T 細胞が NASH への進展へ寄与している可能性が示された (Diehl AM et al. Hepatology. 2010)。これらに加え、一般的に NASH では抗核抗体の陽性率が 20% と高いことが知られている。また、脂肪肝が改善しても肝炎のみ遷延する burned out NASH と呼ばれる現象が報告されており、NASH は単なる代謝性疾患ではない。

以上の知見から、NASH 発症に T 細胞サブセットが関与している可能性は高い。このため我々は、NAFLD でもインスリン抵抗性により制御性 T 細胞の数的減少、機能障害が生じ、肝臓での免疫寛容が破綻することで肝炎を発症する仮説にいたった。

## 2. 研究の目的

非アルコール性脂肪肝疾患において、約 1 割の症例で予後良好の単純性脂肪肝から進行性の非アルコール性脂肪肝炎への進展が見られる。非アルコール性脂肪肝炎は肝細胞癌、肝硬変の基礎疾患である。単純性脂肪肝から脂肪肝炎への進展機序は明らかでないが、この解明は治療法を開発する上で重要である。研究代表者は、この単純性脂肪肝から非アルコール性脂肪肝炎への病態進展に、免疫寛容の破綻が関与している仮説を立て、この仮説を明らかにすることを旨とした。

## 3. 研究の方法

本研究の目的は、単純性脂肪肝から脂肪肝炎を発症する過程で、肝臓に浸潤している制御性 T 細胞が数的に減少、もしくは機能障害により、肝臓での免疫寛容が維持できなくなり脂肪肝炎が発症することを明らかにすることである。

上記を目的とし、下記 3 項目を計画している

1. 単純性脂肪肝を発症させるが脂肪肝炎を発症しない、もしくは軽症の脂肪肝炎を発症する動物モデルにおいて、制御性 T 細胞の数、機能を外的にコントロールし、脂肪肝炎の発症、もしくは重症化を観察する。
2. 脂肪肝炎が発症する動物モデルで肝臓における制御性 T 細胞の数、機能の変化を観察する。
3. 脂肪肝炎において制御性 T 細胞が障害を受ける機序を明らかにする。

#### 4. 研究成果

肥満に基づくレプチン抵抗性は、高レプチン血症を惹起する。高レプチン血症は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病因の一つと考えられている。しかし、アディポサイトカインであるレプチンがどのような機序で慢性炎症であるNASHを引き起こすかについては十分に理解されていない。

我々は、制御性T細胞、ナイーブCD4+T細胞がレプチンレセプターを発現しており、高レプチン環境では制御性T細胞の免疫抑制機能が低下することを見出した。我々はレプチンの獲得免疫系の作用とNASH発症との関連を検討するため、リンパ球系のみレプチン受容体を発現させるマウスを作製した。このリンパ球系のみレプチン受容体を発現させるマウスでは、高脂肪食負荷により重度のNASHが発症することが観察された。肝臓浸潤免疫細胞をフローサイトメーターで解析したところ、制御性T細胞が減少し、クッパー細胞すなわち肝在住マクロファージが活性化していた。

このin vivo実験の結果を受け、in vitro実験を実施した。

高レプチン環境下では制御性T細胞の免疫抑制機能が低下した。また、高レプチン環境下では制御性T細胞の細胞増殖が低下することに反し、高レプチン環境下ではナイーブCD4+T細胞は細胞増殖がむしろ亢進した。

このような相反する細胞増殖作用の機序を明らかにするためにPhos Flowにより細胞内シグナル伝達を検討した。

T細胞はCD3およびCD28の刺激によりmTOR(mammalian target of rapamycin)の活性化が起こり、これが細胞増殖を促進すると考えられている。興味深いことに、高レプチン環境下では、TregではmTORがより活性化していた。このため、ナイーブCD4+T細胞は細胞増殖が亢進すると考えられた。一方、制御性T細胞ではmTORが過剰に活性化すると細胞増殖が抑えられることが知られており、このために細胞増殖がむしろ抑えられたと考えられた。

次に、この制御性T細胞の抑制機能低下がNASHの直接的な発症原因となるかについて実験的に検討した。高脂肪食負荷下に一過性に制御性T細胞を除去したところ、NASHが発症することを病理組織学的に確認した。しかも、興味深いことに制御性T細胞の除去では肝臓炎症反応のみならず、肝脂肪化自体も悪化していた。

つまり、高レプチン環境により制御性T細胞の免疫抑制機能が障害されるとヘルパーT細胞の活性化とそれに続く肝在住マクロファージの活性化が起こりNASH発症の一因となることが明らかとなった。

#### 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 件)

Favorable effect of modest alcohol consumption to fatty liver disease.  
Hamaguchi M, Kojima T.  
World J Gastroenterol. 2013 Aug 28;19(32):5393-4. doi: 10.3748/wjg.v19.i32.5393. PMID:23983447

[Diabetes and colorectal cancer].  
Hamaguchi M, Kojima T, Kato T.  
Nihon Rinsho. 2012 Jul;70 Suppl 5:573-7. Japanese. No abstract available. PMID: 23156461

T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development.  
Hamaguchi M, Ohkura N, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, Osaki M, Tanaka Y, Yamashita R, Nakano N, Huehn J, Fehling HJ, Sparwasser T, Nakai K, Sakaguchi S.  
Immunity. 2012 Nov 16;37(5):785-99. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.010. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23123060

Regulatory T cells expressing PPAR-control inflammation in obesity.  
Hamaguchi M, Sakaguchi S.  
Cell Metab. 2012 Jul 3;16(1):4-6. doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.007. PMID: 22768833

Identification of individuals with non-alcoholic fatty liver disease by the diagnostic criteria for the metabolic syndrome.  
Hamaguchi M, Takeda N, Kojima T, Ohbora A, Kato T, Sarui H, Fukui M, Nagata C, Takeda J.  
World J Gastroenterol. 2012 Apr 7;18(13):1508-16. doi: 10.3748/wjg.v18.i13.1508. PMID: 22509083

Aging is a risk factor of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal women.  
Hamaguchi M, Kojima T, Ohbora A, Takeda N, Fukui M, Kato T.  
World J Gastroenterol. 2012 Jan 21;18(3):237-43. doi: 10.3748/wjg.v18.i3.237. PMID: 22294826

Protective effect of alcohol consumption for fatty liver but not metabolic syndrome.

Hamaguchi M, Kojima T, Ohbora A, Takeda N, Fukui M, Kato T.

World J Gastroenterol. 2012 Jan 14;18(2):156-67. doi:

10.3748/wjg.v18.i2.156.

PMID: 22253522

〔学会発表〕(計2件)

岐阜における非アルコール性脂肪肝 NAFLD の経時的コホート研究、NAGALA

(NAFLD in Gifu Area, Longitudinal Analysis) study

濱口真英 1、小島孝雄 2、大洞昭博 3

1.大阪大学免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学

2.朝日大学村上記念病院総合健診センター

3.朝日大学村上記念病院消化器内科

第1回肝臓と糖尿病・代謝研究会 2014年7月4日 東京

制御性T細胞減弱による代謝免疫学的非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウスの解析

濱口真英 1、島津裕 2,3、高折晃史 2、角田圭雄 4、山口寛二 4、西川博嘉 3、福井道明 1、坂口志文 3、伊藤義人 4、中村直登 1

1 京都府立医科大学 内分泌代謝内科

2 京都大学 血液・腫瘍内科

3 大阪大学免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学

4 京都府立医科大学 消化器内科

〔図書〕(計2件)

リウマチ科第50巻第2号(科学評論社2013年8月発行)

特集/感染症に伴う関節症の診断と治療 解説

制御性T細胞による免疫応答制御

濱口真英 坂口志文

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学

標準免疫学第3版

第7章 ホメオスタシス維持のメカニズム 191-205

執筆協力者

濱口真英

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

2件の出願を予定している

取得状況(計 件)

なし

〔その他〕

第1回肝臓と糖尿病・代謝研究会 2014年7月4日 東京

学術奨励賞受賞

ライフサイエンス領域融合レビュー

免疫系における恒常性の維持と制御性T細胞 2013年5月15日

濱口真英・坂口志文

(大阪大学免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学)

<http://leading.lifesciencedb.jp/2-e005/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱口真英(大阪大学免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学 特任助教)

研究者番号: K10G028684L

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし