

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791527

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流障害における新しいメカニズムの解明 T細胞の役割について

研究課題名(英文) The Novel Role of T cell in Liver Ischemia and Reperfusion Injury

研究代表者

内田 洋一郎 (Uchida, Yoichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：30597745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肝虚血再灌流障害におけるT細胞の制御機構について、TIM(T cell Immunoglobulin Mucin)分子に焦点をおいて解明を行った。マウス70%肝部分虚血再灌流モデルにおいて、安定型Gal-9 (TIM-3 ligand)投与群では、非投与群に比べて有意に肝障害(血清ALTおよび組織所見)が軽減された。サイトカイン(IL-6, INF- $\gamma$ , CXCL-1, CXCL-2)誘導は、投与群で有意な軽減を認め、肝組織におけるTUNEL染色では、アポトーシス誘導が抑制された。Gal-9は肝虚血再灌流障害に対してT細胞活性化を抑制し保護効果を示すと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to investigate the novel role of T cell in liver ischemia and reperfusion injury (IRI), focused on T cell Immunoglobulin Mucin (TIM) molecules. In our established 70% partial warm liver IR model for C57BL/6 mice, treated with PBS or stable Galectin-9 (Gal-9 is a TIM-3 ligand), the serum ALT level and histological findings in Gal-9 treated group were significantly ameliorated compared to PBS treated groups. The induction of cytokines (IL-6, INF- $\gamma$ , CXCL-1, CXCL-2) and apoptotic positive cells by TUNEL staining in the liver was decreased in Gal-9 treated groups. Gal-9 might be protective for liver IRI through the inhibition of T cell activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：虚血再灌流障害 肝臓 Galectin-9 TIM T細胞 TLR-4 肝移植 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓外科領域においては、虚血再灌流障害 (IRI) の予防・軽減は安全かつ確実に手術を行うために重要である。中でも肝臓移植においては、グラフト肝の機能保持をする為に重要な課題である。2010年7月、本邦における改正臓器移植法の施行に伴い、それまで少数であった脳死移植症例が増加しつつあり、本邦で主として行われてきた生体肝移植とは異なり、長時間の阻血(虚血)保存による IRI が欧米同様に問題となっている。

この IRI のメカニズムとして、クッパー細胞(肝マクロファージ)・好中球・類洞内皮細胞の相互作用、活性酸素・サイトカインによる微小循環障害が知られているが、T細胞の機能については1997年にCD4陽性T細胞がIRIを制御することが報告されたことが始まりであり(J Clin Invest 100:279-289, 1997)、その後は十分に解明されていなかった。2002年にT細胞に発現するT cell Immunoglobulin Mucin (TIM) family (図1)が発見された(Nature 415:536-541, 2002)。

本研究代表者は、IRIの第一人者である米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校(UCLA), Dumont-UCLA Transplant CenterのDr. Kupiec-Weglinskiの元で博士研究員として3年間研究に従事してきた。その中で、TIM signal pathwayに着目して、TIM signalが自然免疫支配下の肝IRIを制御しうることを解明し、2010年にHepatology (51:1363-72)及びGastroenterology (139:2195-2206)に報告し、肝IRIにおけるT細胞の機能解明の前進となった。活性化したCD4陽性T細胞に発現するTIM-1は、マクロファージに存在するTIM-4を介して炎症を惹起し(TIM-1/TIM-4 pathway)、Th1細胞に発現するTIM-3は、そのligandであるGalectin-9(Gal-9)と作用し、apoptosis誘導・INF- $\gamma$ 産生抑制を導き、マクロファージ上に発現するToll-like receptor (TLR)-4を介して炎症を抑制する(TIM-3/Gal-9 pathway)。

一方で、Gal-9はlectin familyに属するproteinであり、本邦の香川医科大学(現香川大学医学部)免疫病理学平島光臣教授グループが新規好酸球誘導因子として同定した。TIM-3の生理的ligandとされ、マスト細胞やマクロファージが保有し肝に豊富に存在し、TIM-3陽性細胞のapoptosis誘導により自己免疫反応を抑制する。制御性T細胞(Treg)を増加させ、Th2 cytokineに抑制的に働き(Clinical Immunology 140:92-101, 2011)、I型糖尿病においてはTIM-3/galectin-9 signalがtherapeutic targetになり(Endocrinology 153:612-620, 2012)、autoimmune arthritisにおいてはTh17の抑制とTregの活性化作用を有するとの報告がある(Clin Immunol 127:78-88, 2008)。

本研究代表者は、このように13年間進展がなかった肝IRIにおけるT細胞の役割について、“TIM signal pathwayを介して肝IRIを制御しうる”ことを初めて報告している。さらに、肝IRIにおいては、T細胞上のTIM-1/TIM-4、TIM-3/Gal-9 signalを介した免疫賦活と免疫寛容の折衝により肝障害の重症度が規定されること見出している。

肝IRIを予防もしくは軽減するためには、さらなる機序の解明が必須であり、その解明には動物実験は非常に重要となる。本研究を通して、臨床応用への可能性を模索したい。

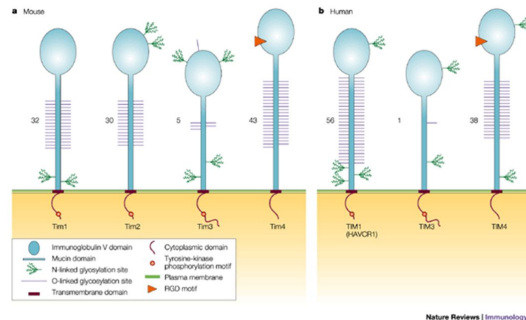


図1: TIM分子

Nat Rev Immunol. 3:454-462, 2003

## 2. 研究の目的

上記背景に基づき、自然免疫支配下の肝虚血再灌流障害(IRI)におけるT細胞の制御機構について、TIM(T cell Immunoglobulin Mucin)分子に焦点をおいてTIM pathwayの役割を解明していくことである。

## 3. 研究の方法

(1) マウス 70%肝部分虚血再灌流障害(IRI)モデルを使用する。全身麻酔に開腹し、肝70%領域を支配する門脈・胆管・肝動脈を一括してクランプし閉腹、90分後に再開腹しデクランプにより再還流し閉腹、その後6時間・24時間後に血液および肝組織を採取して解析する。

TIM signal pathwayを解明するために、signal遮断もしくは活性化する目的で、抗TIM-1抗体/抗TIM-3抗体の使用に加え、さらにGal-9を投与してモデルを作成し、肝機能評価(血中AST/ALT値測定、HE染色)を行う。

(2) 得られた肝組織・血液サンプルを用いて、各種サイトカイン測定・アポトーシス評価(TUNEL染色)・免疫染色・蛋白定量・フローサイトメトリ(TIM発現の有無)などを行う。

#### 4. 研究成果

(1) 初年度の成果の一つは、上記肝 IRI マウスモデルの作成が安定したことであった。このモデルは、環境因子(特に気温)の影響を受けやすく、コントロール群における肝機能の安定化に時間を要した。

(2) 当初の計画では、抗TIM-1抗体・抗TIM-3抗体を使用する予定であったが、動物実験に使用するための必要十分な抗体量が入手できず、TIM signal pathway を解明するために、Gal-9を中心として投与する方針にした。他施設へ見学に行き、当研究室でGal-9の精製を試みた。精製完了のための全工程には4日間必要とした。精製したGal-9を前投与し、マウス70%肝部分IRIモデルを作成し、血中AST/ALT値とHE染色で肝機能の評価した結果、Gal-9投与群での肝機能にばらつきがあり、効果判定が非常に困難な状況であった。

原因解明を行った所、精製したGal-9が不安定型であることを突き止め、条件によっては分解されやすく、十分な効果が得られないことが判明した。

(3) 安定型Gal-9の入手に成功し、安定型Gal-9の前投与によるマウス70%肝IRIモデルモデルを再作成し、肝機能を検討した。結果として、非投与群に比べ安定型Gal-9投与群で有意に肝障害が軽減された(undisclosed data)。

(4) 投与方法・投与時間および投与量の検討を行い、肝IRIの鎮静化に対して、TIM-3/Gal-9経路が重要な働きを担うことがin vivo実験で見出すことができた(undisclosed data)。

(5) 得られたサンプルを用いて、サイトカイン(IL-6, IFN- $\gamma$ , CXCL-1, CXCL-2)測定を行った。投与群で有意な軽減を認め、Gal-9によるT細胞活性化の抑制効果が考えられた(undisclosed data)。

(6) 肝組織におけるTUNEL染色を行った結果、アポトーシス誘導が抑制され、IRIに起因する細胞死誘導の抑制が判明した(undisclosed data)。

以上より、Gal-9による肝IRIに対する保護効果が示され、TIM-3とGal-9の重要性が示唆された結果が得られた。

現在、Gal-9の発現状態をWestern blotならびに免疫染色で検討中であり、フローサイトメトリによりTIM-3の発現を検証している段階である。

上記undisclosed dataに関する論文作成を今年度中の目標としている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

(1) Ohe H, Uchida Y, Yoshizawa A, Hirao H, Taniguchi M, Maruya E, Yurugi K, Hishida R, Maekawa T, Uemoto S, Terasaki PI. Association of anti-HLA and anti-Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies with Liver Allograft Fibrosis after Immunosuppression Withdrawal. Transplantation. 査読有 (in press)

(2) Jobara K, Kaido T, Hori T, Iwaisako K, Endo K, Uchida Y, Uemoto S. Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats. Nutrition. 査読有 (in press)

(3) Miyagawa-Hayashino A, Yoshizawa A, Uchida Y, Egawa H, Yurugi K, Masuda S, Minamiguchi S, Maekawa T, Uemoto S, Haga H. Progressive graft fibrosis and donor-specific HLA antibodies in pediatric late liver allografts. Liver Transpl. 査読有 18:1333-1342, 2012

(4) Chestovich PJ, Uchida Y, Chang W, Ajalat M, Lassman C, Sabat R, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Interleukin-22: Implications for Liver Ischemia-Reperfusion Injury. Transplantation. 査読有 93:485-492, 2012

(5) Freitas MC, Uchida Y, Lassman C, Danovitch GM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Type I Interferon Pathway Mediates Renal Ischemia/Reperfusion Injury. Transplantation. 査読有 92:131-138, 2011

(6) Shen XD, Ke B, Uchida Y, Ji H, Gao F, Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Native macrophages genetically modified to express heme oxygenase 1 protect rat liver transplants from ischemia/reperfusion injury. Liver Transpl. 査読有 17:201-210, 2011

〔学会発表〕(計3件)

(1) 内田 洋一朗、加茂 直子、Ronald W. Busuttil、Jerzy W. Kupiec-Weglinski、上本 伸二

肝虚血再灌流障害における T Cell Ig Mucin-3 (TIM-3) の役割

第 111 回日本外科学会定期学術集会 (2011.5.26-28)

(2) 内田 洋一朗、加茂 直子、Ronald W. Busuttil、Jerzy W. Kupiec-Weglinski、上本 伸二

肝虚血再灌流障害における TIM-3(T-Cell Immunoglobulin Mucin-3)と Galectin-9 および TLR-4 との Cross-Talk

第 112 回日本外科学会定期学術集会 (2012.4.12-14)

(3) 内田 洋一朗、加茂 直子、平尾 浩史、田中 宏和、寺嶋 宏明、Ronald W. Busuttil、Jerzy W. Kupiec-Weglinski、上本 伸二

肝虚血再灌流障害における IL-22 の保護効果

第 113 回日本外科学会定期学術集会 (2013.4.11-13)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

内田 洋一朗 (UCHIDA, Yoichiro)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：30597745

尚、本研究は米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校(UCLA), Dumont-UCLA Transplant Center の虚血再灌流障害(IRI)を専門とする Dr. Kupiec-Weglinski と、ハーバード大学, Transplantation Research Center のTIM分子を専門とする Dr Najafian の協力支援を得て遂行している。本研究代表者の後任が、当科より博士研究員として赴任し継続して研究を行っており、肝 IRI および肝移植に関するの情報共有や discussion を行っている。