

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659032

研究課題名(和文) 肝臓における免疫寛容成立機構分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of immunological tolerance in liver

研究代表者

立花 雅史 (Tachibana, Masashi)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80513449

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)：肝臓は免疫学的に寛容の状態にあり、その分子メカニズムは未だ不明な点が多く残されている。本研究では、肝臓において免疫抑制性のサイトカインの発現が脾臓に比して高いことを見出し、肝臓の免疫寛容を担う実体の一つである可能性を示した。さらに、肝臓特異的な細胞群の一種である類洞内皮細胞がサイトカイン刺激に応じて抑制性サイトカインの発現を上昇させることを見出し、肝臓の免疫寛容において重要な役割を果たす可能性を示した。本知見は、免疫寛容の理解ならびに様々な肝疾患の治療に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Liver exhibits the feature of immunological tolerance. Although several mechanisms have been suggested, it still remain unclear. In this study, we found that an immunosuppressive cytokine expression was higher in liver than in spleen of naïve mice. Moreover, we found that liver sinusoidal endothelial cells, which exist only in liver, enhanced an immunosuppressive cytokine expression by the stimulation of other cytokine. These findings would lead to the understanding of immunological tolerance and the therapy for several liver diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：免疫学 免疫寛容 肝臓

1. 研究開始当初の背景

免疫系は非自己である異物を認識し、それに反応する免疫担当細胞によって、異物を排除するよう機能している。一方で、自己に反応する免疫担当細胞は分化の段階で排除されるが、一部はその排除を逃れ生体内に存在している。これらの細胞は自己に対する免疫応答を起こしうるが、抑制性免疫細胞によって制御されている。このように、免疫系は非自己に対しては排除するように機能し、自己に対しては免疫応答を起こさないように機能することで、生体の免疫恒常性を維持している。このような自己に対する免疫応答の状態は免疫寛容と言われ、制御性T細胞の同定により、生体の免疫恒常性維持に重要な機構であることが証明された。制御性T細胞の解析から、免疫寛容の分子レベルでの理解が大きく進展したが、例えば臓器レベルでの理解には至っておらず、免疫寛容機構についてはまだまだ解明すべき点は多い。

さて、肝臓は生体内における最大の臓器であり、脂質・タンパク質の代謝や薬物解毒作用、さらに胎生期では造血を行っており、極めて多彩な機能を有している。また、肝臓は一部が切除されても自己再生により復元できるという他の臓器では認められない特徴も有している。免疫学的観点からも肝臓は非常に興味深い臓器で、肝移植を行うと移植された肝に対し免疫寛容が成立しやすく、他の臓器移植と比較しても極めて生着率が高いことが古くから知られている。また近年、抗原遺伝子を遺伝子導入ベクターにより肝臓へ送達すると、その抗原に対する免疫寛容を成立させることがいくつか報告されている。これらの知見は、肝臓においては後天的に免疫寛容が成立する、ということを示している。これまでに、肝臓に存在する様々な細胞群が免疫抑制機能を有していることが報告されているが、その分子機構については不明な点が多く残されている。その分子機構の解明は免疫反応の理解に繋がり、新たな免疫抑制剤の開発に繋がる可能性を含んでいることから、極めて重要な研究課題となっている。

2. 研究の目的

本研究課題においては、肝臓特異的細胞群である類洞内皮細胞 (Liver sinusoidal endothelial cells : LSEC) とT細胞との相互作用を中心に解析し、「正常な肝臓組織の維持」と「免疫寛容」について新たなメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)単核球の単離

野生型マウスから脾臓を回収し、cell strainer とプランジャーを用いて磨り潰すことで細胞を回収した。この細胞を氷冷したHBSSを用いて10 mLにメスアップし、1700 rpm、4 で6分間遠心を行った。その後、ACK

buffer を1 mL 加え、氷上で1分間静置することで赤血球を除去した。2% FCS/HBSS 溶液を加え、1700 rpm、4 で6分間遠心を行った。さらに上清を除去し、同様に遠心を行うことで単核球を単離した。

(2)Flow cytometry 解析

細胞集団を FACS buffer (2% FCS/0.02% NaN₃/PBS) に溶解し、Purified anti-mouse CD16/32 Antibody を加えて4 で5分間静置した後、1700 rpm、4 で6分間遠心した。これを再度 FACS buffer に溶解し、各種抗体を加えて4 で15分間静置した。これを1700 rpm、4 で6分間遠心し上清を除去し、再度遠心操作を繰り返した後 FACS buffer に懸濁し MACS Quant により解析した。

(3)遺伝子発現解析

ISOGEN を用いて各細胞株から total RNA を回収した。各 total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Superscript VIL0 cDNA synthesis kit を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA) を合成した。SYBR Green gene expression assays を用いた定量的 RT-PCR を行い、StepOnePlus リアルタイム PCR システムにより定量した。定量的 RT-PCR に用いたプライマーは以下に示した。

Gene	Primer sequence (5' 3')
GAPDH	(F) CAATGTGTCCGTCGTGGATCT
	(R) GTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG
IL-6	(F) CTGCAAGAGACTTCCATCCAG
	(R) AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
IL-10	(F) CTTACTGACTGGCATGAGGATCA
	(R) GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
IL-23	(F) CAGCAGCTCTCTCGGAATCTC
	(R) TGGATACGGGGCACATTATTTTT
IL-27	(F) CTGTTGCTGCTACCCTTGCTT
	(R) CACTCCTGGCAATCGAGATTC
TGF-β	(F) CCGCAACAACGCCATCTATG
	(R) CCCGAATGTCTGACGTATTGAAG

(4)LSEC の単離

HBSS に EDTA、Pronase、Collagenase を溶解し、それぞれ 0.5 mM、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL になるよう調製した。EGTA/HBSS 溶液、Pronase/HBSS 溶液、Collagenase/HBSS 溶液の順に約 5 mL/min の速度で5分間ずつ肝臓を灌流した。灌流後の肝臓を回収し、cell strainer とプランジャーを用いて磨り潰すことで細胞を回収した。この細胞を氷冷した2% FCS/HBSS を用いて30 mL にメスアップし、1700 rpm、4 で6分間遠心を行った。上清を除去して再び同様の操作を行った。遠心分

離した細胞を OptiPrep 溶液を用いた密度勾配遠心により、LSEC を含む分画を回収した。その後、2% FCS/HBSS 溶液により細胞を懸濁し、低速で遠心することによって肝実質細胞をはじめとするその他の大型細胞を大幅に除去した。得られた細胞に anti-CD146 MACS beads を加え、MACS 法により LSEC を得た。

4. 研究成果

(1) 肝臓における抑制性サイトカインの発現

肝臓が免疫学的にどのような特徴を示すのかを明らかにする必要があると考え、脾臓との比較検討を行った。脾臓は、免疫応答惹起の場であり、肝臓と同様に血液を多く含んでいることから対象として適格と考え、選択した。まず、肝臓全体あるいは脾臓全体での抑制性サイトカインである Interleukin (IL)-10 の遺伝子発現について検討を行った。その結果、肝臓において IL-10 の発現が顕著に高かった(図1)ことから、肝臓の微小環境は IL-10 産生性、すなわち免疫抑制性である可能性が示唆された。

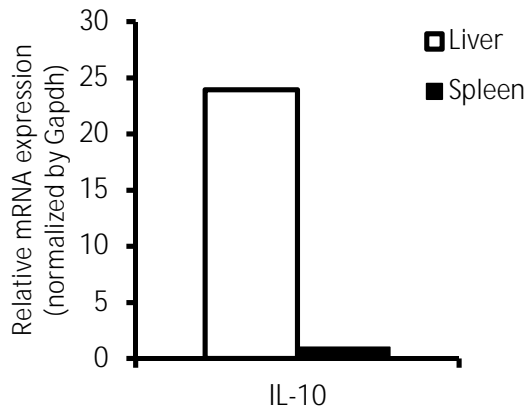


図1. 肝臓(Liver)と脾臓(Spleen)での IL-10 発現

次に、T 細胞側からのアプローチとして、表面分子の発現ならびに各種サイトカインの遺伝子発現について検討を行った。表面分子の発現解析から肝臓の T 細胞では脾臓の T 細胞に比べて活性化マーカーである CD44 の発現が高いことが分かり、活性化状態にあることが示唆された。一方で、抑制性サイトカインとして知られる IL-10 の発現について検討したところ、肝臓と脾臓の T 細胞とで差が認められなかった。以上のことから、肝臓での IL-10 発現は T 細胞によるものではないことが明らかとなり、今後、肝臓におけるどの細胞群が IL-10 を産生するのか明らかにする必要があると考えられた。

(2) IL-17 による LSEC の機能制御

さて近年、炎症性サイトカインの一つである IL-17 が、様々な疾患において重要な機能を担っていることが明らかにされてきている。しかし一方で、最近になって抑制性サイトカインとしての機能も発揮することが報

告されてきたことから、様々な生体内環境における IL-17 の生理的機能について精査する必要が生じてきている。

そのような背景の下、肝臓での免疫寛容において IL-17 が重要な機能を担っている可能性を考え、IL-17 が LSEC に及ぼす影響を検討することとした。まず、IL-17 受容体の発現について検討したところ、IL-17 受容体が LSEC に発現していることを見出した(図2)。

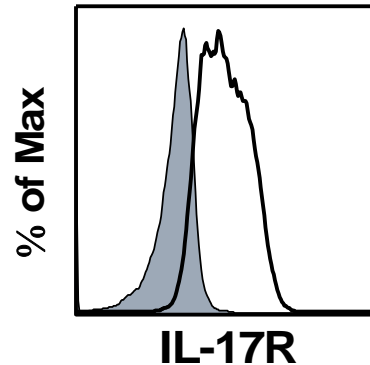


図2. LSEC における IL-17 受容体発現

(■; コントロール、□; LSEC)

次に、IL-17 が LSEC におけるサイトカイン発現に及ぼす影響を明らかにするため、野生型マウスより単離した初代培養 LSEC に IL-17 を添加し、各種遺伝子発現に与える影響について検討を行った。その結果、非常に興味深いことに、IL-17 によって LSEC における Transforming growth factor (TGF)-βの発現上昇が認められた(図3)。TGF-βは T 細胞増

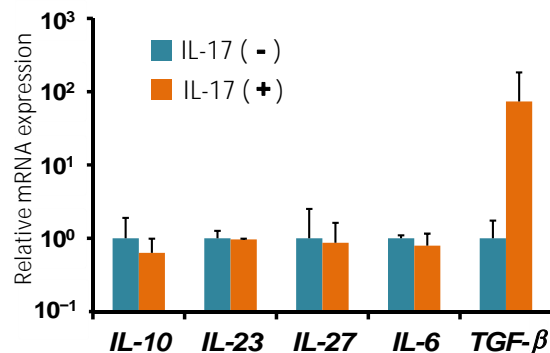


図3. LSEC での各種サイトカイン発現に与える IL-17 の影響

殖を抑制する機能を有していることから、LSEC による T 細胞増殖抑制には IL-17 の作用が必要である可能性が考えられる。一方で、TGF-βや IL-17 は肝線維化を促進することが知られており、肝線維化過程には LSEC を介した、IL-17 による TGF-β発現誘導が重要である可能性が示唆された。以上のことから、IL-17 産生を伴うような炎症病態下では、T 細胞増殖抑制による炎症の鎮静化と肝線維化が同時に起こる可能性が示唆された。近年、食の欧米化に伴い、肥満による慢性肝炎、ならびにそれによって引き起こされる肝硬変や肝がんが問題となってきている。最近になって、脂肪酸や腸内細菌などが慢性肝炎の増

悪化に関わっていることが明らかにされてきたが、病態の全容解明に向けてはさらなる研究が必要である。今後は、本研究で見出した知見の詳細な分子メカニズムを明らかにし、肝臓での免疫寛容や慢性肝炎などの病態における生理的意義を明らかにしていきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野

<https://sites.google.com/site/bunshiseibutugaku/>

6．研究組織

(1)研究代表者

立花 雅史 (TACHIBANA MASASHI)

大阪大学大学院・薬学研究科・助教

研究者番号：80513449