

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461005

研究課題名(和文) 脂肪肝炎における脂肪化肝細胞の免疫原性及び肝内浸潤制御性T細胞についての検討

研究課題名(英文) Examination about the association between intrahepatic immunogenicity and the expression of regulatory molecules on hepatic T cells in mouse NASH model.

研究代表者

山口 寛二 (YAMAGUCHI, KANJI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50381950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝炎発症に免疫老化による獲得免疫異常を疑い、マウス脂肪肝炎モデルを用いて肝内浸潤T細胞のFACS解析を行った。結果、老化及び脂肪化で肝内浸潤T細胞上に制御性マーカーであるPD-1の継続的な上昇がみられ、老化や脂肪化がその発現を助長していると考えられた。この変化は脾臓内や末梢血ではなく肝内に強いことから肝内に脂肪肝炎関連の抗原の存在が示唆された。さらに肝内のPD-1+CD4及びCD8陽性T細胞をソートし検討したところ、CD4+T細胞ではPD-1は抑制的に機能するが、CD8+T細胞ではむしろ活性化しており、CD8陽性T細胞のPD-1発現による機能異常が確認された。

研究成果の概要(英文)：PD-1 signaling negatively regulates immune responses in chronically inflamed liver. We aimed to clarify the pathophysiological role of PD-1-expressing CD4+ and CD8+ T cells in a murine NASH model. Mice were fed HFHC diets for 24 weeks. PD-1-expressing CD4+ and CD8+ T cells were increased in livers of HFHC diet-fed mice in a time-dependent manner related to the degree of hepatic injury. However, PD-1 expression on CD4+ T cells suppressed tumor necrosis factor alpha and interleukin (IL)-6 expression and increased IL-10 expression, and on CD8+ T cells it significantly increased granzyme B and perforin expression despite suppressing IL-6 expression. This regulatory molecule may act as a suppressor in CD4+ T cells, but an activator in CD8+ T cells. Two different effects of PD-1 expression on intrahepatic CD4+ and CD8+ T cells in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis, indicating imbalance of cytokine production in PD-1 expressed CD8+ T cells may be contributed to development of NASH.

研究分野：消化器内科

キーワード：脂肪肝炎

## 1. 研究開始当初の背景

臨床肝臓の分野で本邦でもメタボリック症候群に関連した脂肪肝 (NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease) 脂肪性肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) が注目されている。

脂肪肝の約 10% が脂肪性肝炎となり肝硬変へ、そして肝癌を発症することが認知されてきた。これまで我々は肝脂肪化と炎症、線維化の関係について高脂肪食やメチオニン・コリン欠乏食で誘導したマウス脂肪肝・脂肪肝炎モデルを用いて研究を進めてきた (Yamaguchi K et al. Hepatology 2007, Yamaguchi K et al. Hepatology 2008)。脂肪肝炎の発症機序に関して定説となっている two-hit theory では、1st hit である脂肪肝にインスリン抵抗性、炎症性サイトカイン、酸化ストレス、肝再生不全といった 2nd hit が加わることで肝炎・肝線維化が発症すると考えられている。しかし近年の報告では two-hit theory だけでなく、SNIP 解析結果から脂肪肝炎になりやすい遺伝的素因が証明されたことや (kawaguchi T, et al. 2012 PLoS One) 肝脂肪化は有害な脂肪酸をエステル化により中性脂肪として備蓄する一種の生体の防御反応であることが判明しつつあり (Yamaguchi K, et al. 2007 Hepatology)、脂肪肝炎の発症機序が非常に多岐に渡ることがわかってきた。

また、脂肪肝炎の免疫学的機序の研究も進み、免疫と脂質代謝に関する報告も多い。肝炎発症における免疫学的機序に関しては、脂肪細胞由来のアディポカインや炎症性サイトカインに関するもの、腸管からのエンドトキシン刺激と TLR4 を介した肝の自然免疫応答に関するものが多く (Imajo K, et al. 2012 Cell Metab)、我々も炎症性サイトカインである IL-6 の脂肪肝炎における役割についてこれまで報告してきた (Yamaguchi K, et al 2010, 2011 Lab Invest)。また、肝内の発

症機序としては、遊離脂肪酸や遊離コレステロールによる肝臓自然免疫の賦活やクッパー細胞由来の炎症性サイトカイン、NKT 細胞の関与などの検討が報告されている (Syn WK, et al 2012 Hepatology)。今回我々はに関連し、1) 脂肪化・風船化した肝細胞の内部における免疫原性の獲得と、2) 免疫老化と肝炎の発症、3) 免疫老化と肝内浸潤制御性 T 細胞の関連に関して検討を予定した。加齢による免疫老化に関しては 2009 年に PD(program death)-1 発現 CD4 陽性 T 細胞の増加が、T 細胞機能低下だけでなく炎症を惹起すると報告されている (Shimatani K, et al. 2009 PNAS)。また脂肪肝炎を含む種々のヒト肝炎で PD-1 陽性 T 細胞が増加することが知られており (Kassel R, et al. 2009 Hepatology)、免疫老化と脂肪肝炎の発症に制御性 T 細胞が関与することが示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、近年増加傾向にある脂肪肝炎の発症に、脂肪肥大した肝細胞を自己抗原とする免疫学的機序と、加齢に伴う免疫老化が関与している可能性を検討すべく、ヒト脂肪肝炎に近いと言われている最新のマウス脂肪肝炎モデルを作成し、末梢血及び肝内浸潤 T 細胞、NKT 細胞を単離して、免疫老化にかかわる制御性 T 細胞の発現解析を行い、また、制御性 T 細胞の機能解析のために、特異抗体投与によるシグナル遮断実験を行い、得られた知見を患者検体で確かめることによって、肝疾患の病態に関する理解を深めると共に、その制御方法を見出すことによって、新たな肝疾患の治療予防法の開発につながることを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス脂肪肝・脂肪肝炎モデルを作成し、肝内浸潤 T 細胞・脾臓 T 細胞を単離、末梢血 T 細胞における制御性 T 細胞のマーカー、CD25, LAG(Lymphocyte-activation gene)3, PD-1,

CTLA(Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen )4 の発現を FACS で解析する。得られた T 細胞を賦活化してサイトカイン産出能を FACS で測定することで T 細胞の機能解析を行う。T 細胞の制御性マーカーである、PD-1、LAG3、CTLA4 に注目し、受容体中和抗体をマウスモデルに投与し、脂肪肝炎への影響を検討する。ヒト肝生検検体で免疫染色により制御性 T 細胞のマーカーの発現を調べる

#### 動物モデル

C57BL/6 マウスを 48 匹用いて、各 12 匹ずつに普通食、高コレステロール食、高脂肪食、高脂肪高コレステロール食を投与し脂肪肝、脂肪性肝炎を誘導する。それぞれ、8 週、16 週、24 週間後に肝臓、脾臓内に浸潤する T 細胞を単離、末梢血 T 細胞とあわせて FACS 解析を行う。残りの核 3 匹ずつのマウスは 24 週目に肝臓、血液、腹腔内脂肪、皮下脂肪、筋肉を摘出し脂肪肝炎の解析に使用する。

C57BL/6 マウスを 48 匹用いて、普通食、高コレステロール食、高脂肪食、高脂肪高コレステロール食を投与し、さらにそれぞれを 2 群にわけて一方に、PD-1 受容体中和抗体、PD-1 のリガンドである PDL1 の抗体を投与、一方にコントロール抗体を投与する。24 週間の投与後に肝内 T 細胞の FACS 解析及び、肝臓、血液、腹腔内脂肪、皮下脂肪、筋肉を摘出し脂肪肝炎の解析に使用する。2 と同様に PD-1 抗体に変えて LAG3、CTLA4 の抗体を投与し同様の解析を行う。

#### FACS 解析の方法

・肝内 T 細胞の単離方法：マウスの門脈より PBS を還流し脱血後に肝臓を摘出する。続いて肝臓を磨り潰しながら 70um のメッシュに通し、35%パーコールで密度勾配遠心分離法することで肝リンパ球分画を抽出する。T 細胞は CD3,CD4,CD8 で染色、NKT 細胞には CD1d-tetramer( -GalCer)を用いて 選別し、それぞれの細胞の制御性分子 CD25, PD-1, LAG3, CTLA4 の発現を解析する。

#### FACS による細胞内サイトカインの測定

・ Intracellular Cytokine Staining Starter Kit を用いて、上記方法で抽出した T 細胞に対して幼若化を行い、細胞内サイトカインを発現、蓄積させ、その後サイトカイン抗体を用いて染色し FACS 解析を行う。今回は TNF、IL-2, IL-4, IL-10, INF、オステオポンチン、EGR(early growth response)2 を測定する予定で、制御性分子の発現による T 細胞の機能変化を Th1、Th2 系のサイトカインを測定することで判別する。

#### PD-1 受容体抗体、PDL1 抗体の投与方法

・PD-1 抗体と PD-1 のリガンドである PDL1 を中和する抗体を投与して制御性 T 細胞の制御を解除する。24 週間、週 2 回のペースで抗体を腹腔内投与して肝炎に及ぼす影響を 24 週間後に肝内 T 細胞の FACS 解析及び、肝臓、血液、腹腔内脂肪、皮下脂肪、筋肉を摘出し脂肪肝炎の解析に使用する。

肝脂肪化：肝内中性脂肪貯蔵量の測定。H&E 染色、オイル・レッド O 染色。肝内の脂質関連遺伝子である SREBP1 や PPARα の発現解析。  
肝線維化：肝内ハイドロキシプロリン含有量。Sirius red 染色。免疫組織学検査 ( SMA など )。線維化マーカー (TGfb-1, pro-collagen(1) 1, SMA, TIMP1) のリアルタイム PCR による RNA レベルでの遺伝子発現解析。

炎症および肝内過酸化脂質、酸化ストレス：H&E 染色。TUNNEL 染色。AST/ALT を含む血液生化学検査。肝内の炎症サイトカイン ( TNF、IL-6 ) のリアルタイム PCR による RNA レベルの発現解析。肝内 4-HNE, Cyp2E1, TBARS の測定。

#### 4 . 研究成果

脂肪肝炎発症の背景に免疫老化による獲得免疫の攪乱が関与すると仮定し、マウス脂肪肝、脂肪肝炎モデルを作成後に肝内浸潤 T 細胞

胞の FACS 解析を行った。具体的には B6 マウス 45 匹を 3 群に分け、普通食、高脂肪食、高脂肪高コレステロール食を投与し、投与後 8 週間、16 週間、24 週間で各 3 匹ずつ、肝臓を還流処置で脱血後に処理して肝内浸潤 T 細胞、NKT 細胞、クッパー細胞を単離しそれぞれのマーカー (CD3, CD4, CD8, NK1.1, CD1d, CD11c, F4/80) および T 細胞の制御性マーカーである PD-1, CTLA4, LAG3, CD25/foxp3 で FACS 解析を行った。結果、老化及び脂肪化で肝内浸潤 T 細胞に発現する制御性マーカーの継続的な上昇が確認された。老化に伴うこれらの変化を脂肪化が助長していると考えられた。また、同時に末梢血、脾臓内の T 細胞も単離し肝臓との所見を比較検討した。脾臓でも肝臓と同様の傾向が確認されたが肝臓ほど強い変化ではなかった。一方、末梢血ではほとんど変化がなく、肝内浸潤 T 細胞の変化を末梢血で予想することは困難であると結論した。次に各 6 匹の残ったマウスより血液、肝臓のサンプルを採取し解析を行った。肝臓より mRNA を抽出し、リアルタイム PCR で炎症性サイトカイン、ケモカインについて遺伝子発現解析を行ったところ、炎症の程度に応じて PD-1, LAG3 の免疫染色を施行したとこと肝内浸潤リンパ球の一部に PD-1 陽性細胞が確認されたが、その局在に関しては各群で有意な差はなかった。次に CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞からそれぞれ PD-1 陰性、陽性細胞分画をソーティングにより抽出し、mRNA を取り出してサイトカインの発現解析、72 時間の CD3 刺激後に細胞内サイトカインを染色し PD-1 発現により T 細胞機能評価を行った。これらにより脂肪肝炎における T 細胞に発現する PD-1 の役割を検討した。結果、肝脂肪化と老化における肝内浸潤 T 細胞の制御性マーカーを経時的に追うことが出来た。また、脂肪肝炎における肝内浸潤 CD8T 細胞上に発現する PD-1 だけでなく、CD4 陽性 T 細胞に PD-1 の発現が誘導される際に、細胞内蛋白染色で

Foxp3 が強く発現していることが判明した。PD-1 抗体投与により脂肪肝炎は著明に改善されるが、この機序に CD4 陽性 PD-1 陽性細胞に Foxp3 の発現増加の関与が示唆された。

脂肪肝炎および老化で T 細胞の制御性マーカーが肝臓特異的に増加すること、その役割が CD4 陽性 T 細胞と、CD8 陽性 T 細胞で異なる可能性があること、PD-1 シグナル阻害により肝機能が改善する。今後の課題としては、PD-1 シグナル阻害は実際の臨床分野において悪性黒色腫治療で大きな副作用なく効果を発揮している。今後は他の癌腫においてもその適応が拡大される可能性があるため、ヒト脂肪肝炎に及ぼす影響についても検討が役立つと考えられる。

## 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 3 件)

1)Umemura A, Yamaguchi K, Karin M., et al. p62, Upregulated during Preneoplasia, Induces Hepatocellular Carcinogenesis by Maintaining Survival of Stressed HCC-Initiating Cells. Cancer Cell. 2016 May 19. (査読有)

2)Yamaguchi K, Itoh Y et al. Blockade of interleukin 6 signalling ameliorates systemic insulin resistance through upregulation of glucose uptake in skeletal muscle and improves hepatic steatosis in high-fat diet fed mice. Liver Int. 2015 Feb;35(2):550-61. (査読有)

3)Okada Y, Yamaguchi K, Itoh Y et al. Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. Liver Int. 2013 Feb;33(2):301-11. (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

1)第66回アメリカ肝臓学会 2015年11月16日;サンフランシスコ Yamaguchi K, Itoh Y et al. Two different aspects of PD-1 expression on intrahepatic CD4+ and CD8+ T cells in a High Fat High Cholesterol Diet-induced murine NASH.

2)第64回 アメリカ肝臓学会 2013年11月2日;ワシントンD.C. Yamaguchi K, Itoh Y et al. Mouse non-alcoholic steatohepatitis livers up-regulate expression of T-cell regulatory gene PD-1 and LAG3.

3)第63回 アメリカ肝臓学会 2012年11月日;ボストン Yamaguchi K, Itoh Y et al. Blockade of interleukin-6 signaling improves systemic insulin resistance and hepatic steatosis through mainly up-regulation of glucose uptake in skeletal muscle in high fat diet-fed lean mice.

4)第63回 アメリカ肝臓学会 2012年11月12日;ボストン Okada Y, Yamaguchi K, Itoh Y. Rosuvastatin ameliorates high fat and high cholesterol diet-induced rat nonalcoholic steatohepatitis through not only its lipid-lowering activity but also its anti-inflammatory and fibrotic effects.

国内発表

5) 第52回肝臓学会総会 . 2016年5月19日;東京ベイ幕張ホール(千葉). 山口寛二、伊藤義人. Heat shock protein 110 ファミリー Apg-2 の脂肪肝形成における役割.

6) 第41回日本肝臓学会西部会 . 2015年12月4日;名古屋国際会議場(名古屋). 山口寛二、石破博、伊藤義人. マウス脂肪肝における Heat shock 蛋白 Apg-2 の役割についての検討 .

7) 第51回肝臓学会総会 . 2015年5月22日;

ホテル日航熊本(熊本). 山口寛二、岡嶋亮、伊藤義人. マウス脂肪肝における PD-1 陽性 T 細胞の発現解析 .

8)第50回肝臓学会総会 . 2014年5月30日;ホテルニュー大谷(東京). 山口寛二、岡嶋亮、瀬古裕也、石破博、杼木希、森口理久、角田圭雄、光吉博則、安居幸一郎、南 祐仁、岡上 武、伊藤義人. マウス脂肪肝における PD-1 陽性 T 細胞の発現・機能解析 .

9)JDDW 2013年10月10日;グランドプリンスホテル新高輪(東京). 山口寛二、伊藤義人. マウス脂肪肝における制御性 T 細胞の発現解析.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山口 寛二 (YAMAGUCHI, KANJI)

京都府立医科大学 大学院医学研究科 助教

研究者番号 : 50381950

(2)研究分担者;なし

研究者番号 :

(3)連携研究者

伊藤 義人 (ITOH, YOSHITO)

京都府立医科大学 大学院医学研究科 教授

研究者番号 : 70244613