

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：74314

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670590

研究課題名(和文) 自然免疫支配下のT細胞の存在意義の追求 なぜ肝障害を制御できるのか？

研究課題名(英文) The elucidation of novel T cell function in innate immunity-dominated liver tissue damage.

研究代表者

寺嶋 宏明 (TERAJIMA, Hiroaki)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・研究主幹

研究者番号：40314215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝虚血再還流障害は肝移植において重要な克服すべき問題である。T細胞およびマクロファージの相互作用を受けることより、我々はT細胞上に発現するTim-3と糖鎖結合蛋白であるGalectin-9(Gal-9)経路の制御システムに着目した。マウス肝虚血再還流障害におけるGal-9の変動を明らかにし、外因性にGal-9投与すると虚血再還流による障害が改善した。またGal-9欠損マウスにおいてはその障害は増悪し、外因性Gal-9投与により改善することを確認した。生体内におけるGal-9のホメオスタシスを維持する保護作用を見出し、Gal-9投与が肝虚血再還流障害に対する新たな治療法になる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Liver ischemia reperfusion injury (IRI) is still an important problem in liver transplantation, and is affected by T-cell / Macrophage interaction. We have focused on Tim-3 / Galectin-9 pathway as regulatory system in liver IRI. The expression of Gal-9 was enhanced endogenously in liver especially by hepatocytes and Kupffer cells during warm IRI for a mouse liver. Exogenously administered reGal-9 significantly ameliorated hepatocellular damage due to IR. In the circumstance of Gal-9 absence, the liver damage exacerbated the severity as compared with wild type. The severe liver damage in Gal-9 KO mice was improved by the administration of reGal-9. Our study suggests a significant role of Gal-9 in the maintenance of hepatic homeostasis, and exogenous Gal-9 treatment will be a new therapeutic strategy against liver IRI.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝虚血再灌流障害 galectin-9 Tim-3

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫支配を受ける肝虚血再灌流障害 (ischemia reperfusion injury:IRI) において、T細胞は T cell immunoglobulin mucin (TIM) family や programmed death-1(PD-1) を介した免疫応答の相互作用によりマクロファージ(Mφ)の活性化を通して、肝障害を制御することが明らかとなった。特に、TIM-1/TIM-4、また TIM-3/galectin-9 (Gal-9: TIM-3 ligand) の相互作用を介した TIM signaling により、T細胞における INF- $\gamma$  の産生を制御することで、Mφ の活性化を調整していることが解明された。

今回我々が注目したのは、Mφ に発現する B7-H1 という Immunoglobulin B family と Gal-9 である。B7-H1 は血管内皮・類洞内皮・Mφ などに発現し、PD-1 を介する T細胞抑制作用によりホメオスタシスを維持している。Gal-9 は lectin family に属する protein であり、香川大学医学部免疫病理学 平島光臣元教授と本研究協力支援者である当研究所山内清明らが新規好酸球誘導因子として同定した。Gal-9 はマスト細胞や Mφ が保有し、肝に豊富に存在し、TIM-3(+)細胞の apoptosis 誘導により自己免疫反応を抑制、Treg の増加、Th2 cytokine へ抑制的に作用する。

IR により活性化された T細胞が、どのように、どのタイミングで恒常性を取り戻すのか、その signal を解明し増幅させることは可能か? という問いがある。本研究では、肝 IRI の機能制御解明に向けて、新しい視点を切り開きたい。

## 2. 研究の目的

肝 IRI における T細胞と Mφ の cross-talk の調節機構を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) 野生型 (C57BL/6)マウスおよび Gal-9 ノックアウト (KO) マウスに肝 IRI (70%部分肝、90分虚血) を与え、recombinant Gal-9 製剤(rGal-9)投与群と非投与群において検討する。肝障害の程度、および炎症性サイトカイン産生、アポトーシスへの影響などの観点から解析する。具体的には、血液検査・HE 染色・免疫染色・RT-PCR・Western blotting により評価する。

(2) 上記結果に基づき、in vitro 解析を行ない、TIM-3 などの発現を検討する。免疫染色、FACS 解析を行なう。

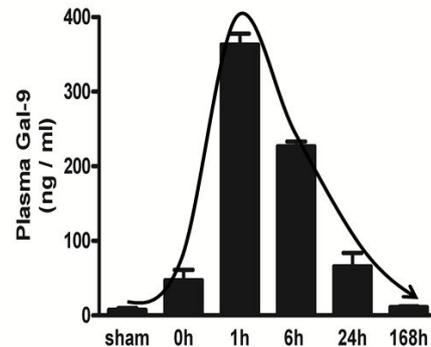
(3) 機能機序解明のために、Toll-like receptor 4 (TLR4) KO マウスおよび TIM-3 KO マウスを入手し、当研究所動物飼育室において breeding を行なう。特に、TIM-3 KO

マウス(正確には mutant マウス)を入手(米国ジャクソン研究所より有償分与)する。

## 4. 研究成果

### < in vivo 実験 >

(1) Gal-9 の生体内での発現機能評価を検討した。野生型マウスにおける肝組織内および血中 Gal-9 の発現は、IR 刺激により経時的に変化した。血中においては IR 後 1 時間で peak となり、肝組織中においては IR 後 6 時間で bottom となった。



(2) 野生型マウスにおける IR 刺激による肝機能障害は、rGal-9 投与により有意に改善した。肝組織における TNF- $\alpha$  / IL-6 / IL-1 / INF- $\gamma$  / CXCL-1 / CXCL-2 の発現を RT-PCR にて解析すると、rGal-9 投与群で有意に抑制された。さらに免疫染色では、CD3(+), Ly-6G(+), CD68(+)細胞数は rGal-9 投与群で有意に減少した。

(3) Gal-9 KO 型マウスでは野生型に比べて IR 刺激による肝機能障害は有意に増悪した。この増悪した肝障害は rGal-9 投与により有意に改善した。さらに、KO 型では著明な肝組織のアポトーシスが生じていた。

このように、血中/組織内の Gal-9 発現の経時的変化を明らかにし、外因性 Gal-9 投与の有効性につき動物実験での実証に至った。Gal-9 は、T細胞を起点とした炎症反応のカスケードを抑制できる機能を持つといえる。肝組織内での Gal-9 の発現量は通常は少ないが、IR による刺激、特に虚血により核内から細胞質へと経時的に発現され、細胞障害に伴い細胞外へ放出され、炎症を鎮静化する役割を担うと考えられる。

これらの新しい知見に基づき、肝 IRI における主として Gal-9 に focus を置いた論文として、2015 年に海外雑誌 Liver transplantation へ報告した。

#### < FACS 解析 >

TIM-3 発現を検証するために免疫染色を施行したが、検出は困難であった。野生型マウス IRI モデルを作成、末梢血を採取し TIM-3 発現を FACS にて解析を行なった。CD4(+)細胞ではなく CD4(-)細胞にても TIM-3 発現を認め、これらは CD11b 陽性を示した。TIM-3 発現が CD4(+)細胞のみならずクッパー細胞を含めた Mφ においても発現していることを確認した。

#### < 今後の展望 >

現在 breeding している TLR4 KO および TIM-3 KO マウスを用いて、in vivo および in vitro 実験に着手し、肝 IRI における T 細胞と Mφ の cross-talk の調節機構の解明を継続していく。

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 10 件 )

(1) Hirao H, Uchida Y, Kadono K, Tanaka H, Niki T, Yamauchi A, Hata K, Watanabe T, Terajima H, Uemoto S.

The protective function of galectin-9 in liver ischemia and reperfusion injury in mice.

Liver Transpl. 査読有 21:969-81, 2015  
DOI: 10.1002/lt.24159.

(2) Kinoshita M, Kubo S, Nakanuma Y, Sato Y, Takemura S, Tanaka S, Hamano G, Ito T, Terajima H, Yamada T, Nakamori S, Arimoto A, Fujikawa M, Sugawara Y, Yamamoto T, Abue M, Nakagawa K, Unno M, Mizuguchi T, Takenaka K, Shirabe K, Shibata T.

Pathological spectrum of bile duct lesions from chronic bile duct injury to invasive cholangiocarcinoma corresponding to bile duct imaging findings of occupational cholangiocarcinoma.

J Hepatobiliary Pancreat Sci, 査読有 23: 92-101, 2015.

DOI: 10.1002/jhbp.305.

(3) Kanai M, Hatano E, Kobayashi S, Fujiwara Y, Marubashi S, Miyamoto A, Shiomi H, Kubo S, Ikuta S, Yanagimoto H, Terajima H, Ikoma H, Sakai D, Kodama Y, Seo S, Morita S, Ajiki T, Nagano H, Ioka T. A multi-institution phase II study of gemcitabine/cisplatin/S-1(GCS) combination chemotherapy for patients with advanced biliary tract cancer (KHBO 1002).

Cancer Chemother Pharmacol, 査読有 75: 293-300, 2015.

DOI: 10.1007/s00280-014-2648-9.

(4) Hatano E, Okuno M, Nakamura K, Ishii T, Seo S, Taura K, Yasuchika K, Yazawa T, Zaima M, Kanazawa A, Terajima H, Kaihara S, Adachi Y, Inoue N, Furumoto K, Manaka D, Tokka A, Furuyama H, Doi K, Hirose T, Horimatsu T, Hasegawa S, Matsumoto S, Sakai Y, Uemoto S.

Conversion to complete resection with mFOLFOX6 with bevacizumab or cetuximab based on K-ras status for unresectable colorectal liver metastasis (BECK study).

J Hepatobiliary Pancreat Sci 査読有 22:634-45, 2015.

DOI: 10.1002/jhbp.254.

(5) 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 98:1105-11, 2014

DOI: 10.1097/TP.000000000000185.

(6) 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 30:1195-207, 2014

DOI: 10.1016/j.nut.2014.02.005.

(7) Iida T, Kaido T, Yagi S, Hori T, Uchida Y, Jobara K, Tanaka H, Sakamoto S, Kasahara M, Ogawa K, Ogura Y, Mori A, Uemoto S.

Hepatic arterial complications in adult living donor liver transplant recipients: a single-center experience of 673 cases

Clin Transplant. 査読有 28:1025-1030, 2014

DOI: 10.1111/ctr.12412.

(8) Okuno M, Hatano E, Seo S, Taura K, Yasuchika K, Nakajima A, Yazawa T, Furuyama H, Kawamoto H, Yagi S, Nishitai R, Fujikawa T, Arimoto A, Zaima M, Yoshimura T, Terajima H, Kaihara S, Manaka D, Tanaka A, Uemoto S.

Indication for neoadjuvant chemotherapy in patients with colorectal liver metastases based on a nomogram that predicts disease-free survival.

J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読有 21: 881-8, 2014.

DOI: 10.1002/jhbp.149.

(9) Kobayashi S, Nagano H, Sakai D, Eguchi H, Hatano E, Kanai M, Seo S, Taura K, Fujiwara Y, Ajiki T, Takemura S, Kubo S, Yanagimoto H, Toyokawa H, Tsuji A, Terajima H, Morita S, Ioka T.

Phase I study of adjuvant gemcitabine or S-1 in patients with biliary tract cancers undergoing major hepatectomy: KHBO1003 study.

Cancer Chemother Pharmacol. 査読有 74: 699-709, 2014.

DOI: 10.1007/s00280-014-2543-4.

(10) Toyoda M, Ajiki T, Fujiwara Y, Nagano H, Kobayashi S, Sakai D, Hatano E, Kanai M, Nakamori S, Miyamoto A, Tsuji A, Kaihara S, Ikoma H, Takemura S, Toyokawa H, Terajima H, Morita S, Ioka T. Phase I study of adjuvant chemotherapy with gemcitabine plus cisplatin in patients with biliary tract cancer undergoing curative resection without major hepatectomy (KHBO1004).

Cancer Chemother Pharmacol 査読有 73:1295-1301,2014

DOI: 10.1007/s00280-014-2431-y.

〔学会発表〕(計3件)

(1) 内田 洋一郎、平尾 浩史、門野 賢太郎、山内 清明、上田 修吾、森 章、金澤 旭宣、上本 伸二、寺嶋 宏明

肝虚血再灌流障害における Galectin-9 による制御機構の解明

第 116 回日本外科学会定期学術集会

大阪国際会議場：大阪府大阪市

(2016.4.14-16)

(2) Hirofumi Hirao, Yoichiro Uchida, Kentaro Kadono, Akira Yamauchi, Takeshi Watanabe, Hiroaki Terajima, Shinji Uemoto

The role of T cell immunoglobulin mucin-3 and Galectin-9 pathway in liver ischemia reperfusion injury

14th Transplantation Science Symposium Lorne, Australia

(2015.11.11-13)

(3) 内田洋一郎、平尾浩史、門野賢太郎、田中宏和、吉富摩美、飯田拓、上田修吾、金澤旭宣、上本伸二、寺嶋宏明

肝虚血再灌流障害と自然免疫の新しいメカニズムの解明-T cell macrophage cross talk-

第 115 回日本外科学会定期学術集会

名古屋国際会議場：愛知県名古屋市

(2015.4.16-18)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

寺嶋 宏明 (TERAJIMA, Hiroaki)

公益財団法人田附興風会・医学研究所

第 1 研究部・研究主幹

研究者番号：40314215

### (2)研究分担者

内田 洋一郎 (UCHIDA, Yoichiro)

公益財団法人田附興風会・医学研究所

第 1 研究部・主任研究員

研究者番号：30597745

尚、本研究は京都大学肝胆膵移植外科大学院と連携大学院システムを構築し、大学院生(田中 宏和、平尾 浩史、門野 賢太郎)と、また gal-9 の機能解析とその精製に成功した当研究所第 1 研究部山内 清明部長の協力支援を得て遂行された。