

学位論文

「iNKT 細胞の活性化は、マクロファージの形質転換を介して、
肝虚血再灌流障害後の肝修復を促進させる」

DM19010 後藤 卓也

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 外科学
指導教授 比企 直樹

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

【背景・目的】

肝虚血再灌流(I/R)障害は、肝切除や肝移植の際に生じる肝障害の主な原因である。肝の修復と再生が不十分であると、患者の予後は不良となる。肝臓は類洞構造を有し、腸管から吸収された多様な物質が門脈を介して直接流入し曝露を受ける。それに対し Natural Killer T (NKT) 細胞は自然免疫系の初期防御を担っている。NKT 細胞は T 細胞の一種であり、CD1d 分子により提示された糖脂質抗原を認識し活性化する。活性化 NKT 細胞はそれ自体が免疫機能を有している一方で、生理活性物質を分泌し他の免疫細胞の活性化を誘導する調節性細胞としての機能を有している。NKT 細胞は常在型肝細胞内リンパ球の 20~30%を占める。肝臓の NKT 細胞の多くは、Invariant T cell receptor を有した Invariant NKT (iNKT) 細胞である。alpha-ガラクトシルセラミド(α -GalCer) は iNKT 細胞を活性化させる特異的リガンドとして様々な研究で用いられている。これまでに様々な肝炎症モデルで NKT 細胞の役割について報告されているが、未だ急性肝障害後の肝修復過程における NKT 細胞の役割は不明である。マクロファージの表現型が炎症性から修復性へと変化することは、肝 I/R 障害後の肝修復に極めて重要である。しかし、その機構は未だ解明されていない。本研究では、iNKT 細胞がマクロファージの表現系に影響を与え、肝 I/R 障害後の肝修復に重要な役割を果たすかを検討した。

【結果】

1. iNKT 細胞の活性化は肝 I/R 障害後の肝修復を促進した

肝 I/R 障害モデルマウスは次の手順で作成した。開腹し、血管クランプを用いて肝中葉と左肝葉への血液供給を 60 分間遮断した。再灌流はクランプを外すことにより開始した。肝虚血時に iNKT 細胞を活性化させる α -GalCer とビークルをそれぞれ腹腔内投与し比較した。 α -GalCer 投与群では、ビークル投与群と比較して血清 ALT 値および肝壊死領域が減少した。さらに、 α -GalCer 投与群では、肝細胞の増殖を示す PCNA⁺肝細胞の割合が増加した。 α -GalCer の投与は、肝 I/R 障害後の肝修復を促進することを示した。

2. 炎症性および修復性マクロファージ関連遺伝子の発現

肝 I/R 障害後の肝臓の炎症性および修復性マクロファージ関連遺伝子の発現を比較した。肝 I/R 障害後 6 時間の炎症性マクロファージ関連遺伝子の発現は、 α -GalCer 投与群で増強していた。一方で、修復性マクロファージ関連遺伝子の発現は、肝 I/R 障害後の修復期において α -GalCer 投与群で増強した。

3. 肝 I/R 障害時のマクロファージ集積

フローサイトメトリー解析で肝 I/R 障害時のマクロファージを同定した。マクロファージは Ly6c を用いて、Ly6C^{high} マクロファージ(炎症性マクロファージ)と Ly6C^{low} マクロファージ(修復性マクロファージ)に分類した。Ly6C^{high} マクロファージは、 α -GalCer 投与群でビークル投与群と比較して肝 I/R 後 6 時間と 24 時間に増加した。Ly6C^{low} マクロファージは、 α -GalCer 投与群で肝 I/R 後 24 時間と 48 時間で増加した。 α -GalCer の投与は、炎症性マクロファージと修復性マクロファージの両方を増加させ、肝 I/R 障害時に炎症性マクロファージから修復性マクロファージへの形質転換を促進することを示した。

4. iNKT 細胞は肝 I/R 障害後早期に IL-4 と IFN- γ を産生した

炎症性マクロファージから修復性マクロファージへの表現系の変化には、IL-4、IL-13、IFN- γ などのサイトカインが関与する。肝 I/R 障害時に、活性化 iNKT 細胞がこれらのサイトカインを産生するか測定した。 α -GalCer 投与群では、ビークル投与群と比較して肝 I/R 障害後 6 時間で、iNKT 細胞由来の IL-4 および IFN- γ が増加したが、IL-13 は増加しなかった。

5. IL-4 阻害は、マクロファージの形質転換と肝修復を遷延させる

IL-4 がマクロファージの形質転換に関与するかを検討した。抗 IL-4 中和抗体またはコントロール IgG を肝 I/R および α -GalCer を投与する 1 時間前にマウスの腹腔内に投与した。抗 IL-4 中和抗体投与により、肝 I/R 後 24 時間および 48 時間の Ly6C^{high} マクロファージが増加し、Ly6C^{low} マクロファージが減少した。抗 IL-4 中和抗体は、肝 I/R 後 48 時間の血清 ALT 値と壊死領域を増加させ、PCNA⁺肝細胞の割合を減少させた。さらに、抗 IL-4 中和抗体の投与は、炎症性マクロファージ関連遺伝子の発現を増強させ、修復性マクロファージ関連遺伝子の発現を減弱させた。活性化 iNKT 細胞は、IL-4 を介して炎症性マクロファージから修復性マクロファージへの分化を促進し、肝臓の修復に寄与することが示唆された。

6. IFN- γ 阻害は炎症性マクロファージと肝臓の炎症を減少させた

IFN- γ がマクロファージ表現系の変化を誘導するかを検討した。抗 IFN- γ 中和抗体は、肝 I/R 後 24 時間と 48 時間の Ly6C^{high} マクロファージを減少させた。一方で、Ly6C^{low} マクロファージに変化は認めなかった。抗 IFN- γ 中和抗体は、肝 I/R 後 48 時間の血清 ALT 値と壊死領域を減少させ、PCNA⁺肝細胞の割合を増加させた。抗 IFN- γ 中和抗体投与群では、炎症性マクロファージ関連遺伝子の発現が減弱し、修復性マクロファージ関連遺伝子の発現が増強した。IFN- γ は炎症性マクロファージの割合の増加に寄与することで、肝臓の炎症の増強や肝細胞増殖の抑制に関連することが示唆された。

7. 肝 I/R 障害時のマクロファージにおける CD1d の発現

α -GalCer を投与したマウスで、肝 I/R 障害時に iNKT 細胞がマクロファージに発現する CD1d 分子と相互作用しているかを検討した。免疫蛍光染色で、肝 I/R 後 6 時間の F4/80⁺細胞(マクロファージ)に Cd1d の発現を認めた。フローサイトメトリー解析で、肝 I/R 後 6 時間の Ly6C^{high} マクロファージで CD1d の発現を認めた。マクロファージに CD1d が発現しており、肝 I/R 障害において iNKT 細胞と相互作用することが示唆された。

8. in vitro における iNKT 細胞とマクロファージの相互作用

骨髄由来マクロファージと iNKT 細胞を共培養し、in vitro において活性化 iNKT 細胞がマクロファージの表現系に影響を与えるかを検討した。 α -GalCer 存在下で iNKT 細胞と共培養したマクロファージは、炎症性および修復性マクロファージ関連遺伝子の発現を増強させた。また、マクロファージで *cd1d1* の発現を確認した。マクロファージにおける *Cd1d1* の発現は、活性化 iNKT 細胞と共培養したマクロファージで増強した。マクロファージに発現している CD1d を介し、活性化 iNKT 細胞とマクロファージが相互作用しマクロファージの表現型に影響を与えることが示唆された。

9. iNKT 細胞と共培養したマクロファージに対する IL-4 および IFN- γ の影響

In vitro において iNKT 細胞が、IL-4 と IFN- γ を産生するかを検討した。iNKT 細胞は、共培養系でこれら mRNA の発現を増強させ、タンパク質レベルを増加させた。活性化 iNKT 細胞と共培養した骨髓由来マクロファージに抗 IL-4 中和抗体を投与すると、マクロファージにおける炎症性マクロファージ関連遺伝子の発現を増強し、修復性マクロファージ関連遺伝子の発現を減弱した。さらに、抗 IFN- γ 中和抗体の投与は、マクロファージにおいて炎症性マクロファージ関連遺伝子の発現を減弱させ、修復性マクロファージ関連遺伝子の発現を増強させた。

10. Cd1d^{-/-}マウスでは肝 I/R 障害時の肝修復とマクロファージ分化が遅延した

iNKT 細胞が欠損した Cd1d^{-/-}マウスにおける肝 I/R 障害後の肝修復について検討した。Cd1d^{-/-}マウスは、野生型 (WT) マウスと比較して肝 I/R 後 48 時間および 72 時間において、血清 ALT 値および肝壊死面積の増加、PCNA⁺肝細胞数の割合の減少を認め、肝修復の遅延を示した。フローサイトメトリー解析では、WT マウスと比較して Cd1d^{-/-}マウスでは、肝 I/R 障害後 24 時間の Ly6C^{high} マクロファージは多く、肝 I/R 障害後 48 時間および 72 時間の Ly6C^{low} マクロファージは少なかった。Cd1d^{-/-}マウスの肝臓における炎症性マクロファージ関連遺伝子の発現は肝 I/R 後 48 時間で増強した。一方で、修復期における Cd1d^{-/-}マウスの肝臓における修復性マクロファージ関連遺伝子の発現は減弱した。さらに、Cd1d^{-/-}マウスで、肝 I/R 後 6 時間の *Ifng* の発現の増強と *Ii4* の発現が減弱を示した。

【結語】

肝 I/R 障害において、 α -GalCer により活性化された iNKT 細胞から IL-4 および IFN- γ が産生されることを明らかにした。活性化 iNKT 細胞は IL-4 を介して、マクロファージの形質転換を促し、肝 I/R 損傷後の肝修復を促進させた。活性化 iNKT 細胞由来の IFN- γ は、炎症性マクロファージの集積に関与し、その後の修復性マクロファージの形質転換を促進させた。また、マクロファージに Cd1d が発現していること、CD1d を発現するマクロファージが α -GalCer を提示して iNKT 細胞を活性化することを明らかにした。iNKT 細胞が欠損している Cd1d^{-/-}マウスの肝 I/R 障害では、マクロファージの形質転換が遅れ、細胞増殖の低下および肝修復が遅延した。これにより、iNKT 細胞が肝 I/R 障害後の肝修復に関与することが示唆された。これらの結果は、肝 I/R 障害において α -GalCer の投与による iNKT 細胞の活性化は、iNKT 細胞とマクロファージの相互作用によりマクロファージの形質転換を促すことで肝修復を促進することを示唆するものである。したがって、iNKT 細胞の活性化は、肝 I/R 障害後の肝組織修復のための治療手段となり、肝臓手術の予後を向上する可能性がある。

目次

	頁
1. 序論.....	1
2. 方法.....	3
2-1. 動物.....	3
2-2. 動物操作.....	3
2-3. 実験プロトコール.....	3
2-4. 組織免疫染色.....	3
2-5. 蛍光免疫染色.....	4
2-6. リアルタイム RT-PCR.....	4
2-7. 肝臓内の血球分離.....	4
2-8. フローサイトメトリー解析とセルソーティング.....	4
2-9. 細胞培養.....	5
2-10. 統計解析.....	5
3. 結果.....	6
3-1. iNKT 細胞の活性化は肝 I/R 障害後の肝修復を促進した.....	6
3-2. 肝 I/R 障害後の iNKT 細胞の割合.....	6
3-3. 炎症および修復性マクロファージ関連遺伝子の発現.....	6
3-4. マクロファージの集積.....	7
3-5. iNKT 細胞は肝 I/R 障害後の初期に IL-4 と IFN- γ を産生した.....	7
3-6. IL-4 阻害はマクロファージの分化と肝修復を遅らせる.....	8
3-7. IFN- γ 阻害は炎症性マクロファージへの分化を遅延し、肝臓の炎症を減少させた.....	8
3-8. 肝 I/R 障害時のマクロファージにおける CD1d の発現.....	8
3-9. iNKT 細胞とマクロファージの相互作用.....	9
3-10. iNKT 細胞と共培養した骨髄由来マクロファージの表現型に及ぼす IL-4 および IFN- γ 阻害の影響.....	9
3-11. Cd1d1 ^{-/-} マウスは肝 I/R 障害時のマクロファージ分化が遅れ、肝修復が遅延した.....	10

4. 考察	11
4-1. 肝 I/R 後の α -GalCer による iNKT 細胞とマクロファージ表現形式の変化.....	11
4-2. iNKT 細胞由来のサイトカインがマクロファージ表現形式と肝修復に及ぼす効果.....	12
4-3. iNKT 細胞とマクロファージ相互作用の必要性.....	13
5. 総括	15
6. 謝辞	15
7. 引用文献	15
8. 業績目録.....	20
9. 図表	21

1.序論

肝虚血再灌流(I/R)障害は、肝切除や肝移植の際に生じる肝障害の主な原因である。肝組織の修復過程が阻害されることで肝障害の遷延化や肝不全に至り、患者の予後は不良となる(1)。そのため、急性肝障害後の肝組織修復の制御機構の解明は重要な課題である。急性肝障害時の肝組織内では、単球が障害肝に集積し、マクロファージに分化する。マクロファージは肝 I/R 障害などの急性肝障害後の肝修復に重要な役割を担っている(2)。マクロファージの表現型が炎症性から修復性へと変化することは、肝 I/R 障害後の肝組織修復に極めて重要である(3-6)。しかし、マクロファージの表現型の変化を介し、肝組織が修復されるメカニズムについては、未だ明らかになっていない。

Invariant Natural Killer T (iNKT)細胞は、不変性 T 細胞受容体を介して、抗原提示細胞の CD1d 分子に提示された内因性および外因性の糖脂質抗原を認識する(7)。活性化した iNKT 細胞は、インターフェロン(IFN)- γ やインターロイキン(IL)-4 などのサイトカインを迅速かつ大量に生産し、その後の免疫反応を形成する(8)。iNKT 細胞を活性化させる特異的リガンドとして α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)が知られている(9)。 α -GalCer は、特異的に iNKT 細胞を活性化させ、様々なサイトカインやケモカインを迅速に大量に誘導する手段として広く用いられてきた(10)。

iNKT 細胞は、肝臓に最も多く存在している(11)。肝臓は類洞構造を有し、腸管から吸収された多様な物質が門脈を介して直接流入し曝露を受ける。それに対し NKT 細胞は類洞をパトロールし自然免疫系の初期防御を担っている(12)。肝疾患における iNKT 細胞の機能は複雑であり、多様な役割を担っている可能性があることが、蓄積された証拠によって示唆されている。iNKT 細胞は、好中球の浸潤を伴う四塩化炭素誘発肝損傷を減弱させる(13)。肝 I/R による無菌性肝障害では、iNKT 細胞が誘導され、IFN- γ 産生を介して組織障害に寄与している(14)。この研究は、無菌性炎症によって誘導される iNKT 細胞の活性化が、組織障害に寄与することを示している。一方で、 α -GalCer により iNKT 細胞を事前に活性化させることで、IL-13 産生を介して、肝 I/R 障害から肝臓を保護することが報告されている(15)。

iNKT 細胞は、IFN- γ を産生することにより、急性皮膚創傷の治癒を促進する。iNKT 細胞欠損マウスでは、iNKT 細胞からの IFN- γ 誘導が欠損することで、コラーゲンや平滑筋アクチンの沈着が少なく、新しい血管形成が損なわれることで、創傷治癒が著しく遅延する(16)。iNKT 細胞は、急性心筋梗塞後の障害部位に集積し、IL-10 の産生を介して障害組織を修復する(17, 18)。肝臓においても、iNKT 細胞は、IL-4 産生を介して単球の表現型を炎症性から修復性に変化させることで、肝臓表面の局所的無菌熱損傷後の肝臓組織の修復促進に重要な役割を果たすことが最近報告されている(19)。一方、iNKT 細胞の活性化は、IFN- γ と IL-4 の両方の分泌を介して、マウスの部分肝切除後の肝再生を抑制する(20)。

iNKT 細胞がマクロファージとの相互作用を通じて急性無菌性炎症の誘導に寄与していることを示す証拠が蓄積されている。しかし、炎症の解消や損傷後の修復における iNKT 細胞と単球/マクロファージの相互作用の役割を示す研究はほとんどない(21)。組織修復における iNKT 細胞の重要な役割は、iNKT 細胞とマクロファージや単球を含む CD1d 発現細胞との相互作用によって示されている(22)。さら

に、マクロファージ表現型の変化は、急性肝損傷後の肝組織の修復に不可欠である(4)。したがって、肝微小環境におけるマクロファージとのクロストークにより iNKT 細胞が産生するサイトカインは、マクロファージの形質転換に関与し、肝修復を促進する可能性がある。iNKT 細胞は、様々な炎症性疾患モデルにおいて、それぞれのモデルに応じた代表的なサイトカインを介して肝炎症を緩和する役割を担っているようである。そこで我々は、マウスの肝 I/R 障害後の肝修復における iNKT 細胞の役割について、IFN- γ または IL-4 のいずれかを阻害することで検証を試みた。 α -GalCer による iNKT 細胞の活性化による肝 I/R 障害後の肝修復の促進について、マクロファージ形質転換の加速と増強に重点を置いて考察した。

2. 方法

2-1. 動物

8週齢、20-25gの雄性C57BL/6野生型マウス(WT)(日本クレア、東京、日本)、Cd1d欠損(Cd1d^{-/-})マウスを用いて実施した。Cd1d^{-/-}マウスは、以前に記載したように作製した(23, 24)。これらのマウスは湿度(50%±5)および温度(25°C±1°C)を一定に維持し、12時間の明暗サイクルで、餌と水を自由に摂取させ飼育した。すべての実験手順は、北里大学動物実験・倫理委員会の承認を得ている。すべての実験手順は、北里大学医学部動物実験・倫理委員会(2020-111)の承認を受け、日本学術会議発行の「動物実験適正実施ガイドライン」に準拠した機関別動物実験ガイドラインに従って実施した。

2-2. 動物操作

麻酔下に開腹術を実施し、無傷の血管クランプ(ROBOZ Surgical Instrument, Washington, DC, USA)を使用して、肝中葉および左肝葉への血液供給を60分間遮断する肝部分温虚血再灌流障害モデルを作成した(3)。血流遮断解除後、生理食塩水4mL/kgを腹腔内(ip)投与し、4-0ナイロン縫合糸で閉腹した。麻酔法は、塩酸メドミジン(0.3 mg/kg)(日本全薬工業株式会社、福島、日本)、ミダゾラム(4.0 mg/kg)(アステラス製薬株式会社、東京、日本)、およびブトルファノール(5.0 mg/kg)(明治製薬株式会社、東京、日本)の混合物をip注射し実施した。また処置後、塩酸メドミジンを拮抗させるためアチパメゾール(0.75 mg/kg)(日本全薬工業株式会社)をip注射した。Shamコントロールマウスは血管を閉塞することなく同様のプロトコールを行った。

2-3. 実験プロトコール

肝I/R後0、6、24、48、72および96時間でマウスの血液を採取し、肝臓を摘出した。Dri-Chem 7000 Chemistry Analyzer System(富士フイルム、東京、日本)を用いて血清ALT値を測定し、肝障害の指標とした。摘出した肝臓は分割して、免疫染色、real-time RT-PCR解析に用いた。

α-GalCer(0.1mg/kg)(Funakoshi、東京、日本)は再灌流時にip注射した(25)。抗IL-4中和モノクローナル抗体(BioLegend, San Diego, CA, USA)(26)、抗IFN-γ中和モノクローナル抗体(BioLegend)(27)は肝I/Rの1時間前に、500μgをip注射した。また対照群として、コントロールIgG(BioLegend)を同様にip注射した。

2-4. 組織免疫染色

摘出した肝臓組織の薄片を10%ホルムアルデヒドで固定した。パラフィン包埋組織から切片(厚さ4μm)を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色または免疫染色を行った。画像は、顕微鏡(Biozero BZ-700 Series; Keyence, Osaka, Japan)を用いて撮影した。ImageJソフトウェア(US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて組織切片全体に対する壊死領域を測定した。また、増殖細胞核抗原を検出するために免疫染色を行った(PCNA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。免疫複合体は、Histofine Simple Stain MAX PO(MULTI)(ニチレイ、東京、日本)を用いて、製造者のプロトコールに従って検出した。動物1匹あたり6か所を高倍率視野(400×)で撮影し、1視野あたりのPCNA陽性細胞の割合を総肝細胞数より算出した。

2-5. 蛍光免疫染色

摘出した肝臓組織の小片を PLP(periodate-lysine-paraformaldehyde)固定液で固定し、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.2)で調整した 30%ショ糖で凍結保護した後、Tissue-Tek O.C.T. compound(Sakura Finetek USA, Torrance, CA, USA)に埋め込み凍結保存した。試料をクリオスタットで 8 μ m に切断し、Dako Protein Block Serum-Free solution (Glostrup, Denmark)を用い室温で 1 時間インキュベートした。次に、ラット抗 CD1d モノクローナル抗体(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)およびウサギ抗 F4/80 ポリクローナル抗体(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)と共に 4°Cで一晩インキュベートした。PBS で洗浄後、切片を下記に記す二次抗体を用いて室温で 1 時間インキュベートした: Alexa Fluor 488-ロバ抗ウサギ IgG および Alexa Fluor 594-ロバ抗ラット IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。画像は、蛍光顕微鏡(Biozero BZ-700;Keyence)で撮影した。

2-6. リアルタイム RT-PCR

マウス肝臓組織から total RNA を抽出し、TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) でホモジナイズした。ReverTra Ace qPCR RT Kit(東洋紡、大阪、日本)で、製造元のプロトコールに従って、逆転写により 1 μ g の total RNA から、一本鎖 cDNA を生成した。定量的 PCR は TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus; Takara Bio, Shiga, Japan)を使用して行った。リアルタイム RT-PCR に使用した遺伝子特異的プライマーは、GenBank のデータを基に Primer 3 ソフトウェア (<http://primer3.sourceforge.net/>) を使用して設計した(表 1)。データは、各サンプルにおける GAPDH を内在性コントロール遺伝子として用いて正規化した。

2-7. 肝臓内の血球分離

メドミジン(0.75 mg/kg)、ミダゾラム(4.0 mg/kg)およびブトルファノール(5.0 mg/kg)の混合物麻酔下に、門脈よりハンクス平衡塩溶液 10mL を肝臓に灌流させた後に、肝臓を摘出した。摘出した肝臓を室温の RPMI に入れ、小片に刻んだのち、0.05%コラゲナーゼ(Type IV; Sigma Chemical Co., Dt.Louis, USA)を含む RPMI に 20 分間 37°Cでインキュベートした。その後、組織を 70 μ m のセルストレーナーに通し、細胞を 4°C、10 分間 1290G で遠心分離した。ペレット化した細胞は PBS に再懸濁した。非実質細胞を、33% Percoll (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) を使用し密度勾配遠心分離によって分離した (28)。生存細胞を、トリパンブルーを用いて計数し、均一な細胞密度で再懸濁した。

2-8. フローサイトメトリー解析とセルソーティング

細胞を抗 Fc γ RIII/II(2.4G2 mAb)とともにインキュベートし、一次モノクローナル抗体の非特異的結合をブロックした。次に、以下の蛍光色素標識抗体を組み合わせで細胞を染色した: 抗 TCR β (H57-597)、抗 F4/80(BM8)、抗 CD1d 抗体(1B1)、抗 Ly6G(1A8)、抗 CD11b(M1/70)、抗 CD45(30-F11)、抗 Ly6C(HK1. 4)、抗 CD45(30-F11)(すべて BioLegend)に加えて、 α -GalCer(PBS-57)が結合した CD1d テトラマーとコントロール CD1d-テトラマー(エモリ大学 The NIH Tetramer Core Facility(NTCF)(米国アトランタ、GE)から提供)。氷上で 30 分間暗所に置いた後、ペレットを PBS で 2 回洗浄した。フローサイトメトリー解析では、最初に前方散乱(FSC)と側方散乱(SSC)でゲーティングした。次に CD45+

細胞でゲーティングし、さらに死細胞を染色する 7-AAD (BioLegend) 陽性細胞を除外した。サンプルは FACSVerse™ サイトメーター (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) で分析し、データは Kaluza ソフトウェア v2.1 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を使用して解析した。解析した結果は、CD45⁺細胞 (CD45⁺7ADD⁻細胞) の総生存細胞数に対する割合として定量化し表示をした。

細胞内サイトカイン染色は、肝組織から採取した細胞を表面マーカーで染色した後に、FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (BioLegend) を用いて固定および透過化を行った。その後、抗 IL-4 抗体 (11B11、BioLegend)、抗 IFN- γ 抗体 (XMG1.2、BioLegend)、抗 IL-13 mAb (eBio13A、BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を使用して染色した。染色した細胞は FACS Verse フローサイトメーター (BD Biosciences) で分析し、FlowJo ソフトウェア (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA) を用いて解析した。

2-9. 細胞培養

8 週齢のマウスの大腿骨と脛骨から骨髓細胞を分離した。大腿骨および脛骨は PBS で洗浄し、赤血球溶解緩衝液 (BioLegend) で処理し、赤血球を溶解した。骨髓細胞は 10%FBS を含む RPMI1640 培地で培養し、6 ウェルプレートに 1.0×10^6 /mL の密度で撒いた。プレートは、5%CO₂ の環境下にて 37°C でインキュベートした。さらに、骨髓由来マクロファージを誘導するために骨髓細胞を 20ng/mL M-CSF (BioLegend) で 7 日間培養した。iNKT 細胞 (TCR β ⁺CD1d tetramer⁺細胞) は BD FACSAria™ II (BD Biosciences) を用いたセルソーティングにより肝臓より分離した。

共培養実験では、iNKT 細胞 (1×10^5 /well) と骨髓由来マクロファージ (3×10^5 /well) を、5%FBS を含む RPMI1640 培地を入れた 12 ウェルプレートに撒いた。さらに、培地に α -GalCer (100 ng/mL) を投与し、72 時間インキュベートした (29)。抗体を介した中和実験は、5 μ g/mL の抗マウス IL-4 モノクローナル抗体 (BioLegend) (30)、5 μ g/mL の抗マウス IFN γ モノクローナル抗体 (BioLegend) (31)、または 5 μ g/mL のアイソタイプコントロール IgG (BioLegend) の投与下に実施した。その後、非接着細胞 (浮遊細胞) および接着細胞を回収し、mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR を用いて測定した。更に、iNKT 細胞とマクロファージを共培養した上清を回収し、サイトメトリービーズアレイ (BD Bioscience) を用いてサイトカインレベルを測定し、BD Biosciences FCAP ソフトウェア (V3.0) を用いて解析した。

2-10. 統計解析

すべての結果は、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示し、GraphPad Prism ソフトウェア、バージョン 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を使用して解析した。対応のない両側 Student の t 検定を用い、2 群間のデータを比較した。多群間でのデータ比較は、一元配置分散分析とそれに続く Tukey の事後検定を使用した。p 値 < 0.05 は統計的に有意であるとみなした。有意性は以下のようにグラフにアスタリスクで記した: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, および ****P < 0.0001。

3. 結果

3-1. iNKT 細胞の活性化は肝 I/R 障害後の肝修復を促進した

iNKT 細胞の活性化が肝 I/R 損傷後の肝修復を促進するかどうかを調べるために、再灌流時に α -GalCer またはビークルを投与した。肝障害の指標として血清 ALT 値を測定すると、 α -GalCer 投与群およびビークル投与群のいずれも肝 I/R 後 6 時間でピークを認め、徐々に減少した(図 1A)。肝 I/R 後 6 時間と 24 時間の血清 ALT 値には、両群間に統計的な有意差は認めなかった。肝 I/R 後 48 時間で、 α -GalCer 投与群の血清 ALT 値は、ビークル投与群と比較して有意に低値を示した。

また肝壊死面積は血清 ALT 値と同様に肝 I/R 後 24 時間で両群間に有意な差は認めなかったが、肝 I/R 後 48 時間における α -GalCer 投与群の壊死面積は、ビークル投与群よりより低値であった(図 1B)。また、肝 I/R 障害後の肝細胞の増殖を調べるために、PCNA の免疫染色を施行した。ビークル投与群では、PCNA⁺肝細胞の割合が肝 I/R 後 48 時間で増加した(3)。一方、 α -GalCer 投与群では、PCNA⁺肝細胞の割合が肝 I/R 後 24 時間より増加し、ビークル投与群と比較し高値を示した(図 1D)。これらの結果から、 α -GalCer の投与による iNKT 細胞の活性化は、肝 I/R 障害後の肝修復を促進すると考えられた。

α -GalCer の投与による影響を確認するために、 α -GalCer を投与した偽手術マウスを作成し、血清 ALT 値、壊死面積、PCNA⁺肝細胞数を測定した。血清 ALT 値は偽手術後 24 時間および 48 時間で中程度に上昇し、72 時間で減少した(図 S1)。偽手術マウスの血清 ALT 値は、肝 I/R 障害を受けた α -GalCer 投与マウスの血清 ALT 値より著しく低かった。 α -GalCer を投与した偽手術マウスでは、小さな炎症巣の形成が見られたが、肝壊死領域(図 1C)は観察されなかった。また、肝細胞の PCNA の発現は上昇していなかった。

3-2. 肝 I/R 障害後の iNKT 細胞の割合

肝 I/R 障害後の iNKT 細胞を調べるために、TCR β ⁺CD1d-tetramer⁺細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いて測定した(図 2、左図)。 α -GalCer-およびビークル投与マウスの両群で、肝 I/R 後 6 時間の CD45⁺細胞における iNKT 細胞の割合は減少しはじめ、肝 I/R 後 24 時間および 48 時間で顕著に減少した(図 2、右図)。ビークル投与群における iNKT 細胞は、肝 I/R 後 72 時間では低いままであったが、肝 I/R 後 96 時間ではわずかに上昇した。一方、 α -GalCer 投与群では、肝 I/R 後 72 時間および 96 時間における iNKT 細胞の割合が、ビークル投与群よりも大きかった。

3-3. 炎症および修復性マクロファージ関連遺伝子の発現

肝 I/R 障害後の炎症期と修復期に、肝組織の炎症性マクロファージと修復性マクロファージに関連する遺伝子が発現する(3, 28)。そこで、炎症性マクロファージ関連遺伝子(*tumor necrosis factor: Tnf*、*interleukin-1 β : Il1b*、*interleukin-6: Il6*、*nitric oxide synthetase-2: Nos2*、*interferon- γ : Ifng*)と、修復性マクロファージ関連遺伝子(*mannose receptor: Mrc1*、*resistin-like molecule- α : Retnla*、*interleukin-4: Il4*、*interleukin-13: Il13*)の mRNA の発現を比較検討した(図 3)。肝 I/R 障害後 6 時間において、ビークル投与群と比較して、 α -GalCer 投与群の炎症性マクロファージ関連遺伝子(*Tnf*、

Il1b, *Il6*, *Ifng*)は増強していた。また、修復期においては、ビークル投与群と比較して α -GalCer 投与群の修復性マクロファージ関連遺伝子(*Mrc1*, *Retnla*, *Il4*)が増強した。さらに、肝 I/R 後 6 時間における α -GalCer 投与群の *IL-4* および *IL-13* の発現は、ビークル投与群より増強していた。

3-4. マクロファージの集積

肝組織に集積するマクロファージのサブタイプを調べるために、フローサイトメトリーを行った。生存した CD45⁺細胞から好中球を示す Ly6G^{high}/CD11b⁺の集団を除外した。次に、マクロファージの亜集団を調べたところ、2 つの異なる表現型のマクロファージを認め、(図 4) Ly6G⁻/Ly6C^{high}/CD11b^{high}/F4/80^{high} の細胞集団を炎症性マクロファージ(:Ly6C^{high} マクロファージ)、Ly6G⁻/Ly6C^{low}/CD11b^{high}/F4/80^{high} の細胞集団を修復性マクロファージ(Ly6C^{low} マクロファージ)と定義した。

フローサイトメトリー解析の結果、ビークル投与群の肝臓では、Ly6C^{high} マクロファージの割合が肝 I/R 後 6 時間で増加し、96 時間まで持続した(図 4)。 α -GalCer 投与群では、肝 I/R 後 6 時間および 24 時間における Ly6C^{high} マクロファージの割合が、ビークル投与群と比較し増加した。 α -GalCer 投与群における Ly6C^{high} マクロファージの時間的変化は、ビークル投与群と同様であった(図 4)。ビークル投与群の肝臓では、Ly6C^{low} マクロファージの割合は肝 I/R 後 24 時間から増加し、72 時間で最大となった。ビークル投与群と比較して、 α -GalCer 投与群の Ly6C^{low} マクロファージの割合は、肝 I/R 後 24 時間で有意な増加を示し、48 時間で最大となった。

これらの結果は、 α -GalCer 投与が、炎症性マクロファージと修復性マクロファージの両方を増加させ、肝 I/R 障害時に炎症性マクロファージから修復性マクロファージへの形質転換を早期に誘導することを示している。

また、フローサイトメトリーにより、肝 I/R 障害を受けた肝臓では、好中球(Ly6G⁺/CD11b⁺)が主要な白血球集団であることが明らかになった(図 S2B)。好中球の蓄積は、 α -GalCer 投与群とビークル投与群の両方で、肝 I/R 後 6 時間で最大となり二群間で差は認めなかった。両群で好中球の割合は時間経過とともに減少した。肝 I/R 後 48 時間および 72 時間において、 α -GalCer 投与群の好中球の割合は、ビークル投与群よりも低かった。 α -GalCer 投与群とビークル投与群のクッパー細胞(Ly6G⁻/Ly6C⁻/CD11b^{high}/F4/80^{high})は、肝 I/R 障害後とともに著しく減少していた。ビークル投与群のクッパー細胞は、肝 I/R 後 72 時間と 96 時間において徐々に増加を認めた(図 S2C)。 α -GalCer 投与群では、肝 I/R 障害後のクッパー細胞は少なく、肝 I/R 後 96 時間後の割合はビークル投与群に比べ低かった。

3-5. iNKT 細胞は肝 I/R 障害後の初期に IL-4 と IFN- γ を産生した

急性肝損傷後の肝修復には、肝損傷部に集積したマクロファージ表現型の変化が関与する(2, 32)。炎症性から修復性マクロファージへの形質転換には、IL-4、IL-13、IFN- γ などのサイトカインが関与する。iNKT 細胞がこれらのサイトカインを産生し、マクロファージの形質転換に関与しているかどうかを調べるために、肝 I/R 後 6 時間において、活性化された iNKT 細胞が産生するサイトカインのレベルを測定した(図 5)。 α -GalCer 投与群において、肝 I/R 後 6 時間で、iNKT 細胞由来の IL-4 と IFN- γ

が上昇したが、IL-13 は低値であった。ビークル投与群では、iNKT 細胞のこれらのサイトカインレベルは低値であった。

3-6. IL-4 阻害はマクロファージの分化と肝修復を遅らせる

IL-4 および IFN- γ が肝修復に関連するマクロファージの表現型の変化に関与しているかどうかを検討した(図 6)。まず、IL-4 の役割について抗 IL-4 中和抗体を用いて検討した。抗 IL-4 中和抗体またはコントロール IgG を、肝 I/R を行う 1 時間前に ip 投与した。その後に肝 I/R を施行し、血流遮断時に α -GalCer を投与した。フローサイトメトリー解析の結果、抗 IL-4 中和抗体投与により、肝 I/R 後 24 時間および 48 時間における Ly6C^{high} マクロファージの割合が増加し、Ly6C^{low} マクロファージの割合が減少した(図 6A)。抗 IL-4 中和抗体による処理は、肝 I/R 後 48 時間で、血清 ALT 値と壊死面積を増加させ、PCNA⁺肝細胞を減少させた(図 6B)。また、コントロール IgG 投与群と比較して、抗 IL-4 中和抗体投与群の肝臓における炎症性マクロファージ関連遺伝子 (*Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Nos2*, *Irfng*) は増強し、修復性マクロファージ関連遺伝子 (*Mrc1*, *Retnla*, *Il13*) の発現は減弱した(図 6C)。これらの結果より、IL-4 は炎症性から修復性マクロファージへの形質転換を促進することで肝修復に寄与していることが示唆された。

3-7. IFN- γ 阻害は炎症性マクロファージへの分化を遅延し、肝臓の炎症を減少させた

次に、 α -GalCer 投与マウスにおいて、IFN- γ が炎症性マクロファージ表現型への変化に関与しているか検討した。肝 I/R 障害および α -GalCer の投与を行う 1 時間前に抗 IFN- γ 中和抗体を ip 投与した。フローサイトメトリー解析の結果、抗 IFN- γ 中和抗体の投与は、肝 I/R 後 24 時間および 48 時間における Ly6C^{high} マクロファージの割合を、コントロール IgG 群と比較して減少させたが、Ly6C^{low} マクロファージの割合には変化が見られなかった(図 6A)。これらの結果は、IFN- γ が炎症性マクロファージへの形質転換に関与している可能性が示唆されたが、修復性マクロファージへの分化には影響を与えなかった。抗 IFN- γ 中和抗体の投与は、コントロール IgG の投与と比較して、肝 I/R 後 24 時間の好中球の割合を減少させたが、クッパー細胞の割合は変化しなかった(図 S3)。また、抗 IFN- γ 中和抗体は、肝 I/R 後 48 時間で、血清 ALT 値と壊死面積を減少させ、PCNA⁺肝細胞の数を増加させた(図 6B)。抗 IFN- γ 中和抗体投与群の肝臓では、炎症性マクロファージ関連遺伝子 (*Tnf*, *Nos2*) の発現が、コントロール IgG 投与群と比較して減弱していた。また、抗 IFN- γ 中和抗体投与群では、修復性マクロファージ関連遺伝子 (*Mrc1*, *Retnla*, *Il13*) の発現がコントロール IgG 投与群と比較し増強していた(図 6C)。これらの結果から、IFN- γ は炎症性マクロファージの増加に寄与し、それが肝臓の炎症の増強や肝細胞増殖の抑制に関連していることが示唆された。

3-8. 肝 I/R 障害時のマクロファージにおける CD1d の発現

α -GalCer で活性化された iNKT 細胞が、CD1d を発現しているマクロファージと相互作用しているかどうかを調べた。蛍光免疫染色により、肝 I/R 後 6 時間で CD1d が F4/80⁺細胞(マクロファージ)に発現していることが明らかになった(図 S4A)。さらに、フローサイトメトリー解析により、Ly6C^{high} マクロファージは CD1d に対して強陽性であることが示された(図 S4B)。肝 I/R 後 6 時間後では、Ly6C^{low} マ

クローファージがほとんど存在しなかったため、CD1d の発現は検出されなかった。肝 I/R 後 24 時間および 48 時間では、Ly6C^{high} および Ly6C^{low} マクロファージの両方が CD1d を発現していた。これらの結果は、マクロファージが CD1d の発現源であり、肝 I/R 障害の初期段階において iNKT 細胞と相互作用することを示唆するものであった。

3-9. iNKT 細胞とマクロファージの相互作用

活性化した iNKT 細胞がマクロファージの分化に影響を与えるかどうかを、骨髄由来のマクロファージと肝臓由来の iNKT 細胞の共培養実験系を用いて検討した(図 S5)。まず、培養ウェル内の接着細胞と非接着細胞の特徴を把握した。接着細胞は *Itgam* の増強と *Cd3e* の減弱を示したが、非接着細胞は逆の表現型を示した(図 S5A, B)。この共培養実験系では、接着細胞はマクロファージであり、非接着細胞は iNKT 細胞であることが示唆された。

次に、iNKT 細胞がマクロファージ表現型の変化を促進するかどうかを調べた(図 8)。骨髄由来マクロファージは、 α -GalCer 存在下で炎症性および修復性マクロファージ表現型に関連する mRNA の発現を上昇させなかった。また、 α -GalCer 非存在下で iNKT 細胞と共培養した骨髄由来マクロファージにおいても、炎症性および修復性マクロファージ表現型に関する mRNA の発現を上昇させなかった。一方で、 α -GalCer 存在下で iNKT 細胞と共培養した骨髄由来マクロファージは、炎症性マクロファージ表現型(*Il1b*, *Il6*, *Ifng*)と修復性マクロファージ表現型(*Mrc1*, *Retnla*, *Il4*, *Il13*)に関する遺伝子の発現を増強させた。これらの結果から、 α -GalCer で活性化された iNKT 細胞はマクロファージと相互作用して、マクロファージを炎症性および修復性マクロファージに分化させることが示唆された。さらに、マクロファージにおける CD1d の発現を検討した。*Cd1d1* は骨髄由来マクロファージで発現しており、 α -GalCer 投与のみではこの発現に影響を与えなかった。活性化した iNKT 細胞と共培養したマクロファージで *Cd1d1* の発現は増強したことから、CD1d を介して iNKT 細胞とマクロファージの相互作用がマクロファージの表現型に影響を与えていることが示唆された。

3-10. iNKT 細胞と共培養した骨髄由来マクロファージの表現型に及ぼす IL-4 および IFN- γ 阻害の影響

iNKT 細胞が、骨髄由来マクロファージの表現型を変化させる IL-4 と IFN- γ を産生するかどうかを検討した。iNKT 細胞は、共培養実験系でこれらのサイトカインの mRNA(図 S6A)とタンパク質レベル(図 S6B)を著しく増加させた。

活性化 iNKT 細胞と共培養したマクロファージでは、抗 IL-4 中和抗体を投与すると、炎症性マクロファージ関連遺伝子(*Tnf*, *Il1b*)の発現が増強し、修復性マクロファージ関連遺伝子(*Mrc1*, *Il13*)の発現が減弱した(図 8A)。一方で、抗 IL-4 中和抗体の投与は、*Il6* と *Nos2* の発現を減少させ、*Retnla* と *Il4* の発現は変化しなかった。抗 IL-4 中和抗体は、iNKT 細胞において *Il4* の発現に影響を与えなかったが、*Ifng* の発現を減弱させた(図 8B)。抗 IFN- γ 中和抗体を投与すると、マクロファージの炎症性マクロファージ関連遺伝子(*Il1b*, *Il6*, *Nos2*, *Ifng*)の発現が減弱し、修復性マクロファージ関連遺伝子(*Retnla* および *Il4*)の発現が増強した(図 8A)。また、抗 IFN- γ 中和抗体は、iNKT 細胞の *Il4* の発現を増強させ、*Ifng* の発現を減弱させた(図 8B)。

3-11. Cd1d1^{-/-}マウスは肝 I/R 障害時のマクロファージ分化が遅れ、肝修復が遅延した
最後に、iNKT 細胞が欠損している Cd1d^{-/-}マウスを使用し、iNKT 細胞が肝 I/R 障害後の肝修復に影響を与えているかどうかを検討した。Cd1d^{-/-}マウスでは、WT マウスと比較して肝 I/R 後 48 時間および 72 時間において、血清 ALT 値および肝壊死面積の増加、PCNA⁺肝細胞数の減少によって示されるように、肝修復の遅延を示した(図 9A)。フローサイトメトリー解析の結果、肝 I/R 後 24 時間の Cd1d^{-/-}マウスの Ly6C^{high} マクロファージの割合は WT マウスより多く、肝 I/R 後 48 時間および 72 時間の Cd1d^{-/-}マウスの Ly6C^{low} マクロファージの割合は WT マウスより少ないことが示された(図 9B)。Cd1d^{-/-}マウスの肝臓における炎症性マクロファージ関連遺伝子(*TNF α*、*IL-1 β*、*IL-6*、*iNOS*)の発現は、肝 I/R 後 48 時間において WT マウスの肝臓よりも増強していた。一方で、肝 I/R 障害の修復期における Cd1d^{-/-}マウスの肝臓の修復性マクロファージ関連遺伝子(*MR*、*Fizz1*、*IL-4*、*IL-13*)の発現は、WT マウスの肝臓よりも減弱していた(図 9C)。さらに、Cd1d^{-/-}マウスは WT マウスと比較して、肝 I/R 後 6 時間で *Ifng* の発現の増強と *Il4* の発現の減弱を示した。肝修復における iNKT 細胞の役割をさらに評価するために、Cd1d^{-/-}マウスに α -GalCer またはビークルを投与した。肝 I/R 後 72 時間における血清 ALT 値、肝壊死面積、PCNA⁺肝細胞において、ビークル投与群と α -GalCer 投与群間に統計的な差は認めなかった。また、肝組織の炎症性マクロファージと修復性マクロファージ関連遺伝子の発現も両群間で差を認めなかった(図 S7B)。

4. 考察

急性肝障害後の肝組織修復には、損傷部位へのマクロファージの集積とそれに続くマクロファージの形質転換が必須である。単球由来マクロファージの枯渇は、肝再生に有害である(33)。マクロファージは、急性肝損傷後の壊死領域の改善を促進する(34)。マクロファージの形質転換とは、損傷部位で炎症性マクロファージから修復性マクロファージに移行することを示しているが、この表現型のスイッチングに関与するメカニズムは、依然として不明である(32)。

iNKT 細胞は、急性肝障害に対しては保護的な役割を果たす一方で侵害的な役割を果たすという双方の研究成果がある。本研究では、 α -GalCer による iNKT 細胞の活性化は、早期肝 I/R 障害には影響をすることなく、その後の肝修復を促進することを見いだした。この肝修復は、iNKT 細胞とマクロファージの相互作用によるマクロファージ形質転換の促進によって促された。活性化 iNKT 細胞は、肝 I/R 障害の初期に IL-4 と IFN- γ の両方を産生した。活性化 iNKT 細胞由来の IL-4 は、マクロファージの表現形式を炎症性から修復性へと転換させ、損傷した組織修復を促進した。また活性化 iNKT 細胞由来の IFN- γ は、肝 I/R 障害後の肝臓への炎症性マクロファージの急速な集積に関与していた。

4-1. 肝 I/R 後の α -GalCer による iNKT 細胞とマクロファージ表現形式の変化

α -GalCer は iNKT 細胞を活性化し、IL-4、IL-13、IFN- γ などの様々なサイトカインを迅速に産生することが知られている(35)。我々は、肝 I/R 後 6 時間において、IL-4 や IFN- γ などの iNKT 由来のサイトカインが有意に増加したことから、 α -GalCer により iNKT 細胞が活性化したことを確認した。iNKT 細胞は、NKT1、NKT2、NKT17 の 3 つのタイプが同定されている。NKT1 細胞は、T ヘルパー 1 (TH1) 細胞と類似しており、活性化されると IFN- γ を分泌する。NKT2 細胞は IL-4 や IL-13 などのサイトカインを分泌し、TH2 細胞に類似しており、NKT17 細胞は TH17 細胞に類似している(11)。したがって、我々の結果は、 α -GalCer によって誘導された NKT1 および NKT2 が、肝 I/R 障害および肝修復に関連していることを示している。一方で、 α -GalCer 非存在下において、肝 I/R 障害後 6 時間で iNKT 細胞は IL-4 と IFN- γ を大量に産生しなかった(36)。しかし、Arrenbergら(37)は、雌マウスを用いて 1.5 時間の肝虚血を施行し、肝 I/R 後 6 時間において、iNKT 細胞の 30% に IFN- γ を認めることを示した。これは、使用したマウスや虚血時間などの実験プロトコルの違いに起因するものと思われる。また、iNKT 細胞表面受容体がダウンレギュレートされ、フローサイトメトリーにおいて iNKT 細胞が検出されなくなっていた(38、39)。本研究では、 α -GalCer 投与の有無に関わらず、肝 I/R 障害後、iNKT 細胞数は経時的に減少していた。 α -GalCer 処理マウスにおける TCR β のダウンレギュレーションは、少なくとも再灌流後 48 時間まで続いた。 α -GalCer 投与マウスの iNKT 細胞は、再灌流後 72 時間および 96 時間に再増殖し、これは、肝臓への α -GalCer の投与後 72 時間および 96 時間に iNKT 細胞が再出現することを示す結果と一致した(38)。図 3 に示すように、 α -GalCer 処理マウスの肝臓では、肝 I/R 後 6 時間という早い段階で、炎症性および修復性マクロファージ関連遺伝子の発現が上昇した。この結果は、活性化された iNKT 細胞は、肝 I/R 障害の初期段階において、炎症性および修復性マクロファージの集積を誘導している可能性を示している。したがって、活性化 iNKT 細胞はマクロファージの表現型の分化を促進すると考えられた。この仮説は、 α -GalCer の投与により炎症性マクロファージから修復性マクロファージへの形質転換が早期に誘導されることを示したフローサイトメトリー解析の結果からも

支持される。

4-2. iNKT 細胞由来のサイトカインがマクロファージ表現形式と肝修復に及ぼす効果

本研究では、iNKT 細胞の活性化が、肝 I/R 障害後の肝修復を促進するためにマクロファージの形質転換を促進することを明らかにした。また、iNKT 細胞の非存在下では、マクロファージの形質転換が遅れ、肝修復の遅延と関連することも明らかにした。活性化した iNKT 細胞は再灌流後 6 時間で IL-4 を産生した。抗 IL-4 中和抗体は、肝 I/R 障害時に Ly6C^{high} マクロファージから Ly6C^{low} マクロファージへの形質転換を遷延させ、障害部位における肝細胞増殖と修復を抑制した。iNKT 細胞から産生される IL-4 がマクロファージの形質転換を介し、肝 I/R 障害後の肝修復を促進するかどうかについては、さらなる研究が必要である。

IL-4 阻害は、単球由来マクロファージの修復性マクロファージへの分化を遷延し、肝表面の無菌性熱傷害によって引き起こされる障害肝の修復過程に影響を与える(32)。細菌感染時には、好塩基球由来の IL-4 が Ly6C^{high} 単球由来マクロファージから修復性単球由来マクロファージへの表現型の転換を促進し、それによって肝臓の炎症が軽快し組織の恒常性が回復する(40)。最近の報告では、無菌性局所熱傷害によって誘導される損傷肝組織への iNKT 細胞の集積が組織修復に関与していることが示唆されている(19)。この研究における iNKT 細胞の反応は、損傷部周辺での炎症性から修復性単球への表現型の変化と相関しており、これは iNKT 細胞が産生する IL-4 に依存していた。

IL-4 に加えて、IL-13 は、炎症を改善するための修復性マクロファージの形質転換と肝臓の損傷組織の創傷治癒に関与している(41)。今回の結果は、 α -GalCer 処理によって IL-13 と IL-4 のレベルが上昇することを示しており、IL-13 が肝 I/R 障害後の肝修復に寄与していることを示唆している。しかし、活性化された iNKT 細胞は、IL-4 や IFN- γ よりも少ない IL-13 しか産生しないことから、 α -GalCer 投与マウスの肝 I/R 障害時には、iNKT 細胞以外の細胞が IL-13 産生に関与していることが示唆された。我々は以前、樹状細胞由来の IL-13 が肝 I/R 障害後の肝組織修復を促進することを報告した(42)。iNKT 細胞による肝 I/R 障害後の肝組織修復における IL-13 の役割を明らかにするために、さらなる研究が必要である。

IFN- γ もまた、炎症性マクロファージへの移行に寄与していた。我々のデータは、 α -GalCer によって活性化された iNKT 細胞が、肝 I/R 障害早期に IFN- γ を産生することを示した。また、IFN- γ 阻害により Ly6C^{high} マクロファージの集積が減少することが示され、iNKT 細胞由来の IFN- γ が Ly6C^{high} マクロファージの集積を促進していることが示唆された。In vitro の研究では、IFN- γ 阻害により、活性化 iNKT 細胞との共培養で炎症性マクロファージの数が減少することが示された。これらの結果は、IFN- γ が炎症性マクロファージへの移行を促進することを示唆している。

一方、IFN- γ 阻害により肝損傷と炎症性メディエーターが減少する一方で、肝修復や肝細胞増殖の促進と関連したことから、活性化 iNKT 細胞由来の IFN- γ は肝 I/R 損傷後に炎症を増加させ、肝修復を遷延させることが示唆された。また、Ly6C^{high} マクロファージは、肝 I/R 障害の急性期のイニシエーターの一つであり、肝修復の遅延に寄与している可能性がある(3)。この結果と同様に、IFN- γ の阻害は、マウスの肝 I/R 障害から肝臓を保護する(14)。IFN- γ の上昇は、肝臓の炎症を促進し、肝障害を悪化させ、肝線維化を増加させる(43, 44)。

我々のデータは、 α -GalCer 投与により、活性化 iNKT 細胞から炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインである IFN- γ と IL-4 が同時に産生されることを明らかにした。IFN- γ と IL-4 はともにマクロファージの形質転換に関与しており、マクロファージを IFN- γ または IL-4 で刺激すると、それぞれ炎症性マクロファージまたは修復性マクロファージへの移行が開始される。実際、本研究では、IFN- γ はマクロファージを炎症性マクロファージに、IL-4 は修復性マクロファージに形質転換させた。IFN- γ は肝 I/R 障害を増強するが、 α -GalCer を投与したマウスは肝 I/R 障害後の炎症の消失と肝修復が促進されることが示された。これらの結果は、肝 I/R 障害後の肝修復への IFN- γ の寄与は、IL-4 よりも小さいことを示唆している。この研究では、IFN- γ が肝損傷と炎症に関与していることがわかったが、このモデルにおける炎症と修復における IFN- γ の役割は、さらなる研究が必要である。さらに、IFN- γ の阻害は、Ly6C^{high} マクロファージの蓄積を減少させたが、Ly6C^{low} マクロファージの蓄積は抑制しなかった。肝の *I/R* の発現量は、抗 IFN- γ 抗体投与マウスでも、コントロールの IgG 投与マウスと同様に高いままであった。これらの結果は、IFN- γ が IL-4 を介した修復性マクロファージへの分化に影響を与えないことを示唆している。

本研究では、 α -GalCer による iNKT 細胞の活性化が、肝 I/R 障害後の非障害領域における肝細胞の増殖を促進することが示された。また、 α -GalCer 単独では肝臓の肝細胞増殖に影響を与えないことも明らかにした。しかし、 α -GalCer による iNKT 細胞の活性化は、マウスの部分肝切除後の肝再生を抑制し、それは IFN- γ と IL-4 を介することが示唆されている(20)。これらの矛盾した結果は、実験モデルの違いに起因していると考えられる。肝 I/R 障害では、重度の肝損傷が引き起こされ、その後、好中球、単球、マクロファージなどの炎症性細胞が動員される。一方、肝部分切除術では、肝損傷は軽度で、マクロファージの増殖を伴い、炎症細胞の集積は少ない。

4-3. iNKT 細胞とマクロファージ相互作用の必要性

iNKT 細胞を α -GalCer で刺激すると、マクロファージとの相互作用を介して肝臓の炎症と修復に影響を与える。これと一致して、活性化された iNKT 細胞は、マクロファージの浸潤に影響を与えることによって、マウスの心筋梗塞後の炎症の改善と組織修復を促進する(17)。In vivo の脂肪組織において iNKT 細胞を α -GalCer で刺激すると、IL-10 と IL-4 が産生され、マクロファージが修復性マクロファージに誘導できる(45)。今回の in vitro 研究の結果、 α -GalCer で活性化された iNKT 細胞は、マクロファージを炎症性マクロファージに分化させるだけでなく、IL-4 や IFN- γ の産生を介して修復性マクロファージに分化させることが明らかとなった。これらの結果は、iNKT 細胞とマクロファージの相互作用が、マクロファージの表現型を調節するのに重要であることを示唆している。In vitro の研究では、 α -GalCer 非存在下で iNKT 細胞と共培養したマクロファージでは、炎症性および修復性のマクロファージ関連遺伝子の発現に変化がなかったことから、マクロファージと iNKT 細胞の直接接触のみでは、マクロファージのこれらの遺伝子発現を増強しないことが明らかにされた。一方、iNKT 細胞のソーティングに用いた α -GalCer/CD1d tetramers が iNKT 細胞を部分的に活性化する可能性や、骨髄由来マクロファージに内在する NKT 細胞に対するリガンドが培養中の iNKT 細胞に影響を与える可能性がある(24)。

さらに、in vitro の研究では、IL-4 に対する中和抗体は炎症性マクロファージ関連遺伝子を増強したが、*I16*と*Nos2*を含むいくつかの遺伝子は減弱した。これらの結果は、IL-4 の阻害だけではマクロファージを炎症性の表現型には変換できないこと、あるいは iNKT 細胞から放出される IL-4 以外のサイトカインが共培養系でこれらの遺伝子の発現を減弱する可能性があることを示すものである。我々のデータでは、抗 IL-4 中和抗体が iNKT 細胞の *Ifng* の発現を減弱することが示された。そのメカニズムは不明であるが、iNKT 細胞における *Ifng* の減弱は、*I16* や *Nos2* を含む遺伝子の発現を減弱している可能性がある。IFN- γ に対する中和抗体による処理でも同様の結果が得られ、IFN- γ の阻害はすべての修復性マクロファージ関連遺伝子を増強しないことが示された。さらに、今回の研究では、IFN- γ 抗体が iNKT 細胞における *I14* の mRNA の発現量を増強することが示された。これらの結果は、共培養システムにおいてマクロファージが修復性の表現型に編奇するためには、IL-4 に加え、他の因子が必要であることを示唆している。

4-4. CD1d 欠損マウスにおけるマクロファージ形質転換と肝修復遅延

肝臓では、CD1d は肝類洞内皮細胞、クッパー細胞、肝細胞、および肝星状細胞や樹状細胞などの細胞に発現している(11, 12, 19)。本研究では、蛍光免疫染色解析により、 α -GalCer で処理した肝臓では、CD1d の発現が、少なくとも部分的に、マクロファージと共局在していることが明らかになり、これはフローサイトメトリー分析の結果と一致した。急性無菌性肝障害の初期に iNKT 細胞は障害部位に浸潤しないため(19)、肝 I/R 障害の早期には肝細胞ではなくマクロファージと直接相互作用している可能性が示唆される。さらに、マクロファージにおける CD1d の発現は、in vitro で活性化された iNKT 細胞の存在下で上昇したことから、CD1d を発現するマクロファージが α -GalCer を提示して iNKT 細胞を活性化することが示唆された。つまり、iNKT 細胞は CD1d を発現するマクロファージと相互作用することで、障害部位に集積するマクロファージの極性化に寄与していると考えられる。

興味深いことに、iNKT 細胞が欠損した *Cd1d*^{-/-}マウスでは、マクロファージへの形質転換が遅れ、細胞増殖が低下し、肝修復が遅延していることが明らかになった。これらの結果は、iNKT 細胞が肝 I/R 障害後の肝修復に関与していること、マクロファージの集積は iNKT 細胞の存在とは無関係であることを示唆している。iNKT 細胞以外の細胞からの *Ifng* 発現の増強は、炎症性マクロファージの数を増加させ、修復性マクロファージの数を減少させ、肝修復の遅延をもたらすことが明らかになった。*Cd1d*^{-/-}マウスは NKT 細胞を欠損しており、その中には Type I NKT (iNKT 細胞)と Type II NKT (variant NKT 細胞)が含まれている(46)。 α -GalCer を認識する Type I NKT 細胞は invariant T 細胞受容体(TCR)を発現しているが、Type II NKT 細胞は variant TCR を発現している。この結果は、Type I NKT 細胞が肝 I/R 障害後の肝修復に関与していることを示すものである。しかし、*Cd1d*^{-/-}マウスの結果は、Type II NKT 細胞の関与を否定するものではない。以前、スルファチドによる Type II NKT 細胞の活性化は、マウスの Type I NKT 細胞からの IFN- γ 産生を減少させることにより、肝 I/R 障害を減弱させることが示された(37)。したがって、肝 I/R 障害後の肝修復における Type II NKT 細胞の関与を評価するために、さらなる研究が必要である。

5. 総括

結論として、我々のデータは、 α -GalCerによって活性化された iNKT 細胞が IL-4 を産生し、マクロファージの表現型のスイッチングを促進し、その結果、肝 I/R 障害後の肝組織修復を促進することを示した。また、活性化 iNKT 細胞由来の IFN- γ は、炎症性マクロファージへの極性化と、その後の修復性マクロファージへの形質転換を促進したが、 α -GalCer 投与マウスの肝 I/R 障害誘発には限られた役割しか示さなかった。これらの結果は、iNKT 細胞とマクロファージとの相互作用が、肝 I/R 障害の程度と期間を決定し、次いで肝修復を決定することを示唆している。したがって、iNKT 細胞を活性化することは、肝 I/R 障害後の肝組織修復のための治療手段となり、肝臓手術の予後を改善する可能性がある。

6. 謝辞

本論文の作成にあたり、終始適切な助言と丁寧な指導を下された天野英樹教授、岩淵和也教授、比企直樹教授、内藤剛教授に深く感謝します。また、調査・分析・試料作成にあたり、薬理学研究室の伊藤義也先生や、免疫学研究室の江島耕二先生、佐藤雅先生には細部に渡る指導を頂きました。西澤伸恭先生、中本修司先生をはじめ、研究室のメンバーには常に刺激的な議論を頂き、精神的にも支えられました。本当にありがとうございました。

7. 引用文献

1. Bagante F, Ruzzenente A, Beal EW, Campagnaro T, Merath K, Conci S, et al. Complications After Liver Surgery: A Benchmark Analysis. *HPB (Oxford)* (2019) 21:1139–49.
2. Krenkel O, Tacke F. Liver Macrophages in Tissue Homeostasis and Disease. *Nat Rev Immunol* (2017) 17:306–21.
3. Nishizawa N, Ito Y, Eshima K, Ohkubo H, Kojo K, Inoue T, et al. Inhibition of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Facilitates Liver Repair After Hepatic Injury in Mice. *J Hepatol* (2018) 69:110–20.
4. Wen Y, Lambrecht J, Ju C, Tacke F. Hepatic Macrophages in Liver Homeostasis and Diseases-Diversity, Plasticity and Therapeutic Opportunities. *Cell Mol Immunol* (2021) 18:45–56.
5. Ye L, He S, Mao X, Zhang Y, Cai Y, Li S. Effect of Hepatic Macrophage Polarization and Apoptosis on Liver Ischemia and Reperfusion Injury During Liver Transplantation. *Front Immunol* (2020) 11:1193.
6. Ni M, Zhang J, Sosa R, Zhang H, Wang H, Jin D, et al. TIM-4 is Critical for KC Homeostatic Function in the Activation and Resolution of Liver Ischemia Reperfusion Injury. *Hepatology* (2021) 74:2118–32.
7. Salio M, Silk JD, Jones EY, Cerundolo V. Biology of CD1⁻ and MR1-Restricted T

- Cells. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:323–66.
8. Van Kaer L. NKT Cells: T Lymphocytes With Innate Effector Functions. *Curr Opin Immunol* (2007) 19:354–64.
 9. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of Valpha14 NKT Cells by Glycosylceramides. *Science* (1997) 278:1626–9.
 10. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-Restricted iNKT Cells, the ‘Swiss-Army Knife’ of the Immune System. *Curr Opin Immunol* (2008) 20:358–68.
 11. Crosby CM, Kronenberg M. Tissue-Specific Functions of Invariant Natural Killer T Cells. *Nat Rev Immunol* (2018) 18:559–74.
 12. Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, Manlongat N, Kronenberg M, Briskin MJ, et al. Intravascular Immune Surveillance by CXCR6⁺ NKT Cells Patrolling Liver Sinusoids. *PLoS Biol* (2005) 3:e113.
 13. Lisbonne M, L’Helgoualc’h A, Nauwelaers G, Turlin B, Lucas C, Herbelin A, et al. Invariant Natural Killer T-Cell-Deficient Mice Display Increased CCl₄-Induced Hepatitis Associated With CXCL1 Over-Expression and Neutrophil Infiltration. *Eur J Immunol* (2011) 41:1720–32.
 14. Lappas CM, Day YJ, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2a Receptor Activation Reduces Hepatic Ischemia Reperfusion Injury by Inhibiting CD1d-Dependent NKT Cell Activation. *J Exp Med* (2006) 203:2639–48.
 15. Cao Z, Yuan Y, Jeyabalan G, Du Q, Tsung A, Geller DA, et al. Preactivation of NKT Cells With Alpha-GalCer Protects Against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse by a Mechanism Involving IL-13 and Adenosine A2a Receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2009) 297:G249–58.
 16. Tanno H, Kawakami K, Ritsu M, Kanno E, Suzuki A, Kamimatsuno R, et al. Contribution of Invariant Natural Killer T Cells to Skin Wound Healing. *Am J Pathol* (2015) 185:3248–57.
 17. Sobirin MA, Kinugawa S, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, et al. Activation of Natural Killer T Cells Ameliorates Postinfarct Cardiac Remodeling and Failure in Mice. *Circ Res* (2012) 111:1037–47.
 18. Homma T, Kinugawa S, Takahashi M, Sobirin MA, Saito A, Fukushima A, et al. Activation of Invariant Natural Killer T Cells by α -Galactosylceramide Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *J Mol Cell Cardiol* (2013) 62:179–88.
 19. Liew PX, Lee WY, Kubes P. iNKT Cells Orchestrate a Switch From Inflammation to Resolution of Sterile Liver Injury. *Immunity* (2017) 47:752–65.e5.
 20. Yin S, Wang H, Bertola A, Feng D, Xu MJ, Wang Y, et al. Activation of Invariant Natural Killer T Cells Impedes Liver Regeneration by Way of Both IFN- γ and IL-4-Dependent

- Mechanisms. *Hepatology* (2014) 60:1356–66.
21. Ferhat MH, Robin A, Barbier L, Thierry A, Gombert JM, Barbarin A, et al. The Impact of Invariant NKT Cells in Sterile Inflammation: The Possible Contribution of the Alarmin/Cytokine IL-33. *Front Immunol* (2018) 9:2308.
 22. Cortesi F, Delfanti G, Casorati G, Dellabona P. The Pathophysiological Relevance of the iNKT Cell/Mononuclear Phagocyte Crosstalk in Tissues. *Front Immunol* (2018) 9:2375.
 23. Mendiratta SK, Martin WD, Hong S, Boesteanu A, Joyce S, Van Kaer L. CD1d1 Mutant Mice are Deficient in Natural T Cells That Promptly Produce IL-4. *Immunity* (1997) 6:469–77.
 24. Satoh M, Hoshino M, Fujita K, Iizuka M, Fujii S, Clingan CS, et al. Adipocyte-Specific CD1d-Deficiency Mitigates Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice. *Sci Rep* (2016) 6:28473.
 25. Satoh M, Namba KI, Kitaichi N, Endo N, Kitamei H, Iwata D, et al. Invariant Natural Killer T Cells Play Dual Roles in the Development of Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *Exp Eye Res* (2016) 153:79–89.
 26. Mishra PK, Patel N, Wu W, Bleich D, Gause WC. Prevention of Type 1 Diabetes Through Infection With an Intestinal Nematode Parasite Requires IL-10 in the Absence of a Th2-Type Response. *Mucosal Immunol* (2013) 6:297–308.
 27. Simons DM, Oh S, Kropf E, Aitken M, Garcia V, Basehoar A, et al. Autoreactive Th1 Cells Activate Monocytes to Support Regional Th17 Responses in Inflammatory Arthritis. *J Immunol* (2013) 190:3134–41.
 28. Nakamoto S, Ito Y, Nishizawa N, Goto T, Kojo K, Kumamoto Y, et al. Lymphangiogenesis and Accumulation of Reparative Macrophages Contribute to Liver Repair After Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *Angiogenesis* (2020) 23:395–410.
 29. Maeda M, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Minami K, Nakamaru Y, Takagi D, et al. IL-21 Enhances Dendritic Cell Ability to Induce Interferon-Gamma Production by Natural Killer T Cells. *Immunobiology* (2007) 212:537–47.
 30. Wang W, Huang MC, Goetzl EJ. Type 1 Sphingosine 1-Phosphate G Protein-Coupled Receptor (S1P1) Mediation of Enhanced IL-4 Generation by CD4 T Cells From S1P1 Transgenic Mice. *J Immunol* (2007) 178:4885–90.
 31. Terrazas LI, Montero D, Terrazas CA, Reyes JL, Rodríguez-Sosa M. Role of the Programmed Death-1 Pathway in the Suppressive Activity of Alternatively Activated Macrophages in Experimental Cysticercosis. *Int J Parasitol* (2005) 35:1349–58.
 32. Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, Kolaczowska E, Wong CH, Petri B, et al. A Dynamic Spectrum of Monocytes Arising From the *in Situ* Reprogramming of CCR2⁺ Monocytes at a Site of Sterile Injury. *J Exp Med* (2015) 212:447–56.
 33. Holt MP, Cheng L, Ju C. Identification and Characterization of Infiltrating Macrophages

- in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *J Leukoc Biol* (2008) 84:1410–21.
34. Starkey Lewis P, Campana L, Aleksieva N, Cartwright JA, Mackinnon A, O'Duibhir E, et al. Alternatively Activated Macrophages Promote Resolution of Necrosis Following Acute Liver Injury. *J Hepatol* (2020) 73:349–60.
 35. Van Kaer L. Lalpha-Galactosylceramide Therapy for Autoimmune Diseases: Prospects and Obstacles. *Nat Rev Immunol* (2005) 5:31–42.
 36. Cao Z, Yuan Y, Jeyabalan G, Du Q, Tsung A, Geller DA, et al. Preactivation of NKT Cells With Alpha-GalCer Protects Against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse by a Mechanism Involving IL-13 and Adenosine A2A Receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2009) 297:G249–58.
 37. Arrenberg P, Maricic I, Kumar V. Sulfatide-Mediated Activation of Type II Natural Killer T Cells Prevents Hepatic Ischemic Reperfusion Injury in Mice. *Gastroenterology* (2011) 140:646–55.
 38. Crowe NY, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Hammond KJ, Hayakawa Y, Sidobre S, et al. Glycolipid Antigen Drives Rapid Expansion and Sustained Cytokine Production by NK T Cells. *J Immunol* (2003) 171:4020–7.
 39. Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagómez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR, et al. The Response of Natural Killer T Cells to Glycolipid Antigens is Characterized by Surface Receptor Down-Modulation and Expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100:10913–8.
 40. Blériot C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disson O, Lecuit M. Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair During Bacterial Infection. *Immunity* (2015) 42:145–58.
 41. Noll J, Helk E, Fehling H, Bernin H, Marggraff C, Jacobs T, et al. IL-23 Prevents IL-13-Dependent Tissue Repair Associated With Ly6C(lo) Monocytes in *Entamoeba Histolytica*-Induced Liver Damage. *J Hepatol* (2016) 64:1147–57.
 42. Nakamoto S, Ito Y, Nishizawa N, Goto T, Kojo K, Kumamoto Y, et al. EP3 Signaling in Dendritic Cells Promotes Liver Repair by Inducing IL-13-Mediated Macrophage Differentiation in Mice. *FASEB J* (2020) 34:5610–27.
 43. Knight B, Lim R, Yeoh GC, Olynyk JK. Interferon-Gamma Exacerbates Liver Damage, the Hepatic Progenitor Cell Response and Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Liver Injury. *J Hepatol* (2007) 47:826–33.
 44. Park O, Jeong WI, Wang L, Wang H, Lian ZX, Gershwin ME, et al. Diverse Roles of Invariant Natural Killer T Cells in Liver Injury and Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride. *Hepatology* (2009) 49:1683–94.
 45. Ji Y, Sun S, Xu A, Bhargava P, Yang L, Lam KS, et al. Activation of Natural Killer T Cells Promotes M2 Macrophage Polarization in Adipose Tissue and Improves Systemic Glucose

Tolerance *via* Interleukin-4 (IL-4)/STAT6 Protein Signaling Axis in Obesity. *J Biol Chem* (2012) 287:13561–71.

46. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT Cells: What's in a Name? *Nat Rev Immunol* (2004) 4:231–7.

8. 業績目録

(1) 著書

1. 後藤卓也, 山梨高広: (右側結腸切除)縫合不全回避の ABC. 合併症回避の ABC, 白石憲男, 上田貴威, p.211-22, メジカルビュー社, 東京, 2022

(2) 原著

1. Goto T, Ito Y, Satoh M, Nakamoto S, Nishizawa N, Hosono K, et al. Activation of iNKT Cells Facilitates Liver Repair After Hepatic Ischemia Reperfusion Injury Through Acceleration of Macrophage Polarization. *Front Immunol.* 2021 Oct 6;12:754106.
2. Goto T, Ito Y, Nishizawa N, Kuroda YU, Nakamoto S, Hosono K, et al. Expansion of iNKT Cells Promotes Liver Repair Following Hepatic Ischemia Reperfusion Injury. *In Vivo.* 2022 Nov-Dec;36(6):2604-2614.
3. Nakamoto S, Ito Y, Nishizawa N, Goto T, Kojo K, Kumamoto Y, et al. EP3 signaling in dendritic cells promotes liver repair by inducing IL-13-mediated macrophage differentiation in mice. *FASEB J.* 2020 Apr;34(4):5610-5627.
4. Nakamoto S, Ito Y, Nishizawa N, Goto T, Kojo K, Kumamoto Y, et al. Lymphangiogenesis and accumulation of reparative macrophages contribute to liver repair after hepatic ischemia-reperfusion injury. *Angiogenesis.* 2020 Aug;23(3):395-410.
5. Otaka F, Ito Y, Goto T, Kojo K, Tanabe M, Hosono K, et al. Recovery of Liver Sinusoidal Endothelial Cells Following Monocrotaline-induced Liver Injury. *In Vivo.* 2021 Sep-Oct;35(5):2577-2587
6. Otaka F, Ito Y, Goto T, Eshima K, Amano H, Koizumi W, et al. Platelets prevent the development of monocrotaline-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett.* 2020 Dec 15;335:71-81.
7. Yamanashi T, Miura H, Tanaka T, Watanabe A, Goto T, Yokoi K, et al. Short- and long-term outcomes of robotic-assisted laparoscopic surgery for rectal cancer: A single-center retrospective cohort study. *Asian J Endosc Surg.* 2022 Oct;15(4):794-804.
8. Yamanashi T, Miura H, Tanaka T, Watanabe A, Goto T, Yokoi K, et al. Comparison of short-term outcomes of robotic-assisted and conventional laparoscopic surgery for rectal cancer: A propensity score-matched analysis. *Asian J Endosc Surg.* 2022 Oct;15(4):753-764.
9. 後藤 卓也, 中村 隆俊, 添野 孝文, 石井 智. Mesodiverticular band を伴う Meckel 憩室による絞扼性腸閉塞の 1 例. *日腹部救急医学会誌.* 2019 39(6) : 1091~1093.

9. 図表

表 1 RT-PCR のプライマー配列一覧

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>Tnf</i>	TCTTCTCATTCCCTGCTTGTGG	GATCTGAGTGTGAGGGTCTGG
<i>Il1b</i>	TACATCAGCACCTCACAAGCA	CCAGCCCATACTTTAGGAAGA
<i>Il6</i>	CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG	TAGGAGAGCATTGGAAATTGG
<i>Nos2</i>	AAAACCCCTTGTGCTGTTCTC	CTGGAACATTCTGTGCTGTCC
<i>Ifng</i>	ATCTGGAGGAACTGGCAAAG	CGGAACCAAATGAGATCAGAA
<i>Mrc1</i>	TTTGTCCATTGCACTTTGAGG	TGCCAGGTAAAGCAGACTTG
<i>Retnla</i>	TGCCAATCCAGCTAACTATCC	CACACCCAGTAGCAGTCATCC
<i>Il4</i>	GAACGAGGTCACAGGAGAAGG	CTTGAAGCCCTACAGACGAG
<i>Il13</i>	CAGCATGGTATGGAGTGTGG	TGGGCTACTTCGATTTTGGT
<i>Cd1d1</i>	ACTCAGCCACCATCAGCTTC	AGGGTACATTTACAGCCCG
<i>Itgam</i>	ACTGGAGCAAGAATAGGAAGG	ATAGTCTGGGTTGGGAACAGG
<i>Cd3e</i>	TCCTGCGCCTCAATTATACAC	CTGAGCATCCATAGCCAGAAC
<i>Gapdh</i>	ACATCAAGAAGGTGGTGAAGC	AAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG

図 1

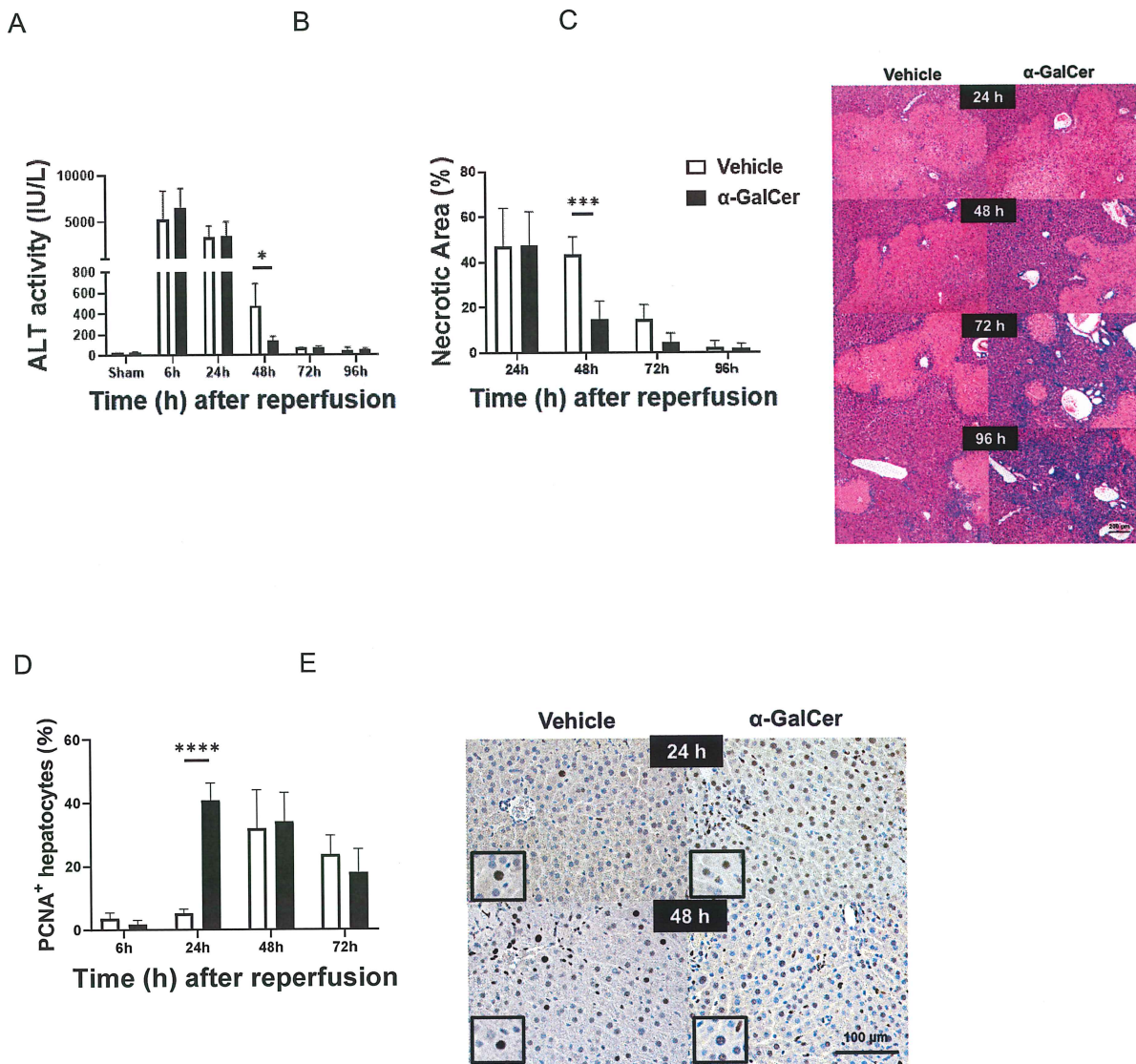


図 1 iNKT 細胞の活性化は、肝虚血再灌流障害後の肝修復を促進する

A. B. 肝虚血再灌流障害後のビークルまたは α -GalCer 投与群の血清 ALT 値(A)、壊死面積(B)の経時的变化を示す。

C. 肝 I/R 後 24、48、72、96 時間の代表的な HE 染色を示す。

D. E. 肝 I/R 後 24、48、72 時間の PCNA 陽性肝細胞の経時的变化(D)と、肝 I/R 後 24、48 時間における代表的な PCNA 染色を示す(E)。大きく丸い細胞は肝細胞とみなし、典型的な肝細胞を左下隅に示した。

図 2

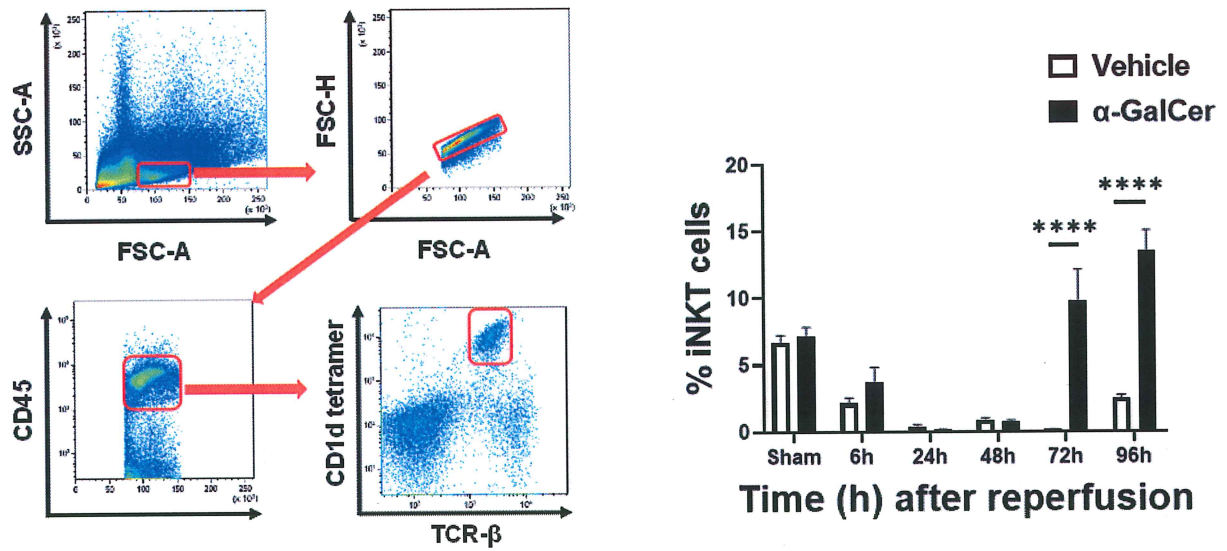


図 2 肝虚血再灌流障害後の iNKT 細胞の経時的変化

A. フローサイトメトリー解析を用いて、肝虚血再灌流障害後のビークルまたは α -GalCer 投与群における iNKT 細胞 (TCR β^+ /CD1d tetramer $^+$ 細胞) の経時的変化を示す。

図 3

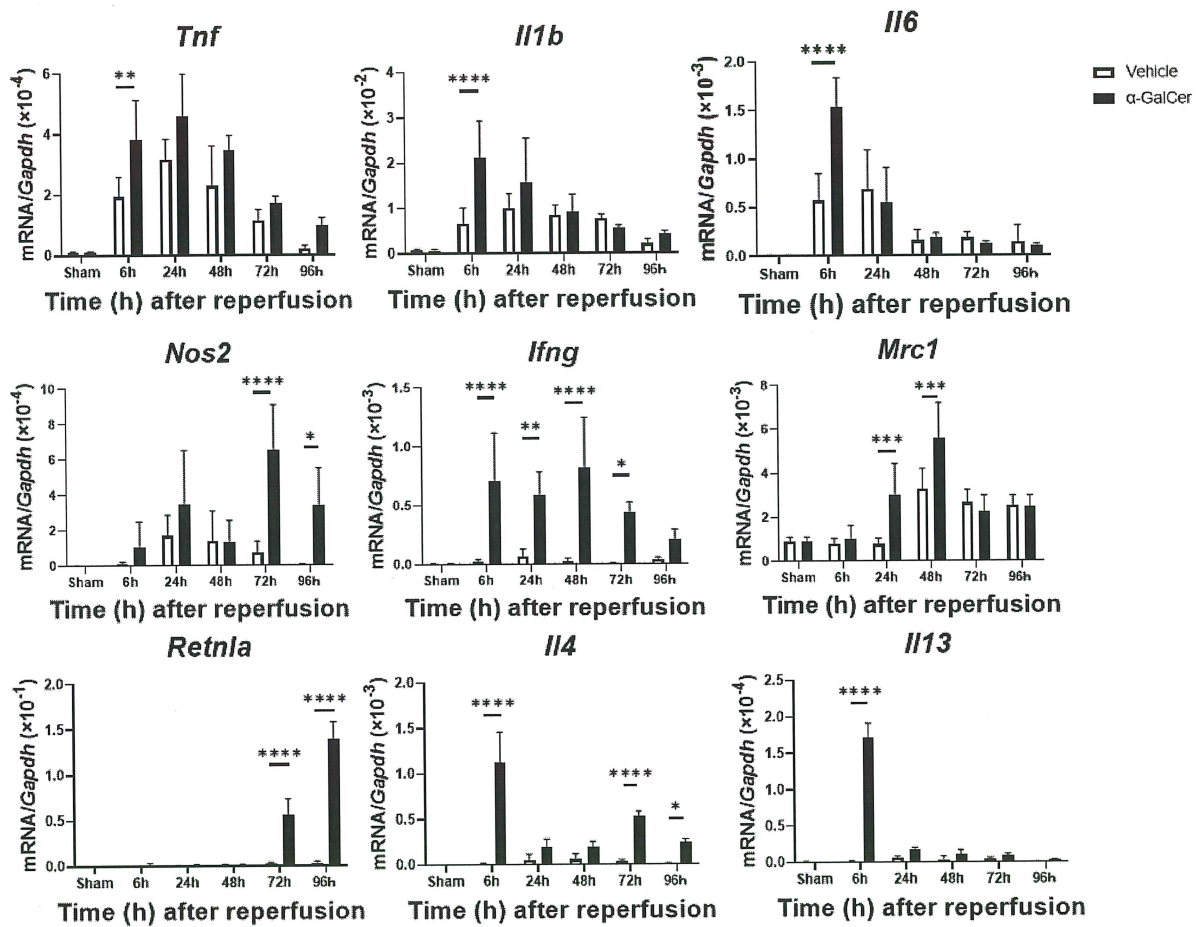


図 3. 肝虚血再灌流障害後の炎症性および修復性マクロファージ関連遺伝子の発現
 ビークルまたは α -GalCer 投与群における炎症性マクロファージに関連する遺伝子 (*Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Nos2*, *Ifng*) および修復性マクロファージに関連する遺伝子 (*Mrc1*, *Retnla*, *Il4*, *Il13*) の mRNA 発現を示す。

図 4

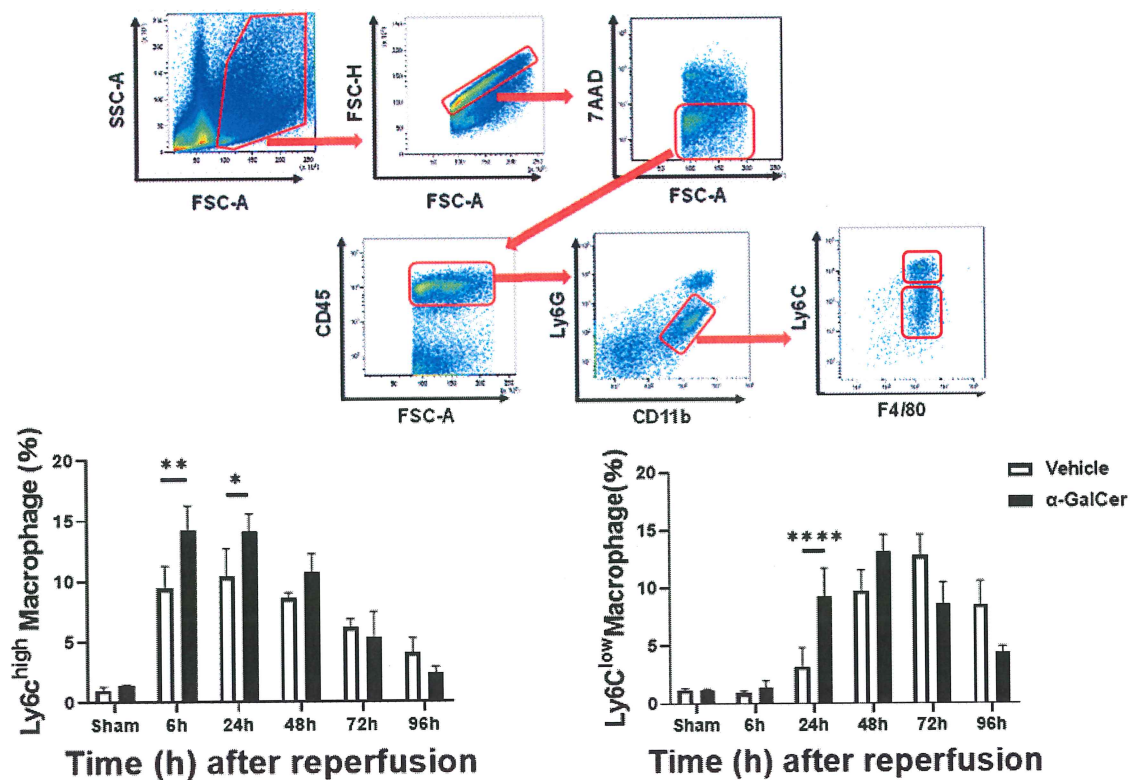


図 4. 集積マクロファージの経時的変化

肝組織に集積したマクロファージのサブタイプを同定するために使用したフローサイトメトリーゲーティングの方法を示す。好中球を示す Ly6G⁺/CD11b⁺細胞を除外した後、Ly6C と F4/80 の発現に基づいて 2 つのサブセットに分離した。Ly6G⁻/Ly6C^{high}/CD11b^{high}/F4/80^{high} 細胞は Ly6C^{high} マクロファージ (炎症性マクロファージ)、Ly6G⁻/Ly6C^{low}/CD11b^{high}/F4/80^{high} 細胞は Ly6C^{low} マクロファージ (再生性マクロファージ) として定義した。肝虚血再灌流障害後のビークルまたは α -GalCer 投与群の Ly6C^{high} マクロファージ (Ly6G⁻/Ly6C^{high}/CD11b^{high}/F4/80^{high} 細胞) および Ly6C^{low} マクロファージ (Ly6G⁻/Ly6C^{low}/CD11b^{high}/F4/80^{high}) の割合の変化を示す。

図 5

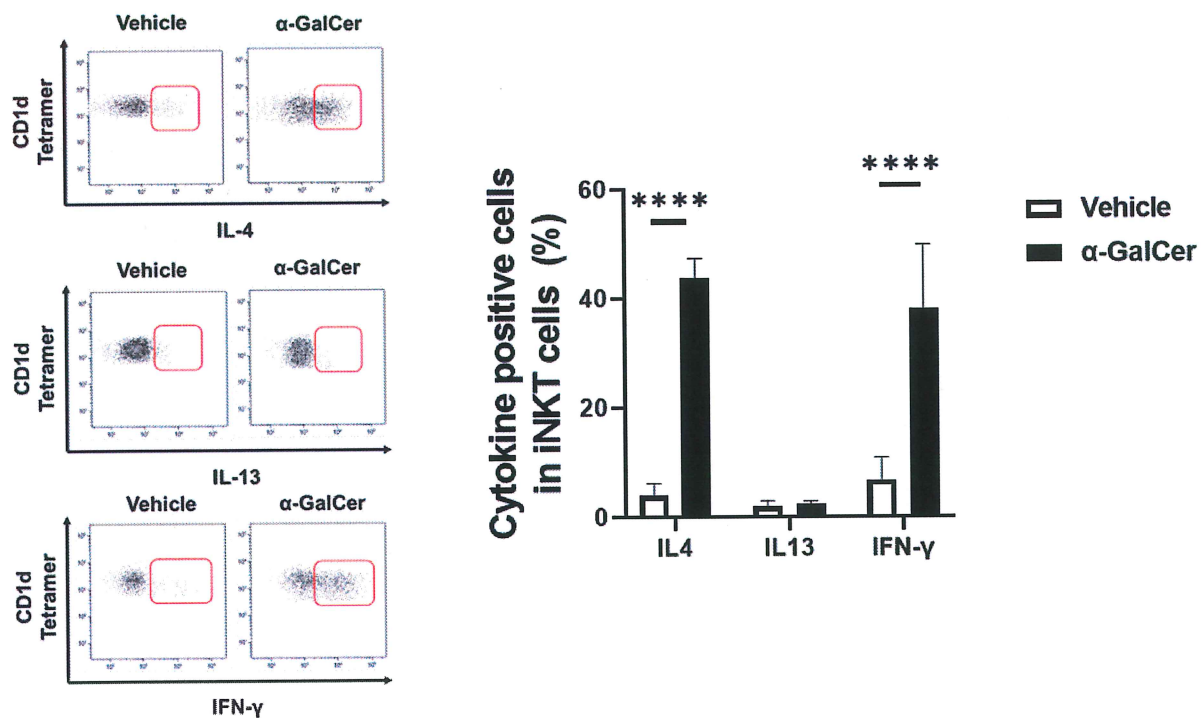
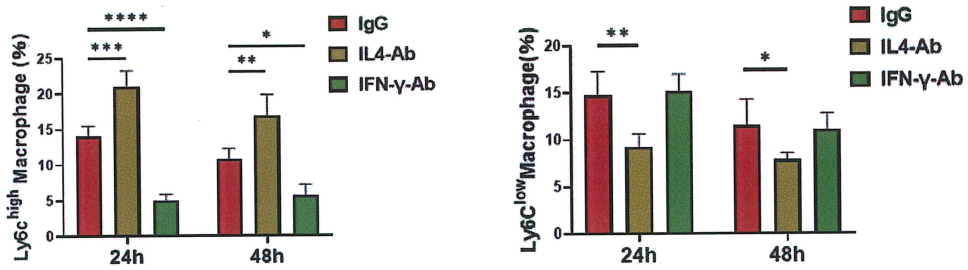


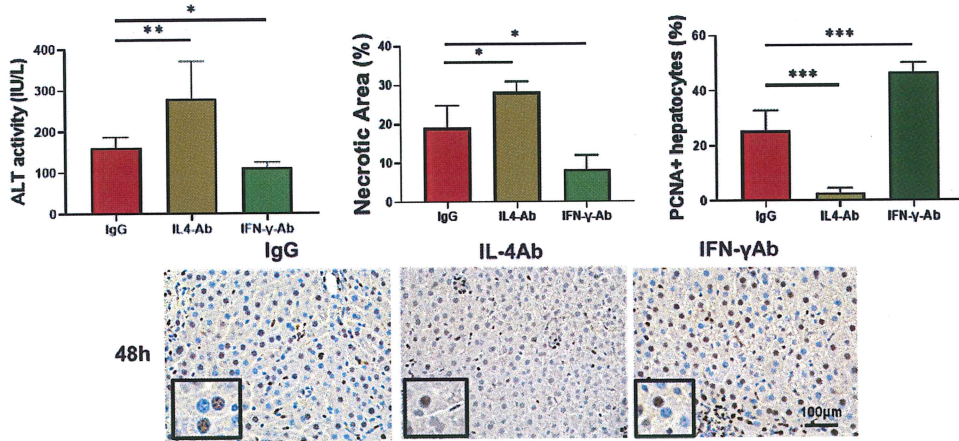
図 5. 肝虚血再灌流障害後の iNKT 細胞からのサイトカイン産生
 肝 I/R 障害後 6 時間の iNKT 細胞における代表的なドットプロットを示す(左図)。ビークルまたは α -GalCer 投与群の iNKT 細胞における IL-4、IL-13、および IFN- γ 陽性細胞の割合(右図)を示す。

6

A



B



C

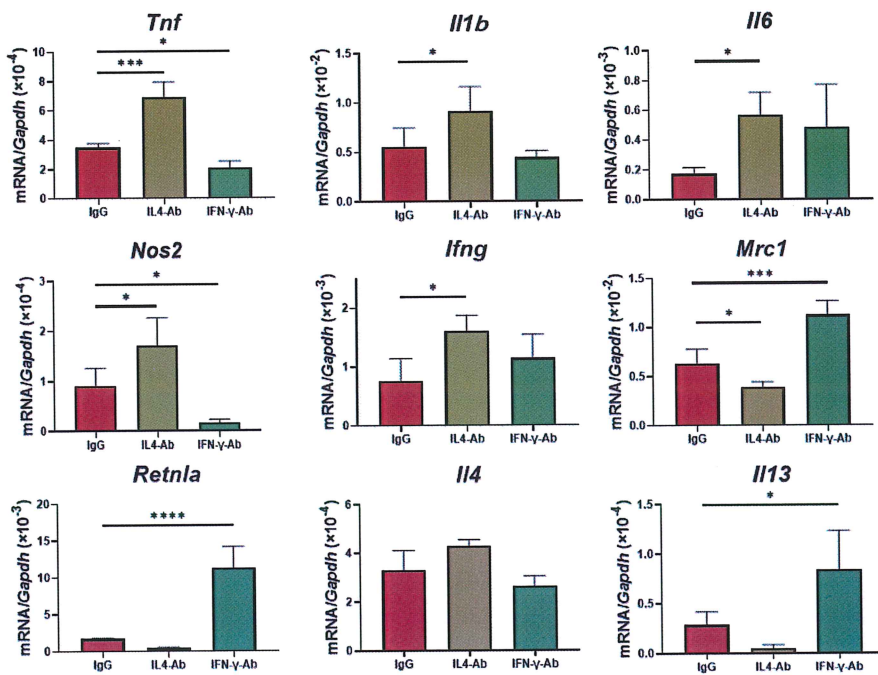


図 6. IL-4 または IFN- γ の阻害は、肝虚血再灌流障害後のマクロファージ表現型の変化を抑制し、肝臓の炎症および修復に影響を与える

A. 抗 IL-4 中和抗体、抗 IFN- γ 中和抗体、または IgG 投与群における Ly6C^{high} マクロファージ (Ly6G⁺/Ly6C^{high}/CD11b^{high}/F4/80^{high} 細胞) および Ly6C^{low} マクロファージ (Ly6G⁺/Ly6C^{low}/CD11b^{high}/F4/80^{high} 細胞) の比率を示す。

B. 抗 IL-4 中和抗体、抗 IFN- γ 中和抗体、または IgG 投与群の血清 ALT 値、肝壊死面積、PCNA+ 肝細胞の割合を示す。抗 IL-4 中和抗体、抗 IFN- γ 中和抗体、または IgG 投与群における代表的な PCNA 染色を示す。大きく丸みを帯びた細胞は肝細胞とみなされ、典型的な標識肝細胞は左下隅に示した。

C. 抗 IL-4 中和抗体、抗 IFN- γ 中和抗体、または IgG 投与群における肝虚血再灌流障害後の炎症性マクロファージ (*Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Nos2*, *Ifng*) および修復性マクロファージ (*Mrc1*, *Retnla*, *Il4*, *Il13*) 関連遺伝子の発現量を示す。

図 7

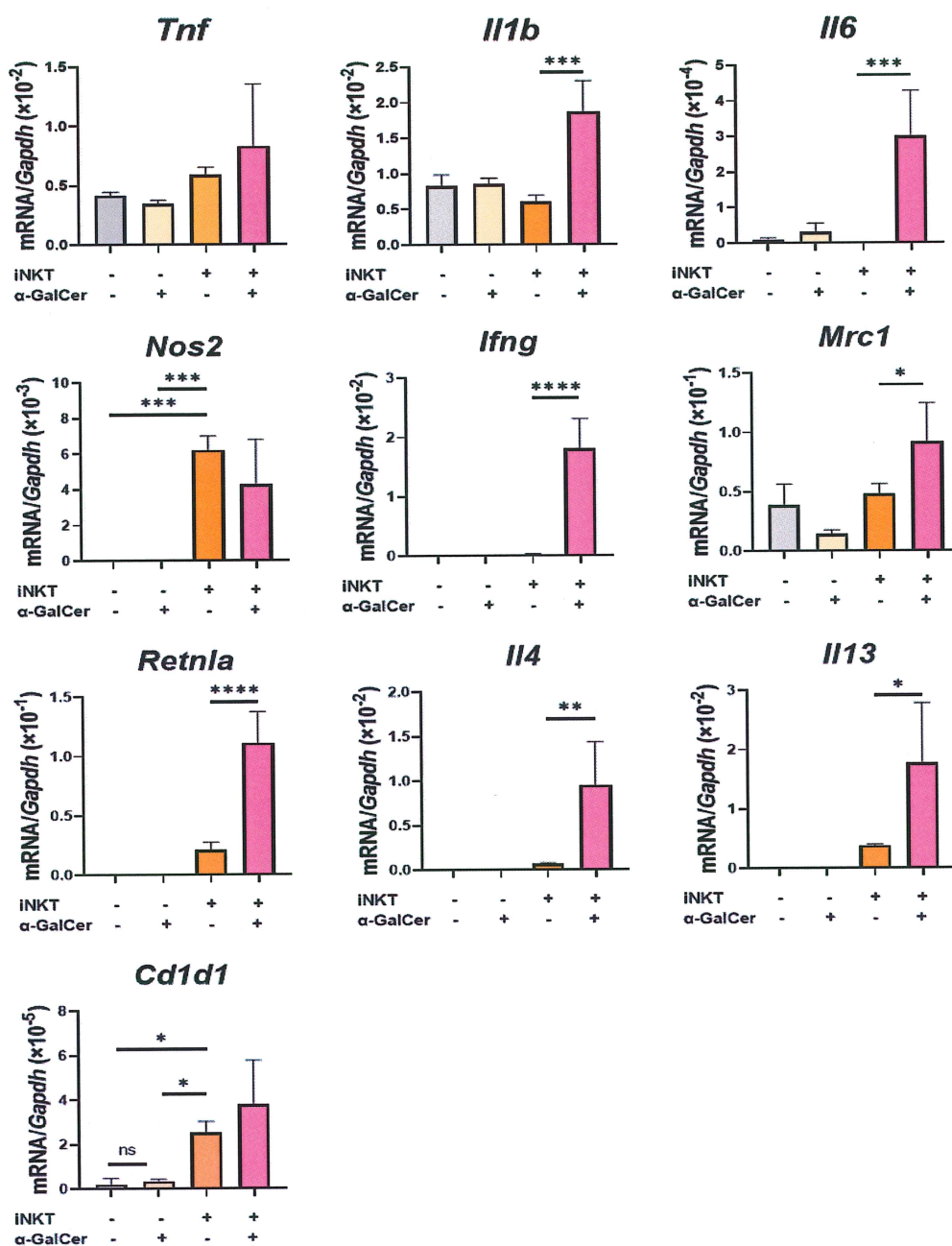
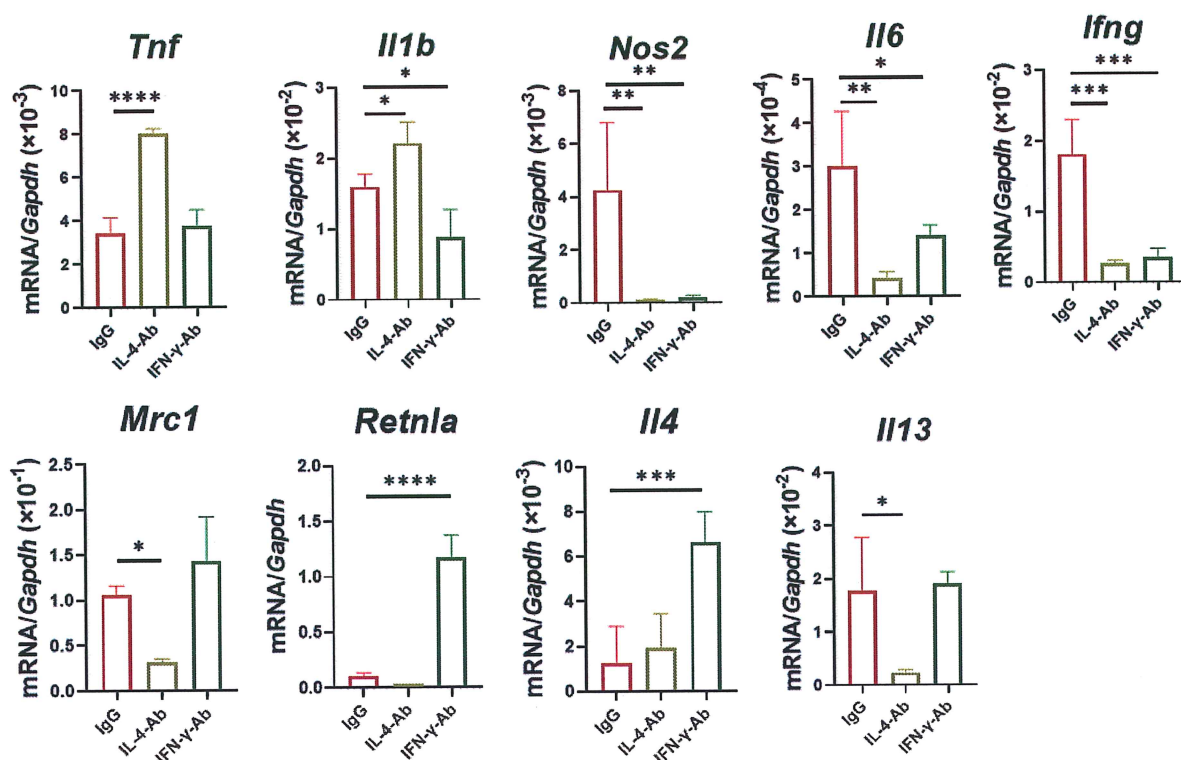


図 7. 活性化 iNKT 細胞は、骨髄由来マクロファージを炎症性および修復性マクロファージへと分化させた

iNKT 細胞と共培養した骨髄由来マクロファージにおける炎症性マクロファージ関連遺伝子 (*Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Nos2*, *Ifng*)、修復性マクロファージ関連遺伝子 (*Mrc1*, *Retnla*, *Il4*, *Il13*)、および *Cd1d1* の mRNA の発現量を示した。骨髄由来マクロファージ単独、 α GalCer 存在下、iNKT 細胞存在下、iNKT 細胞および α -GalCer 存在下で 72 時間培養した。

図 8

A



B

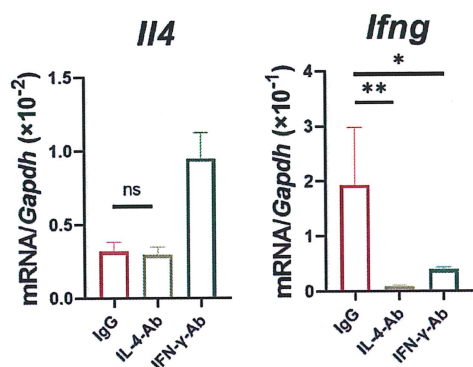


図 8. マクロファージ形質転換と iNKT 細胞からのサイトカイン産生に対する IL-4 または IFN- γ の阻害効果

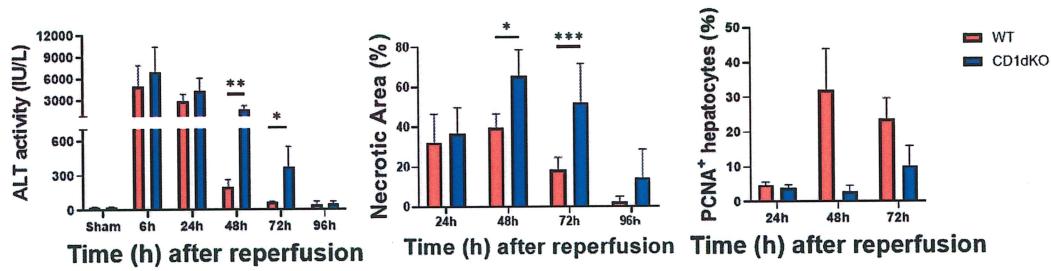
α -GalCer 存在下に iNKT 細胞と骨髄由来マクロファージを共培養し、さらに抗 IL-4 中和抗体、抗 IFN- γ 中和抗体または IgG を追加投与し、72 時間インキュベートした。

A. 骨髄由来マクロファージにおける炎症性マクロファージ関連遺伝子 (*Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Nos2*, *Ifng*) および修復性マクロファージ関連遺伝子 (*Mrc1*, *Retnla*, *Il4*, *Il13*) の mRNA の発現量を示す。

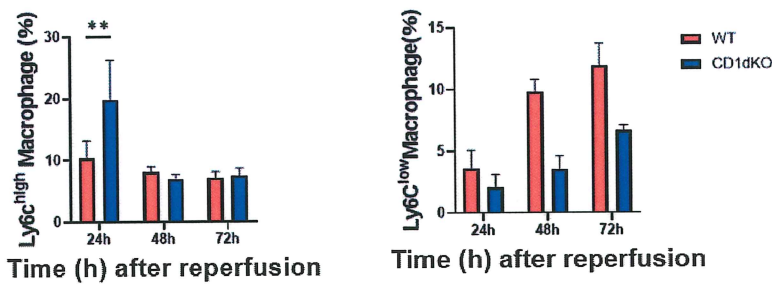
B. iNKT 細胞における *Il4* と *Ifng* の mRNA の発現量を示す。

9

A



B



C

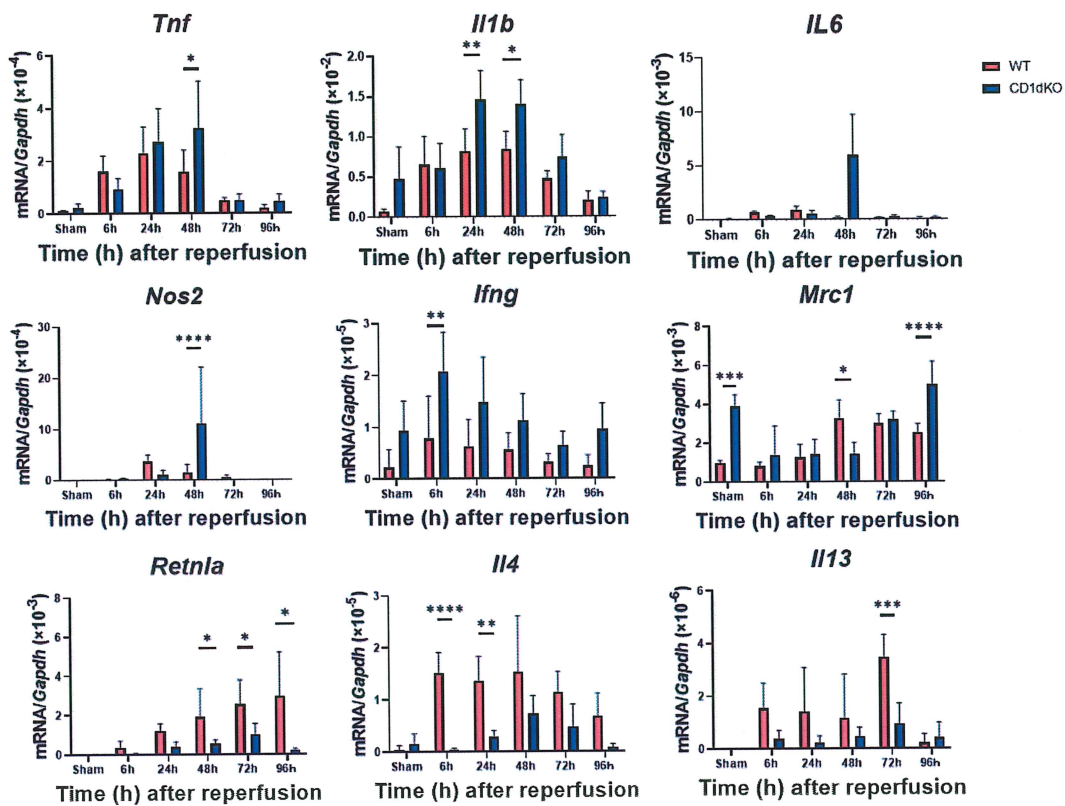


図 9. Cd1d^{-/-}マウスでは肝 I/R 障害時の肝修復とマクロファージ分化の遅延を示した。

A. 血清 ALT 値、肝壊死面積、PCNA⁺肝細胞(%)を示す。

B. Ly6Chigh マクロファージ(Ly6G⁻/Ly6C^{high}/CD11b^{high}/F4/80^{high} 細胞)および Ly6Clow マクロファージ(Ly6G⁻/Ly6C^{low}/CD11b^{high}/F4/80^{high} 細胞)の割合を示す。

C. WT および Cd1d^{-/-}マウスの肝 I/R 損傷後の炎症性マクロファージ関連遺伝子(*Tnf*、*Il1b*、*Il6*、*Nos2*、*Ifng*)および修復性マクロファージ関連遺伝子(*Mrc1*、*Retnla*、*Il4*、*Il13*)の発現を示す。

図 S1

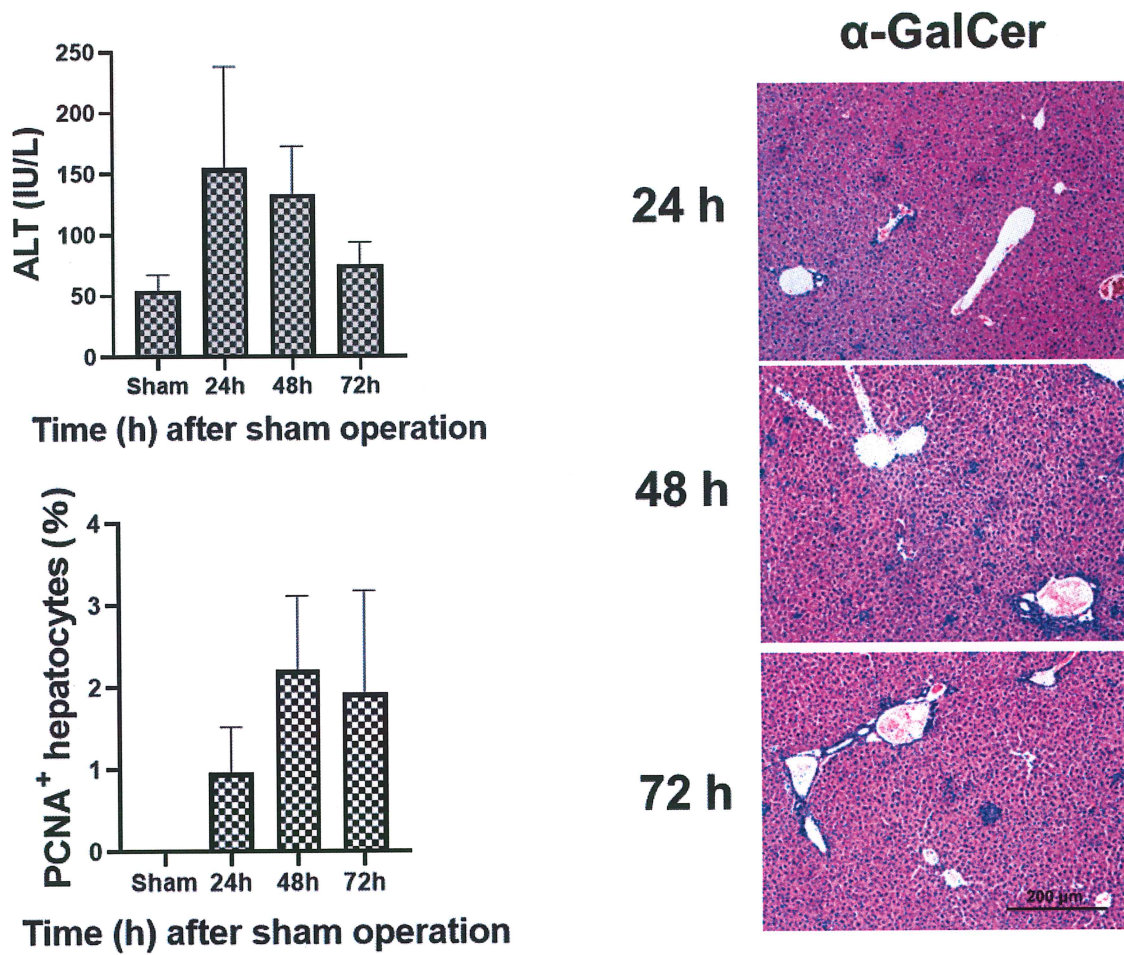
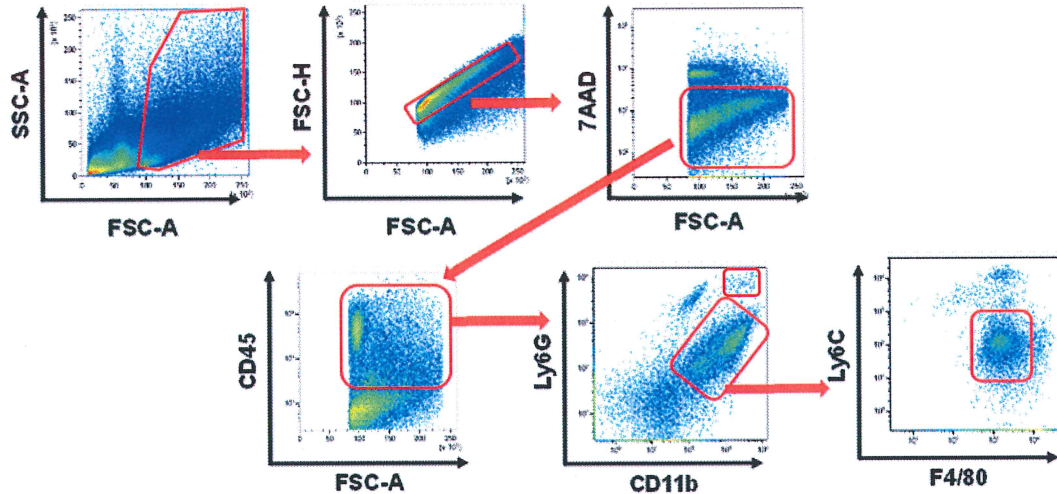


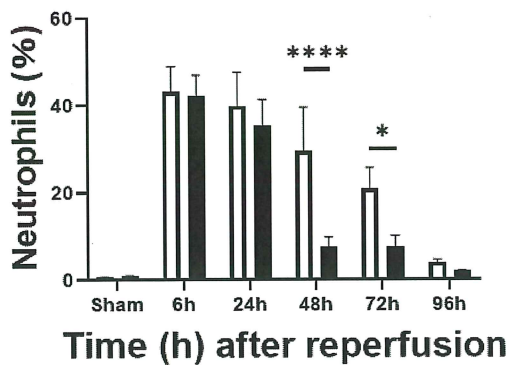
図 S1. α -GalCer を投与した偽手術マウスの肝損傷と肝細胞の増殖
 α -GalCer を投与した偽手術マウスの血清 ALT 値および PCNA+肝細胞の割合、代表的な HE 染色を示す。

図 S2

A



B



C

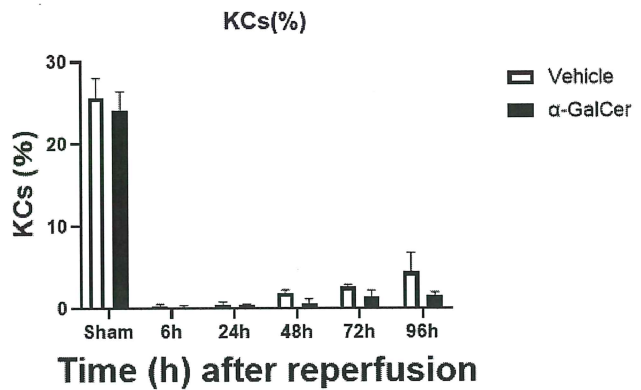


図 S2. 肝虚血再灌流障害後の免疫細胞の浸潤

A. 好中球とクッパー細胞(KC)を同定するために使用したフローサイトメトリーゲーティングの方法を示す。好中球は CD45⁺/Ly6G⁺/CD11b⁺ 細胞と定義した。クッパー細胞 (KCs) は CD45⁻/Ly6G^{low}/Ly6C⁻/CD11b^{low}/F4/80^{high} 細胞と定義した。

B. C. ビークルまたは α-GalCer 群における肝 I/R 障害後の肝臓に存在する好中球(B)および KCs (C)の割合の変化を示す。

図 S3

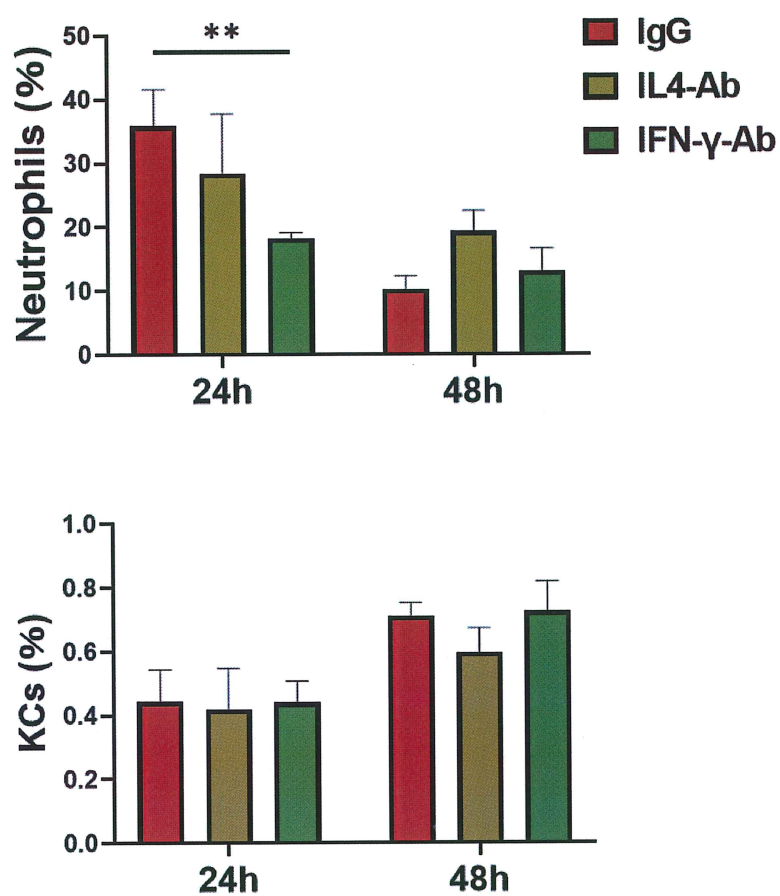
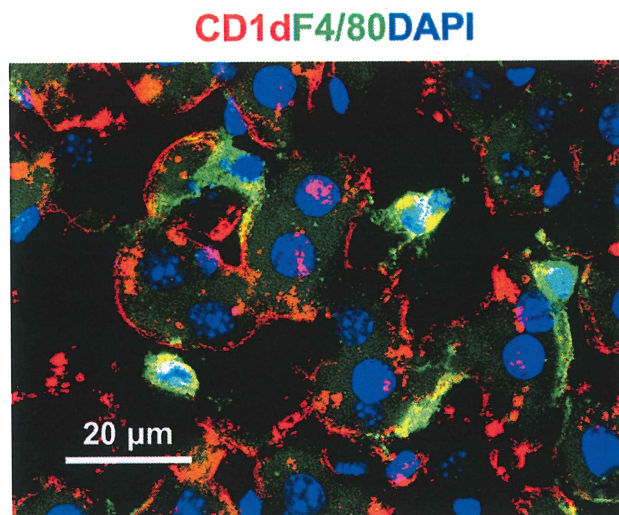


図 S3 肝虚血再灌流障害後の好中球およびクッパー細胞(KCs)に対するIL-4またはIFN- γ 阻害の影響

血流遮断を行う1時間前に抗IL-4またはIFN- γ 中和抗体をip投与し、再灌流時に α -GalCerを投与した。抗IL-4中和抗体、IFN- γ 中和抗体またはIgGを投与したマウスの肝臓の好中球(CD45⁺/Ly6G⁺/CD11b⁺細胞)とクッパー細胞(CD45⁺/Ly6G^{low}/Ly6C⁻/CD11b^{low}/F4/80^{high}細胞)の割合を示す。

図 S4

A



B

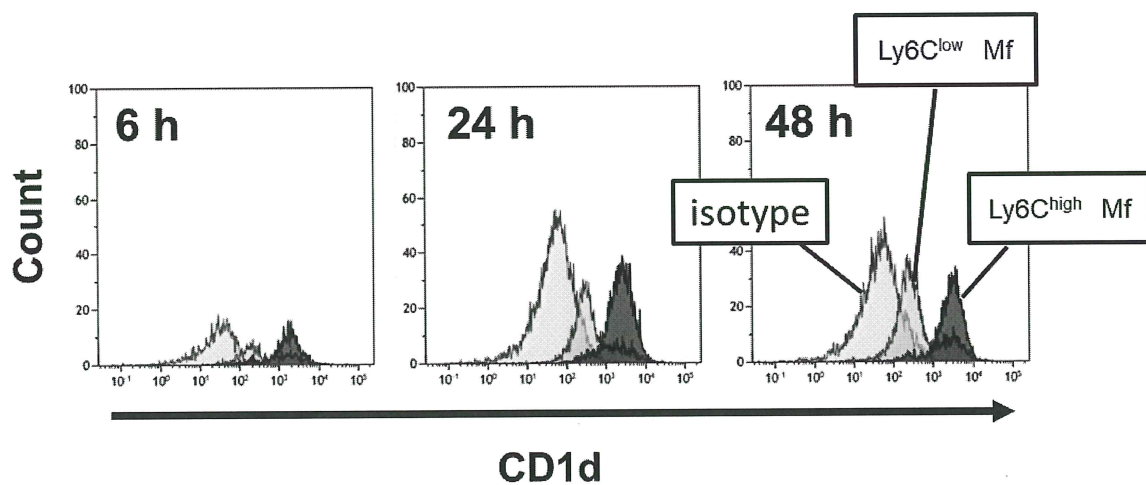
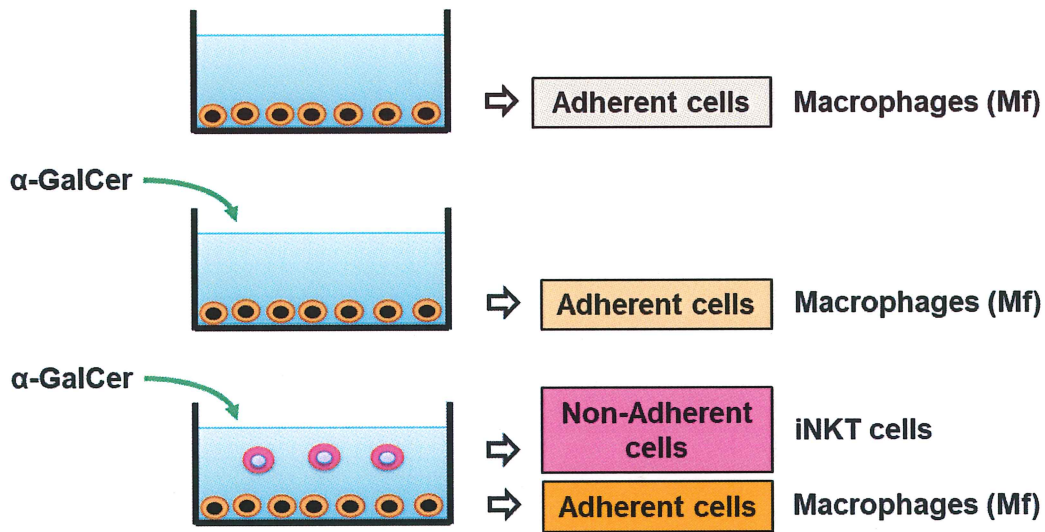


図 S4. α -GalCer 投与群における肝虚血再灌流障害後の肝臓における CD1d の発現

A. 肝 I/R 後 6 時間の α -GalCer 投与群の肝臓における CD1d (赤)/F4/80 (緑)/DAPI (青) の代表的な蛍光免疫染色を示す。

B. 肝 I/R 後 6、24、48 時間における Ly6C^{high} マクロファージ (Ly6G⁻/Ly6C^{high}/CD11b^{high}/F4/80^{high} 細胞) および Ly6C^{low} マクロファージ (Ly6G⁻/Ly6C^{low}/CD11b^{high}/F4/80^{high} 細胞) における CD1d の発現を示す。

図 S5



A

B

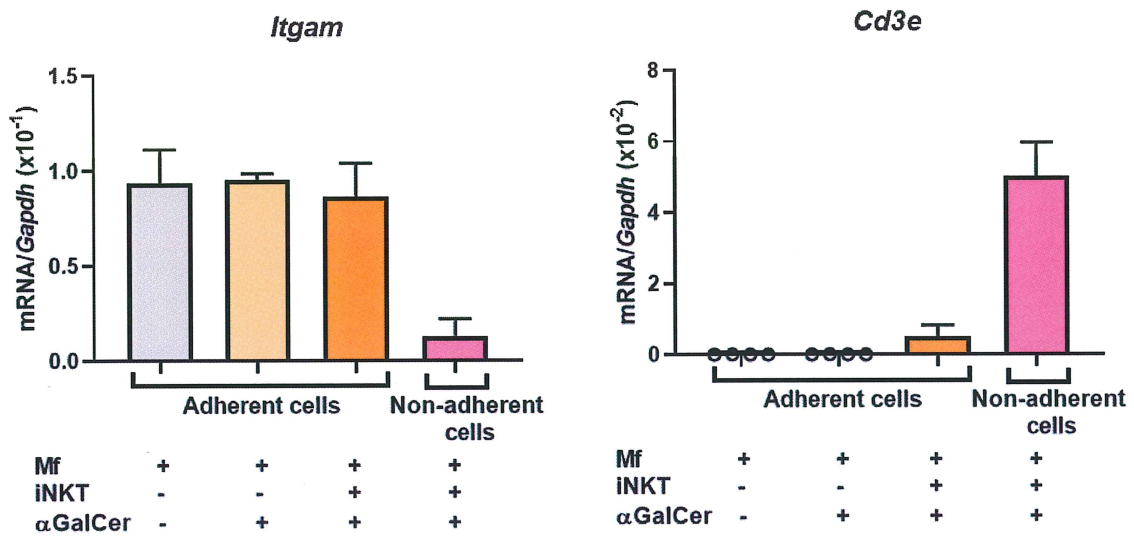
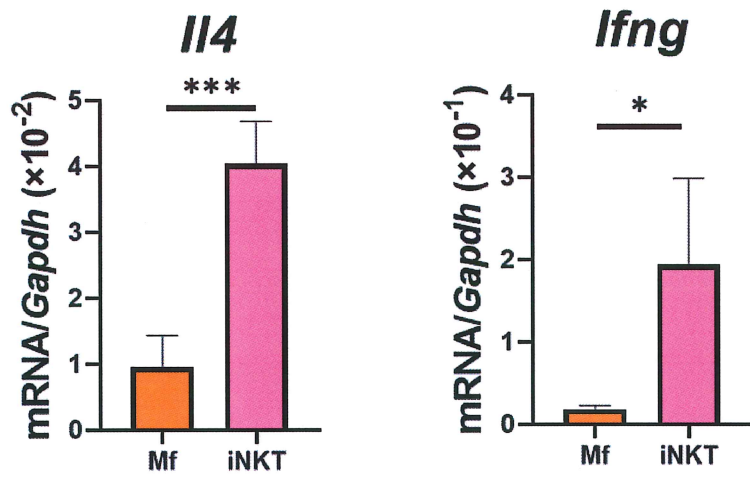


図 S5. マクロファージと活性化 iNKT 細胞の共培養における接着細胞および非接着細胞の性状
 骨髄由来マクロファージ(Mf)と iNKT 細胞は、 α -GalCer で 72 時間刺激した後に、ウェルに接着した
 細胞と接着していない細胞をそれぞれ回収し、*Itgam*(A)と *Cd3e*(B)の mRNA の発現量を測定した。

図 S6

A



B

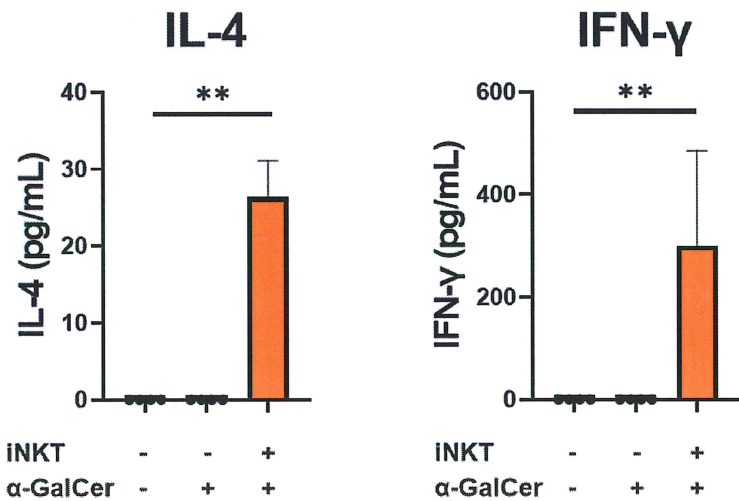


図 S6. in vitro において iNKT 細胞から IL-4 と IFN- γ が産生された

A. α -Galcer 存在下に共培養した活性化 iNKT 細胞および骨髓由来マクロファージの IL4 および *Ifng* の mRNA の発現量を示す。

B. iNKT 細胞および骨髓由来マクロファージを共培養した上清中の IL-4 および IFN- γ の蛋白レベルを示す。