

学位論文要旨

氏名 後藤 卓也



論文題目

「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」

指導教授承認印

比企直樹



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

氏名 後藤 卓也

【背景】

肝虚血再灌流障害 (I/R) 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の報告はあるが、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 (M ϕ) 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 傷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 M ϕ の表現系に影響を与え、肝 I/R 傷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 傷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中央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 とビヒクルをそれぞれ腹腔内投与し比較した。 α -GalCer 投与群では、ビヒクル投与群と比較して 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 陽性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. 炎症と修復性 M ϕ 関連遺伝子の発現

肝 I/R 傷害後の肝臓の炎症性および修復性 M ϕ 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 M ϕ 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 M ϕ 関連遺伝子の発現は、肝 I/R 傷害後の修復期において α -GalCer 投与群で増強した。

3. 肝 I/R 傷害時の Mφ 集積

フローサイトメトリ解析で肝 I/R 傷害時の Mφ を同定した。Mφ は Ly6c を用いて、Ly6C^{high} 炎症性 Mφ と、Ly6C^{low} 修復性 Mφ に分類した。炎症性 Mφ は、α-GalCer 投与群でビヒクル投与群と比較して肝 I/R 障害後 6 時間と 24 時間に増加した。修復性 Mφ は、α-GalCer 投与群で肝 I/R 障害後 24 時間と 48 時間で増加した。α-GalCer 投与は、炎症性 Mφ と修復性 Mφ の両方を増加させ、肝 I/R 傷害時に炎症性 Mφ から修復性 Mφ への表現系変化を促進することを示した。

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

炎症性 Mφ から修復性 Mφ 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 傷害時に、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、ビヒ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 の遮断は、Mφ の表現系変化と肝修復を遷延させる

IL-4 が Mφ 表現系変化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 障害後 24 時間および 48 時間の炎症性 Mφ が増加し、修復性 Mφ が減少した。抗 IL-4 中和抗体は、肝 I/R 障害後 48 時間の ALT 値と壊死領域を増加させ、PCNA 陽性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 Mφ 関連遺伝子の発現を増強させ、修復性 Mφ 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 Mφ から修復性 Mφ 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 の遮断は炎症性 Mφ と肝臓の炎症を減少させた

IFN-γ が Mφ 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 障害後 24 時間と 48 時間の炎症性 Mφ を減少させた。一方で、修復性 Mφ には変化は認めなかった。抗 IFN-γ 中和抗体は、肝 I/R 障害後 48 時間の ALT 値と壊死領域を減少させ、PCNA 陽性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 Mφ 関連遺伝子の発現が減弱し、修復性 Mφ 関連遺伝子の発現が増強した。IFN-γ は炎症性 Mφ 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 傷害時の Mφ における CD1d の発現

α-GalCer 投与マウスで、肝 I/R 障害時に iNKT 細胞が Mφ 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 障害後 6 時間の F4/80⁺細胞 (Mφ) に Cd1d の発現を認めた。フローサイトメトリ解析で、肝 I/R 障害後 6 時間の炎症性 Mφ で CD1d の発現を認めた。Mφ に CD1d が発現しており、肝 I/R 傷害において 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Mφの相互作用

骨髄由来MφとiNKT細胞を共培養し、in vitroにおいて活性化iNKT細胞がMφ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Mφは、炎症性および修復性Mφ関連遺伝子の発現を増強させた。また、骨髄由来Mφで*cd1d1*の発現を確認した。Mφにおける*Cd1d1*の発現は、活性化iNKT細胞と共培養したMφで増強した。Mφに発現しているCD1dを介し、活性化iNKT細胞とMφの相互作用がMφ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Mφにおける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Mφに抗IL-4中和抗体を投与すると、Mφにおける炎症性Mφ関連遺伝子の発現を増強し、修復性Mφ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、Mφにおいて炎症性Mφ関連遺伝子の発現を減弱させ、修復性Mφ関連遺伝子の発現を増強させた。

10. *Cd1d1*^{-/-}マウスでは肝I/R傷害時の肝修復とMφ分化が遷延した

iNKT細胞が欠損した*Cd1d1*^{-/-}マウスにおける肝I/R傷害後の肝修復について検討した。*Cd1d1*^{-/-}マウスは、WTマウスと比較して肝I/R障害後48時間および72時間において、ALT値および肝壊死面積の増加、PCNA陽性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解析では、WTマウスと比較して*Cd1d1*^{-/-}マウスでは、肝I/R障害後24時間の炎症性Mφは多く、48時間および72時間の修復性Mφは少なかった。*Cd1d1*^{-/-}マウス肝における炎症性Mφ関連遺伝子の発現は肝I/R障害後48時間で増強した。一方で、修復期における*Cd1d1*^{-/-}マウス肝の修復性Mφ関連遺伝子の発現は減弱した。さらに、*Cd1d1*^{-/-}マウスで、肝I/R障害後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、Mφの形質転換を促し、肝I/R損傷後の肝臓修復を促進させた。活性化iNKT細胞由来のIFN-γは、炎症性Mφの集積に関与し、その後の修復性Mφへの形質転換を促進させた。また、Mφに*Cd1d*が発現していること、*CD1d*を発現するMφ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*Cd1d1*^{-/-}マウスの肝I/R障害では、Mφの表現系変化が遅れ、細胞増殖の低下および肝修復が遷延した。これにより、iNKT細胞が肝I/R傷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Mφの相互作用によりMφ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損傷後の肝臓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。