

# 学位論文要旨


氏名 井上 智仁



論文題目

「RAMP1 in Kupffer cells is a critical regulator in immune - mediated hepatitis (クッパー細胞における RAMP1 シグナルの自己免疫性肝炎制御について)」

指導教授承認印

小泉和彦印 

RAMP1 in Kupffer cells is a critical regulator in immune-mediated hepatitis  
(クッパー細胞における RAMP1 シグナルの自己免疫性肝炎制御について)

氏名 井上 智仁

(以下要旨本文)

【背景】肝臓は門脈を通じて流入する消化管からの食事(異物)や腸内細菌などによる侵襲を常に処理している生体防御機能を担う臓器である。肝常在性マクロファージである Kupffer 細胞(KC)は、これらの免疫を調整し実行している。KC を含めた肝免疫細胞および脾臓免疫細胞は急性肝障害の原因となるが、これら細胞間の相互作用調節機構については不明である。近年、様々な疾患に関し神経系と免疫系との相互作用の重要性が明らかになっている。神経系が全身各部位の免疫・炎症反応を制御している事、一方、神経系も免疫系・炎症系の制御を受けている事などが解明され、神経と免疫・炎症の相互作用が注目されている。感覚神経系から放出されるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が、CGRP 受容体のサブユニットである受容体活性調整タンパク質 1(RAMP1)を介し自然免疫活性を調節する事をこれまで報告してきた。免疫系の発達した肝臓においても交感、副交感神経系が分布しており、これら神経系と免疫系の相互作用が注目されているが未だ不明である。

【目的】免疫介在性肝炎の病因における RAMP1 シグナルと肝臓および脾臓免疫細胞との相互作用について示す。

【方法】KC および脾臓 T 細胞由来の炎症性サイトカインと、免疫細胞浸潤を伴う重篤な肝障害を特徴とする Concanavalin A(ConA)誘導肝炎モデルマウスを用いた。RAMP1 欠損マウス(*Ramp1*<sup>-/-</sup>)とその野生型マウス(WT)を用い、ConA(2.0mg/ml)を尾静注した。肝障害の評価として生存率、ALT、肝壊死面積を ConA 投与 0, 1, 3, 6 および 24 時間後に測定した。RAMP1 シグナルによる炎症調整機構の評価として免疫染色、real-time RT-PCR、ELISA および FACS による解析を行った。サイトカイン評価のため TNF/IFN $\gamma$  中和抗体を投与した。RAMP1 シグナルによる T 細胞制御の評価のため養子移入を行った。KC と T 細胞の関与を評価するため、それぞれの細胞除去処置を施し、相互作用の評価のために単独培養および共培養を行った。脾臓による ConA 肝炎への影響を評価するため ConA 投与直前に脾摘術を行った。

【結果】

*Ramp1*<sup>-/-</sup>でのConA肝炎の増悪

WTと比べ*Ramp1*<sup>-/-</sup>の生存率はConA投与24時間以降低下し、血清ALT値および肝

壊死面積は増悪、Ly6c<sup>+</sup>、CD68<sup>+</sup>およびCD4<sup>+</sup>細胞は増加した。これら集積細胞は *Ramp1*<sup>-/-</sup>の肝臓でLy6C<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/F4/80<sup>low</sup>細胞(炎症反応性単球)が増加し、Ly6C<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/F4/80<sup>high</sup>細胞(炎症反応性マクロファージ)は減少した。Ly6C<sup>low</sup>/CD11b<sup>low</sup>/F4/80<sup>high</sup> (常在性マクロファージ)は両群で減少した。CD3<sup>high</sup>/CD4<sup>high</sup>/CD8<sup>low</sup>細胞が *Ramp1*<sup>-/-</sup>の肝臓で増加したが、CD3<sup>high</sup>/CD4<sup>low</sup>/CD8<sup>high</sup> 細胞に両群での有意差は認めなかった。つまり、RAMP1シグナルは肝臓への炎症細胞浸潤を抑制する事が示唆された。また、*Ramp1*<sup>-/-</sup>の脾臓においても、Ly6C<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/F4/80<sup>low</sup>細胞が増加したが、Ly6C<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/F4/80<sup>high</sup>細胞は減少した。しかし肝臓と比べこれらの割合は小さく、その貢献度は肝臓より少ない事が示唆された。

### ConA肝炎でのCGRPおよびRAMP 1 発現

肝での *Ramp1* mRNAはConA投与1時間後にピークを迎え、6時間後に最も低くなり、24時間後に正常値に戻った。脾臓ではConA投与後より漸減した。肝臓および脾臓のCD68<sup>+</sup>細胞とCD4<sup>+</sup>細胞にRAMP1発現を認めた。脾臓のCGRP発現は両群でConA投与1時間後に著明に減少し、以降正常値まで漸増した。つまり、CGRP/RAMP1発現の減少はConA肝炎と関連し、マクロファージおよびT細胞のRAMP1がこの過程で重要な役割を果たすことを示唆した。

### ConA肝炎での炎症性サイトカイン発現

WTと *Ramp1*<sup>-/-</sup>においてConA投与1時間後に *Tnf* および *Ifng* mRNA 発現が最大となり、いずれも *Ramp1*<sup>-/-</sup>で発現が増加した。この発現量は肝と比べ脾臓で増加した。

### ConA 肝炎での脾臓細胞の役割

ConA投与直前に脾摘術を行うと両群で6時間後のALT値が改善した。またConA投与1時間後の *Ramp1*<sup>-/-</sup>では *Tnf*発現が減少したが、WTでは有意差は認めなかった。*Ifng* 発現は両群で有意に減少した。つまり脾摘術により初期の肝障害が改善し、これは脾臓由来炎症性サイトカインがConA肝炎の原因となる事を示唆した。

脾臓でのConA投与1時間後のTNF $\alpha$ とIFN $\gamma$ を産生したF4/80陽性数は *Ramp1*<sup>-/-</sup>で増加した。脾CD4<sup>+</sup>細胞についても同様であった。つまり、脾臓マクロファージおよびT細胞におけるRAMP1シグナルはConA反応性の炎症性サイトカイン産生を抑制する事が示唆された。脾臓マクロファージと比べCD4<sup>+</sup>細胞ではこれらサイトカイン発現が増加し、CD4<sup>+</sup>細胞がTNF $\alpha$ およびIFN $\gamma$ の主たる産生源である事が示唆された。

培養細胞をConAで刺激しCGRPを加えると、WT由来脾臓マクロファージではTNF $\alpha$ とIFN $\gamma$ の発現が減少したが、*Ramp1*<sup>-/-</sup>では減少しなかった。CD4<sup>+</sup>細胞においても同様であった。

ConA投与24時間前に抗CD4抗体を投与した。WTと *Ramp1*<sup>-/-</sup>においてConA投

与 6,24 時間後の ALT 値が部分的に減少した。つまり、ConA 肝炎での CD4+細胞の RAMP1 シグナルは限定的な影響であると示唆された。

*Ramp1*<sup>-/-</sup>脾臓 CD4+細胞を単離し WT に養子移植すると ConA 投与 24 時間後の ALT 値は増悪したが、*Ramp1*<sup>-/-</sup>の 24 時間後には及ばなかった。つまり、全細胞 *Ramp1*<sup>-/-</sup>において *Ramp1*<sup>-/-</sup>の CD4+T 細胞は少なくとも部分的に肝障害を増悪させる事を示唆した。

### ConA肝炎でのKCにおけるRAMP1シグナルの防御的役割

クロドロン酸(CL)の前処置により両群のALT値は改善した。CLは*Tnf*および*Ifng* mRNA発現および炎症細胞集積を抑制した。KCのRAMP1シグナルはConA肝炎に反応性を持つ事が示唆された。

ConA投与30分前に抗TNFα/IFNγ抗体を投与した。ALT値の減少、肝壊死面積の減少、そして免疫細胞浸潤の減少による肝障害抑制を認めた。

FACSではConA投与1時間後のTNFα陽性KC数は*Ramp1*<sup>-/-</sup>で増加したが、TNFα陽性CD4+細胞数に有意差は認めなかった。IFNγについても同様であった。つまり、肝臓でのRAMP1シグナルはKC由来の炎症性サイトカイン産生を抑制した。

単離したKCをConAとCGRPで刺激すると、WTでは*Tnf*および*Ifng* mRNA発現は低下したが*Ramp1*<sup>-/-</sup>では減少しなかった。

KCとT細胞を単離・共培養した。共培養ではConAによる*Tnf*および*Ifng* mRNA発現が増加し、CGRP投与によりこれらの発現はWTでは抑制されたが*Ramp1*<sup>-/-</sup>では減少しなかった。以上より、脾臓T細胞とKCの相互作用はRAMP1シグナル依存的にConA肝炎に寄与している事が示唆された。

### ConA肝炎でのCGRPはALTの改善とサイトカイン産生を抑制する

ConA投与30分前にCGRPを投与した。WTでは24時間後のALT値の改善と、肝臓および脾臓での1時間後のサイトカイン発現減少を認めた。一方、*Ramp1*<sup>-/-</sup>ではALTの改善は認めなかった。

#### 【考察】

本研究ではRAMP1シグナルがKCおよび脾臓T細胞による炎症性サイトカイン産生を抑制することでConA肝炎に対し防御的に作用する事を実証した。KCはConA肝炎の誘発・増悪に必須であり、RAMP1シグナルは肝脾免疫細胞を抑制し肝炎の発症を阻害する。つまり、RAMP1が免疫介在性肝炎の治療標的となる事を示した。

肝臓では、CGRP陽性神経は門脈周囲および小葉の結合組織に分布し、この神経から分泌されたCGRPがRAMP1シグナルを介して免疫機能を調節する。

ConA肝炎ではマクロファージによるCD4+細胞の活性化が重要であり、CGRPはこれを抑制するがCGRP受容体の役割は不明である。本研究ではRAMP1がConA

肝炎を減弱させることを示した。

ConA 肝炎での主たる RAMP1 発現は肝脾マクロファージおよび脾臓 T 細胞であった。また、肝臓および脾臓での CGRP 値が ConA への暴露により低下した。CGRP は分泌直後に循環中のプロテナーゼにより分解されるが、CGRP レベルを維持する事は肝障害の予防に重要である。実際、CGRP を補充すると炎症性サイトカインは減少し肝炎を抑制した。

脾臓は炎症性メディエーターの供給源と考えられる。CGRP陽性神経末端は、マクロファージおよびT細胞が位置する領域近くに分布する。脾臓はConA肝炎の病態生理に影響を受け、また影響を与える。活性化した脾臓T細胞が肝臓に移動し肝障害を悪化させる。脾摘は炎症性サイトカインの分泌を減少させ肝障害を抑制した。従って、脾臓はこれらを産生することでConA肝炎の初期段階に寄与する。しかし、WTの脾臓切除術では24時間後に炎症が減弱せず、脾臓自体は疾患重症度に関与していない事が示唆された。一方、脾摘術後の *Ramp1*<sup>-/-</sup> のALT値は、sham operationした *Ramp1*<sup>-/-</sup> と比べConA投与24時間後で50%減少し、脾細胞のRAMP1欠損がConA肝炎を悪化させる事を示した。つまり、脾細胞におけるRAMP1シグナルがConA肝炎の増悪を抑制する事を示唆した。また、脾臓T細胞がRAMP1シグナルに依存するTNF $\alpha$ およびIFN $\gamma$ を産生しConA肝炎に寄与した事が示唆され、あるいは、ConAによって脾臓でのRAMP1シグナルが喪失しT細胞が調節不全になることで、脾臓がConA肝炎の初期誘導部位となる可能性も示唆された。

抗CD4抗体を投与するとConA肝炎を部分的に減弱させ、これは活性化CD4+細胞は疾患の進行に関与する事を示した。*Ramp1*<sup>-/-</sup>脾臓CD4+細胞の移入は、全身的なRAMP1欠損マウスと比べ肝障害は中程度であった。つまり、脾臓CD4+細胞におけるRAMP1シグナルがConA肝炎に関与する事を示唆した。

脾臓マクロファージのRAMP1シグナルがTNF $\alpha$ およびIFN $\gamma$ の産生を抑制したが、T細胞よりも炎症性サイトカイン産生は少量であった。

マクロファージ除去により肝障害は著しく減弱し、KCがConA肝炎に関与する事が示唆された。またCLによって炎症性メディエーターが抑制されConA肝炎を減弱させた。RAMP1シグナルはKC由来炎症性サイトカイン産生を抑制した。従って、KCによる炎症性サイトカイン産生はRAMP1依存的であり、KCにおけるRAMP1シグナルはConA肝炎の発症に重要である。

ConA肝炎の初期段階において、脾臓T細胞およびKCの活性化の後、KCとの相互作用によって肝浸潤脾臓T細胞が肝障害を誘発する。それぞれの単独培養と比べ共培養にConAを投与する事で炎症性サイトカイン発現が増加し、これはRAMP1シグナル依存的であった。これはTNF $\alpha$ およびIFN $\gamma$ がConA肝炎の誘発に重要であるという考えを支持した。実際、抗TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ 抗体は炎症細胞浸潤を抑制しConA肝炎を減弱した。

ConA投与24時間後にKC数は有意に減少した。KC由来サイトカインは、Ly6C+またはCD68+単球/マクロファージの集積を促進し、ConA肝炎の後期に広範な肝障害を惹

起した。ConA投与24時間後の傷害肝に集積したマクロファージの表現型は、WTおよび*Ramp1*<sup>-/-</sup>で異なっており、RAMP1シグナルがマクロファージの分化分極に関与している事が示された。ConA肝炎における炎症および肝修復に関するRAMP1シグナルの解明には、さらなる研究が必要である。

**【結論】**KCにおけるRAMP1シグナルが免疫介在性肝炎の予防および/または抑制において重要な役割を果たす事を実証した。