

慢性肝障害における肝 NKT 細胞の動態

小 海 秀 央

新潟大学大学院医歯学総合研究科

機能再建医学講座 消化器・一般外科学分野

(主任：畠山 勝義教授)

Selective Loss of Hepatic NKT Cells in Chronic Liver Injury in Mice

Hidenaka KOKAI

Division of Digestive and General Surgery

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Katsuyoshi HATAKEYAMA)

要 旨

生体の中で NKT 細胞が最も多く存在する臓器は肝臓である。マウス実験モデルにおいて、急性肝障害の病態形成に NKT 細胞が関与していることが明らかになってきた。しかし、慢性の肝障害において、NKT 細胞がどのように変化し、またその病態にどのように関与しているかは明らかでない。本研究では、マウスに四塩化炭素を投与して慢性の肝障害・肝硬変を発症させ、その発症過程および回復過程での NKT 細胞の解析を行った。四塩化炭素により肝硬変が誘導される過程において、肝 NKT 細胞の選択的な減少とともに肝細胞上の CD1d の発現低下が見られた。四塩化炭素投与中止により、肝硬変から回復する過程では、減少していた肝 NKT 細胞数は正常レベルまで回復し、肝細胞上の CD1d の発現も正常レベルに戻った。四塩化炭素によって肝細胞が傷害を受け、NKT 細胞の分化・維持に必須の分子である CD1d 分子の肝細胞上での発現が低下し、その結果、肝 NKT 細胞が選択的に減少することが示唆された。

キーワード：NKT 細胞, 慢性肝障害, 肝硬変, CD1d

緒 言

肝臓は、末梢のリンパ臓器（脾臓やリンパ節など）とは大きく異なるリンパ球分布を示す¹⁾。さらに、肝臓には、クッパー細胞という独自の機能をもったマクロファージや、他の臓器のものとは異なる性質をもつ樹状細胞や顆粒球が存在する。

これら肝臓に特異的な白血球分布は、肝障害、癌の肝転移、肝臓における感染症、肝再生、移植片の生着・拒絶、免疫寛容など、肝臓における免疫反応に大きな役割を果たす²⁾³⁾。

肝臓に多く見られるリンパ球として、NKT 細胞があげられる⁴⁾⁵⁾。NKT 細胞は、NK 細胞に特異的とされてきた NK 細胞レセプターである

Reprint requests to: Hidenaka KOKAI
Division of Digestive and General Surgery
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器・一般外
科学分野 小海 秀 央

NK1.1とT細胞レセプターの両方を同時に発現する細胞として同定された。NKT細胞は、通常のT細胞とは大きく異なる特徴をもつ。通常のT細胞は、多様なT細胞レセプターを使用するのに対し、マウスNKT細胞は、 $V\alpha 14J\alpha 18$ という均一なT細胞レセプターを使用する。また、通常のT細胞が、MHCに提示されたペプチド抗原を認識するのに対し、NKT細胞は、CD1dに提示された糖脂質を認識する。CD1dはNKT細胞の分化にも必須の分子で、CD1d欠損マウスはNKT細胞を持たない。CD1d拘束性の $V\alpha 14$ NKT細胞は主に $CD4^+$ のものと $CD4^-CD8^-$ のものからなる。生理的な内因性のリガンドは不明であるが、海綿由来のスフィンゴ糖脂質である α -galactosylceramide (α -GalCer)はNKT細胞を強力に活性化する。ヒトにおいても、 $V\alpha 24J\alpha Q$ (マウスの $V\alpha 14J\alpha 18$ に相当する)を均一に発現し、CD1d反応性のNKT細胞が存在し、やはり肝臓に多い⁶⁾。NKT細胞は、活性化にともない、IL-4やIFN- γ を多量に産生し、また、パーフォリンやFas Lなどの細胞傷害性分子を用いて、腫瘍細胞や自己細胞など標的細胞を殺傷する⁷⁾。これらの機能を発揮し、NKT細胞は種々の病態に関与している。

マウスに α -GalCerを投与すると、肝臓のNKT細胞が活性化し、多量のIL-4やTNF- α を産生するとともに、NKT細胞上のFas Lの発現が増強して、自己の肝細胞を破壊し、急性の肝障害を引き起こす⁸⁾⁹⁾。また、マウスに植物由来レクチンであるConcanabalin Aを投与すると、T細胞依存性の急性の肝障害が発症するが、NKT細胞を欠損するマウスでは肝炎の発症が見られず、この病態にもNKT細胞が関与している⁹⁾¹⁰⁾。このように、急性の肝障害の際はNKT細胞が関与していることが明らかになりつつある。しかし、慢性の肝障害において、NKT細胞がどのように変化し、またその病態にどのように関与しているかはわかっていない。本研究では、マウスに四塩化炭素を投与して慢性の肝障害・肝硬変を発症させ、その発症過程および回復過程でのNKT細胞の解析を行った。

材料と方法

1. マウス

C57BL/6マウスは日本チャールズリバーから購入し、新潟大学脳研究所動物資源リソースセンターにてSPFの条件下で飼育した。8～12週齢の雌を実験に用いた。すべての実験は、新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得た。

2. 四塩化炭素投与による肝障害の誘導

四塩化炭素(シグマ・アルドリッチ)をオリーブ油に5%の濃度で溶解し、この溶液0.2 mlを2日毎にマウスに腹腔内投与した¹¹⁾。対照群には、オリーブ油を投与した。

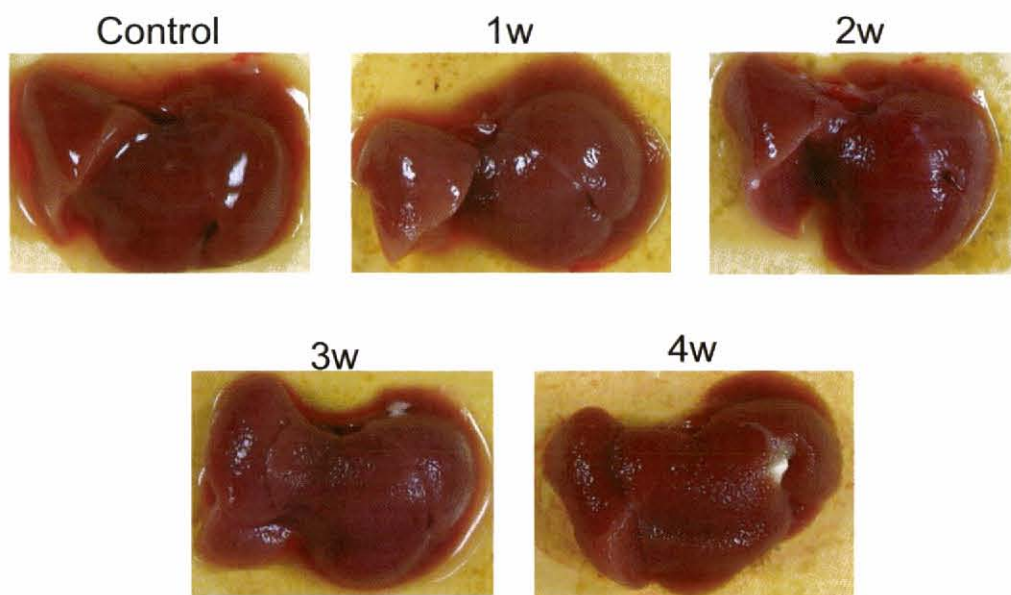
3. 細胞分離

マウスから肝臓、脾臓を摘出した。肝臓をハサミで細切した後、ステンレススチールメッシュで濾し、35%パーコール(GEバイオサイエンス)にて比重遠心を行い、赤血球をACKバッファー(インビトロジェン)にて溶血させ、肝リンパ球を得た。脾臓をステンレススチールメッシュで濾し、赤血球をACKバッファーにて溶血させ、脾リンパ球を得た。肝実質細胞は、肝臓を生理食塩水で灌流し、コラゲナーゼ(シグマアルドリッチ)処理した後、比重遠心にて得た。得られた細胞の生存率は、トリパンブルー(インビトロジェン)による色素排除試験にて行った。

4. フローサイトメトリー

FITC標識抗CD3(145-2C11)、PE標識抗NK1.1(PK136)、PE標識抗CD1d(1B1)およびアイソタイプコントロール抗体は、BD Bioscience Japanより購入した。抗体の非特異的結合を防ぐために、細胞は未標識抗CD16/32(2.4G2)(BD Bioscience Japan)で4℃で5分間インキュベートした後、標識抗体で染色した。染色した細胞は、FACSCan(BD Bioscience Japan)にてフローサイトメトリーにて解析し、データの解析には、CellQuestソフトウェアを使用した。

A



B

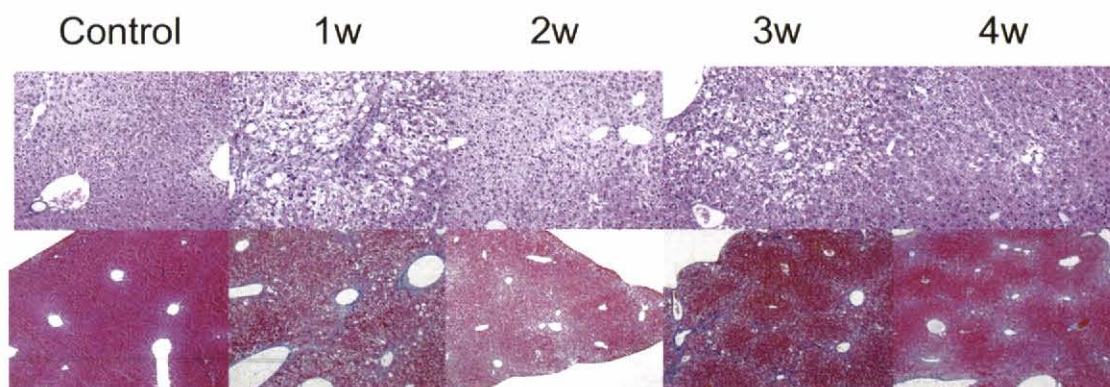


図 1 四塩化炭素投与後の肝臓の変化

A：肉眼像, B：組織像（上段：HE 染色, 下段：Mallory 染色）.

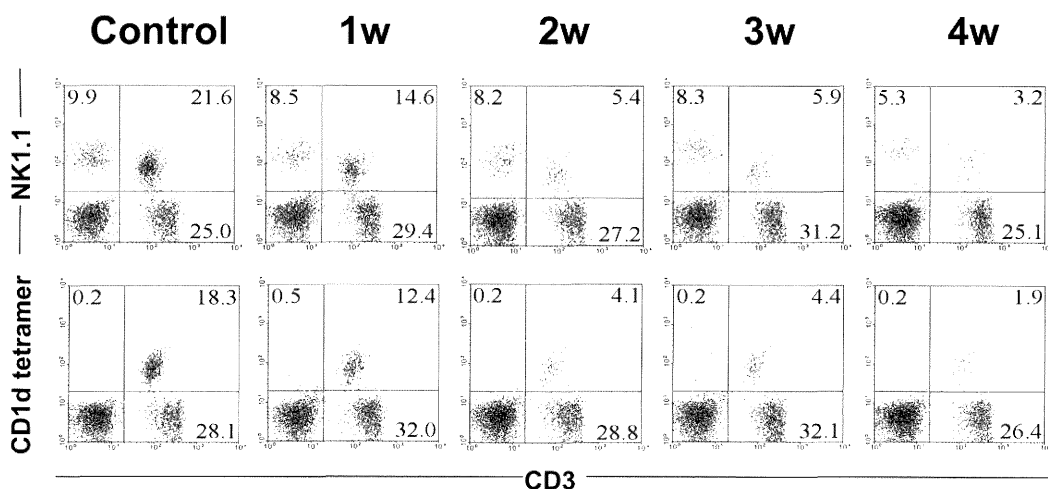


図2 四塩化炭素投与後の肝リンパ球サブセットの変化

5. 組織学的解析

マウス肝臓を10%ホルマリンにて固定した後、パラフィンで包埋し、4 μ mの厚さの切片を作製し、Hematoxylin-eosin および Mallory にて染色した。

結 果

1. 四塩化炭素投与による慢性肝障害の誘導期における肝リンパ球の解析

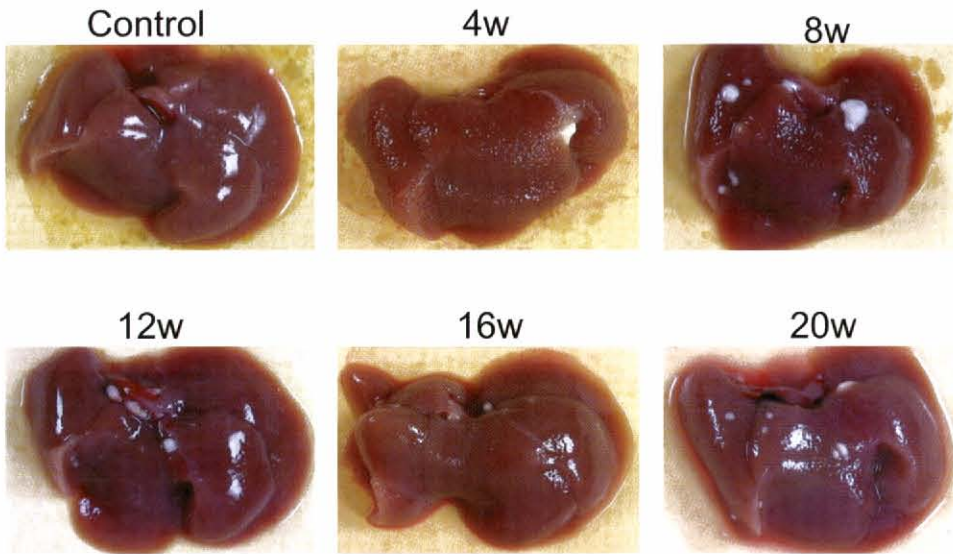
四塩化炭素は実験動物に薬剤性肝障害モデルを作成する際に広く用いられており、過酸化物による肝細胞への直接的な障害を引き起こし、反復投与によって慢性肝障害・肝硬変を誘導する¹¹⁾。本研究においては、B6マウスに、四塩化炭素を2日毎に4週間投与した。四塩化炭素の投与期間が長くなると、肉眼的に、肝臓表面の凹凸が徐々に見られるようになり、投与4週目には、肝硬変の所見を呈した(図1A)。組織学的所見としては、四塩化炭素投与1週目では、肝細胞の脂肪変性、炎症細胞の浸潤が認められるが、4週目では、脂肪変性は目立たなくなり、繊維化が認められた(図1B)。

このように誘導される慢性肝障害の経過中、肝臓のリンパ球サブセットに変化があるかどうかを検討した。四塩化炭素投与後、経時的に肝臓からリンパ球を分離して、肝リンパ球をFITC標識抗CD3抗体とPE標識抗NK1.1抗体で二重染色し、フローサイトメトリーにて解析した(図2)。NK1.1陽性T細胞(NK1.1⁺CD3⁺)は、正常マウスの肝臓のリンパ球のなかで、約20%を占めるが、四塩化炭素投与によって慢性肝障害が誘導された肝臓においては、時間の経過とともにその割合が減少していった(図2上段)。タイプIのNKT細胞を同定するために、 α -GalCer/CD1dテトラマーによる染色を行った(図2下段)。正常マウスにおいては、NK1.1陽性T細胞中の約90%はタイプI NKT細胞である。肝障害の経過とともにタイプI NKT細胞の割合が減少していった。肝臓においては、NKT細胞以外のリンパ球である、NK細胞、B細胞、通常のT細胞の割合には大きな変化が見られなかった。

2. 四塩化炭素投与による慢性肝障害の誘導期における肝リンパ球の解析

肝線維化は不可逆的な病態と考えられていたが、

A



B

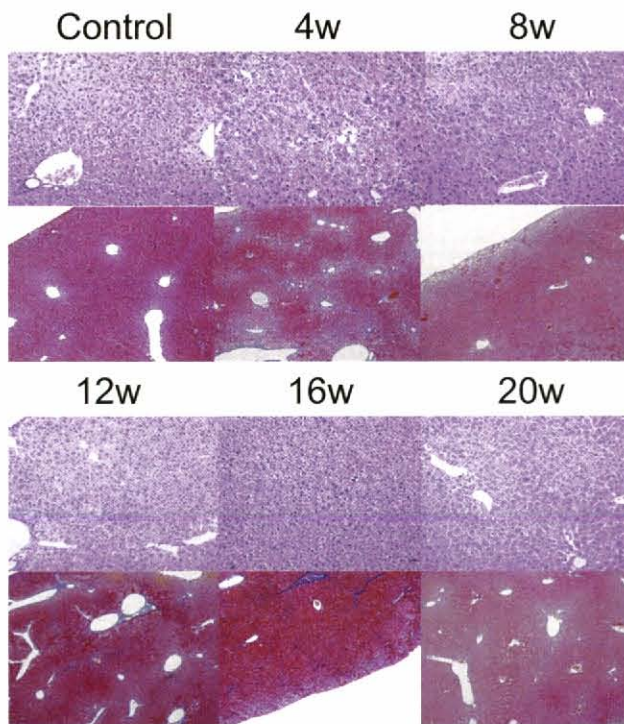


図 3 四塩化炭素投与後の肝臓の変化

A：肉眼像, B：組織像（上段：HE 染色, 下段：Mallory 染色）.

四塩化炭素を 4 週間投与した後, 投与を中止した. 図中の週数は, 四塩化炭素投与後の週数を示す.

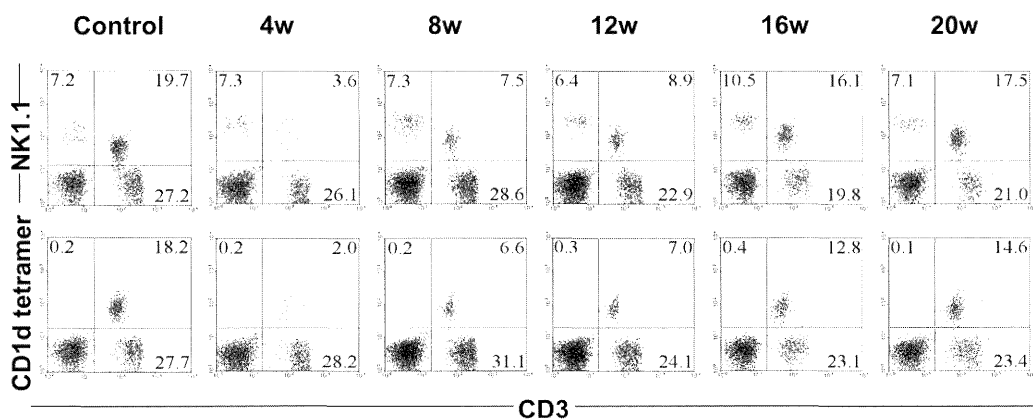


図4 四塩化炭素投与後の肝リンパ球サブセットの変化

四塩化炭素を4週間投与した後、投与を中止した。図中の週数は、四塩化炭素投与後の週数を示す。

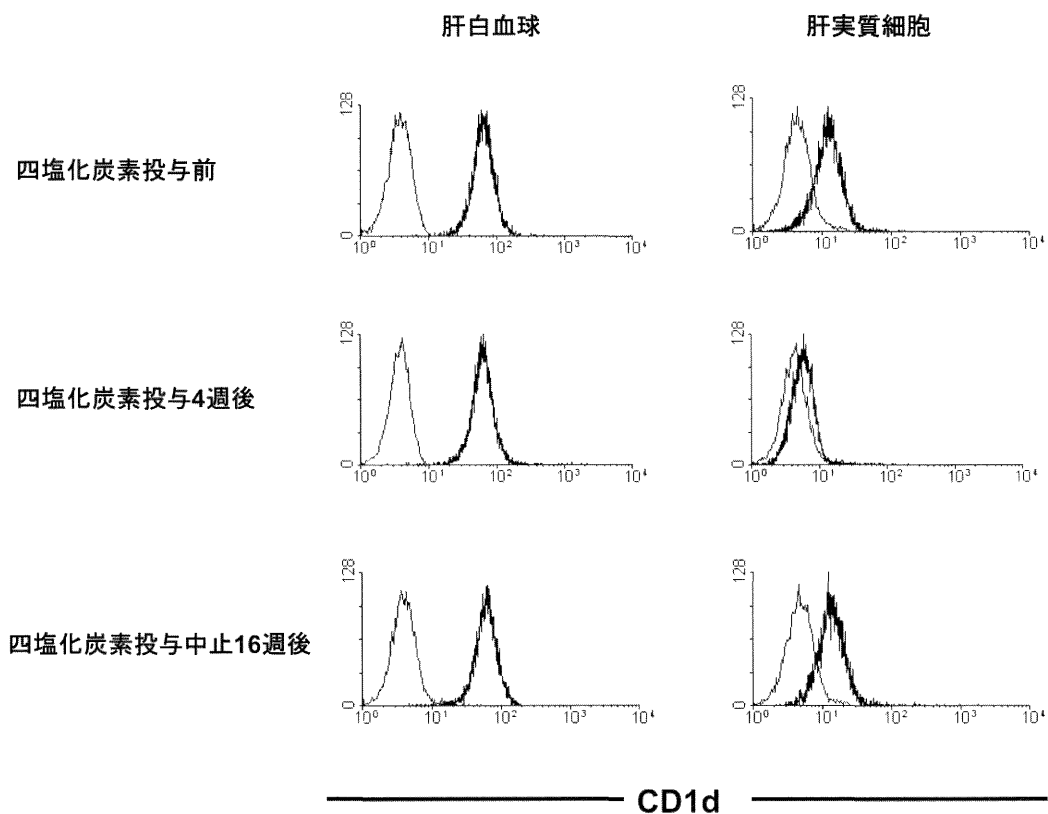


図5 四塩化炭素投与による肝臓におけるCD1d発現の変化

四塩化炭素や thioacetamide, α -naphthylisothiocyanate, ethionine, コリン欠乏食, 胆管結紮などの実験的肝線維化モデルにおいて, その原因を除くと肝線維化が改善することが報告されている。臨床的にも, アルコール性肝疾患やヘモクロマトーシスに適切な治療を行うと, 肝線維化が改善することが報告されている。ウイルス性肝炎でも, インターフェロン療法に奏功する C 型慢性肝炎では肝線維化が改善することが証明されている¹²⁾。そこで, 本研究においても, 四塩化炭素を 4 週間投与した後, 投与を中止し, 肝臓の状態が改善するかどうかを検討した。四塩化炭素中止後, 肉眼的に観察されていた肝臓表面の凹凸が時間の経過とともに目立たなくなり, 投与中止 8 週間後には, ほぼ正常の外見を呈していた (図 3A)。組織学的にも, 投与時に見られた脂肪変性や炎症細胞浸潤は, 投与中止により徐々に見られなくなり, 投与中止 16 週間後では, ほぼ正常の肝組織像を呈した (図 3B)。次に, 四塩化炭素の投与を中止し, 肝硬変からの回復過程での肝リンパ球の変化を解析した (図 4)。四塩化炭素投与により減少していた NKT 細胞の割合は, 四塩化炭素投与中止後は, 時間の経過とともに増加し, 投与中止 16 週間後には, 正常レベルの約 80%にまで回復した。

3. 肝臓における CD1d 分子の発現の変化

CD1d は, MHC class I 関連分子であり, NKT 細胞は CD1d に提示された糖脂質を認識する。また, CD1d は NKT 細胞の分化・維持にも必須の分子である⁴⁾。四塩化炭素投与により, 肝 NKT 細胞の選択的な減少が見られた。このメカニズムとして, 肝臓における CD1d の発現に変化があるとの仮説を立て, それを検討した。肝臓から, 白血球と肝実質細胞を分離し, 四塩化炭素投与により, それら細胞上の CD1d の発現に変化があるかどうかをフローサイトメトリーにて解析した (図 5)。白血球上の CD1d の発現は, 四塩化炭素投与により, 変化はみられなかった。しかし, 肝細胞上の CD1d の発現は, 四塩化炭素投与により, 肝硬変を発症した肝臓においては, 著明に低下していた。また, 四塩化炭素投与中止により, その発

現は正常レベルに回復した。

考 察

本研究により, 四塩化炭素で誘導される慢性肝障害・肝硬変において, 肝臓の NKT 細胞が肝障害の程度が進行するにつれて減少することが明らかになった。特に, 肝障害の程度が進行して肝硬変の状態になると, 肝 NKT 細胞はほとんど見られなくなった。同時に, 脾臓を調べてみると, NKT 細胞数は変化していなかった。このことから, この NKT 細胞数の減少は, 肝臓特異的であることがわかった。このメカニズムを探るため, 肝実質細胞上の CD1d の発現を解析したところ, 慢性肝障害の肝細胞は, CD1d の発現が著明に低下していた。CD1d は NKT 細胞の分化・維持に必須の分子である⁴⁾⁵⁾。CD1d を欠損するマウスでは, NKT 細胞が存在しない。しかし, CD1d は, NKT 細胞以外のリンパ球である, B 細胞, T 細胞, NK 細胞の分化・維持には必須ではなく, CD1d 欠損マウスでは NKT 細胞以外のリンパ球は正常に見られる。四塩化炭素によって障害を受けた肝細胞は, CD1d の発現を失い, これによって肝 NKT 細胞が選択的に減少したことが示唆される。四塩化炭素を 4 週間投与すると, 肝硬変が誘導されたが, 投与を中止して経過を調べたところ, 投与中止後 16 週間目で肉眼的および組織学的に, 正常の肝臓に回復することが明らかになった。肝臓が正常状態に回復するにつれて, 肝 NKT 細胞数が正常に回復することも明らかになった。四塩化炭素投与中止後 16 週目では, 肝細胞上に発現される CD1d の発現も正常に回復していた。このことから, 肝硬変において肝 NKT 細胞の減少は, 肝細胞上の CD1d の発現の低下によるものであると示唆された。臨床的な観点からみると, 肝硬変患者には, 高率に癌の発症がみられる。NKT 細胞は, パーフォリンや Fas L などの分子を用いて腫瘍細胞を殺傷し, 腫瘍免疫における重要なエフェクター細胞である⁷⁾。抗腫瘍活性を持つ NKT 細胞が, 傷害を受けた肝細胞上の CD1d の発現低下により減少し, そのために肝硬変で癌が

発症することが示唆された。

マウスのみならず、ヒトの肝臓においても、NKT細胞の割合が多い⁶⁾。肝硬変患者の肝リンパ球を解析すると、CD56陽性T細胞の選択的な減少が見られた¹³⁾。CD56陽性T細胞の一部はV α 24陽性のinvariant NKT細胞であることが知られており、本研究の結果とも一致する。その報告では肝硬変患者の肝細胞上のCD1dの発現は解析されておらず、今後の解析が待たれる。このように、マウスモデルのみならず、ヒトにおいても慢性肝障害・肝硬変においてNKT細胞の減少が見られる。また、原発性胆汁性肝硬変においては、胆管上皮細胞上で、NKT細胞に抗原提示をするCD1dの発現の増強がみられ、この病態に肝NKT細胞が関与していることが示唆されている¹⁴⁾。その他にも、種々の肝疾患においても、肝NKT細胞が病態と密接に関連している¹⁵⁾¹⁶⁾。

本研究では、四塩化炭素によって肝細胞が傷害を受け、NKT細胞の分化・維持に必須の分子であるCD1d分子の肝細胞上での発現が低下し、その結果、肝NKT細胞が選択的に減少することが示唆された。この結果は、臨床的にも、肝硬変から肝癌が発症するメカニズムの理解、さらには肝硬変の予防・治療につながるものと考えている。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導頂いた本学医動物学教室教授安保徹先生、同准教授川村俊彦先生および医動物学教室の皆様へ深謝申し上げます。また、組織の染色に関し、御指導頂きました本学第2病理学教室教授内藤眞先生および第2病理学教室の皆様にも深謝申し上げます。

文 献

- 1) Abo T, Kawamura T and Watanabe H: Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev* 174: 135 - 149, 2000.
- 2) Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T and Hiraide H: The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag⁺ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 174: 35 - 49, 2000.
- 3) Kawamura T, Toyabe S, Moroda T, Iiai T, Takahashi - Iwanaga H, Fukuda M, Watanabe H, Sekikawa H, Seki S and Abo T: Neonatal granulocytosis is a postpartum event which is seen in the liver as well as in the blood. *Hepatology* 26: 1567 - 1572, 1997.
- 4) Kronenberg M: Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 23: 877 - 900, 2005.
- 5) Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ and Baxter AG: NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21: 573 - 583, 2000.
- 6) Doherty DG and O'Farrelly C: Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 174: 5 - 20, 2000.
- 7) Kawamura T, Takeda K, Mendiratta SK, Kawamura H, VanKaer L, Yagita H, Abo T and Okumura K: Critical role of NK1⁺ T cells in IL-12-induced immune responses in vivo. *J Immunol* 160: 16 - 19, 1998.
- 8) Osman Y, Kawamura T, Naito T, Takeda K, VanKaer L, Okumura K and Abo T: Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of α -galactosyl-ceramide. *Eur J Immunol* 30: 1919 - 1928, 2000.
- 9) Kawamura T, Takeda K, Kaneda H, Matsumoto H, Hayakawa Y, Raulet DH, Ikarashi Y, Kronenberg M, Yagita H, Kinoshita K, Abo T, Okumura K and Smyth MJ: NKG2A inhibits invariant NKT cell activation in hepatic injury. *J Immunol* 182: 250 - 258, 2009.
- 10) Toyabe S, Seki S, Iiai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H, Hiraide H, Uchiyama M and Abo T: Requirement of IL-4 and liver NK1⁺ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol* 159: 1537 - 1542, 1997.
- 11) Kawachi Y, Arai K, Moroda T, Kawamura T, Umezu H, Naito M, Ohtsuka K, Hasegawa K, Takahashi - Iwanaga H, Iwanaga T, Shultz LD, Watanabe H and Abo T: Supportive cellular elements for hepatic T cell differentiation: T cells expressing intermediate levels of the T cell

- receptor are cytotoxic against syngeneic hepatoma, and are lost after hepatocyte damage. *Eur J Immunol* 25: 3452 - 3459, 1995.
- 12) Malhi H and Gores GJ: Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 134: 1641 - 1654, 2008.
 - 13) Kawarabayashi N, Seki S, Hatsuse K, Ohkawa T, Koike Y, Aihara T, Habu Y, Nakagawa R, Ami K, Hiraide H and Mochizuki H: Decrease of CD56⁺ T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35: 962 - 969, 2000.
 - 14) Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, Ansari AA, Rogers P, He XS, Koning F, Mikayama T, Van De Water J, Coppel RL, Kaplan M and Gershwin ME: Quantization and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 123: 1031 - 1043, 2002.
 - 15) Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y and Chisari FV: Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 192: 921 - 930, 2000.
 - 16) Ahmad A and Alvarez F: Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J Leukoc Biol* 76: 743 - 759, 2004.

(平成 21 年 1 月 15 日)