

門脈血再灌流後肝障害における NKT 細胞 および顆粒球の関与

嶋村 和彦

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：島山 勝義教授)

国際感染医学講座免疫・医動物学分野

(指導：安保 徹教授)

Association of NKT Cells and Granulocytes with Liver Injury after Reperfusion of the Portal Vein

Kazuhiko SHIMAMURA

Department of Regenerative and Transplant Medicine,

Division of Digestive and General Surgery

Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Katsuyoshi HATAKEYAMA)

Department of Infectious Disease Control and International Medicine,

Division of Immunology and Medical zoology

Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Toru ABO)

要 旨

急性肝虚血後の再灌流障害における白血球の関与を検討するために、マウスの門脈を 30 分間遮断後開放して肝虚血再灌流したモデルを作成し実験に用いた。このモデルマウスにおいて、肝内のリンパ球数が経時的に変動して肝障害が引き起こされた。肝内では NKT 細胞が最も増加しており T 細胞, NK 細胞はわずかに増加, またはある時点においては減少していた。肝内の NKT 細胞の増加を反映して血清中には IL-4, IFN- γ 双方の産生量が増加しており, Th0 タイプサイトカイン産生されていた。NKT 細胞欠損マウスである CD1d ノックアウトマウス, 抗ア

Reprint requests to: Kazuhiko SHIMAMURA
Department of Regenerative and Transplant Medicine
Division of Digestive and General Surgery
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科機能再建医学講座
消化器外科・一般外科学分野 嶋村 和彦

シアロ GM1 抗体を *in vivo* 投与し NK 細胞を除去したマウス, 抗 NK1.1 抗体を *in vivo* 投与し NK 細胞, NKT 細胞を除去したマウスいずれにおいても肝障害が抑制されていた. また CD1d ノックアウトマウス, 抗 NK1.1 抗体投与マウスは, NK 細胞のみを除去したマウスより肝障害が抑制されたことから NKT 細胞が NK 細胞を介し NK 細胞の細胞障害活性を増強している可能性も考えられた. NKT 細胞を除去したマウスは, 肝障害を完全には抑制しなかったため他の白血球の関与も検討した. 最も考え得る他の白血球は顆粒球であり, 事実顆粒球が肝障害の程度に比例し肝内に蓄積しており, 再灌流後肝障害を引き起こしている可能性が示唆された. 本研究において, NKT 細胞および顆粒球双方の蓄積が再灌流後肝障害を引き起こしている重要な一因である可能性が示唆された.

キーワード：NKT 細胞, 顆粒球, 肝障害, 再灌流, 急性虚血

緒 言

急性虚血後の臓器再灌流は外傷, 外科手術などで生じ, 再灌流後, 組織には低酸素に加えて生体の免疫反応が加わり, 激しい組織障害が惹起されている. 肝虚血再灌流後の肝障害に関して, 肝内への T 細胞の蓄積が肝障害を引き起こす要因の一つであることが報告されている^{1)–3)}. また肝内には多種のリンパ球サブセットが存在し, 特に NK 細胞, 胸腺外分化 T 細胞, NKT 細胞が多臓器に比べて豊富である特徴を有している^{4)–7)}. しかしながら, 既知の再灌流に関する報告^{1)–3)}では, これら肝内の豊富なリンパ球サブセットの再灌流後肝障害に関与について詳細な検討がなされていない.

そこで, 本研究は肝虚血再灌流障害における肝内白血球の関与を検討することを目的とし, マウスの門脈遮断により急性肝虚血モデルを作成してリンパ球, 顆粒球双方について種々の方法を用いて解析した.

材料と方法

8～15 週齢の C57BL/6 (B6), CD1d ノックアウトマウス⁸⁾⁹⁾, を用いた. CD1d ノックアウトマウスは B6 マウスをバックグラウンドとした. マウスの腹腔内に 50mg/kg の sodium pentobarbital

を投与, 麻酔して門脈を 30 分間遮断後開放した. 開放した時点をも 0 時間として経時的に屠殺し肝臓を採取した. 肝内単核球は既報の方法に従い分離した¹⁰⁾. 採取した肝臓を 200 ゲージのステンレススチールメッシュで濾し, 2% NCS MEM-HEPES (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 液に浮遊させた. 培養液で一度洗浄後, 35% パーコール液 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 15ml を加え 1200 × g, 15 分間密度勾配遠心法で細胞を分離した. 分離後のペレットは赤血球溶血液 (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA-Na, 170mM Tris, pH7.3) を加えて赤血球を溶解し, 2% NCS MEM-HEPES に再浮遊させた. 蛍光抗体法には FITC, PE, ビオチンで標識したモノクローナル抗体を用いた. ビオチン標識抗体にはトリカラー標識ストレプトアビジン (Caltag Laboratories, San Francisco, CA) を反応させた¹¹⁾. 使用したモノクローナル抗体は抗 CD3 抗体 (145-2C11), 抗 IL-2R β 抗体 (TM- β 1), 抗 NK1.1 抗体 (PK136), 抗マクロファージ抗体 (Mac-1) および抗顆粒球抗体 (Gr-1) (BD Biosciences, Mountain View, CA) で解析は FACScan (BD Biosciences) を用いた. 標識抗体による染色前に抗体の非特異結合防止目的で CD16/32 (2.4G2; BD Biosciences) を加えた. 死細胞は FSC および PI 法により除去した. NK, NKT 細胞除去には抗シアロ GM1 抗体 (20 μ l/mouse, Wako Pure Industries,

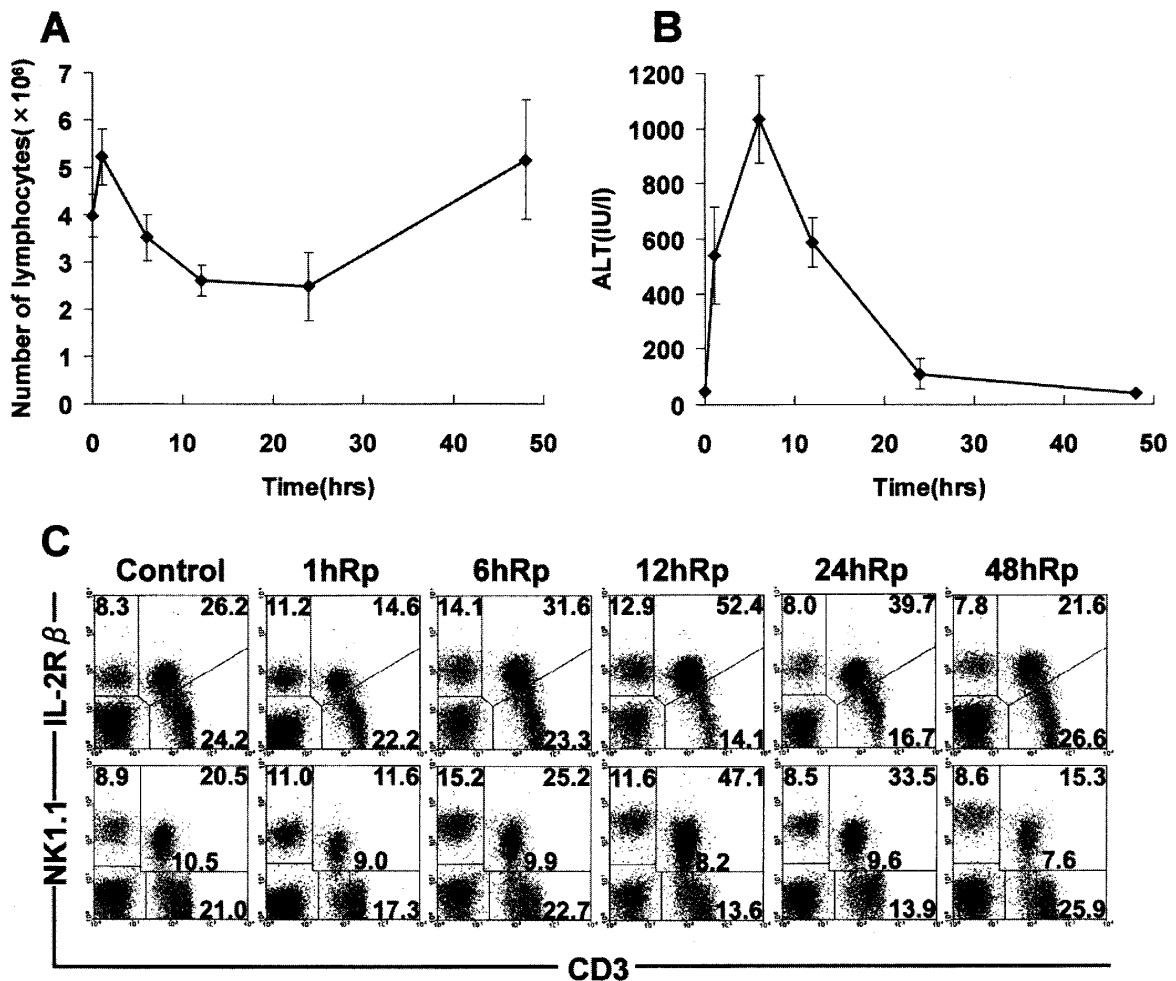


図1 門脈血再灌流後の肝内白血球数および血清ALT値の変動

肝内の白血球数 (A) および血清ALT値 (B) を経時的に測定した ($n=4$)。また代表的なFACSパターンを呈示した (C)。図内の数値は各サブセットの比率を示す。

Rp: Reperfusion.

Osaka, Japan) を実験1日前に、抗NK1.1抗体 (0.5mg/mouse, BD Biosciences) を実験3日前に腹腔内投与した。サイトカインはOpt EIA mouse IL-4 and IFN- γ sets (BD Biosciences) を用いELISA法により血清IL-4, IFN- γ を測定した。肝障害は血清alanine aminotransferase (ALT) 値を指標とし、エス・ティー・エーテストワコー (Wako Pure Industries) を用いて測定した。

結 果

再灌流後の肝臓内におけるリンパ球とそのサブセット分布の時間的変動

門脈血を30分間遮断しその後再灌流させた (図1)。リンパ球数は一時的に増加して ($3.9 \rightarrow 5.2 \times 10^6/\text{liver}$)、その後30時間後まで減少を続け再び増加に転じた。この変化の間血清ALT値は上昇し8~10時間後に最大となった。CD3およびIL-2R β , CD3およびNK1.1の二重染色で

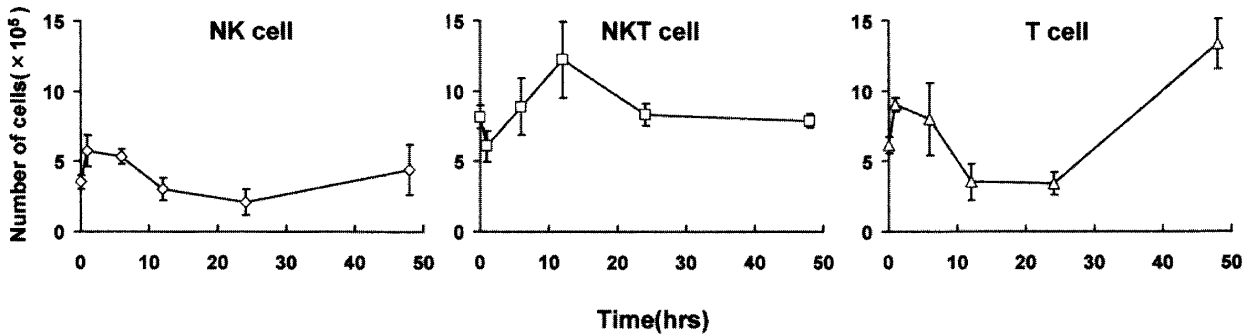


図2 門脈血再灌流後の肝内各リンパ球サブセット絶対数の変動
肝内のNK, NKT, T各細胞の絶対数を示した。

NK細胞 (CD3⁻IL-2Rβ⁺またはCD3⁻NK1.1⁺), CD3^{int}細胞 (CD3^{int}IL-2Rβ⁻), NKT細胞 (CD3^{int}NK1.1⁺), T細胞 (CD3^{high}IL-2Rβ⁻)を同定した(図1C). NK細胞比率は比較的変動無く, CD3^{int}細胞, NKT細胞の比率は変動した. CD3^{int}細胞およびNKT細胞両者の比率は1時間後に減少した後増加に転じ, およそ12時間後に最大となった.

細胞総数, リンパ球サブセット比率からNK細胞, NKT細胞, T細胞の絶対数を計算した(図2). NK細胞, T細胞数は早期相(10時間まで)で増加しその後減少したが再灌流約50時間後には回復した. NKT細胞数は最初減少し10~20時間後を最大として増加した. 同じく再灌流約50時間後には回復した.

再灌流後のサイトカイン産生

再灌流後のサイトカイン産生について検討する為, 血清IL-4, IFN-γの値を再灌流後経時的に測定した(図3A). 再灌流後6時間を最大として血清IL-4, IFN-γが増加しており, Th0タイプサイトカインが産生されていた.

再灌流後肝内ではNKT細胞が最も増加しており, NKT細胞自体のサイトカイン分泌への関与を検討した(図3B). NKT細胞を欠損するCD1dノックアウトマウスではIL-4ではなくIFN-γ値が減少していた.

NK細胞欠損またはNKT細胞欠損マウスにおける肝障害

NKおよびNKT細胞の再灌流後肝障害への関与を検討する為, NKT細胞欠損マウスであるCD1dノックアウトマウス⁸⁾および抗アジアロGM1抗体(aASGM1), 抗NK1.1抗体(aNK1.1)をそれぞれ*in vivo*投与したマウスを用いた(図4). 肝障害は血清ALT値を指標とした. CD1dノックアウトマウス, 抗アジアロGM1抗体投与マウス, 抗NK1.1抗体投与マウスいずれにおいても肝障害が著明に抑制されていた(図4).

再灌流後の肝障害における顆粒球の関与

以上からNKT細胞が再灌流後の肝障害に関与している可能性が考えられた. しかし, NKT細胞を除去したマウスは, 肝障害を完全には抑制しなかったため他の要因として顆粒球の関与の可能性も検討した(図5). 肝内における顆粒球(Mac-1⁺Gr-1⁺)とマクロファージ(Mac-1⁺Gr-1⁻)の増加を検討する為Mac-1, Gr-1による二重染色を行った. 肝内の顆粒球の著明な増加を認め, 再灌流6~12時間後が最大であった.

考 察

本研究により門脈血再灌流後の肝障害の要因が, NKT細胞および顆粒球により引き起こされる可能性が示唆された. 血流が停滞すると組織に

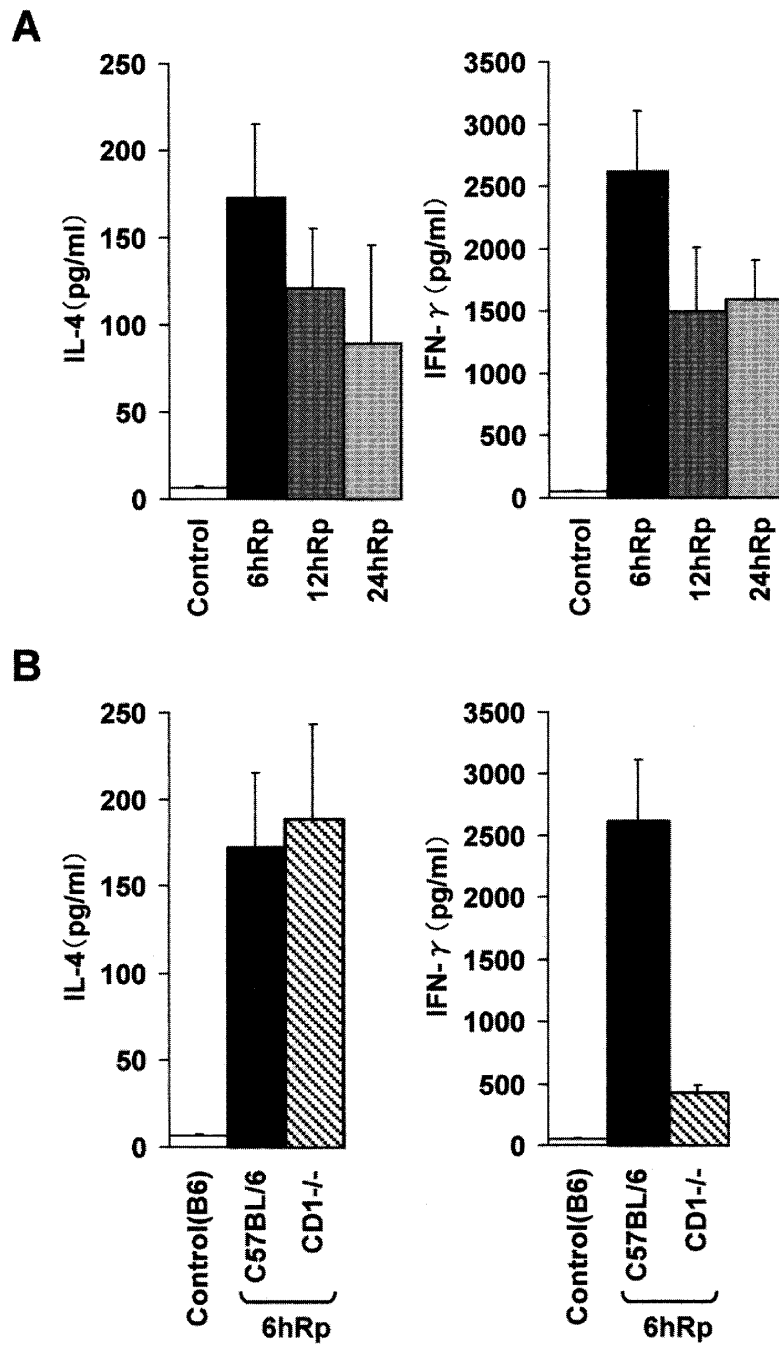


図3 門脈血再灌流後のサイトカイン産生
血清IL-4およびIFN γ をELISA法により
経時的に測定した(A). 再灌流6時間後にお
けるC57BL/6マウスとCD1dノックアウトマ
ウスのサイトカイン産生量の比較(B).

は低酸素状態がもたらされて肝細胞が障害されることは報告されていたが、本研究により肝内に白血球が蓄積して組織障害をさらに悪化させることが示された^{1)–3)13)–15)}。再灌流後の肝障害に CD4⁺フェノタイプを含む T 細胞が関与している報告^{1)–3)}もあるが、NK1.1 抗原の発現について

は言及していない。NKT 細胞の大部分は CD4⁺フェノタイプを有しており^{6)16)–19)}、本結果はそのような報告と合致する。再灌流後肝障害に顆粒球の関与を指摘している報告^{13)–15)}もあるが、いずれにしる今回の結果を支持している。

これら NKT 細胞や顆粒球を含む白血球の数の増加、肝内への移動という現象については、Th0 タイプサイトカインが肝内の NKT 細胞の活性化に関与している可能性が考えられる。NKT 細胞を欠損する CD1d ノックアウトマウスでは血清 IFN- γ 値の増加が抑制されていたので再灌流後の IFN- γ は NKT 細胞自身により産生されていた可能性が考えられる。他方で血清 IL-4 値の増加は抑制されておらず、IL-4 は肝内に存在する他のリンパ球サブセットにより産生された可能性が考えられる。顆粒球の場合は交感神経の活性化の関与や TNF α により顆粒球が活性化していた可能性も考えられる¹⁵⁾。

本現象における NKT 細胞の関与を NKT 細胞欠損マウスと種々の抗体投与マウスを用いて検討した。NKT 細胞欠損マウスである CD1d ノックアウトマウス、抗アシアロ GM1 抗体を *in vivo* 投与し NK 細胞を除去したマウスおよび抗 NK1.1 抗体を投与して NK 細胞、NKT 細胞ともに除去したマウスは、いずれにおいても肝障害が抑制されていた。しかし CD1d ノックアウトマウス、抗 NK1.1 抗体を投与したマウスにおいて肝障害が他のマウスに比べ、より抑制されていたため、活性化した NKT 細胞が NK 細胞を介して細胞障害性を増強させている可能性も考えられた。今後、ど

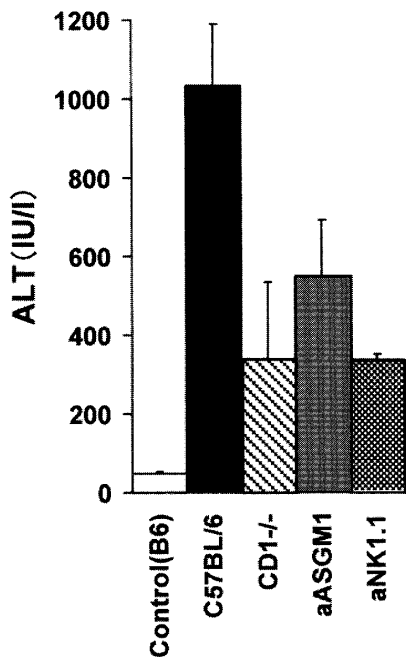


図 4 C57BL/6, CD1d ノックアウト, 抗アシアロ GM1 抗体投与 (aASGM1), 抗 NK1.1 抗体投与 (aNK1.1) 各マウスにおける再灌流後肝障害

再灌流 6 時間後における各マウスの血清 ALT 値を比較した。

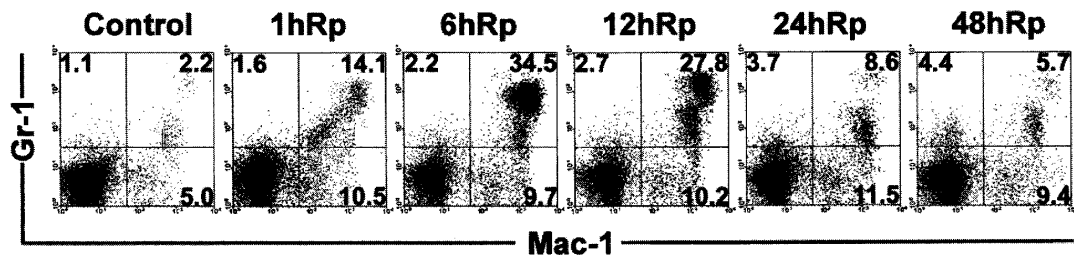


図 5 肝内顆粒球の変動

Mac-1 および Gr-1 の重染色により顆粒球 (Mac-1⁺Gr-1⁺) の変動を検討した。図中の数値は各サブセットの比率を示す。

のようなメカニズムで肝細胞がリンパ球により傷害されるかは検討していかなければならない。

今回の研究により NKT 細胞と NK 細胞の肝障害への関与が示されたが、種々の抗体投与マウスなどを用いて NKT 細胞と NK 細胞を除去しても肝障害抑制がいつも不完全であり、他の白血球の関与を考える必要性があった。最も考えられるものは顆粒球であった。事実肝内顆粒球の変動を Mac-1, Gr-1 による二重染色を行い検討すると再灌流 6 ~ 12 時間を最大として顆粒球が増加し、再灌流 50 時間後には回復していた。血清 ALT 値の増減とほぼ一致しており、顆粒球による肝障害の可能性も示唆された。今回は肝内の個々の白血球分画の再灌流後肝障害への関与を示したが、今後は NKT 細胞, NK 細胞および顆粒球の相互作用, またはマクロファージや血管内皮細胞との相互作用を検討しなければならない。

結 語

低酸素状態だけでなく NKT 細胞と顆粒球の蓄積が門脈血流不全後の再灌流後肝障害に関与している可能性が示唆される。同じ現象が外傷, 外科手術, 様々な炎症など多くの原因により生じており, 本結果はそのような障害を低減させる治療法の一助となることが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導御校閲を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科免疫・医動物学分野, 安保徹教授, 消化器・一般外科学分野, 島山勝義教授に深謝致します。また直接御指導頂きました免疫・医動物学分野, 関川弘雄助教授, 川村宏樹講師, 教室員の皆様に深謝致します。

尚, 本研究の一部は第 31 回日本免疫学会 (2001 年, 大阪) にて発表した。

文 献

- 1) Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN and Aw TY: T-lymphocyte-derived tumor necrosis factor exacerbates anoxia-reoxygenation-induced neutrophil-endothelial cell adhesion. *Circ Res* 86: 205-213, 2000.
- 2) Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L and Engelhardt JF: CD4⁺ T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 100: 279-289, 1997.
- 3) Moine OL, Louis H, Demols A, Desalle F, Demoor F, Quertinmont E, Goldman M and Deviere J: Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin 10 in mice. *Hepatology* 31: 1266-1274, 2000.
- 4) Abo T, Ohteki T, Seki S, Koyamada N, Yoshikai Y, Masuda T, Rikiishi H and Kumagai K: The appearance of T cells bearing self-reactive T cell receptor in the livers of mice injected with bacteria. *J Exp Med* 174: 417-424, 1991.
- 5) Sato K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Ymagiwa S, Watanabe H, Asakura H and Abo T: Evidence for extrathymic generation of intermediate TCR cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J Exp Med* 182: 759-767, 1995.
- 6) Watanabe H, Miyaji C, Kawachi Y, Iiai T, Ohtsuka K, Iwanaga T, Takahashi-Iwanaga H and Abo T: Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1⁺ T cells in various immune organs. NK1.1⁺ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J Immunol* 155: 2972-2983, 1995.
- 7) Abo T, Kawamura T and Watanabe H: Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev* 174: 135-149, 2000.
- 8) Mendiratta SK, Martin WD, Hong S, Boesteanu A, Joyce S and Kaer LV: CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 6: 469-477, 1997.
- 9) Smiley ST, Kaplan MH and Grusby JJ: Immuno-globulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* 275: 977-979, 1997.
- 10) Kawachi Y, Watanabe H, Moroda T, Haga M, Iiai T, Hatakeyama K and Abo T: Self-reactive

1) Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN and Aw TY: T-lymphocyte-derived tumor necrosis factor exacerbates anoxia-reoxygenation-

- T cell clones in a restricted population of IL-2 receptor β^+ cells expressing intermediate levels of the T cell receptor in the liver and other immune organs. *Eur J Immunol* 25: 2272 - 2278, 1995.
- 11) Yamagiwa S, Sugahara S, Shimizu T, Iwanaga T, Yoshida Y, Honda S, Watanabe H, Suzuki K, Asakura H and Abo T: The primary site of CD4⁻ 8⁻ B220⁺ T cells in *lpr* mice — the appendix in normal mice. *J Immunol* 160: 2665 - 2674, 1998.
 - 12) Osman Y, Kawamura T, Naito T, Takeda K, van Kaer L, Okumura K and Abo T: Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of α -galactosylceramide. *Eur J Immunol* 30: 1919 - 1928, 2000.
 - 13) Jaeschke H, Farhood A and Smith CW: Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 4: 3355 - 3359, 1990.
 - 14) Jaeschke H: Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5: 402 - 408, 1998.
 - 15) Colletti LM, Kunkel SL, Walz, A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA and Strieter RM: The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 23: 506 - 514, 1996.
 - 16) Kikly K and Dennert G: Evidence for extrathymic development of TNK cells. NK1.1⁺ CD3⁺ cells responsible for acute marrow graft rejection are present in thymus-deficient mice. *J Immunol* 149: 403 - 412, 1992.
 - 17) Makino Y, Yamagata N, Sasho T, Adachi Y, Kanno R, Koseki H, Kanno M and Taniguchi M: Extrathymic development of V α 14-positive T cells. *J Exp Med* 177: 1399 - 1408, 1993.
 - 18) Bix M and Locksley RM: Natural T cells. Cells that coexpress NKRP-1 and TCR. *J Immunol* 155: 1020 - 1022, 1995.
 - 19) Vicari AP and Zlotnik A: Mouse NK1.1⁺ T cells: a new family of T cells. *Immunol Today* 17: 71 - 76, 1996.

(平成 16 年 1 月 20 日受付)