

180. 免疫寛容誘導による肝虚血再灌流障害の軽減に関する検討

内田 洋一郎

Key words : galectin-9, 肝虚血再灌流障害, 自然免疫, マクロファージ, T 細胞

田附興風会 医学研究所 北野病院
消化器センター外科
第1研究部 (癌研究部)

緒 言

肝虚血再灌流障害 (Ischemia Reperfusion Injury: IRI) において, CD4 陽性 T 細胞がその障害度を規定し重要な役割を果たしている¹⁾. T 細胞に発現する TIM (T cell immunoglobulin mucin family) 分子が同定され²⁾, 肝 IRI を TIM-1/TIM-4 シグナルは免疫賦活により増悪³⁾, TIM-3/galectin-9 シグナルは免疫寛容により軽減⁴⁾する方向に作用することが判明した. galectin-9 は helper T1 細胞に発現する TIM-3 のリガンドとして作用することで抗炎症作用をもたらすこと⁵⁾が解明されて以来, Th17 細胞の抑制作用⁶⁾, 制御性 T 細胞の活性化作用⁷⁾が知られるようになった多機能を有するレクチンの1種である. そこで我々は, galectin-9 に着目しこれを肝 IRI 時に投与することで肝障害が軽減できないかと考えた. galectin-9 は TIM-3 を発現する CD4 陽性 helper T1 細胞に作用しアポトーシスを誘導することで IFN- γ の産生を抑制し, マクロファージを介した免疫応答に負のフィードバックがかかり免疫寛容が誘導される. その結果として, 肝 IRI の軽減に期待できるのではないかと考え, マウス肝 IRI モデルを用いて, galectin-9 の肝保護効果について検討を行った.

方 法

マウス 70%肝部分虚血再灌流モデルを使用した. 簡潔に要約すると, 全身麻酔下に開腹し, 血管クリップにて肝 70%領域を支配する門脈・胆管・肝動脈を一括クランプし, 90 分後にデクランプにより再灌流した.

野生型マウスおよび galectin-9 ノックアウトマウスに虚血再灌流による障害を加え, galectin-9 (recombinant galectin-9: GalPharma Co., Ltd.) 投与群および非投与群を作製し, 再灌流後 6/24 時間後に血液および肝組織を採取した. 肝障害度を血中 ALT 値の推移および肝組織の HE 染色にて病理学的に評価を行い, T 細胞/マクロファージ/好中球の炎症細胞浸潤の評価を免疫染色, 肝組織中の炎症性サイトカイン (TNF- α /IL-1 β /IL-6/IFN- γ) およびケモカイン (CXCL-1/CXCL-2) の発現を RT-PCR 解析, さらにアポトーシス評価として tunel 染色および Cleaved-Caspase3 の定量 (Western blot analysis) を行った.

結 果

1. 肝虚血再灌流障害における血清 ALT 値, 組織評価

肝虚血再灌流後, 6 時間および 24 時間の血清 ALT 値は, galectin-9 ノックアウトマウスではいずれにおいても野生型に比べ有意に上昇したが, galectin-9 投与によりその障害は著明に抑制された (図 1A). また HE 染色による肝組織の障害度をスコアリング (Suzuki's score) したところ, 血清 ALT 値と非常に相関しており galectin-9 欠損状態では肝組織の破壊が著しく, 逆に投与群において障害範囲が有意に抑制された (図 1B).

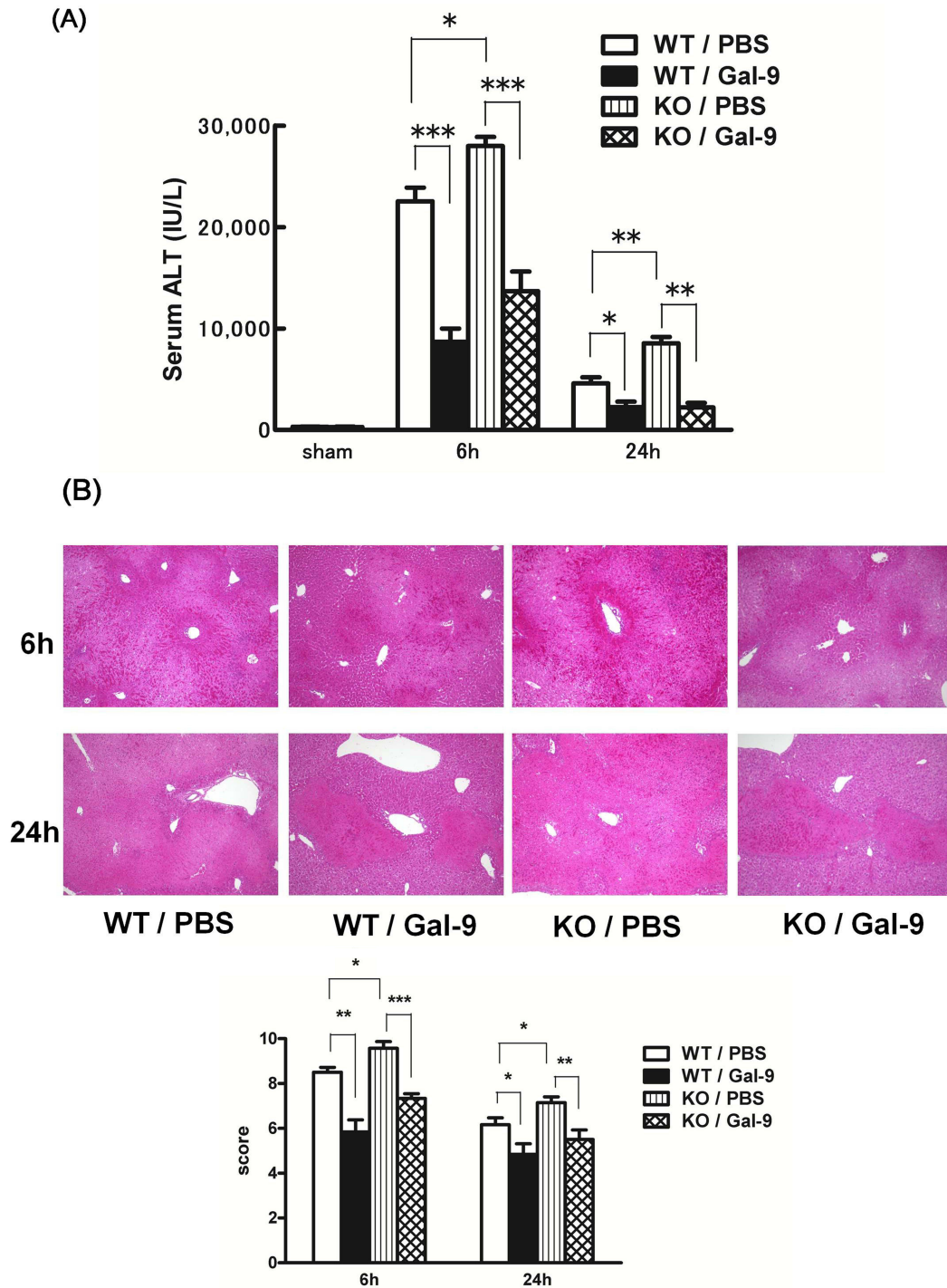


図 1. 肝虚血再灌流障害における血清 ALT 値, HE 染色像および障害度スコア.

A) 野生型マウスに比べ galectin-9 ノックアウトマウスでは著明に肝障害度が増悪し, galectin-9 投与群では有意な抑制効果を認めた. B) 代表的な HE 染色像を示す ($\times 100$), 肝障害のスコアリング (Suzuki's score: necrosis, sinusoidal congestion, and centrilobular ballooning, 0-4) では, 血清 ALT 値と同様, galectin-9 投与により有意に肝障害の軽減を認めた ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; $n=6-8/\text{group}$, Student t test).

2. galectin-9 による肝組織への炎症細胞浸潤の抑制

炎症細胞として、T 細胞 (CD3)・マクロファージ (CD68) および好中球 (Ly-6G) による肝組織における免疫染色を行った。T 細胞の浸潤は、再灌流後 6 時間の galectin-9 投与群において有意に抑制された (図 2A)。

マクロファージの浸潤は、6 時間後で野生型マウスに比べて galectin-9 ノックアウトマウスにおいて浸潤が著明であったが、galectin-9 投与群においては 6 時間、24 時間ともに抑制された (図 2B)。

好中球に関しては、6 時間において galectin-9 ノックアウトマウスでは有意な浸潤を認め、24 時間においては galectin-9 投与群で有意に抑制された (図 2C)。

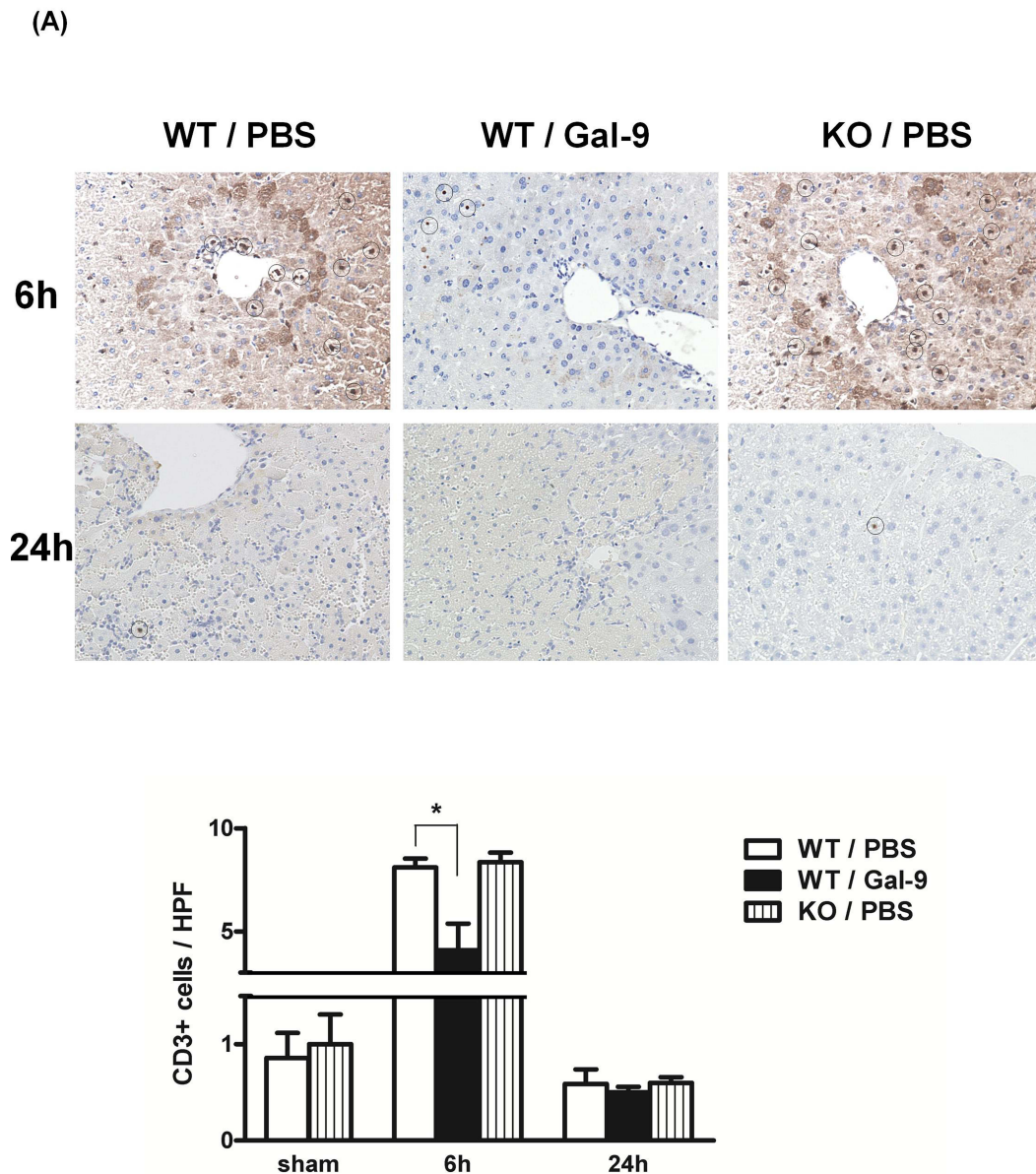


図 2. 肝虚血再灌流障害における炎症細胞の浸潤 (T 細胞).

A) galectin-9 投与群において CD3 陽性細胞 (○印) の浸潤が有意に抑制された ($\times 400$, $*p < 0.05$; $n=3/\text{group}$, Student t test).

(B)

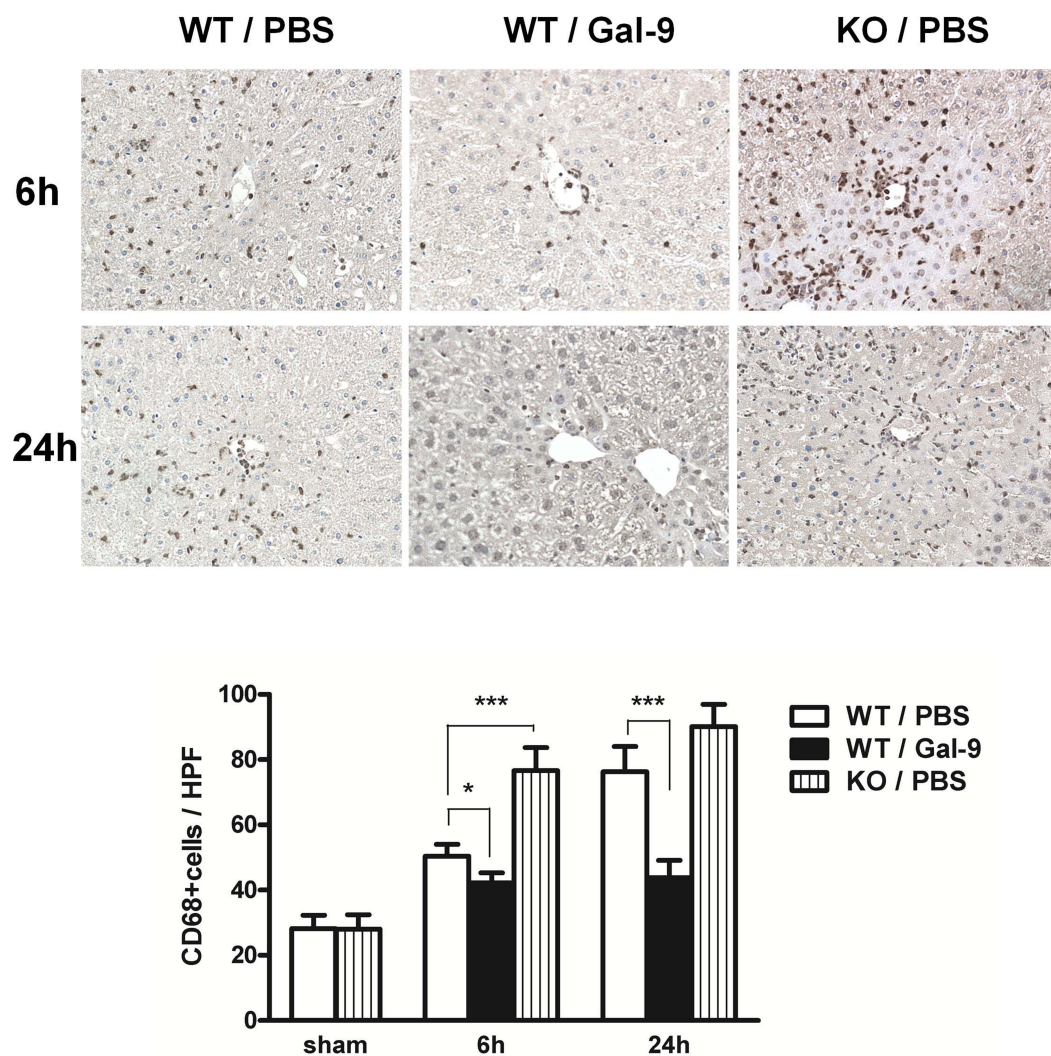


図2. 肝虚血再灌流障害における炎症細胞の浸潤（マクロファージ）.

B) CD68 陽性細胞は、6 時間 24 時間いずれも galectin-9 投与群で有意に減少した ($\times 400$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n=3$ /group, Student t test).

(C)

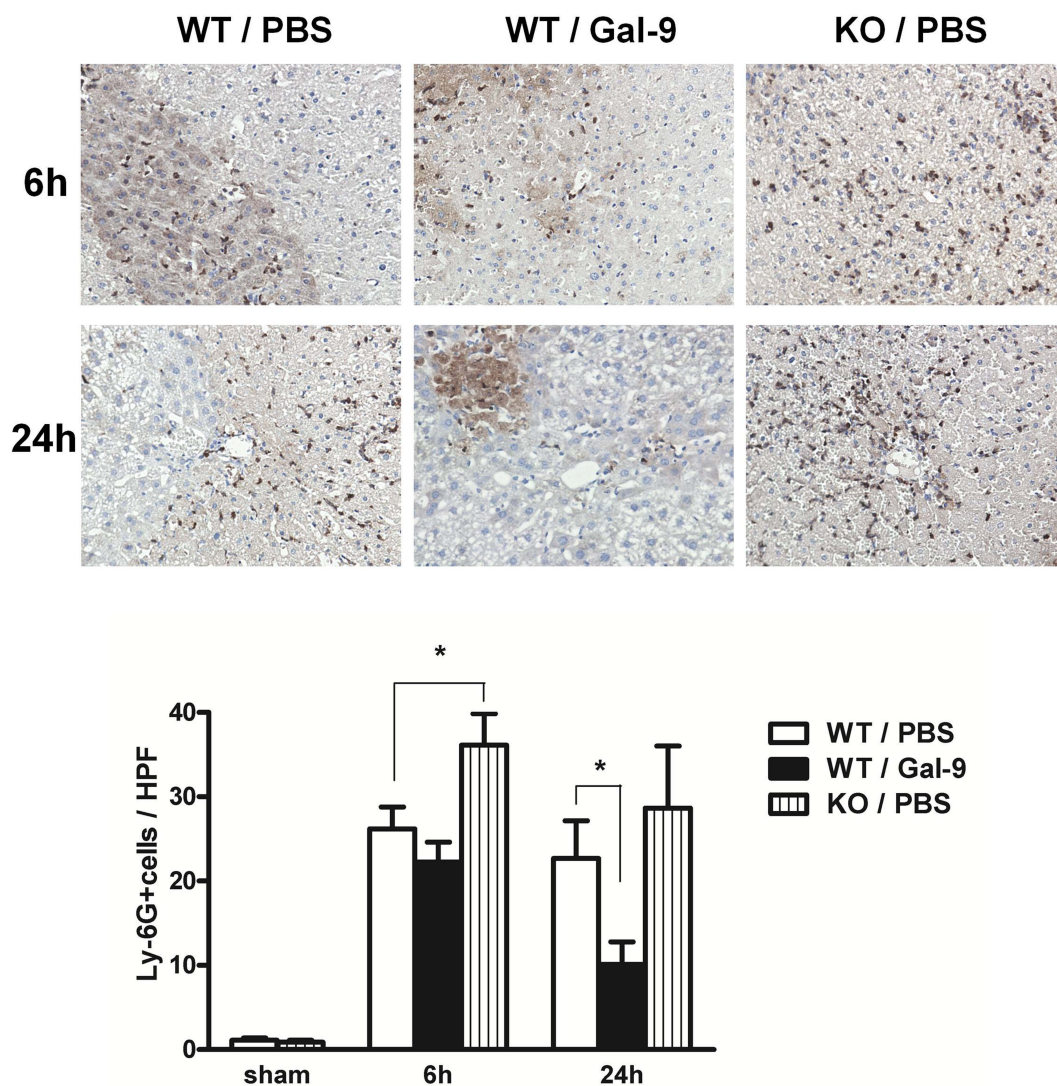


図2. 肝虚血再灌流障害における炎症細胞の浸潤（好中球）.

C) Ly-6G 陽性細胞は、24 時間において galectin-9 投与群で有意に抑制された ($\times 400$, $*p < 0.05$; $n=3/\text{group}$, Student t test).

3. 肝組織における炎症性サイトカインおよびケモカインの遺伝子発現

肝組織より得られた mRNA から cDNA を作製し RT-PCR により各種遺伝子発現の解析を行った。T 細胞に代表されるサイトカインである IL-6 および IFN- γ の発現は, galectin-9 投与において有意に抑制され, 好中球遊走因子である CXCL-1/CXCL-2 といったケモカインの発現は galectin-9 欠損では有意に上昇しているのに対し, galectin-9 投与によりその発現は抑制された (図 3)。

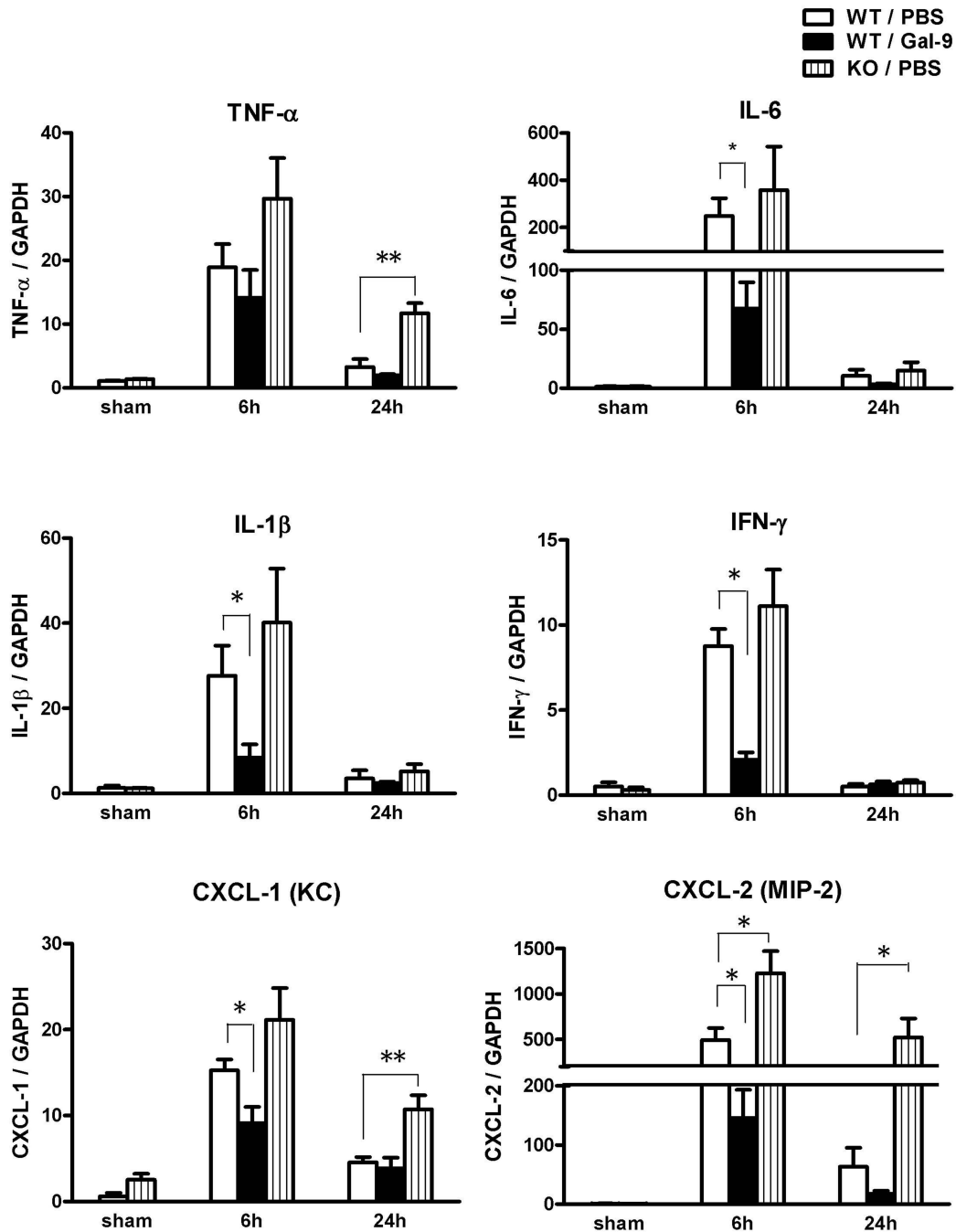


図 3. 肝組織における炎症性サイトカイン・ケモカインの発現。

IL-6, IFN- γ は 6 時間後に galectin-9 投与群で有意に抑制されて, CXCL-1 や CXCL-2 は galectin-9 欠損下で有意に増加した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n=4-5$ /group, Student t test).

4. galectin-9 による抗アポトーシス作用

galectin-9 がアポトーシスに与える影響を調べるために、組織標本を用いて tunel 染色、そして肝組織から抽出したタンパクを用いて Cleaved-Caspase3 の発現を western blot にて定量した。

tunel 染色において陽性細胞は galectin-9 投与群において有意に少ないのに対して、galectin-9 ノックアウトマウスでは有意に増加した (図 4A)。

肝組織中の cleaved-caspase3 の発現 (Western blot analysis) も tunel 染色と同様の傾向を認め、galectin-9 欠損状態では著明に発現が亢進し、galectin-9 投与群では抑制された (図 4B)。

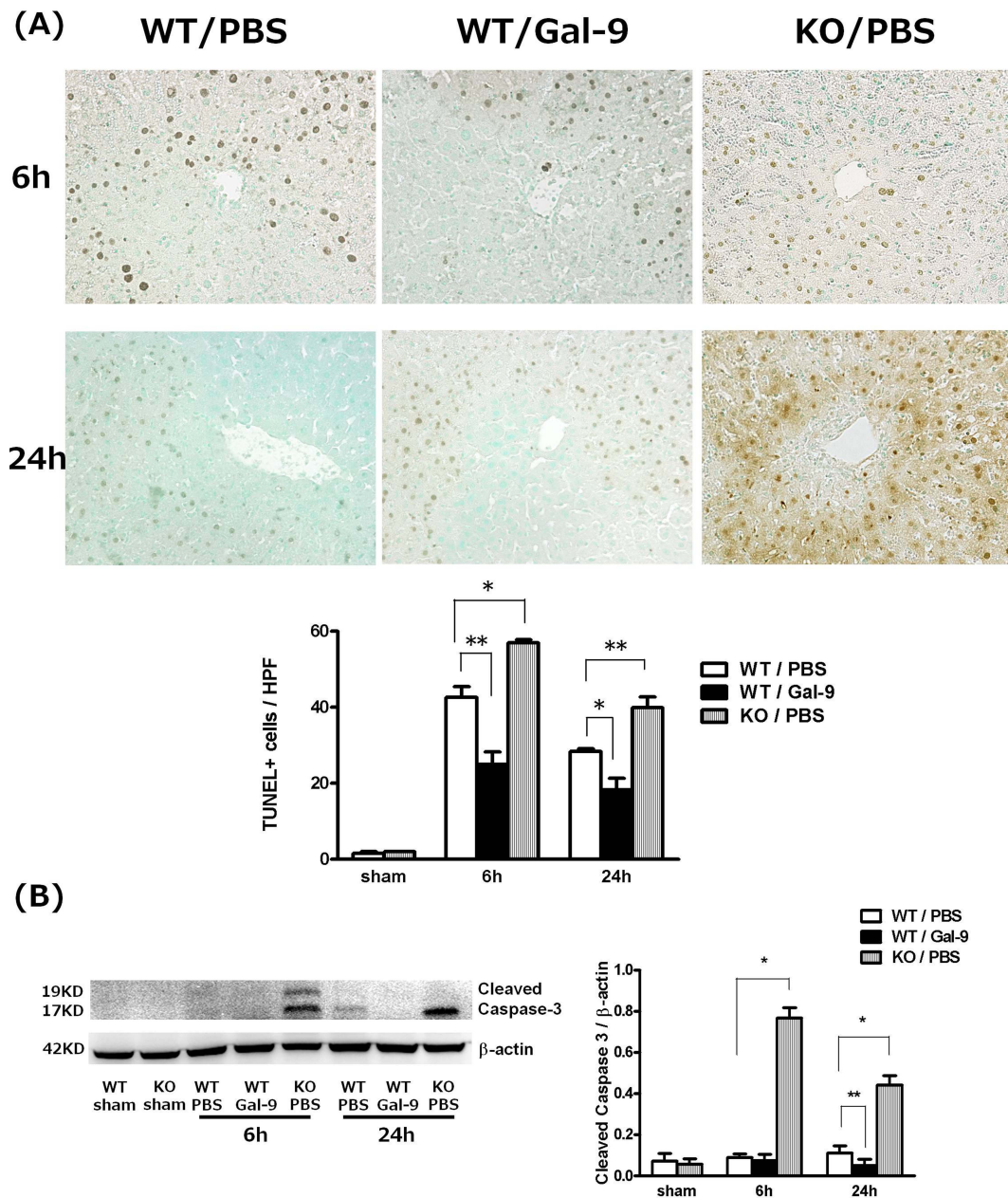


図 4. 肝組織におけるアポトーシスの評価。

A) galectin-9 欠損下では tunel 陽性細胞は有意に増加し、galectin-9 投与群において抑制された ($\times 400$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$; $n=5-6/\text{group}$, Student t test). B) Cleaved caspase-3 の発現も tunel 染色と同様の結果を示した ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$; $n=3-5/\text{group}$, Student t test).

考 察

肝虚血再灌流障害は免疫賦活と免疫寛容の折衝により、その障害度が規定され则认为している。galectin-9は、T細胞/マクロファージ/好中球といった炎症細胞の浸潤制御、炎症性サイトカイン・ケモカインの抑制作用、さらに肝細胞のアポトーシス抑制により、肝保護効果を示すことが判明した。

虚血再灌流時に galectin-9 が生体内でどのように発現するのか、どのような細胞が産生し障害を制御しうるのか、今後さらなる研究が必要である。

尚、今回の研究成果は、国際雑誌 *Liver Transplantation* に掲載された⁸⁾。

共同研究者

本研究の共同研究者は、田附興風会医学研究所北野病院第1研究部（兼乳腺外科）山内清明、香川大学医学部免疫学教室仁木敏朗、京都大学医学部肝胆膵移植外科大学院医学研究科（兼田附興風会医学研究所北野病院第1研究部客員研究員）平尾浩史および門野賢太郎である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Zwacka, R. M., Zhang, Y., Halldorson, J., Schlossberg, H., Dudus, L. & Engelhardt, J. F. : CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J. Clin. Invest.*, **100** : 279-89, 1997.
- 2) Monney, L., Sabatos, C. A., Gaglia, J. L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E. A., Coyle, A. J., Sobel, R. A., Freeman, G. J. & Kuchroo, V. K. : Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, **415** : 536-541, 2002.
- 3) Uchida, Y., Ke, B., Freitas, M. C., Ji, H., Zhao, D., Benjamin, E. R., Najafian, N., Yagita, H., Akiba, H., Busuttil, R. W. & Kupiec-Weglinski, J. W. : The emerging role of T cell immunoglobulin mucin-1 in the mechanism of liver ischemia and reperfusion injury in the mouse. *Hepatology*, **51** : 1363-1372, 2010.
- 4) Uchida, Y., Ke, B., Freitas, M. C., Yagita, H., Akiba, H., Busuttil, R. W., Najafian, N. & Kupiec-Weglinski, J. W. : T-cell immunoglobulin mucin-3 determines severity of liver ischemia/reperfusion injury in mice in a TLR4-dependent manner. *Gastroenterology*, **139** : 2195-2206, 2010.
- 5) Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., Zheng, X. X., Strom, T. B. & Kuchroo, V. K. : The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.*, **6** : 1245-1252, 2005.
- 6) Oomizu, S., Arikawa, T., Niki, T., Kadowaki, T., Ueno, M., Nishi, N., Yamauchi, A. & Hirashima, M. : Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner. *Clin. Immunol.*, **143** : 51-58, 2012.
- 7) Seki, M., Oomizu, S., Sakata, K. M., Sakata, A., Arikawa, T., Watanabe, K., Ito, K., Takeshita, K., Niki, T., Saita, N., Nishi, N., Yamauchi, A., Katoh, S., Matsukawa, A., Kuchroo, V. & Hirashima, M. : Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin. Immunol.*, **127** : 78-88, 2008.
- 8) Hirao, H., Uchida, Y., Kadono, K., Tanaka, H., Niki, T., Yamauchi, A., Hata, K., Watanabe, T., Terajima, H. & Uemoto, S. : The protective function of galectin-9 in liver ischemia and reperfusion injury in mice. *Liver Transplantation*, **21** : 969-981, 2015.