

## 164. 急性肝障害における DNAM-1 の役割

鍋倉 幸

\*筑波大学 生命領域学際研究センター 免疫学研究室

Key words : 免疫学, 急性肝障害, ILC1, DNAM-1, IFN- $\gamma$

### 緒言

急性肝障害は、急激かつ高度の肝細胞機能障害に基づいて肝不全症状をきたし、多臓器不全に繋がる事も多い致死率の高い疾患である [1]。先進国では非肝炎ウイルス性の化学物質や薬物を原因とする急性肝障害が殆どである。これら非ウイルス性急性肝障害の発症と増悪に関し、肝細胞死・炎症・免疫応答が関与している事は広く知られている [2]。しかし急性肝障害発症や増悪の分子機序、特に免疫細胞受容体の関与については未だ完全には解明されていない。

近年、新しい免疫細胞サブセットとして自然リンパ球 (ILC) が同定された。ILC は抗原受容体を発現せず、活性化後に特定のサイトカインの産生で特徴付けられる免疫細胞である [3, 4]。ILC のうちグループ 1 ILC (ILC1) は肝臓にのみ多く存在し、高いインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 産生能を持つナチュラルキラー (NK) 細胞様の免疫細胞である [3, 4]。しかしながら肝臓 ILC1 の活性化機序のみならず、肝臓の恒常性維持並びに肝障害や肝再生における肝臓 ILC1 の生理的・病理的な役割は未だ全く明らかになっていない。

DNAM-1 は NK 細胞の細胞傷害に関与し、CD8 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  産生の共刺激分子として作用する活性化受容体である [5, 6]。著者らは肝臓 ILC1 が DNAM-1 を非常に強く発現する事を見出した。次に野生型 (WT) 及び *DNAM-1* 欠損 (*Cd226*<sup>-/-</sup>) マウスに対して四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) を投与して急性肝障害を誘導した結果、*Cd226*<sup>-/-</sup> マウスに於いて肝障害が増悪した。この肝障害の差は T 細胞・B 細胞・NKT 細胞が存在しない *Rag-1* 欠損 (*Rag1*<sup>-/-</sup>) マウスと *Rag-1*・*DNAM-1* 両欠損 (*Rag1*<sup>-/-</sup>*Cd226*<sup>-/-</sup>) マウスの間でも観察された。また、ILC1 と NK 細胞を除去出来る抗 NK1.1 抗体 (PK136) 投与にて CCl<sub>4</sub> 誘導肝障害が増悪した。更に *in vitro* で肝臓 ILC1 の DNAM-1 を架橋刺激した結果、肺と腎臓で組織障害を抑制する事が報告されている IFN- $\gamma$  の産生が亢進した。故に、肝臓 ILC1 が発現する DNAM-1 が IFN- $\gamma$  産生を促進し、肝障害を抑制している事が強く示唆された。

上記の結果から、CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害モデルに於いて、肝臓 ILC1 が発現する DNAM-1 が IFN- $\gamma$  を促進し、急性肝障害を抑制している事が強く示唆された。従って、当該研究課題では急性肝障害における肝臓 ILC1 が発現する DNAM-1 の役割を解明する事を目的とした。この結果を受けて以下の 3 点を明らかにする。

- (1) ILC1 が急性肝障害の抑制に寄与する免疫細胞である
- (2) DNAM-1 が ILC1 の活性化や IFN- $\gamma$  産生等の機能に必須である
- (3) IFN- $\gamma$  が急性肝障害の抑制に重要な役割を果たしている

### 方法

#### 1. WT マウスと *Cd226*<sup>-/-</sup> マウスに於ける CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害の重症度の比較

WT 及び *Cd226*<sup>-/-</sup> マウスに対して CCl<sub>4</sub> を投与し、血漿 ALT 値にて急性肝障害の重症度を比較し、*Cd226*<sup>-/-</sup> マウスに於いて CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害が増悪する事を確認した。更に、適応免疫細胞である  $\alpha\beta$  T 細胞・ $\gamma\delta$  T 細胞・NKT 細胞が発現する DNAM-1 が急性肝障害の増悪に必要なのか、自然免疫細胞である NK 細胞・ILC1 が発現する DNAM-1 が急性肝障害の増悪に必要なのかを決定する為、*Rag1*<sup>-/-</sup> マウスと *Rag1*<sup>-/-</sup>*Cd226*<sup>-/-</sup> マウスに於ける CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害を比較した。

## 2. NK細胞かつ又はILC1の除去によるCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害の重症度の比較

ILC1は残存するが、NK細胞を優先的に除去する抗 asialo GM1 抗体の量と投与経路を検討した。その後、抗 asialo GM1 抗体の投与によりNK細胞を選択的に除去されたマウスと、ILC1とNK細胞の両方を除去する抗NK1.1抗体(PK136)の投与されたマウスに対しCCl<sub>4</sub>を投与して急性肝障害を誘導した。両群の血漿ALT値を比較し、ILC1が肝障害抑制に寄与する細胞である可能性を検討した。

## 3. CCl<sub>4</sub>投与後のWT及びCd226<sup>-/-</sup>マウスの肝臓ILC1の評価

WT及びCd226<sup>-/-</sup>マウスにCCl<sub>4</sub>を投与し、肝臓ILC1の存在率・細胞数・詳細な表現型(活性化マーカー・細胞傷害分子・サイトカイン受容体等)・IFN- $\gamma$ 産生をフローサイトメトリーで評価した。

## 4. 肝臓ILC1に対するDNAM-1刺激

WTマウスから肝臓ILC1を単離し、*in vitro*に於いて肝臓ILC1のDNAM-1を抗DNAM-1抗体で架橋刺激し、IFN- $\gamma$ の産生を評価した。

## 5. IFN- $\gamma$ 中和によるCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害の重症度の評価

WTマウスに対しIFN- $\gamma$ 中和抗体を投与後にCCl<sub>4</sub>を投与し、急性肝障害の重症度を評価した。

# 結果

## 1. WTマウスとCd226<sup>-/-</sup>マウスに於けるCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害の重症度の比較

WT及びCd226<sup>-/-</sup>マウスに対してCCl<sub>4</sub>を投与した結果、WTマウスと比較してCd226<sup>-/-</sup>マウスは高い血漿ALT値を示し、CCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害が増悪した事が示された(図1A)。更に、Rag1<sup>-/-</sup>マウスとRag1<sup>-/-</sup>Cd226<sup>-/-</sup>マウスに於けるCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害を比較した所、Rag1<sup>-/-</sup>と比較してRag1<sup>-/-</sup>Cd226<sup>-/-</sup>マウスは高い血漿ALT値を示し、急性肝障害が増悪した事が示された(図1B)。従って、DNAM-1はCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害の軽快に寄与する事が明らかとなった。

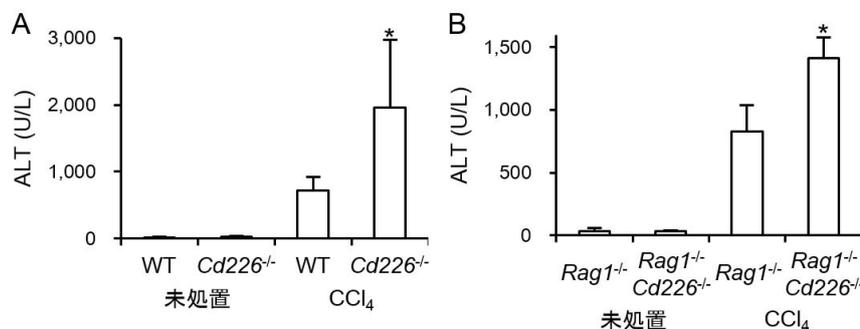


図1. 自然免疫細胞のDNAM-1はCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害の軽快に寄与するマウスへCCl<sub>4</sub>を投与後、1日後に肝障害を血漿ALT値にて評価した。

(A) WT及びCd226<sup>-/-</sup>マウスに於けるALT値。\* $p < 0.005$  vs. WT、CCl<sub>4</sub> ( $t$ 検定)

(B) Rag1<sup>-/-</sup>及びRag1<sup>-/-</sup>Cd226<sup>-/-</sup>マウスに於けるALT値。\* $p < 0.005$  vs. Rag1<sup>-/-</sup>、CCl<sub>4</sub> ( $t$ 検定)

## 2. NK細胞かつ又はILC1の除去によるCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害の重症度の比較

抗 asialo GM1 抗体の投与によりNK細胞を選択的に除去されたWTマウスと、ILC1とNK細胞の両方を除去する抗NK1.1抗体(PK136)を投与されたWTマウスに対しCCl<sub>4</sub>を投与した。その結果、抗 asialo GM1 抗体投与にて急性肝障害は軽快・増悪ともに確認されなかった一方で、PK136投与では急性肝障害が増悪した(図2)。従って、肝臓ILC1が肝障害抑制に寄与する細胞である事が強く示唆された。

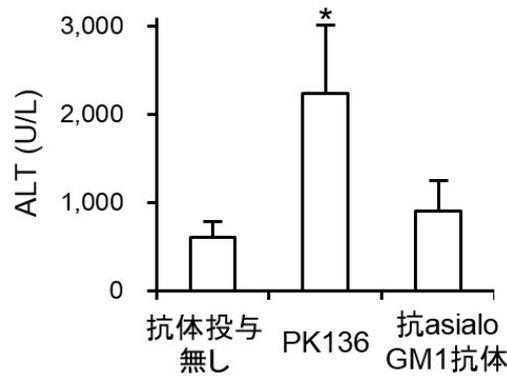


図2. ILC1はCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害の軽快に寄与する  
WTマウスに抗asialo GM1抗体或いはPK136を投与した。その後CCl<sub>4</sub>を投与し、1日後に急性肝障害を血漿ALT値にて評価した。  
\* $p < 0.005$  vs. 抗体投与無し・抗asialo GM1抗体 ( $t$ 検定)

### 3. CCl<sub>4</sub>投与後のWT及びCd226<sup>-/-</sup>マウスの肝臓ILC1の評価

WT及びCd226<sup>-/-</sup>マウスにCCl<sub>4</sub>を投与し、1日後の肝臓ILC1の表現型をフローサイトメトリーにて評価した。両群の間で肝臓ILC1の存在率や細胞数には変化がなかった。未処置WTマウスの肝臓ILC1と比較し、CCl<sub>4</sub>を投与されたWTマウスの肝臓ILC1は活性化マーカーCD69の発現を上昇させている事が確認された(図3A)。しかしながら、Cd226<sup>-/-</sup>マウスではCCl<sub>4</sub>を投与後に肝臓ILC1に於けるCD69の発現上昇が障害されていた(図3A)。更に、未処置及びCCl<sub>4</sub>を投与されたWT及びCd226<sup>-/-</sup>マウスから肝臓ILC1を単離し、*in vitro*で培養してIFN- $\gamma$ 産生を評価した。未処置WTマウスの肝臓ILC1と比較し、CCl<sub>4</sub>を投与されたWTマウスの肝臓ILC1はIFN- $\gamma$ を産生した(図3B)。一方、CCl<sub>4</sub>を投与されたCd226<sup>-/-</sup>マウスの肝臓ILC1は著しく低いIFN- $\gamma$ 産生能を示した(図3B)。従って、DNAM-1はCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害に於ける肝臓ILC1の活性化及びIFN- $\gamma$ 産生に必須の役割を果たしている事が明らかになった。

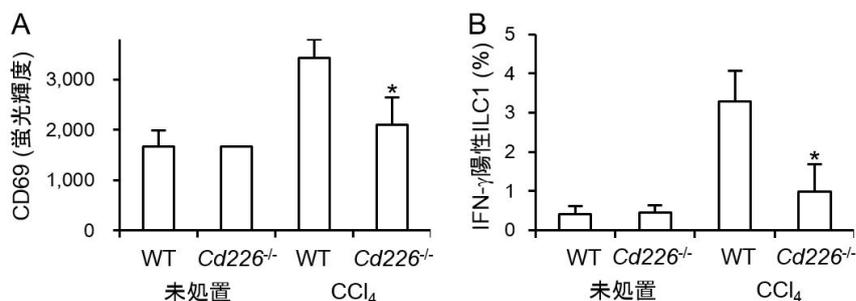


図3. DNAM-1はCCl<sub>4</sub>誘導急性肝障害に於ける肝臓ILC1の活性化とIFN- $\gamma$ 産生に必要であるWT及びCd226<sup>-/-</sup>マウスにCCl<sub>4</sub>を投与し、1日後に肝臓ILC1をフローサイトメトリーにて評価した。  
(A) 肝臓ILC1に於ける活性化マーカーCD69の発現。\* $p < 0.05$  vs. WT、CCl<sub>4</sub> ( $t$ 検定)  
(B) IFN- $\gamma$ 陽性肝臓ILC1の割合。\* $p < 0.005$  vs. WT、CCl<sub>4</sub> ( $t$ 検定)

### 4. 肝臓ILC1に対するDNAM-1刺激

WTマウスから肝臓ILC1を単離し、インターロイキン2にて1日間培養した。単離直後の未処置肝臓ILC1とこれら活性化肝臓ILC1とを*in vitro*に於いて肝臓ILC1を抗DNAM-1抗体或いはアイソタイプ抗体で架橋刺激し、フローサイトメトリーにてIFN- $\gamma$ の産生を評価した。その結果、アイソタイプ抗体刺激と比較し、DNAM-1を架橋刺激された肝臓ILC1はIFN- $\gamma$ 産生を亢進する事が示された(図4)。従って、DNAM-1は肝臓ILC1のIFN- $\gamma$ 産生を亢進する機能を持つ事が明らかになった。

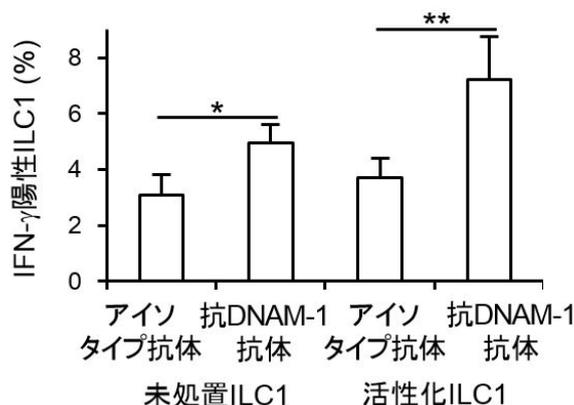


図4. DNAM-1は肝臓 ILC1 の IFN- $\gamma$  産生を亢進する

未処置肝臓 ILC1 と活性化肝臓 ILC1 を *in vitro* に於いてアイソタイプ抗体或いは抗 DNAM-1 抗体で架橋刺激し、フローサイトメトリーにて IFN- $\gamma$  の産生を評価した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.005$  (*t* 検定)

## 5. IFN- $\gamma$ 中和による CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害の重症度の評価

WT マウスに対し IFN- $\gamma$  中和抗体或いはアイソタイプ抗体を投与後に CCl<sub>4</sub> を投与し、急性肝障害の重症度を評価した。その結果、アイソタイプ抗体投与後に CCl<sub>4</sub> を投与されたマウスと比較し、IFN- $\gamma$  中和抗体投与後に CCl<sub>4</sub> を投与されたマウスでは急性肝障害が増悪した (図5)。従って、CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害に於いて IFN- $\gamma$  が急性肝障害の軽快に寄与する事が明らかになった。

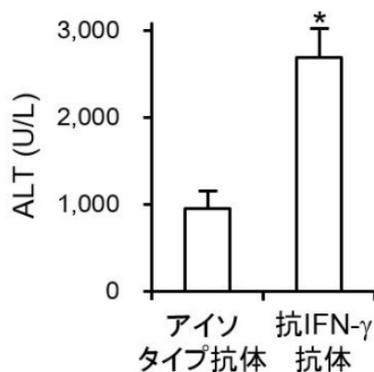


図5. IFN- $\gamma$  は CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害の軽快に寄与する

WT マウスにアイソタイプ抗体或いは抗 IFN- $\gamma$  中和抗体を投与した。その後 CCl<sub>4</sub> を投与し、1 日後に急性肝障害を血漿 ALT 値にて評価した。\* $p < 0.005$  vs. アイソタイプ抗体 (*t* 検定)

## 考 察

ILC1 は肝臓にのみ多く存在し、*in vitro* に於いて高い IFN- $\gamma$  産生能を持つ事が知られている。しかしながら、肝臓 ILC1 の肝恒常性維持或いは肝障害や肝再生に於ける生理的・病理的な役割はこれまでに明らかになっていなかった。本研究の結果から以下の3点が明らかになった。

- (1) CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害に於いて肝臓 ILC1 は急性肝障害の抑制に寄与する免疫細胞である
- (2) DNAM-1 は肝臓 ILC1 の活性化及び IFN- $\gamma$  産生に決定的な役割を果たす活性化受容体である
- (3) IFN- $\gamma$  は CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害の抑制に寄与する

従って CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害モデルに於いて、肝臓 ILC1 が発現する DNAM-1 は肝臓 ILC1 の活性化及び IFN- $\gamma$  産生を促進し、急性肝障害を抑制している事が強く示唆された (図6)。

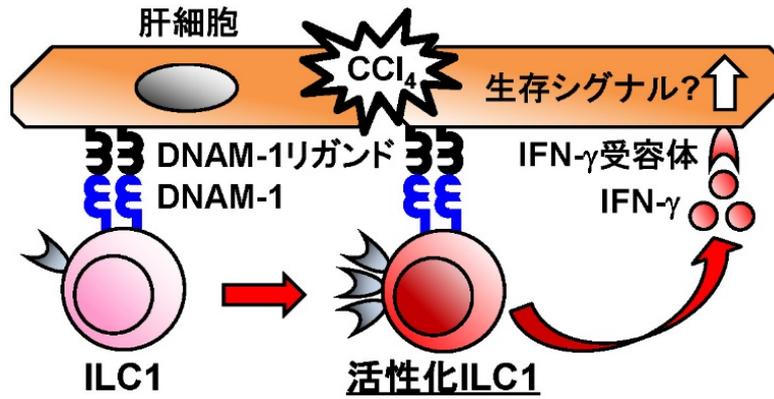


図6. DNAM-1 は肝臓 ILC の活性化と IFN- $\gamma$  産生の亢進し、CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害の軽快に寄与する

今後、CCl<sub>4</sub> 投与後に肝臓 ILC1 の活性化に伴って発現が上昇する分子群を特定する。これら分子に対する除去抗体が利用可能な場合、これら除去抗体を用いて肝臓 ILC1 を選択的に除去し、その後 CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害を誘導し、肝臓 ILC1 が急性肝障害の抑制に寄与する免疫細胞である事を証明する。更に、全てのリンパ球が存在しない *Rag-2*・*IL-2R $\gamma$*  両欠損マウスへ WT マウス由来肝臓 ILC1 を移入し、その CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害を誘導し、肝臓 ILC1 が急性肝障害の抑制に寄与する免疫細胞である事を証明する。加えて、CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害に於ける肝臓 ILC1 の活性化に必要な可溶性因子（炎症性サイトカインや損傷関連分子パターン分子）及びこれらの産生細胞を特定する。

これまでの ILC の研究では、ILC の活性化やサイトカイン産生の制御機構として炎症性サイトカインや損傷関連分子パターンに注目する研究が殆どであった。しかし本研究では、ILC が発現する活性化受容体の機能の一端を解明した。肝臓 ILC1 は NK 細胞との機能的な類似点を多く持つ。従って、ウイルス感染・がん・代謝疾患を含めた種々の病態モデルに於いて、肝臓 ILC1 が発現する免疫受容体による更なる ILC1 活性化制御機構の解明が必要である。

本研究では急性肝障害のモデルとして確立され広く実験的に用いられている CCl<sub>4</sub> 誘導急性肝障害を用いた。本研究で得られた研究成果が急性肝障害全般に一般化出来るか否か、他の薬物性急性肝障害モデル（アセトアミノフェン中毒モデルなど）を用いて検討する必要がある。更に、ウイルス性慢性肝炎モデルマウス（C 型肝炎モデルマウス [7]）等を用い、本研究成果の発展性を評価する。

### 共同研究者・謝辞

筑波大学生存ダイナミクス研究センター免疫学研究室の各位には研究遂行に当たり日頃より有益な御助言と御討論を頂いた。ここに感謝の意を表する。

### 文献

- 1) Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet*. 2010 Jul 17;376(9736):190-201. PMID: 20638564 DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60274-7
- 2) Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *N Engl J Med*. 2013 Dec 26;369(26):2525-34. PMID: 24369077 DOI: 10.1056/NEJMra1208937
- 3) Sojka DK, Plougastel-Douglas B, Yang L, Pak-Wittel MA, Artyomov MN, Ivanova Y, Zhong C, Chase JM, Rothman PB, Yu J, Riley JK, Zhu J, Tian Z, Yokoyama WM. Tissue-resident natural killer (NK) cells are cell lineages distinct from thymic and conventional splenic NK cells. *Elife*. 2014 Jan 1;3:e01659. PMID: 24714492 DOI: 10.7554/eLife.01659

- 4) Spits H, Bernink JH, Lanier L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol.* 2016 Jun 21;17(7):758-64. PMID: 27328005 DOI: 10.1038/ni.3482
- 5) Shibuya AI, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, Kitamura T, Nicholl J, Sutherland GR, Lanier LL, Phillips JH. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity.* 1996 Jun;4(6):573-81. PMID: 8673704
- 6) Nabekura T, Shibuya K, Takenaka E, Kai H, Shibata K, Yamashita Y, Harada K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya A. Critical role of DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of acute graft-versus-host disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 26;107(43):18593-8. PMID: 20937876 DOI: 10.1073/pnas.1005582107
- 7) Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS One.* 2012;7(12):e51656. Epub 2012 Dec 17. PMID: 23284733 DOI: 10.1371/journal.pone.0051656