164　急性肝障害におけるDNAM-1の役割	鍋倉　宰

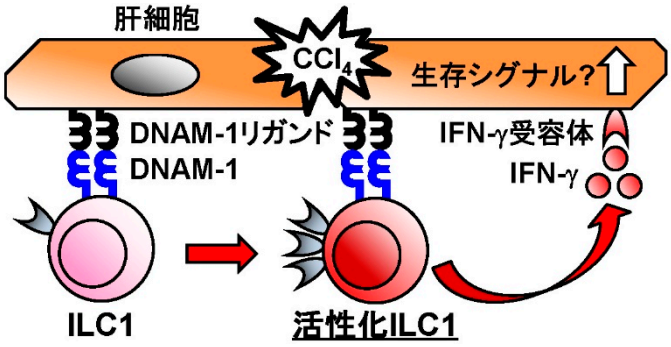
【目的】急性肝障害は致死率の高い疾患である。急性肝障害の発症と増悪には免疫応答が関与する事が知られている。しかしその分子機序、特に免疫受容体の関与については完全には解明されていない。近年、新しい免疫細胞として自然リンパ球（ILC）が同定された。グループ 1 ILC（ILC1）は肝臓にのみ多く存在し高いインターフェロンγ（IFN-γ）産生能を持つナチュラルキラー（NK）細胞様の細胞である。しかし肝臓 ILC1 の生理的・病理的な役割は明らかになっていない。著者らは肝臓 ILC1 が NK 細胞に発現する活性化受容体 DNAM-1 (CD226) を高発現する事を見出した。本研究では四塩化炭素（CCl_4）誘導急性肝障害モデルにて、肝臓 ILC1 が発現する DNAM-1 の役割を解明する事を目的とする。

【方法】野生型（WT）及び *DNAM-1* 欠損（*Cd226*$^{-/-}$）マウスに対して CCl_4 を投与し、血漿 ALT 値にて急性肝障害の重症度を比較する。更に、*Rag-1* 欠損（*Rag1*$^{-/-}$）マウスと *Rag-1・DNAM-1* 両欠損（*Rag1*$^{-/-}$ *Cd226*$^{-/-}$）マウスに於ける CCl_4 誘導急性肝障害を比較する。

1. NK 細胞を優先的に除去する抗 asialo GM1 抗体を投与された 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_4 を投与する。両群の急性肝障害の重症度を比較し、ILC1 が急性肝障害に寄与する免疫細胞か否かを決定する。
2. WT 及び *Cd226*$^{-/-}$マウスに CCl_4 を投与し、肝臓 ILC1 の存在率・細胞数・詳細な表現型（活性化マーカー等）・IFN-γ産生をフローサイトメトリーで評価する。
3. *In vitro* にて肝臓 ILC1 の DNAM-1 を架橋刺激し、IFN-γの産生を評価する。
4. WT マウスに対し IFN-γ中和抗体を投与後に CCl_4 を投与し、急性肝障害の重症度を比較する。

【結果】WT 及び *Cd226*$^{-/-}$マウスに対し CCl_4 を投与した結果、*Cd226*$^{-/-}$マウスに於いて CCl_4 誘導急性肝障害が増悪した。この肝障害の差は適応免疫細胞が存在しない *Rag1*$^{-/-}$マウスと *Rag1*$^{-/-}$ *Cd226*$^{-/-}$マウスの間でも確認された。また、NK 細胞を優先的に除去したマウスでは急性肝障害の増悪が見られなかったのに対し、ILC1 と NK 細胞の両方を除去したマウスでは急性肝障害が増悪した。更に、CCl_4 投与後に WT 及び *Cd226*$^{-/-}$マウスに於ける肝臓 ILC1 の活性化と IFN-γ生を評価した所、*Cd226*$^{-/-}$肝臓 ILC1 の活性化及び IFN-γ産生が著しく障害されている事が明らかになった。一方、肝臓 ILC1 を単離し *in vitro* に於いて DNAM-1 を架橋刺激した所、IFN-γの産生が亢進した。以上の結果から、活性化した肝臓 ILC1 が産生する IFN-γが急性肝障害を軽快させる事が示唆された為、WT マウスに対し IFN-γ中和抗体を投与後に CCl_4 を投与した所、急性肝障害が増悪した。また、肝細胞は IFN-γ受容体を発現し、更に CCl_4 投与後に DNAM-1 リガンドである CD155 の発現を著しく上昇させる事が確認された。従って、肝臓 ILC1 が発現する DNAM-1 は、肝臓 ILC1 活性化及び IFN-γ産生を亢進し、急性肝障害の軽快に寄与する事が強く示唆された。

DNAM-1 による肝臓 ILC の活性化と IFN-γ産生の亢進



164. 急性肝障害における DNAM-1 の役割

鍋倉　宰

*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-γ

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γ（IFN-γ）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-γ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*$^{-/-}$）マウスに対して四塩化炭素（CCl_4）を投与して急性肝障害を誘導した結果、*Cd226*$^{-/-}$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*$^{-/-}$）マウスと *Rag-1・DNAM-1* 両欠損（*Rag1*$^{-/-}$*Cd226*$^{-/-}$）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_4 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-γの産生が亢進した。故に、肝臓 ILC1 が発現する DNAM-1 が IFN-γ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_4 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-γ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-γ産生等の機能に必須である
(3) IFN-γ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*$^{-/-}$マウスに於ける CCl_4 誘導急性肝障害の重症度の比較

WT 及び *Cd226*$^{-/-}$マウスに対して CCl_4 を投与し、血漿 ALT 値にて急性肝障害の重症度を比較し、*Cd226*$^{-/-}$マウスに於いて CCl_4 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αβT 細胞・γδT 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*$^{-/-}$マウスと *Rag1*$^{-/-}$*Cd226*$^{-/-}$マウスに於ける CCl_4 誘導急性肝障害を比較した。

*現在の所属：筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 免疫学研究室

2. NK 細胞且つ又は ILC1 の除去による CCl_4 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_4 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_4 投与後の WT 及び *Cd226*$^{-/-}$ マウスの肝臓 ILC1 の評価

WT 及び *Cd226*$^{-/-}$ マウスに CCl_4 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-γ 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-γ の産生を評価した。

5. IFN-γ 中和による CCl_4 誘導急性肝障害の重症度の評価

WT マウスに対し IFN-γ 中和抗体を投与後に CCl_4 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*$^{-/-}$ マウスに於ける CCl_4 誘導急性肝障害の重症度の比較

WT 及び *Cd226*$^{-/-}$ マウスに対して CCl_4 を投与した結果、WT マウスと比較して *Cd226*$^{-/-}$ マウスは高い血漿 ALT 値を示し、CCl_4 誘導急性肝障害が増悪した事が示された（図 1A）。更に、*Rag1*$^{-/-}$ マウスと *Rag1*$^{-/-}$ *Cd226*$^{-/-}$ マウスに於ける CCl_4 誘導急性肝障害を比較した所、*Rag1*$^{-/-}$ と比較して *Rag1*$^{-/-}$ *Cd226*$^{-/-}$ 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_4 誘導急性肝障害の軽快に寄与する事が明らかとなった。

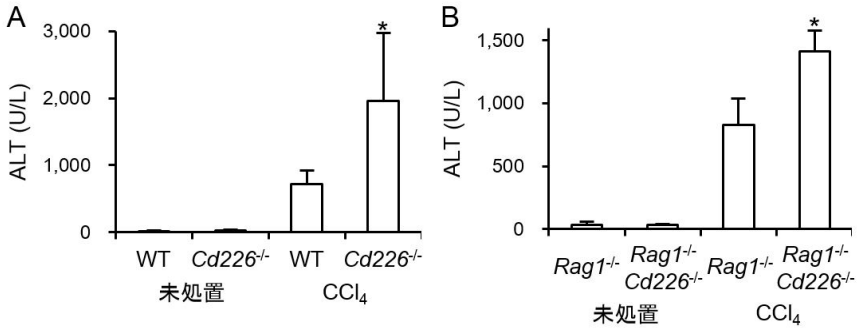


図 1. 自然免疫細胞の DNAM-1 は CCl_4 誘導急性肝障害の軽快に寄与するマウスへ CCl_4 を投与後、1 日後に肝障害を血漿 ALT 値にて評価した。

(A)　WT 及び *Cd226*$^{-/-}$ マウスに於ける ALT 値。$*p < 0.005$ vs. WT、CCl_4（*t* 検定）

(B)　*Rag1*$^{-/-}$ 及び *Rag1*$^{-/-}$ *Cd226*$^{-/-}$ マウスに於ける ALT 値。$*p < 0.005$ vs. *Rag1*$^{-/-}$、CCl_4（*t* 検定）

2. NK 細胞且つ又は ILC1 の除去による CCl_4 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_4 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。

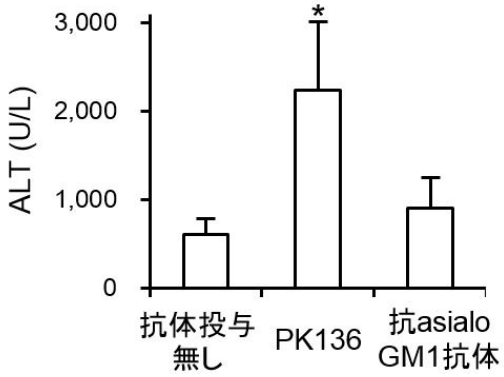


図 2. ILC1 は CCl_4 誘導急性肝障害の軽快に寄与する
WT マウスに抗 asialo GM1 抗体或いは PK136 を投与した。その後 CCl_4 を投与し、1 日後に急性肝障害を血漿 ALT 値にて評価した。
$*p < 0.005$ vs. 抗体投与無し・抗 asialo GM1 抗体（t 検定）

3. CCl_4 投与後の WT 及び *Cd226*$^{-/-}$マウスの肝臓 ILC1 の評価

WT 及び *Cd226*$^{-/-}$マウスに CCl_4 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_4 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*$^{-/-}$マウスでは CCl_4 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_4 を投与された WT 及び *Cd226*$^{-/-}$マウスから肝臓 ILC1 を単離し、*in vitro* で培養して IFN-γ産生を評価した。未処置 WT マウスの肝臓 ILC1 と比較し、CCl_4 を投与された WT マウスの肝臓 ILC1 は IFN-γを産生した（図 3B）。一方、CCl_4 を投与された *Cd226*$^{-/-}$マウスの肝臓 ILC1 は著しく低い IFN-γ産生能を示した（図 3B）。従って、DNAM-1 は CCl_4 誘導急性肝障害に於ける肝臓 ILC1 の活性化及び IFN-γ産生に必須の役割を果たしている事が明らかになった。

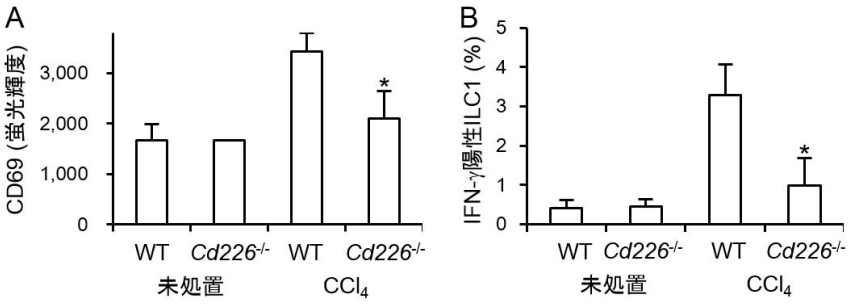


図 3. DNAM-1 は CCl_4 誘導急性肝障害に於ける肝臓 ILC1 の活性化と IFN-γ産生に必要である WT 及び *Cd226*$^{-/-}$マウスに CCl_4 を投与し、1 日後に肝臓 ILC1 をフローサイトメトリーにて評価した。
(A) 肝臓 ILC1 に於ける活性化マーカーCD69 の発現。$*p < 0.05$ vs. WT、CCl_4（t 検定）
(B) IFN-γ陽性肝臓 ILC1 の割合。$*p < 0.005$ vs. WT、CCl_4（t 検定）

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-γ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-γ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-γ産生を亢進する機能を持つ事が明らかになった。

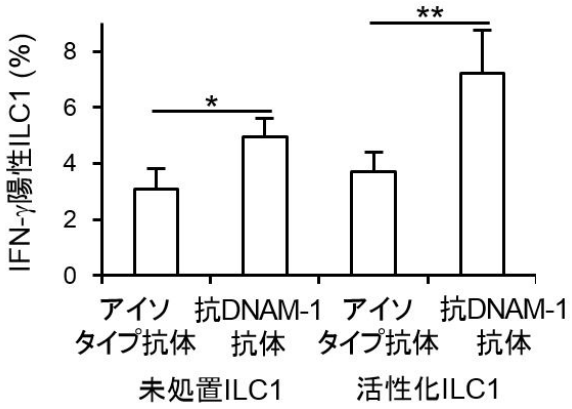


図 4. DNAM-1 は肝臓 ILC1 の IFN-γ産生を亢進する

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-γの産生を評価した。$*p < 0.05$、$**p < 0.005$（*t* 検定）

5. IFN-γ中和による CCl_4 誘導急性肝障害の重症度の評価

WT マウスに対し IFN-γ中和抗体或いはアイソタイプ抗体を投与後に CCl_4 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_4 を投与されたマウスと比較し、IFN-γ中和抗体投与後に CCl_4 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_4 誘導急性肝障害に於いて IFN-γが急性肝障害の軽快に寄与する事が明らかになった。

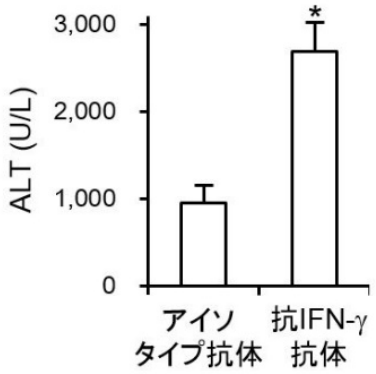


図 5. IFN-γは CCl_4 誘導急性肝障害の軽快に寄与する

WT マウスにアイソタイプ抗体或いは抗 IFN-γ中和抗体を投与した。その後 CCl_4 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-γ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_4 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-γ産生に決定的な役割を果たす活性化受容体である

(3)　IFN-γは CCl_4 誘導急性肝障害の抑制に寄与する

従って CCl_4 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-γ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）。

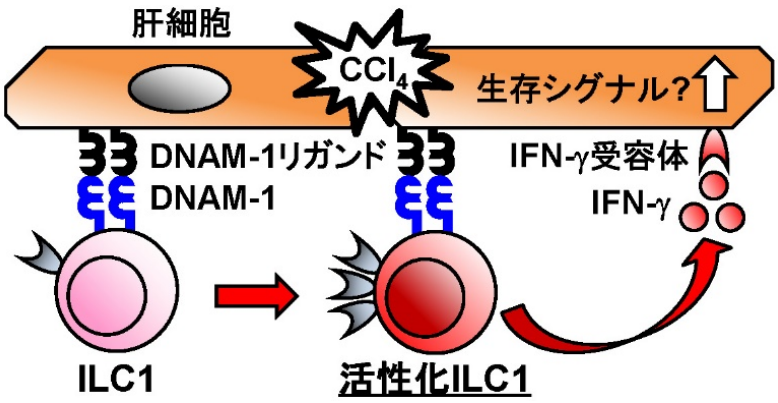


図 6. DNAM-1 は肝臓 ILC の活性化と IFN-γ産生の亢進し、CCl_4 誘導急性肝障害の軽快に寄与する

今後、CCl_4 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_4 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* γ両欠損マウスへ WT マウス由来肝臓 ILC1 を移入し、その CCl_4 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_4 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_4 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 A1, 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