

Concanavalin A 誘導性肝炎における活性化免疫受容体 DNAM-1 の機能解明

松尾 壯一 (筑波大学 生物学類)

指導教員：澁谷 彰 (筑波大学 医学医療系)

背景

急性肝障害は急速に多臓器不全を誘導し生命を脅かし得る疾患であり、肝炎ウイルス感染による肝炎や薬剤誘導性肝炎、自己免疫性肝炎が知られている。肝障害の発症要因として、病原体及び毒素による肝細胞の傷害に加え、免疫応答や炎症による肝細胞の細胞死が挙げられる。また、T細胞による免疫応答が急性肝障害の発症に関与していることが知られており、T細胞が関与する急性肝障害の実験動物モデルの代表例として Concanavalin A (ConA) 誘導性肝炎が挙げられる。ConA はタチナタマ由来のレクチンであり、マンノースに富んだ糖タンパク質に結合する。ConA は投与後に肝臓類洞に到達した後、類洞内皮細胞やクッパー細胞が発現する糖タンパク質と T細胞が発現する T細胞受容体を架橋し、T細胞を活性化し、活性化した T細胞はインターフェロン (IFN) γ や腫瘍壊死因子 (TNF) α などのサイトカインを放出し、肝細胞のアポトーシスを誘導する。また、ConA 誘導性肝炎は T細胞依存的であり、T細胞を持たないマウスや T細胞を除去されたマウスは ConA 肝炎を発症しないことが知られている。

DNAM-1 は、T細胞や NK細胞などに発現する活性化免疫受容体であり、NK細胞や CD8陽性 T細胞の細胞傷害活性や、CD8陽性 T細胞の活性化及び増殖やサイトカイン産生の共刺激分子であることが知られている。しかしながら、肝臓内の T細胞における肝炎における役割は未だ明らかにされていない。

目的

本研究では、肝臓 T細胞に発現する DNAM-1 が ConA 誘導性肝炎の増悪に関与しているとの仮説を立て、これを検証した。

材料・方法**・ConA 投与実験**

C57BL/6J 野生型マウス及び *Cd226*^{-/-} (DNAM-1 欠損) マウスに対し、20 mg/kg body weight の ConA を静脈投与して投与後 48 時間の生存率を評価した。更に、ConA 投与 12 時間後の血漿中 ALT 値・AST 値を測定して肝障害を評価した。また、野生型マウスに DNAM-1 中和抗体 (TX42.1) 或いはコントロール抗体 200 μ g を ConA 投与 24 時間前に腹腔内投与し、その後 ConA を投与して生存率を評価した。

・CBA (Cytometric Bead Assay)

ConA 投与 12 時間後の血漿中のサイトカイン濃度 (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α) を定量した。

・フローサイトメトリーによる肝臓 T細胞の評価

ConA 投与 12 時間後の肝臓 T細胞を単離し、フローサイトメトリーにて T細胞活性化マーカー、分化マーカー、及び DNAM-1 の発現を評価した。

・In vitro アッセイ

野生型マウス及び *Cd226*^{-/-} マウス由来肝臓 T細胞を単離し、ConA 3 μ g/ml を加えて 12 時間培養した。その後、T細胞活性

化マーカーと IFN- γ 及び TNF- α の産生をフローサイトメトリーにて評価した。

結果

予想に反し、ConA 投与後に *Cd226*^{-/-} マウスは野生型マウスよりも低い生存率を示した。DNAM-1 中和抗体を投与された後に ConA を投与された野生型マウスも同様に低い生存率を示した。しかしながら、ALT 値・AST 値に関しては野生型マウスと *Cd226*^{-/-} マウスの間に明確な差は確認できなかった。野生型マウス及び *Cd226*^{-/-} マウスは ConA 投与後に IFN- γ , TNF- α , IL-10 濃度の上昇を示したが、*Cd226*^{-/-} マウスは野生型マウスよりも低い IL-10 濃度を示した。更に、ConA 投与後 12 時間の肝臓 T細胞をフローサイトメトリーにて解析した結果、*Cd226*^{-/-} マウス由来 T細胞は野生型マウス由来肝臓 T細胞と比較し、活性化マーカーである CD69 及び CD25 を強く発現していた。また、野生型マウス由来肝臓 CD4 陽性 T細胞は ConA 投与後に DNAM-1 の発現を上昇することが確認できた。

In vitro アッセイでは、野生型マウス由来肝臓 T細胞と *Cd226*^{-/-} マウス由来肝臓 T細胞ともに ConA 刺激による CD69・CD25 の発現上昇及び IFN- γ ・TNF- α 産生を確認できたが、*Cd226*^{-/-} 肝臓 T細胞の方が野生型 T細胞よりも CD69 を強く発現した。

結論

以上から、ConA 投与後、*Cd226*^{-/-} マウスでは野生型マウスよりも肝臓 T細胞がより強く活性化することが抑制性サイトカインである IL-10 の産生が少ない為に、肝障害が増悪して低い生存率を示すことが示唆された。従って、DNAM-1 は活性化した肝臓内 CD4 陽性 T細胞による IL-10 産生の亢進に必要であることが示唆された。

考察と今後の予定

ConA 投与後、*Cd226*^{-/-} マウスは野生型マウスと比較して低い生存率を示したが、肝障害の指標となる ALT 値・AST 値には明確な差が確認できなかった。従ってマウスの死因が急性肝障害そのものではなく、急性肝障害の合併症である脳浮腫、凝固障害、循環障害、腎不全である可能性が考えられる。この可能性を検証する為、今後これらの臓器の組織学的解析を計画している。また、肝臓 CD4 陽性 T細胞を CD4 陽性細胞除去抗体を用いて除去し、ConA 投与後の生存率及び肝障害の比較を行って、*Cd226*^{-/-} マウスが示す低い生存率の原因が CD4 陽性 T細胞であるか否かを確認する。更に、野生型マウス及び *Cd226*^{-/-} マウス由来肝臓 T細胞を単離し、ConA 存在下で培養した後に IL-10 の産生を評価し、DNAM-1 が肝臓内 T細胞による IL-10 産生の亢進に必要であることを確認する。