

# 博士論文概要

## 論文題目

アセトアミノフェン肝障害における  
自然免疫様 T 細胞の低酸素応答因子 HIFs の  
病態機能解析に関する研究

Functional Analysis of Hypoxia Inducible  
Factors in Innate-like T Cells during  
Acetaminophen-induced Liver Injury

申請者

鈴木	智大
Tomohiro	SUZUKI

生命医科学専攻 分子病態医化学研究

2017 年 10 月

アセトアミノフェン (Acetaminophen, N-Acetyl-p-Aminophenol; APAP) は世界で最も利用されている解熱鎮痛薬の一つである。APAP は適正容量では比較的安全な解熱鎮痛薬であるが、偶発的または意図的な過剰摂取は APAP 誘導性肝障害 (AILI) と呼ばれる重度な急性肝障害を惹起する。AILI 発症には二段階のフェーズがあることが近年の研究で明らかにされてきた。すなわち、肝障害初期では、肝細胞内で APAP は反応中間体である N-Acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) に変換され、NAPQI はミトコンドリア障害を誘導することで肝細胞死を引き起こす。肝障害後期では、障害を受けた肝細胞が Damage-associated molecular pattern を放出することで、Pathogen recognition receptors を介して自然免疫細胞を活性化し、これらの自然免疫細胞が肝細胞障害をさらに拡大する。しかしながら、治療法に関しては、障害初期では N-Acetyl cysteine の投与が行われるが、障害後期には生体肝移植以外の対処法がなく、障害後期の免疫細胞の活性化機構に根ざした新たな分子標的薬の開発が望まれている。

AILI は 24 時間以内に起こる急性肝障害であるため、活性化と増殖に 1 週間以上要する古典的 T 細胞は関与しないという考え方が一般的である。一方、急性炎症でも活性化できる  $\gamma\delta$  T 細胞, Natural killer T (NKT) 細胞などの新たな自然免疫様 T 細胞が発見され、これらの免疫細胞が AILI の発症に関与することが報告されてきた。しかし、AILI において自然免疫様 T 細胞がどのように活性化され機能調節が行われるかに関しては現状ほとんど解明されていない。低酸素応答因子 (Hypoxia-Inducible Factors, HIFs) は低酸素状態で活性化される転写因子として発見され、細胞の低酸素応答を担う遺伝子の発現を調節する。また、低酸素刺激に加えて Toll-like receptor や T cell receptor によっても HIF-1 が活性化される。これまでに慢性炎症で働く T 細胞の HIF-1 の機能が中心的に研究されてきた一方、自然免疫様 T 細胞の機能調節における HIFs の重要性に関しては全く解明されていない。そこで、本研究では、T 細胞特異的 HIF- $\alpha$  遺伝子欠損マウスを用いて、APAP 誘導性急性肝障害における自然免疫様 T 細胞の HIFs の機能解明を目指した。

本論文は全四章で構成されており、各章の概要を以下に示す。

第一章である序論は APAP の一般的な薬理作用に始まり、これまで明らかにされてきた APAP 代謝に基づく AILI の発症機構、自然免疫細胞と適応免疫細胞が AILI の発症に関与する機序、および、HIFs による免疫細胞の制御機構について、全八節に亘って記載した。

第一節では、APAP の開発の経緯や薬理作用について解説し、肝細胞での APAP 代謝による一般的な AILI 発症機構と APAP 代謝を標的とした治療法の限界について述べた。第二節では、自然免疫細胞と適応免疫細胞の機能に関して記しており、第三節では、自然免疫細胞による AILI 発症メカニズムについて詳細に記載した。第四節では、適応免疫細胞である古典的 T 細胞の胎生期における発達、分化およびその機能について述べた。第五節では、急性炎症で活性化する自然免疫様 T 細胞について古典的 T 細胞と比較した。第六節では、自然免疫様 T 細胞が AILI を

誘導するメカニズムを記載した。第七節は転写因子である HIFs の一般的な機能の解説から HIFs による古典的 T 細胞の制御機構に関して記載し、本研究の目的を述べた第八節で第一章を締めくくった。

第二章は実験材料と方法について、本研究で用いたマウスや抗体などの試薬に関する情報および実験手法を詳細に記述した。

第三章は本研究で得られた結果について、T 細胞特異的 HIF- $\alpha$  遺伝子欠損マウスの肝障害の表現型解析から T 細胞の機能解析に至るまで八節に分けて記した。

第一節では APAP を投与したマウスの血清 ALT 活性の測定、Hematoxylin & Eosin 染色、生存率の解析結果から、T 細胞の HIF-2 は AILI に関与しない一方、HIF-1 は肝障害に対して保護作用を有することを示した。第二節では、AILI に関与することが報告されているマクロファージと好中球について解析し、T 細胞特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損は肝臓へのマクロファージの浸潤や Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  や Interleukin (IL) -12p40 などの炎症性サイトカインの遺伝子発現には関与しないことを示した。一方、HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損により肝臓への顕著な好中球浸潤と好中球誘導性ケモカイン CXC chemokine ligand (CXCL) -1 と CXCL2 の遺伝子発現の増加が誘導されることを明らかにした。また、第三節では、HIF-1 は肝臓の NKT 細胞の CD69 発現と Fas ligand 発現に影響しないことから、NKT 細胞の HIF-1 は肝障害には関与しない可能性が高いことを示した。第二節と第三節の解析結果を通じて、既報の免疫細胞による肝障害経路のうち T 細胞の HIF-1 は好中球浸潤にのみに関与することが明らかとなり、HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損による肝障害の増悪は好中球浸潤の増加が原因である可能性が高いと結論づけた。第四節から第七節では、好中球浸潤を制御することが報告されている自然免疫様 T 細胞について詳細に解析した結果を示している。第四節では、好中球浸潤を抑制することで知られる regulatory T (Treg) 細胞の評価を行った。その結果、HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損では、APAP 投与後の肝臓の Treg 細胞数が減少する傾向を示し、この結果は Annexin V 染色による Treg 細胞死の亢進を示す所見と一致した。一方、HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損マウスへの野生型または HIF-1 $\alpha$  遺伝子を欠損した Treg 細胞の投与は AILI を改善できないことから、Treg 細胞の HIF-1 は肝障害に関与しないと結論づけた。第五節では、好中球動員に関与する T 細胞分泌性サイトカインである Interferon- $\gamma$  と Osteopontin について評価した。APAP 投与後の HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損マウスの血清でこれらの因子が顕著に上昇する一方、HIF-1 は肝臓でのこれらの遺伝子発現および T 細胞による産生に関与しないことが示された。従って、Interferon- $\gamma$  と Osteopontin は HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損による好中球浸潤の増加には関与せず血清サイトカインの上昇は二次的な影響によるものと結論づけた。第六節では、CXCL1 および CXCL2 の発現を強力に亢進する IL-17A が HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損マウスの血清で上昇していることを示し、IL-17A 中和抗体投与によって HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損によ

る肝臓への好中球浸潤と血清 ALT 活性が野生型と同程度まで改善することを明らかにした。このことから、IL-17A 分泌を介した肝臓への好中球浸潤が HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損による肝障害を誘導することが明確に示された。次に第七節では、肝臓における IL-17A 産生細胞を詳細に解析し、HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損により肝臓の IL-17A 陽性 $\gamma\delta$  T 細胞が顕著に増加することを示した。また、IL-17A 陽性 $\gamma\delta$  T 細胞の増加は肝臓への $\gamma\delta$  T 細胞浸潤の上昇が原因であることを示した。さらに、 $\gamma\delta$  T 細胞の移入実験により、 $\gamma\delta$  T 細胞の HIF-1 $\alpha$  は肝障害と好中球浸潤を抑制することを明らかにした。これらにより、HIF-1 は肝臓への $\gamma\delta$  T 細胞浸潤を抑制することで、IL-17A 分泌を介した好中球誘導性肝障害に対して保護作用を示すと結論づけた。第八節では、HIF-1 が $\gamma\delta$  T 細胞の遊走能に与える影響を Boyden chamber assay により評価した。HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損 $\gamma\delta$  T 細胞は野生型 $\gamma\delta$  T 細胞よりも CC chemokine ligand 20 に対する遊走能が有意に高いことが示された。また、ミトコンドリアの ATP synthase 阻害剤である Oligomycin 処理を行ったところ、野生型 $\gamma\delta$  T 細胞では遊走能への影響は認められなかったが、HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損 $\gamma\delta$  T 細胞は遊走能が野生型 $\gamma\delta$  T 細胞と同程度まで低下した。一方、野生型 $\gamma\delta$  T 細胞と HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損 $\gamma\delta$  T 細胞ではミトコンドリア含有量に差は認められず、HIF-1 は $\gamma\delta$  T 細胞のミトコンドリア生合成に影響しないことがわかった。従って、 $\gamma\delta$  T 細胞の HIF-1 はミトコンドリアのエネルギー代謝を阻害することで、 $\gamma\delta$  T 細胞の遊走を抑制すると結論づけた。

第四章では、本研究で得られた結果をもとに、好中球を介した AILI 発症機構に関する考察と HIF-1 による $\gamma\delta$  T 細胞の細胞遊走制御メカニズムに関する考察を記載して本文を締めくくった。

本研究により、T 細胞の HIF-1 は、IL-17A 分泌型 $\gamma\delta$  T 細胞の肝臓への浸潤を抑制することで、過剰な好中球浸潤による AILI に対して保護的に働くことが明らかになった。また、 $\gamma\delta$  T 細胞の HIF-1 はミトコンドリアのエネルギー代謝を抑制することで $\gamma\delta$  T 細胞の細胞遊走を阻害する可能性を示した。これまで複数の基礎研究や臨床研究で自然免疫細胞を標的とし TNF- $\alpha$  中和抗体や好中球除去抗体の投与が行われてきたが、単一の自然免疫細胞またはその機能に対する治療はいずれも有効な治療法とはなっていない。本研究を含めた報告で AILI への関与が示された $\gamma\delta$  T 細胞は、自然免疫細胞による炎症の拡大をサイトカイン分泌により上流で制御する T 細胞であり、 $\gamma\delta$  T 細胞を標的とした分子標的薬の開発は AILI の治療に繋がる可能性がある。以上のことを鑑みれば、本研究は $\gamma\delta$  T 細胞の HIF-1 を新たな薬剤標的分子として提示したという観点で、AILI を含めた $\gamma\delta$  T 細胞によって誘導される炎症疾患の治療の礎を築いた重要な成果であると考えられる。

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 鈴木 智大 印

(2018年5月1日現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<ol style="list-style-type: none"> <li>○<u>Suzuki T</u>, Minagawa S, Yamazaki T, Arai T, Kanak M, Shinjo S, Goda N, “Loss of hypoxia inducible factor-1<math>\alpha</math> aggravates <math>\gamma\delta</math> T cell-mediated inflammation during acetaminophen-induced liver injury” <i>Hepatology Communications</i> 2018 May; 2; 571-581..</li> <li>Shinjo S, Jiang S, Nameta M, <u>Suzuki T</u>, Kanai M, Nomura Y, Goda N, “Disruption of the Mitochondria-Associated ER Membrane (MAM) Plays a Central Role in Palmitic Acid-Induced Insulin Resistance” <i>Experimental Cell Research</i> 2017 Oct; 359; 86-93.</li> <li>Arai T, Ono Y, Arimura Y, Sayama K, <u>Suzuki T</u>, Shinjo S, Kanai M, Abe S, Semba K, Goda N, “Type I neuregulin1a is a novel local mediator to suppress hepatic gluconeogenesis in mice” <i>Scientific Report</i> 2017 Feb; 7; 42949.</li> </ol>
総説	<ol style="list-style-type: none"> <li><u>Suzuki T</u>, Shinjo S, Arai T, Kanai M, Goda N, “Hypoxia and Fatty Liver” <i>World Journal of Gastroenterology</i> 2014 Nov; 20; 15087-97.</li> </ol>
講演	<ol style="list-style-type: none"> <li><u>鈴木智大</u>, 皆川祥子, 合田亘人, 「アセトアミノフェン肝障害における T/NKT 細胞の HIF の機能解析」, 第 39 回分子生物学会, 2016 年 11 月, 横浜.</li> <li><u>鈴木智大</u>, 皆川祥子, 合田亘人, 「アセトアミノフェン肝障害における免疫細胞の低酸素応答因子 HIF の機能解析」, 第 4 回低酸素研究会, 2016 年 7 月, 東京. (YIA 最優秀賞受賞)</li> <li><u>鈴木智大</u>, 皆川祥子, 合田亘人, 「アセトアミノフェン誘導性肝障害における免疫細胞の低酸素応答因子 HIF の機能解析」, 第 38 回分子生物学会, 2015 年 12 月, 神戸.</li> <li>皆川祥子, <u>鈴木智大</u>, 合田亘人, ”A phenotypic analysis of HIF function in immune cells during acetaminophen induced liver injury”, 第 3 回低酸素研究会, 2015 年 7 月, 東京.</li> <li><u>Suzuki T</u>, Shinjo S, Goda N, “Effects of hepatic HIF-1 on obstructive sleep apnea-induced metabolic abnormalities.” Keystone Conference E3: Hypoxia: From Basic Mechanisms to Therapeutics, May 15, 2015, Royal Dublin Society (Dublin, Ireland)</li> <li><u>鈴木智大</u>, 塩井菜穂, 合田亘人, 「アルコール性肝炎発症における低酸素応答因子 HIFs の機能解析」, 第 2 回低酸素研究会, 2014 年 7 月, 東京.</li> <li><u>鈴木智大</u>, 塩井菜穂, 合田亘人, 「アルコール性肝炎におけるマクロファージの低酸素応答因子 HIF の機能解析」, 第 21 回肝細胞研究会, 2014 年 6 月, 東京.</li> </ol>
その他 (商業誌)	<ol style="list-style-type: none"> <li><u>鈴木智大</u>, 金井麻衣, 合田亘人, 「HIF が制御するエネルギー代謝」 <i>実験医学</i> (羊土社) 2012; 30(8); 1252-1257.</li> <li><u>鈴木智大</u>, 合田亘人, 「低酸素応答因子と SDB」 <i>呼吸器 NEWS&amp;VIEWS</i> (ライフサイエンス出版) 2012; 40; 6-8.</li> </ol>