

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**

2018 年 6 月

鈴木 智大
Tomohiro SUZUKI

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**

2018 年 6 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 分子病態医化学研究

鈴木 智大
Tomohiro SUZUKI

目次

1. 序論.....	1
1.1. アセトアミノフェン誘導性肝障害.....	1
1.1.1. アセトアミノフェンとその薬理作用.....	1
1.1.2. APAP 誘導性肝障害.....	1
1.1.3. APAP の代謝機構と AILI の発症メカニズム.....	2
1.2. 自然免疫細胞と適応免疫細胞.....	4
1.3. AILI における自然免疫系の役割.....	5
1.3.1. AILI におけるマクロファージの役割.....	6
1.3.2. AILI における好中球の役割.....	6
1.4. 古典的 T 細胞について.....	8
1.5. 自然免疫様 T 細胞について.....	12
1.5.1. $\gamma\delta$ T 細胞.....	13
1.5.2. NKT 細胞.....	14
1.5.3. nTreg.....	16
1.6. AILI における T 細胞の役割.....	18
1.7. T 細胞における低酸素応答因子 HIF の役割.....	19
1.8. 研究目的.....	22
2. 実験方法.....	23
2.1. 遺伝子改変マウスの作製・維持.....	23
2.2. マウス遺伝子型同定.....	23
2.3. AILI モデルマウスの作製.....	25
2.4. アセトアミノフェン誘導性肝炎モデルマウスのサンプル採取.....	26
2.5. 組織切片作製法.....	26
2.5.1. PLP 固定液の調製.....	26
2.5.2. パラフィン切片作製法.....	27
2.6. 組織切片染色法.....	28
2.6.1. Hematoxylin Eosin (H.E.) 染色.....	28
2.6.2. 免疫染色.....	29
2.7. 血清 Alanine aminotransferase (ALT) 活性測定法.....	31
2.8. Enzyme linked immune solvent assay (ELISA)による血清中サイトカインの定量.....	32
2.9. DTNB-glutathione recycling method.....	32
2.10. 免疫細胞の分離.....	33
2.10.1. 肝臓からの免疫細胞の分離.....	33
2.10.2. 脾臓からの免疫細胞の分離.....	36
2.11. Flow cytometry と Cell sorting.....	36
2.11.1. Flow cytometry.....	36

2.11.2. Cell sorting.....	39
2.12. 免疫細胞移入実験.....	40
2.13. 免疫細胞除去実験.....	41
2.14. DNA 合成.....	41
2.14.1. RNA 抽出.....	41
2.14.2. 逆転写反応.....	41
2.15. スタンダードベクターの作製.....	42
2.15.1. TA クローニングおよび目的 DNA の大腸菌への導入.....	42
2.15.2. Mini Prep (ボイル法).....	45
2.15.3. Large prep.....	46
2.16. SYBR Green qPCR/TaqMan qPCR.....	48
2.17. Migration assay.....	50
2.18. 統計解析.....	51
3. 実験結果.....	52
3.1. AILI における肝障害および生存率に対する T 細胞の HIF-1 および HIF-2 の影響.....	52
3.2. TH1F-1KO の肝障害増悪に対するマクロファージと好中球の関与.....	53
3.3. TH1F-1KO の肝障害増悪に対する NK 細胞と NKT 細胞の関与.....	54
3.4. TH1F-1KO の肝障害増悪に対する Treg の関与.....	55
3.5. 好中球浸潤に関わる IFN- γ および OPN の関与.....	56
3.6. 好中球浸潤に関わる IL-17A の関与.....	57
3.7. TH1F-1KO における肝障害増悪への IL-17A 分泌型 $\gamma\delta$ T 細胞の関与.....	58
3.8. $\gamma\delta$ T 細胞の chemotaxis に対する HIF-1 の影響の評価.....	60
4. 考察.....	61
5. 参考文献.....	68
6. 補足.....	81
7. 謝辞.....	82

1. 序論

1.1. アセトアミノフェン誘導性肝障害

1.1.1. アセトアミノフェンとその薬理作用

アセトアミノフェン (Acetaminophen, N-Acetyl-p-Aminophenol; APAP, Paracetamol) 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 1877 年に Harmon Northrop Morse によって合成され、主に Bayer 薬品により販売された[125]。現在では一般医薬品としても入手が可能であり、Tylenol や Panadol が市販されている。APAP の薬理作用は解熱および軽度の疼痛の抑制であり、Aspirin を代表とする Non-steroidal anti-inflammation drugs (NSAIDs) とは異なり抗炎症作用は示さない[60]。適正な容量で服用すれば安全な薬剤であり、WHO 必須薬品モデル・リストにも掲載されている[139]。稀な事例として重度の皮膚の発疹などの副作用を示すが、小児や喘息患者における痛みの軽減にも利用可能である[200]。

解熱鎮痛薬として非常に良く用いられる薬剤として、NSAIDs と APAP が挙げられる。NSAIDs は末梢組織において Cyclooxygenase (COX) -1 と COX-2 のアラキドン酸結合サイトへの結合によって COX の酵素活性を抑制し、アラキドン酸からのプロスタグランジンとトロンボキサンの合成を阻害することで解熱鎮痛作用および抗炎症作用を示す[64]。Aspirin に関しては COX のアセチル化により酵素活性を阻害する。一方、APAP は解熱鎮痛薬として長い歴史を持つにも関わらず、その作用機構は完全には解明されていない。APAP は末梢組織での COX の酵素活性には全く抑制作用を持たず抗炎症作用は示さないため、NSAIDs とは異なるメカニズムで解熱鎮痛作用をもたらすと考えられる[60, 78]。APAP の大部分は脳内、一部は脊髄に移行してアラキドン酸抱合を受けて AM404 に変換される[78]。AM404 は神経細胞の Anandamide membrane transporter に結合して阻害することで細胞内への Anandamide の取り込みを抑制し、細胞外で濃度上昇した Anandamide が Cannabinoid receptors (CB1, CB2) の細胞外領域に結合することで下流経路の活性化が誘導される[9]。また、AM404 は神経細胞における Vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) に結合して活性化する[196]。神経系における Cannabinoid receptors または TRPV1 の活性化は解熱鎮痛作用を呈することが知られている[60]。したがって、APAP は中枢神経における Cannabinoid receptors と TRPV1 channel を活性化することで解熱鎮痛作用を示すと考えられている。

1.1.2. APAP 誘導性肝障害

APAP は適正容量では比較的安全な解熱鎮痛薬であるが、APAP の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誘導する。特に米国では、ウイルス性肝炎を含めた急性肝障害のうち 50%近くが APAP の過剰摂取に起因することが報告されている[107]。アメリカ食品医薬品局 (FDA) は一錠当たりに含まれる APAP 量を 325 mg 以下に制限するなどの対策を講じているにも関わらず、AILI 患者数が依然として減少しないことが問題となっている[102]。ヒトの AILI の症状では、APAP の過剰摂取後 2-3 時間で嘔吐と右上腹部痛を呈し、24 時間以内に肝機能低下が誘導される。マウスの AILI 実験モデルにおいても、APAP の過剰投与後 2-3 時間における肝臓切片の H.E.染色像で肝小葉の中心静脈領域の肝細胞に核凝集と空胞変成が認められ、6 時間以降では中心静脈領域を起点に肝障害領域の拡大と肝障害マーカーである血清 Alanine aminotransferase (ALT) 活性の顕著な上昇が認め

られる[76]。APAP 過剰摂取による肝機能障害は、肺炎、腎不全、および、膵炎などの多臓器不全を伴う場合があり、非常に致死率の高い疾患の一つである。しかしながら、治療法に関しては、軽度の場合は対処療法や N-acetylcysteine (NAC) の投与が行われるが重篤な場合には生体肝移植以外の対処法がなく、分子標的薬に根ざした新たな治療法の開発が望まれている[147]。

1.1.3. APAP の代謝機構と AILI の発症メカニズム

経口摂取または静脈注射により投与された APAP は、主に肝細胞によって代謝を受ける (図 1.1)。APAP の一部は鎮痛作用を持つと考えられている p-aminophenol に加水分解され、さらに神経組織に移行してアラキドン酸抱合を受けて AM404 を生じる[1]。APAP のうち 85~90%近くはグルクロン酸抱合または硫酸

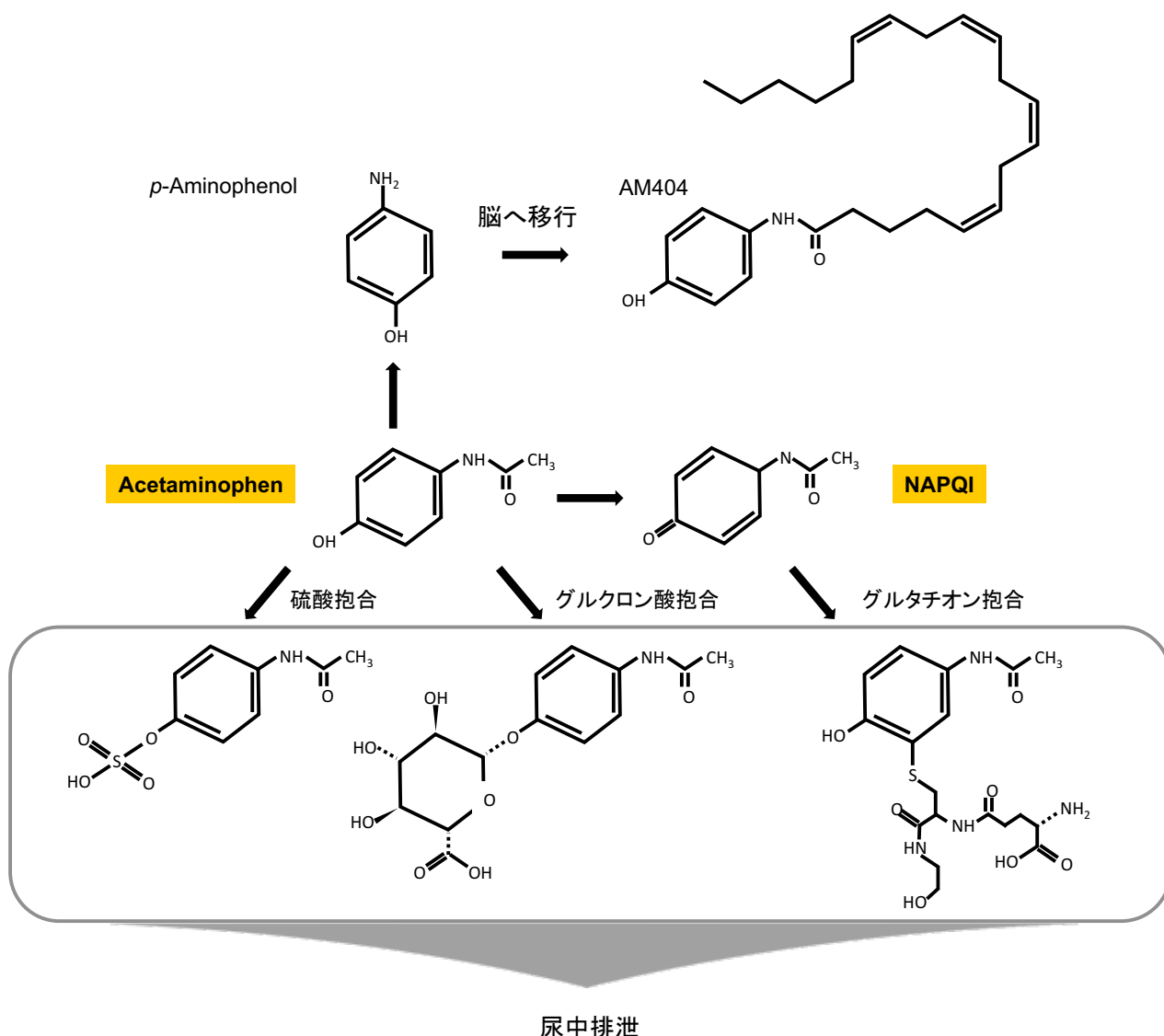


図 1.1 体内における APAP の代謝経路

体内に取り込まれた APAP は主に肝臓で代謝され、化学的抱合を受けて体外に排出される。アセトアミノフェンの一部は p-aminophenol に代謝され、中枢神経系でさらに AM404 に変換されることで解熱鎮痛作用を示すことが示唆されている。

抱合を受けて無毒化され尿中に排出される[76]。また、5%程度は修飾を受けることなくそのまま尿中に排出される。一方、残りの 5~10%程度は Cytochrome P450 (CYP) 2E1 により毒性の高い N-Acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) に変換されるが、グルタチオン抱合により無毒化される。無毒化に関与する還元型グルタチオン (GSH) は、Glucose 代謝によって得られた ATP を用いて必須アミノ酸である Glutamate, Cysteine, Glycine から合成される。また、GSH は肝細胞内で生じた酸化物質の還元に伴い自身は酸化型グルタチオン (GSSG) に変換されるが、ペントースリン酸回路で産生される Nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate (NADPH) などの還元力を用いて GSH に再変換されることで細胞内 GSH レベルが一定に保たれる。しかしながら、絶食時の APAP 摂取や過剰な APAP 摂取により GSH が枯渇した状況において、CYP2E1 経路により産生された NAPQI は肝細胞内に蓄積して肝障害を引き起こす。NAPQI が肝細胞障害を誘導するメカニズムは十分に理解されていないが、ミトコンドリア呼吸鎖のタンパク質に結合することでその機能を阻害し、Reactive oxygen species (ROS) の産生を増加させることが原因ではないかと考えられている[104]。また、ROS は c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を誘導し、具体的な分子メカニズムは分かっていないが、JNK は呼吸鎖の活性を抑制することで ROS の産生がさらに増大する[23, 72]。生じた ROS はミトコンドリア内膜を障害することで細胞死経路を活性化してネクrosisによる細胞死を誘導する[151]。

AILI に対する薬剤治療法の選択肢として、現在はグルタチオンの前駆体である NAC の投与のみが存在している[147]。しかしながら、NAC はアセトアミノフェンの摂取から 10 時間以内であれば肝障害の抑制作用を発揮するが、それ以降の段階では肝保護作用を示さない。このことは、AILI の初期段階では NAPQI および ROS による細胞障害が肝細胞死の主要な要因となる一方で、後期の病態においては異なる

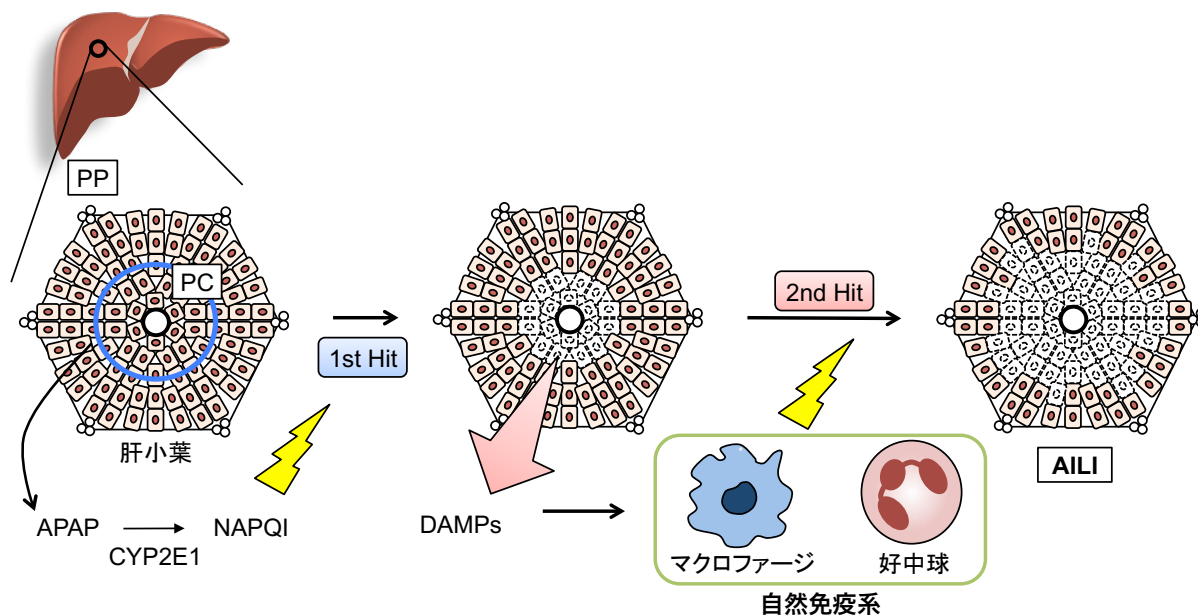


図 1.2 自然免疫細胞を介した AILI 発症モデル

APAP は主に CYP2E1 を発現する肝小葉の中心静脈領域の肝細胞によって代謝され、反応中間体である NAPQI を生じる。NAPQI は肝細胞を障害し、障害を受けた肝細胞は危険シグナルとして DAMPs を放出する。放出された DAMPs は PRRs を介して自然免疫細胞を活性化して肝細胞障害を促進する。(PP: 門脈領域, PC: 中心静脈領域)

システムにより肝障害が拡大することを示唆している。近年、ヒト及びマウスで AILI 研究が精力的に行われ、自然免疫細胞の活性化が AILI の後期病態の拡大の鍵を握っていることが分かってきた (図 1.2)[101]。すなわち、NAPQI によって障害を受けた肝細胞は Damage-associated molecular patterns (DAMPs) を放出し、肝細胞、肝類洞内皮細胞、および、自然免疫細胞の Toll-like receptors (TLRs) などの受容体が DAMPs を認識することで、自然免疫細胞の肝臓への浸潤促進や活性化を誘導する。活性化した免疫細胞はサイトカイン分泌や細胞障害機能を介して細胞死を誘導し、NAPQI 非依存的な AILI 後期の肝細胞死の拡大に寄与する。

1.2. 自然免疫細胞と適応免疫細胞

免疫系は、自然免疫系と適応免疫系に大別される。自然免疫系は、生体に侵入した病原体に対してごく初期から働く免疫系であり、病原体に対して早期応答をすることが特徴である (図 1.3)。自然免疫細胞には、マクロファージ、好中球、樹状細胞、Natural killer (NK) 細胞などが含まれる。これらの自然免疫細胞は、TLRs や NOD-like receptors などの Pathogen recognition receptors (PRRs) により多くの病原体の持つ共通分子パターンである Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識することで活性化する。近年、これらの PRR は High mobility group box 1 (HMG-B1), Heat shock protein (HSP) 70, DNA などの内因性分子である DAMPs を認識することで活性化することも明らかとなった。マクロファージや好中球は主に貪食や ROS 放出 (呼吸バースト) により病原体を障害・排除する。NK 細胞は感染細胞に対して Fas ligand (FasL) や Granzyme B を介して細胞死を誘導することで、病原体の増殖抑制や貪食による病原体排

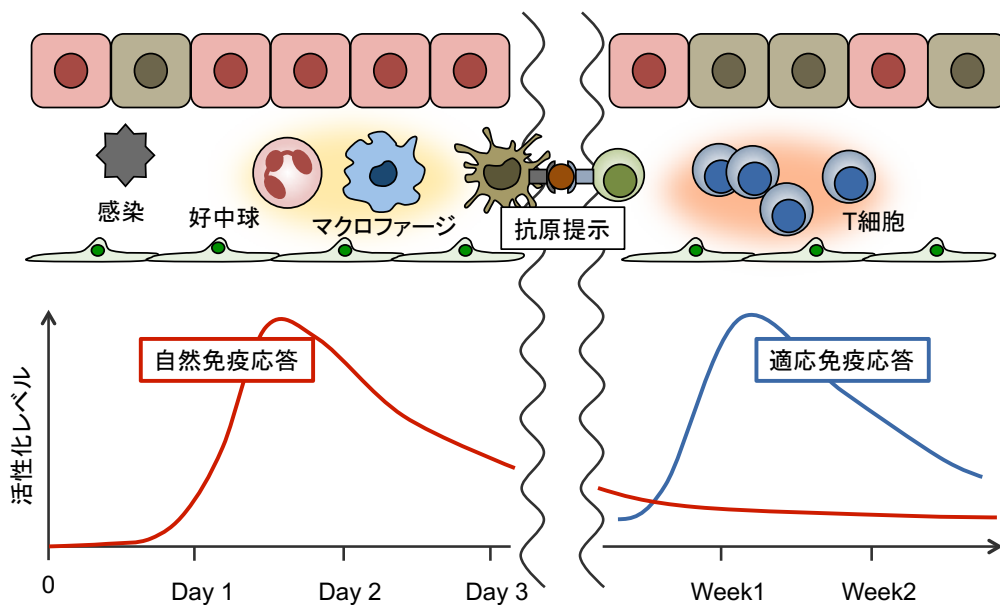


図 1.3 自然免疫系と適応免疫系

感染の初期において、病原体の PAMPs を PRRs が認識することでマクロファージや好中球など自然免疫細胞が活性化し、貪食などによって感染初期の病原体の増加を抑制する。樹状細胞は病原体由来のタンパク質を消化して MHC などを介して T 細胞に抗原提示を行う。抗原提示を受けた T 細胞は活性化し、クローン増殖を経てエフェクター細胞として機能するため、適応免疫応答の成熟には 1 週間以上の期間を要する。

除に関与する。樹状細胞は貪食能を有するが、病原体の排除というよりはむしろ適応免疫系の活性化に関与し、自然免疫系と適応免疫系の橋渡しを行う上で重要な細胞である。一方、適応免疫系は T 細胞と B 細胞で構成されており、これらの適応免疫細胞は自然免疫系で対応しきれなかった病原体をより効率的に排除する。自然免疫系では PAMPs を認識することで病原体の特性に依存しない免疫機能を利用する一方、適応免疫系では病原体が有する特有の分子構造 (抗原) を認識する。T 細胞は T cell receptors (TCRs) により樹状細胞が Major histocompatibility complex (MHC) 分子上に提示した病原体の抗原を認識し活性化される。一方、B 細胞は B cell receptors (BCRs) を介して抗原を直接的に認識し、T 細胞によるサイトカイン分泌を受けて活性化される。胎生期において、原始的な T 細胞と B 細胞は VDJ 遺伝子再編成により TCR 遺伝子座および BCR 遺伝子座の組み換えを介して、特定の抗原を認識できる多様な T 細胞クローンと B 細胞クローンが生成する。ある抗原を認識する適応免疫細胞は非感染時の生体にはごく少数しか存在しておらず、抗原刺激を受けてからクローン増殖・活性化をするため、適応免疫細胞が機能するまでには 1 週間程度の期間を要する (図 1.3)。活性化した T 細胞はサイトカイン分泌を介してマクロファージの貪食能や B 細胞の抗体産生能を亢進させることなどにより病原体の排除に関与する。B 細胞は病原体特有の抗原を認識する抗体を産生・分泌することで、自然免疫細胞による病原体の貪食の促進や補体系の活性化による病原体の排除に関与する。

1.3. AILI における自然免疫系の役割

AILI における自然免疫系は、障害期と回復期の両方のフェーズに関与することが報告されている。障害期では、マクロファージが AILI を増悪するまたは改善するという報告があり結論が得られていないが、

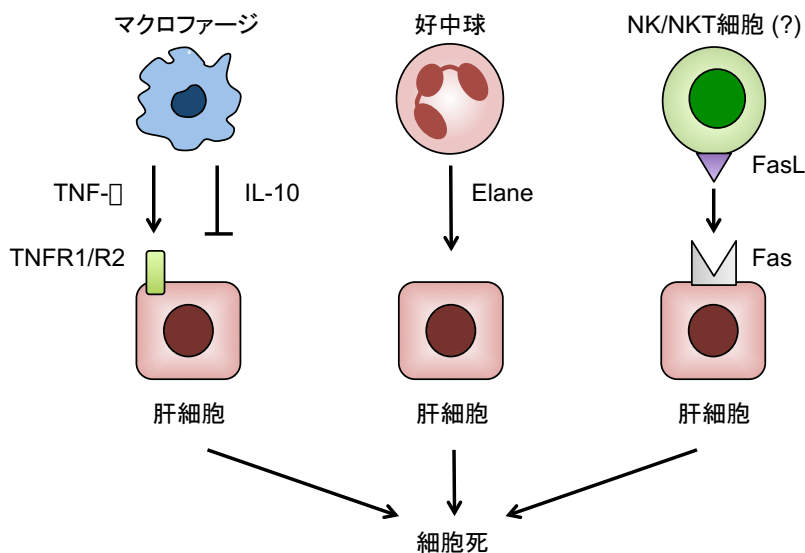


図 1.4 AILI における免疫系を介する主要な肝細胞障害経路

AILI では主に 3 つの肝細胞障害経路が報告されている。マクロファージは TNF-α などの炎症サイトカイン分泌により肝細胞障害を引き起こす一方、IL-10 の分泌により肝細胞障害に対して保護的に働くことも報告されている。好中球は AILI において肝臓の障害領域に大量に浸潤し、Protease の分泌などによって肝障害を増悪する。また、FasL による細胞死経路も肝細胞死を誘導する。

好中球に関しては肝障害を増悪することがわかりつつある (図 1.4)。また, FasL の提示細胞は不明であるが, AILIにおいて Fas 経路を介した肝細胞死が誘導されることも明らかになっている (項 1.6.で後述)。一方, 近年, マクロファージが肝障害の回復に関与することが複数報告されており注目を集めている。

1.3.1. AILIにおけるマクロファージの役割

肝臓に存在するマクロファージは, 卵黄嚢に由来する肝臓常在性の Kupffer 細胞 (KC) と造血幹細胞に由来する単球から分化した浸潤性の Monocyte-derived macrophage (MoMF) に分けられる。KC は腸管から流入する門脈血中の病原体に対する防御網を担っている。PAMPs および DAMPs に応答し, KC は Tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β , CC-chemokine ligand (CCL) 2, CXC chemokine ligand (CXCL) 1/2, および, IL-10 などのサイトカイン・ケモカインを分泌する[101]。APAP 暴露の初期において肝臓中の KC の数は大きく減少するが, 回復期に自己分裂により細胞数が回復する[195]。KC が AILI に与える影響については明確な結論が得られていない。Gadolinium chloride (GdCl₃) により KC を部分的に除去した場合は肝障害の改善が認められる一方, Clodronate liposome により KC を完全に除去した場合には肝障害が増悪することが報告されている[54, 96]。GdCl₃ 処理を行った場合においては, TNF- α などの炎症サイトカインや ROS 産生の低下が認められることから, KC はこれらの傷害性分子の産生を介して AILI を増悪する可能性が考えられる。一方, Clodronate liposome は KC だけでなく骨髄や血中の単球と MoMF も排除してしまうことから, 単球や MoMF が肝障害に対し保護作用を示す可能性もある。

APAP 暴露によって KC が細胞数を減少させる一方で, MoMF は CCL2 とその受容体である CC-chemokine receptor (CCR) 2 依存的に肝臓に浸潤して細胞数を顕著に増加させる。MoMF は KC と同様に表面抗原として F4/80 を発現しているが, TNF- α や IL-1 β などの炎症サイトカインの発現が KC と比較して特徴的に高い。MoMF が AILI における肝細胞障害に与える影響についても一定の見解が得られていない。CCR2 欠損マウスにおいて, 肝障害が改善するという報告と変わらないという報告があり, 実際に肝障害に与える影響は不明である[39, 126]。また, MoMF が主に分泌する TNF- α の受容体である TNF Receptor (TNFR) 1 の欠損や TNF- α に対する中和抗体の投与により, 肝障害が改善することも報告されている[13, 86]。一方で, MoMF は肝障害の回復期に非常に重要な役割を果たすことがわかりつつある。CCR2 の欠損や Clodronate liposome 処理により, 肝臓の障害領域の退縮が遅延する[77, 79, 189]。TNFR1 の欠損により障害領域の回復が遅れることも報告されていることから, MoMF から分泌された TNF- α などのサイトカインが肝細胞に対する生存シグナルとして作用し肝障害の回復に寄与する可能性も考えられる[29]。以上のようにマクロファージの肝細胞障害に対する直接的な影響に関しては議論の決着を得ていないが, マクロファージの浸潤が肝障害領域の退縮期に必須である。

1.3.2. AILIにおける好中球の役割

肝虚血再灌流障害, エンドトキシン誘導性肝障害, アルコール性肝障害などの様々な肝障害モデルにおいて, 好中球の浸潤が肝細胞障害を引き起こすことが報告されている[7, 90, 91]。これまで, 肝臓への好中球浸潤機構が様々な研究によって明らかにされてきた (図 1.5)。肝障害に際して, 肝細胞, 肝類洞血

管内皮細胞 (LSEC), および, KC が分泌する TNF- α , IL-1, CXC chemokine (CXCL1, CXCL2) などの制御を受け, 好中球は肝臓の毛細血管 (類洞血管) に集積する[4, 8, 53, 159, 187]。これらのメディエーターは好中球の β_2 -integrin family に属する Mac-1 (CD11b/CD18) の発現を上昇させ, LSEC 上の Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 を介して好中球が血管壁に接着する[88]。一方, 好中球が肝障害に寄与するためには類洞血管および中心静脈への集積だけでは不十分であり, 肝実質領域へ遊出することが不可欠である[30]。血管壁に接着した好中球は, 主にストレスを受けた肝細胞によって放出された CXCL1, CXCL2, および, Osteopontin (OPN) により肝実質領域に遊出する[2, 5, 6, 35, 108, 118]。肝臓に遊出した好中球は呼吸バーストによる酸化ストレスを介して肝細胞死を誘導する。すなわち, 好中球は Mac-1 を介して肝細胞と近接し, 細胞膜上の NADPH oxidase は拡散性の高い過酸化水素を産生する[66, 89]。また, 主顆粒

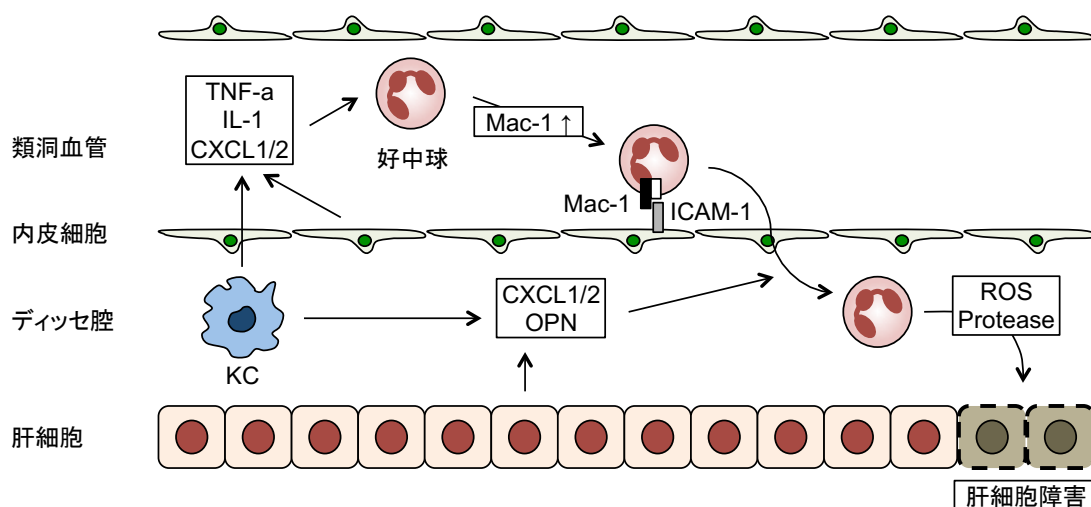


図 1.5 肝臓への好中球の浸潤と細胞障害メカニズム

肝障害において活性化した KC や内皮細胞 (LSEC) から分泌された TNF- α , IL-1, CXCL1/2 などによって好中球の細胞膜上の Mac-1 の発現が亢進する。Mac-1 は内皮細胞上の ICAM-1 と相互作用することで類洞血管壁にトラップされる。好中球はさらに KC や肝細胞から分泌された CXCL1/2 や OPN の作用で肝実質領域に遊出し, ROS や Protease の分泌によって肝細胞障害を引き起こす。

により分泌される Myeloperoxidase は次亜塩素酸を産生する[11]。好中球から放出されたこれらの酸化物質は肝細胞で酸化ストレスを引き起こすことにより細胞死を誘導することがわかっている[92]。さらに, 好中球が主に分泌する Protease 3 と Elastase neutrophil expressed (ELANE) は, TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカイン前駆体を切断して活性型に変換することで肝障害を増悪する[132, 183, 188]。

好中球が AILI の直接的な要因であるかどうかについて, 長期にわたって論争がなされてきた。ヒトとマウスの AILI において, 肝臓の障害領域に好中球が集積する。Kaplowitz の研究グループは, 好中球特異的な表面抗原を認識する Gr-1 抗体をマウスに投与して好中球を除去することで, 好中球が肝細胞障害に寄与することを報告した[117]。同研究において, 筆者らは Gr-1 抗体による APAP 代謝の変化や投与後 24 時間における KC の活性化による肝保護作用を否定している。しかしながら, 同研究での Gr-1 抗体投与

によって得られた表現型は、好中球を貪食した KC が活性化したことで肝細胞での Metallothionein (MT)-1 と MT-2 が発現上昇したためであるとの批判に晒された[117]。また、CD18 欠損マウスにおいて肝障害の回復は認められなかった[184]。ただし、CD18 欠損マウスは野生型マウスと同程度に好中球浸潤が認められたことから、好中球浸潤の重要性に関しては否定されたとは言い難い。さらに、NADPH oxidase 複合体の構成タンパク質の一つである gp91 (phox) を全身性で欠損させても AILI における肝細胞障害に影響しないことが報告された[93]。一方で、CXCL1/2 の受容体である CXC chemokine receptor (CXCR) 2 の全身性欠損により好中球の浸潤と肝障害が抑制できることが報告された[84]。この報告と一致して、CXCL1/2 の発現を誘導する IL-17A に対する抗体の投与により、好中球浸潤と肝障害が軽減することが分かった[179]。また、ELANE 全身性欠損によって AILI における肝細胞死が抑制されることが報告され、好中球が AILI に寄与するメカニズムの一部が明らかになった[81]。以上により、AILI における好中球の浸潤は、炎症の増悪によって誘導される副次的な現象ではなく、肝細胞障害に寄与する重要な要因だと考えられる。

1.4. 古典的 T 細胞について

T 細胞は古典的 T 細胞、Natural killer T (NKT) 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞に大別される。古典的 T 細胞は、さらに CD4 陽性の helper T (Th) 細胞 (CD4⁺ T 細胞) および制御性 T 細胞 (Treg), CD8 陽性の傷害性 T 細胞 (CD8⁺ T 細胞) に分類される。CD4⁺ T 細胞は樹状細胞などの抗原提示細胞 (APC) の MHC class II 分子により提示された抗原で活性化され、B 細胞の形質細胞への分化や CD8⁺ T 細胞とマクロファージの活性化など、他の白血球の機能を補助する働きを持つ。CD8⁺ T 細胞はウイルス感染細胞や癌細胞などの MHC class I 分子によって提示された抗原を認識し、標的細胞のアポトーシスを誘導する。一方、Treg は CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の活性化やエフェクター機能を阻害する役割を持つ。

全ての T 細胞は胎生期に造血幹細胞に由来する Common lymphoid progenitor (CLP) が胸腺に遊走して生じた胸腺細胞から分化して生じる (図 1.6)[59]。分化前の胸腺細胞は CD4⁻CD8⁻ の double negative (DN) 細胞として胸腺の皮質に存在しており、古典的 T 細胞の分化の場合、DN 胸腺細胞は表面マーカーの発現を変えつつ DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁻CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺), DN4 (CD44⁻CD25⁻) を経て double positive (DP) (CD4⁺CD8⁺) を生じ、最終的に single positive (SP) の CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞に分化する。この過程で TCR の α 鎖と β 鎖で V(D)J 遺伝子再編成と呼ばれる体細胞組換えが引き起こされる[173]。すなわち、TCR をコードする遺伝子座は Variable (V), Diversity (D), Joining (J) からなるセグメント構造を取っており、マウスでは、TCR α 遺伝子座は 71 個の V α と 51 個の J α , TCR β 遺伝子座は 35 個の V β , 2 個の D β , 12 個の J β から構成され、ヒトでは、TCR α 遺伝子座は 43 個の V α と 58 個の J α , TCR β 遺伝子座は 42 個の V β , 2 個の D β , 12 個の J β からなる。これらのセグメントは Recombination activating gene (RAG) 1 および RAG2 などの働きで繋ぎ変えられ、定常部 (C) と組み合わせられて機能的な TCR $\alpha\beta$ を生じる。V(D)J 遺伝子再編成により生じる TCR の多様性は数学的に $10^{12}\sim 10^{15}$ と見積もられているが、胸腺での選択圧によりマウスでは約 2×10^6 種類、ヒトでは約 2×10^7 種類の TCR が存在していると考えられている。この V(D)J 遺伝子再編成は機能的な TCR および B cell receptor (BCR) の形成に必須であるため、この過程に関

与する RAG1/2 などの遺伝子異常は T 細胞および B 細胞の欠損を生じる。

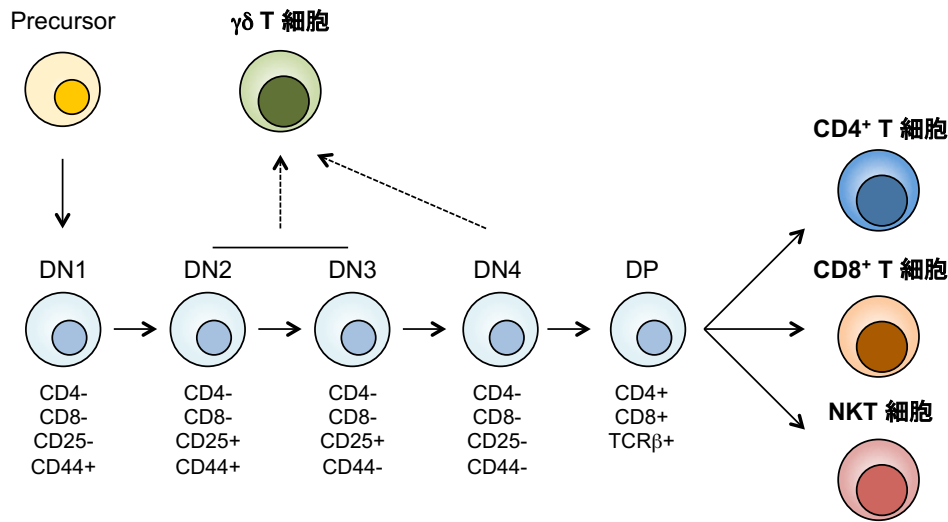


図 1.6 T 細胞の発生経路

全ての T 細胞は共通の造血幹細胞に由来する。T 細胞系列に入った前駆細胞は DN1 から DN4 を経て DP (CD4⁺CD8⁺) 細胞を生じる。DP 細胞はさらに CD4⁺T 細胞, CD8⁺T 細胞, NKT 細胞へと分化する。一方, DN2 から DN3 の一部の細胞は $\gamma\delta$ T 細胞へと分化する。 $\gamma\delta$ T 細胞に関しては DN4 から分化するとする説もある。

生体内に病原体や抗原物質が侵入した場合, naïve T 細胞は APC から提示された抗原を TCR によって認識するとともに, CD28 や Inducible T cell co-stimulator (ICOS) などの共刺激分子を介して活性化を受ける (図 1.7)[16, 161]。TCR シグナル経路は下流の PI3K-Akt 経路, Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路, NF κ B 経路, および, カルシウムシグナル経路などを活性化して T 細胞の免疫機能を亢進する。TCR シグナル伝達の最も初期に起こるイベントは CD3 の Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) のリン酸化による TCR/CD3 シグナル複合体の形成である。TCR は MHC-抗原複合体の認識を行う際, CD4 は MHC class II との結合を補助し, CD8 は MHC class I との結合を補助する。この時, CD4/CD8 は Lymphocyte-specific tyrosine kinase (Lck) をリクルートすることで CD3 ϵ / γ ヘテロダイマー, CD3 ϵ / δ ヘテロダイマー, CD3 ζ ホモダイマーの ITAM リン酸化を引き起こす。TCR/CD3 シグナル複合体の形成によって Zeta-chain-associated protein kinase 70 (ZAP-70) が複合体と結合し, ZAP-70 はさらに, 下流タンパク質のリン酸化を施し活性化する。ZAP-70 による TCR interacting molecule (TRIM) のリン酸化は PI3K と相互作用を促進することで Akt-mTOR 経路の活性化に関与すると考えられている。ZAP-70 からのリン酸化を受けた Linker for activation of T cells (LAT)と SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa (SLP76) は VAV, Phospholipase C (PLC) γ , Son of sevenless (SOS) などの足場となってシグナル複合体を形成する。VAV は RAC の guanine nucleotide exchange factor (GEF) であり JNK や p38 の活性化に寄与する。Phospholipase C (PLC) γ は Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) を Inositol triphosphate (IP₃) と Diacylglycerol (DAG) に変換し, 小胞体からのカルシウム放出, および, PKC θ と RAS guanyl-releasing protein

(RASGRP) の活性化を引き起こすことで Nuclear factor of activated T cell (NFAT) , NFκB, AP-1 の活性化を誘導する。また, SOS は Ras の GEF として働くことで Erk 経路を介して AP-1 を活性化する。以上のような TCR 下流経路は, T 細胞増殖の促進や IL-2 などの遺伝子発現制御を介した T 細胞活性化を引き起こす。これらに加えて, 共刺激分子は一般的に Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) を介して Protein kinase C (PKC) θ と mammalian Target of Rapamycin (mTOR) を活性化することで T 細胞の活性化, タンパク質合成や増殖を引き起こす。in vitro 実験系では, IL-2 の添加に加えて, 抗 CD3ε抗体による刺激, または, 抗 CD3ε抗体および抗 CD28 抗体の共刺激により T 細胞を活性化する。また, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と Ionomycin の共刺激も T 細胞の活性化に良く利用される。PMA は DAG の構造的類似物質であり PKCθ と結合して活性化する一方, Ionomycin は小胞体からのカルシウム流出を誘導する[31]。具体的な機序は不明であるが, PMA と Ionomycin は刺激後 30 分から 1 時間で Akt のリン酸化を促進し, mTOR-S6K 経路を介してタンパク質合成を促進する[123]。そのため, 比較的短時間の PMA と Ionomycin 刺激では転写よりもタンパク質の翻訳によるサイトカイン産生が行われるため, 生体から分離した T 細胞の活性化状態を評価する上で適していると考えられる。

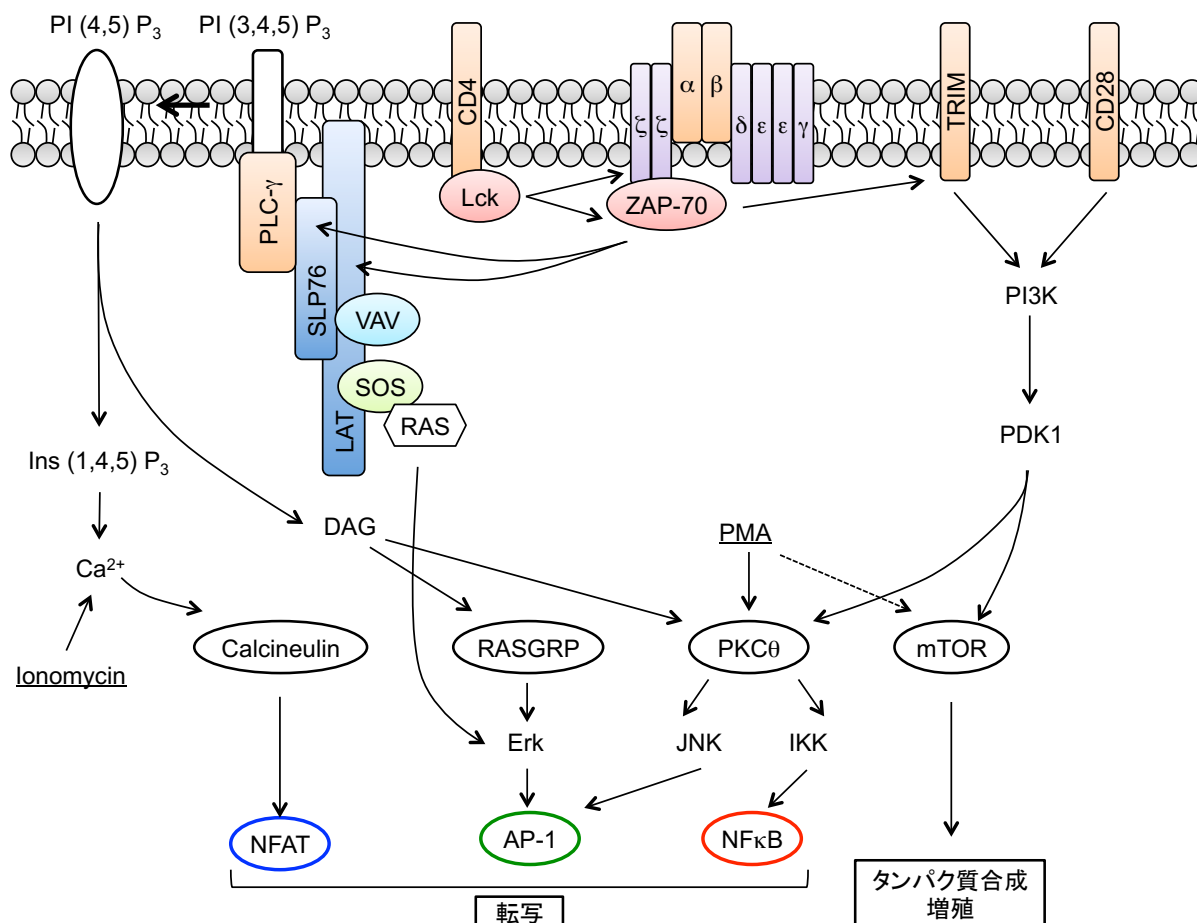


図 1.7 T 細胞活性化に関わるシグナル経路

TCR および共刺激分子の活性化は PI3K-Akt 経路, Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路, NFκB 経路, カルシウムシグナル経路, および mTOR 経路などを活性化することで T 細胞の免疫機能を調節する。

APCの抗原提示によるTCR活性化により、naïve T細胞はエフェクター機能を獲得する。naïve CD4⁺ T細胞の活性化では、周辺のサイトカイン環境によってCD4⁺ T細胞は特徴的な転写因子を発現するTh1, Th2, Th17, Tregの4つのサブタイプに分化する(図1.8)[193]。IL-12の存在下ではT-betの発現が誘導され、IFN- γ を分泌するTh1が生じる。Th1はマクロファージやCD8⁺ T細胞の活性化により腫瘍免疫や細胞内病原体に対する細胞性免疫を促進する一方、自己免疫疾患にも関与する。IL-4の存在下ではGATA-3の発現が誘導され、IL-4やIL-13を分泌するTh2が生じる。Th2は主に細胞外寄生生物の排除などに働くが、アレルギーや喘息の原因ともなる。TGF- β , IL-6, IL-21の存在下ではRetinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) γ tの発現が誘導され、主にIL-17とIL-21を分泌するTh17が分化する。これらのサイトカインは上皮細胞に作用して病原体の侵入を防ぎ好中球を動員することで細胞外細菌やカビの排除に働く。また、Th17の過剰な応答はInflammatory bowel disease (IBD)や関節炎などの自己免疫疾患を引き起こす。これらのT細胞の増殖能やエフェクター機能を抑制するTregは、IL-2とTGF- β の存在下でFoxp3依存的に分化する。Tregの機能は十分には分かっていないが、直接的な細胞間相互作用やIL-10およびTGF β などの抑制性サイトカインの分泌により免疫抑制機能を発揮すると考えられている。Tregに

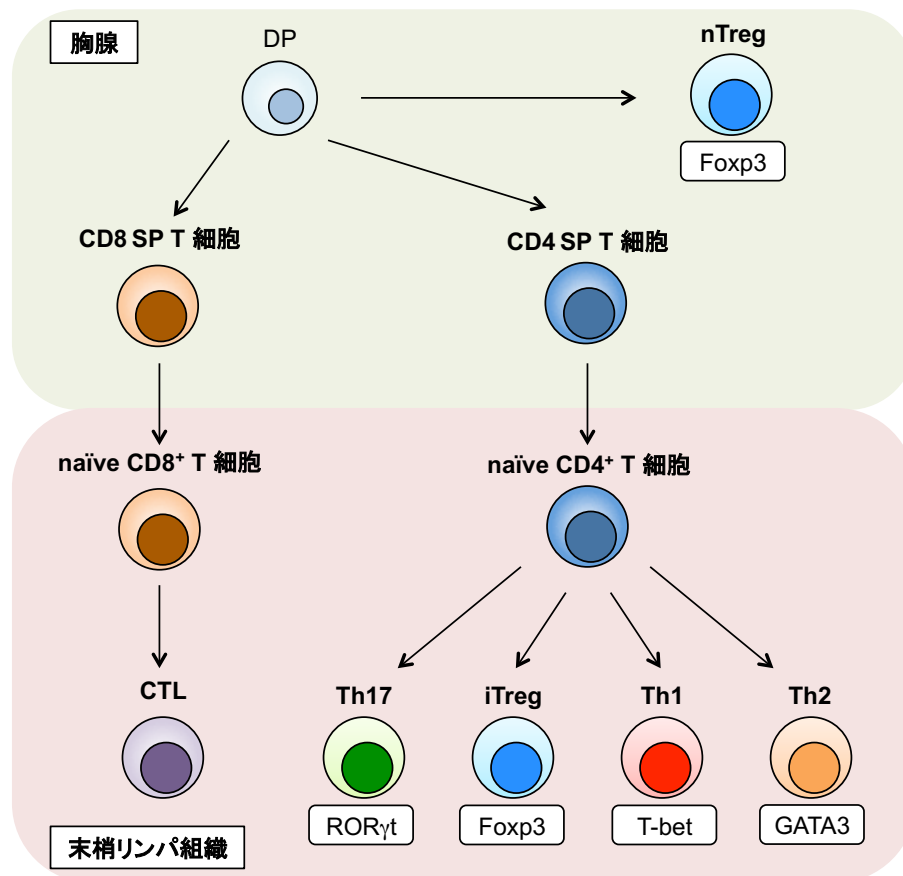


図 1.8 胸腺および末梢リンパ組織における T 細胞の分化

胸腺で生じた DP 細胞は CD4 SP および CD8 SP へと分化し、SP 細胞はそれぞれ末梢リンパ組織に移動して naïve T 細胞として維持される。APC からの抗原提示を受けて、naïve CD8⁺ T 細胞は活性化して CTL へと分化する。また、naïve CD4⁺ T 細胞は抗原提示時に疾患特異的な周辺サイトカイン環境に応じて、独特の転写因子を発現する Th17, iTreg, Th1, Th2 に分化する。また、Treg には胎生期に DP から分化する nTreg が存在しており、末梢リンパ節や末梢組織で維持される。

は胎生期に DP 細胞から分化する naturally occurring Treg (nTreg) と、抗原刺激により naïve CD4⁺ T 細胞から分化する induced Treg (iTreg) の 2 つのタイプが存在する。TCR の多様性などに差異はあるが、いずれの細胞も免疫抑制に関与する。naïve CD8⁺ T 細胞の活性化には CD4⁺ T 細胞よりも強い刺激が必要である。APC と CD4⁺ T 細胞が会合すると、APC は共刺激分子である B7 family (CD80 や CD86) の発現が上昇し、CD4⁺ T 細胞の IL-2 分泌を誘導する。CD8⁺ T 細胞は共刺激分子と IL-2 により活性化して Cytotoxic T lymphocyte (CTL) となり (図 1.8)、Granzyme, Perforin, TNF- α , FasL などによりウイルス感染細胞や癌細胞の除去に働く。一方、過剰な細胞障害機能は、アレルギー反応を引き起こすきっかけとなる。

特定の抗原を認識する TCR $\alpha\beta$ を持つ T 細胞クローンは生体内に数個しか存在しないと考えられている。したがって、特定の抗原に対する免疫応答を誘導するためには、T 細胞クローンの活性化と増殖が必要となり、古典的 T 細胞による免疫の成熟には 1 週間以上の時間を要することから、AILI のような急性炎症には関与しないという見方が一般的である。

1.5. 自然免疫様 T 細胞について

免疫学では免疫細胞は長らく自然免疫細胞と適応免疫細胞の 2 つのカテゴリーに分類されてきた。近年、TCR や CD3 を発現しているにもかかわらず、PRRs やサイトカインの刺激を介して炎症早期に活性化する一群の T 細胞が知られるようになった。これらの細胞は自然免疫様 T 細胞と総称され、古典的 T 細胞とは異なる特徴的な TCR を発現している Natural killer T (NKT) 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞が含まれる (図 1.9)。

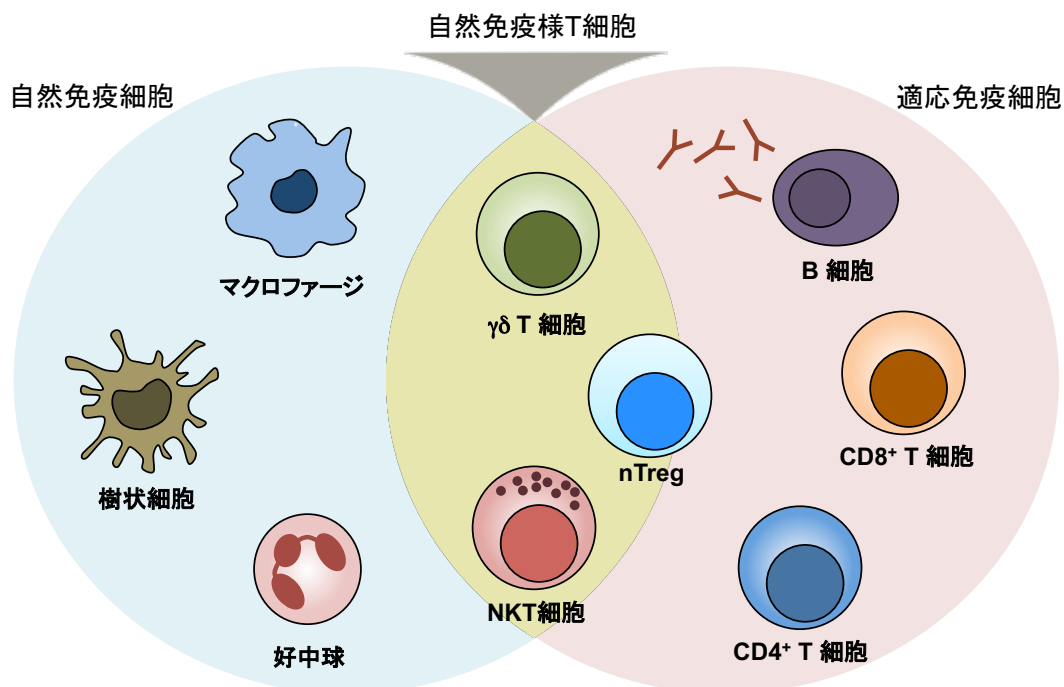


図 1.9 古典的な免疫細胞の分類と自然免疫様 T リンパ球

免疫細胞は炎症初期に作用する自然免疫細胞と炎症後期に作用する適応免疫細胞に加え、それらの免疫系を橋渡しする自然免疫様 T 細胞に大別される。自然免疫様 T 細胞には $\gamma\delta$ T 細胞と NKT 細胞などが分類される。nTreg に関しては、自然免疫様 T 細胞としての機能も有している。

古典的 T 細胞は免疫刺激を受けた後に活性化・クローン増殖を経てエフェクター細胞に分化する必要があるが、自然免疫様 T 細胞は既に分化したエフェクター細胞として生体内に存在しているため早期免疫応答でも機能することができる。自然免疫様リンパ球に加え、Treg の中でも胎生期に分化する nTreg は早期炎症応答で機能する可能性が示唆されている。これらの早期応答性 T 細胞は、自然免疫細胞による早期応答と適応免疫細胞による後期応答のギャップを補完し、無菌性炎症や感染防御において重要な役割を果たす。

1.5.1. $\gamma\delta$ T 細胞

$\gamma\delta$ T 細胞は、 $\alpha\beta$ T 細胞とは異なる TCR $\gamma\delta$ を有する T 細胞の一群として発見された[199]。 $\gamma\delta$ T 細胞は胎生期の胸腺で既に分化しており、IL-17A 分泌型と IFN- γ 分泌型の二つのサブタイプが存在する。これらの細胞は全リンパ球の中で 5%程度を構成しており、 $\alpha\beta$ T 細胞と比較すると細胞数が比較的少ない細胞集団である。一方、感染や組織障害に素早く応答して IL-17A または IFN- γ を大量に分泌することで、免疫応答の初期の段階で重要な役割を果たす。

$\gamma\delta$ T 細胞は $\alpha\beta$ T 細胞よりも個体発生早期の段階で分化し、エフェクター細胞として末梢で維持される[15, 73, 199]。 $\gamma\delta$ T 細胞は $\alpha\beta$ T 細胞と同様に CLP から分化する。分化は主に胸腺で起こり、CLP から分化した DN1 は、CD25 の発現上昇 (DN2)、CD44 の発現低下 (DN3) を経て、この時期に γ 鎖および δ 鎖が再編成を受けて TCR $\gamma\delta$ を発現し、 $\alpha\beta$ T 細胞とは異なる系統の $\gamma\delta$ T 細胞を生じる[165]。一方、 $\gamma\delta$ T 細胞が DN4 から分化するという報告もあり見解の一致を得ていない[143, 148]。 $\gamma\delta$ T 細胞は胎生期に既に分化した IFN- γ や IL-17A 分泌能などのエフェクター機能を獲得し、分化した $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺を出て末梢組織やリンパ節で一生涯に渡って維持される。

$\gamma\delta$ T 細胞の TCR $\gamma\delta$ は、古典的 T 細胞の TCR を構成する α 鎖および β 鎖とは異なる γ 鎖および δ 鎖から構成され、 α 鎖および β 鎖と同様に V(D)J 遺伝子再編成によって生じる[27, 199]。 δ 鎖の遺伝子座は α 鎖の遺伝子座の中に存在しており、V セグメントの一部を共有している。一方、 γ 鎖は α 鎖および β 鎖とは全く異なる遺伝子座に存在している。マウスでは TCR γ 遺伝子座は 7 個の V γ 、4 個の J γ 、TCR δ 遺伝子座は 2 個の D δ 、2 個の J δ が同定されており、ヒトでは TCR γ 遺伝子座は 14 個の V γ 、5 個の J γ 、TCR δ 遺伝子座は 3 個の D δ 、3 個の J δ が同定されている。V δ は V α の一部のセグメントを用いている。 γ 鎖および δ 鎖は α 鎖および β 鎖と異なり特定のセグメントの組み合わせしか持たない。したがって、TCR $\gamma\delta$ は TCR $\alpha\beta$ と比較して認識する抗原の多様性が低いと考えられている。一方、TCR $\gamma\delta$ が認識する抗原はほとんど分かっていない。脂質抗原の提示に関与する CD1 分子を認識できることから、TCR $\gamma\delta$ は TCR $\alpha\beta$ よりも脂質抗原の認識に優れると考えられている[27]。NOD マウスにおいて、Insulin 由来の B:9-23 ペプチドを MHC class II 分子を介して認識することや、ウイルスおよび細菌感染時に引き起こされる MHC 分子のグリコシル化を認識できることが明らかになっている[3, 71]。また、TCR $\gamma\delta$ は BCR と同様に MHC 分子を介さずに直接的に抗原を認識しうる点で TCR $\alpha\beta$ と大きく異なっている。以上のような TCR 分子を介する活性化に加え、一部の $\gamma\delta$ T 細胞は TLRs を細胞表面に発現しており、PAMPs を介した活性化を受けることができる[41]。さらに、マクロファージが分泌する IL-1 および IL-23 刺激によっても活性化できることが報告されており、

自然免疫細胞としての機能を有していることも示されている[167]。

$\gamma\delta$ T 細胞には IL-17A 分泌型と IFN- γ 分泌型の 2 つのサブタイプが確認されている。IL-17A 分泌型 $\gamma\delta$ T 細胞は CD27⁺CD25⁺CCR6⁺であり、IFN- γ 分泌型 $\gamma\delta$ T 細胞は CD27⁺CD122⁺NK1.1⁺である[27, 143]。 $\gamma\delta$ T 細胞は末梢リンパ節では CD3⁺ T 細胞の 2-3%を占ており、粘膜組織に最も多く存在している[199]。IL-17A 分泌型 $\gamma\delta$ T 細胞は主に末梢リンパ節、子宮、腹腔、肺に分布する一方、IFN- γ 分泌型 $\gamma\delta$ T 細胞は主に皮膚と脾臓に多く分布する。一方、肝臓は胎生期の胸腺外の IL-17A 分泌型 $\gamma\delta$ T 細胞分化の場であるとともに、肝臓の $\gamma\delta$ T 細胞は CD3⁺ T 細胞の 15-25%もの割合を占めることから、 $\gamma\delta$ T 細胞は肝臓の恒常性維持や疾患形成に関与すると考えられている[70]。これらの $\gamma\delta$ T 細胞は抗原刺激を受けるとすぐに活性化し、IFN- γ および IL-17A を分泌して免疫応答を制御する。皮膚の損傷や感染に際し、IFN- γ 分泌型 $\gamma\delta$ T 細胞 (T $\gamma\delta$ ifn) は IFN- γ を分泌して樹状細胞の活性化を引き起こす[143]。IL-17A 分泌型 $\gamma\delta$ T 細胞の場合、胎生期に由来し末梢組織で維持される natural occurring T $\gamma\delta$ 17 (nT $\gamma\delta$ 17) と二次リンパ節に分配されて TCR 刺激により活性化される induced T $\gamma\delta$ 17 (iT $\gamma\delta$ 17) が存在する[28]。nT $\gamma\delta$ 17 は刺激から 12 時間以内に活性化して大量に IL-17A を分泌する (図 1.10)。一方、リンパ節で刺激を受けた iT $\gamma\delta$ 17 は抗原刺激後に活性化して、刺激から 60 時間以内に IL-17A を分泌する。刺激からエフェクター機能を獲得するのに 1 週間以上要する Th17 と比較して T $\gamma\delta$ 17 は免疫応答の非常に早期に活性化され、大腸菌感染症、カンジダ感染症、および、結核感染症の初期感染防御において好中球を動員する。

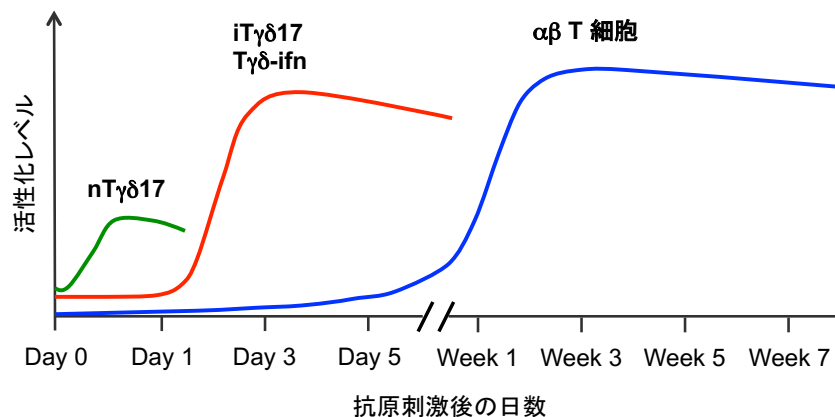


図 1.10 $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の抗原刺激後の活性化にかかる期間と活性化レベル

nT $\gamma\delta$ 17 は抗原刺激後 12 時間以内に IL-17A を産生することが出来る。iT $\gamma\delta$ 17 と T $\gamma\delta$ -ifn はそれぞれ IL-17A と IFN- γ を産生するのに 60 時間程度かかる。一方、 $\alpha\beta$ T 細胞は抗原刺激後にエフェクター機能を獲得するまで 1 週間以上の期間を必要とする。

以上のように、 $\gamma\delta$ T 細胞は古典的 T 細胞とは異なる様式で活性化し、免疫応答の早期段階で免疫機能を発揮することで、自然免疫系と適応免疫系のギャップを補完する重要な細胞集団である。

1.5.2. NKT 細胞

NKT 細胞は、表面抗原として NK 細胞と同様に NK1.1 を発現しており、かつ、 $\alpha\beta$ T 細胞と同様に遺伝

子再編成で生じたTCR $\alpha\beta$ を持つ細胞群である[197]。 $\alpha\beta$ T細胞がMHC分子により抗原提示を受ける一方、NKT細胞の多くはCD1分子拘束性であり、主にスフィンゴ脂質、グリセロ糖脂質やリン脂質などの脂質抗原を認識する。肝臓はiNKT細胞が非常に豊富な臓器であり、T細胞の30%程度を占めている。自己免疫性肝炎、アルコール性肝炎、非アルコール性肝炎、原発性胆汁性肝硬変においてiNKT細胞が大きく関与することが報告されている。

NKT細胞は古典的T細胞と同様にDPを経由して分化する。NKT細胞の前駆細胞については2つの説が提唱されている。すなわち、T細胞と同様にランダムな遺伝子再編成でTCRを生じた後に特定のリガンド刺激を受けてNKT細胞を生じるという説(セレクションモデル)と、T細胞分化の途中から独特な前駆細胞を生じるという説(プリコミットメントモデル)である。NKT細胞の分化に重要なRunx1またはROR γ tをDP特異的に欠損するとNKT細胞を生じなくなることは、T細胞と共通なDPプールからNKT細胞を生じることを示しセレクションモデルを支持している[51]。一方、DN1およびDN4からNKT細胞を生じる前駆細胞を検出できることはプリコミットメントモデルを支持している[43]。NKT細胞の分化に関しては更なる研究が必要である。

ほとんどのNKT細胞のTCRはV α 鎖として同一のV α 14/J α 18を、V β 鎖として主にV β 8、加えてV β 2とV β 7を偏って使用する[197]。そのため、このタイプのNKT細胞はinvariant NKT細胞(iNKT細胞)と呼ばれる。iNKT細胞のリガンドはKIRIN株式会社の研究により、抗腫瘍効果を有するカイメン由来の(2S, 3S, 4R)-1-O-(α -Galactopyranosyl)-2-(N-hexaconsanoylamino)-1,3,4-octadecanetriol (α GalCer)がCD1d分子に結合しTCRを介してNKT細胞を活性化する物質として発見された[98]。一方、生体由来物質の認識に関する知見は十分ではないが、Isoglobotrihexosylceramide (iGb3)が認識されることが報告され、無菌性炎症においてもTCRシグナルがNKT細胞活性化に重要な役割を果たす可能性を示している[42, 192]。NKT細胞はこれらのリガンドを認識すると素早く活性化して免疫機能を発揮する。 α GalCerの投与実験において、投与後6-24時間でNKT細胞の活性化マーカーであるCD69の発現上昇が認められ、急性肝障害に寄与することが報告されている[74]。さらに、 $\gamma\delta$ T細胞と同様に、TLRsを介して活性化されることも報告されている[74, 100]。

NKT細胞は非常に多岐に渡る機能を有しており、サイトカインとしてIL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IFN- γ , TNF- α , Lymphotoxin (LT), Granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF), ケモカインとしてRANTES (CCL5), Eotaxin, MIP-1 α , MIP-2 β , MIP-2などを分泌し、Fas death ligand (FasL), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), Perforin, Granzymeなどの効果分子を発現する[197]。これらの機能は全て一つのNKT細胞サブセットが担う訳ではなく、NKT細胞による免疫応答は一般的にその機能を指標に大きくTh1, Th2, Th17様応答に分類できる。NKT細胞のこれらのエフェクター機能は周辺サイトカイン環境によって制御されるが、その制御機構はCD4⁺T細胞とは異なる。Th1細胞はIL-12によりnaïve CD4⁺細胞から分化してIL-12やIFN- γ を分泌し、Th2細胞はIL-4の刺激によりnaïve CD4⁺細胞から分化してIL-4やIL-10を分泌する。一方、樹状細胞に α GalCerをパルス刺激し、NKT細胞をIFN- γ 刺激した場合にはIL-4を分泌し、NKT細胞をIL-4刺激した場合にはIFN- γ を分泌するというCD4⁺T細胞とは全く逆の応答を示す[121,198]。腫瘍においてはTh2が優位に働き癌免疫に対して

抑制的に働くが、Th2 サイトカイン環境では NKT 細胞は逆に Th1 応答を生じて癌転移を抑制する。また、Th17 様 NKT 細胞 (NKT17 細胞) は主に腸管、肺、皮膚、末梢リンパ節に多く存在する。NKT17 は活性化に際して IL-17 を分泌し、上皮バリアの破綻や好中球動員を誘導することで、炎症性腸疾患 (IBD)、喘息、皮膚炎、関節炎などを引き起こす[12, 122]。NKT 細胞はこのような慢性炎症応答に加え、急性炎症応答でも活性化して疾患形成に関与する。 α GalCer 投与による急性肝障害では、障害初期段階の iNKT 細胞による IL-4 分泌は好中球の生存を促進することで肝細胞死を促進する一方、障害後期の IFN- γ 分泌は好中球のアポトーシスを誘導することで炎症を解消に向かわせる[20]。また、LPS 投与による敗血症モデルでは、NKT 細胞の IFN- γ 分泌により急性免疫応答が誘導される[127]。さらに、近年、Concanavalin-A (Con A) 誘導性肝炎などの急性肝障害では NKT 細胞が OPN を分泌することで好中球動員による炎症を促進することも明らかにされた[46]。

1.5.3. nTreg

エフェクター T 細胞の機能を抑制する Treg の存在は、1995 年の坂口志文らの CD4⁺CD25⁺ T 細胞に関する研究によって明らかになった[156, 160]。Treg には、胎生期に胸腺で分化して各組織に定着・維持される nTreg と、免疫刺激によって末梢リンパ節の naïve CD4⁺ T 細胞から分化する iTreg に分類される。一般的に、iTreg は免疫刺激を受けてからエフェクター機能を獲得するため、早期炎症で活性化する Treg は胎生期にエフェクター機能を獲得する nTreg であると考えられている。nTreg は全血中の 1-2%程度を占める非常に少数の細胞であるが、nTreg を除去したマウスは全身性自己免疫疾患を発症することが知られており、免疫系の制御において非常に重要な役割を果たすと考えられている[131]。

Treg は他の古典的 T 細胞と同様に TCR $\alpha\beta$ を発現している。TCR 多様性の乏しい NKT 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞とは異なり、Treg の TCR は古典的 T 細胞とレパトリーは異なるが多様性は同程度であり、nTreg に関しては古典的 T 細胞よりも多様であると考えられている[135, 140]。また、古典的 T 細胞の TCR よりも MHC 分子への親和性が高いという特徴も持っている。胎生期の胸腺において TEC によって抗原提示を受ける際、MHC/抗原複合体を強く認識する T 細胞はアポトーシスを引き起こし、弱く認識する T 細胞は古典的 T 細胞に分化する。一方、MHC/抗原複合体を中程度の親和性で認識する T 細胞は CD25⁺nTreg 細胞となって古典的 T 細胞とは異なる系列の細胞として分化し、CD4⁺ SP 細胞の時期に Foxp3 を発現する[58, 114]。一方、iTreg に関しては、末梢リンパ節の naïve CD4⁺ T 細胞が抗原提示を受け、IL-2 や TGF- β 等の刺激によって分化すると考えられている[26, 105]。nTreg と iTreg の表面抗原は共通しており、これらの細胞を区別する方法は無い。現在、多くの研究では CD4⁺CD25⁺ T 細胞を Treg として扱っているが、その他の活性化 T 細胞も CD25 を発現しており、CD4⁺CD25⁺ T 細胞は比較的雑多な T 細胞を含むと考えられている。Foxp3 は細胞内抗原であるため細胞分離には使うことができないが、現在最も精度の高い Treg は CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁻細胞であると考えられている[160]。

Treg は非常に多様な免疫抑制作用を持つことが明らかにされてきた (図 1.11)。Treg とエフェクター T 細胞を液性因子のみを透過する培養系で分離培養した場合にエフェクター T 細胞の抑制が認められないことから、当初は Treg の抑制機能は直接的な細胞間接着によるものであると考えられた[160]。Inhibitory B7 superfamily に属する Cytotoxic T-lymphocyte antigen (CTLA) -4 は Foxp3 によって発現制御を受け、Treg

の細胞表面に高発現している[115, 186]。CTLA-4 はエフェクターT 細胞や樹状細胞上の CD80 と CD86 に結合して抑制性のシグナルを伝達する。CD4 関連分子である Lymphocyte-activation gene (LAG) -3 は樹状細胞の MHC class II 分子に結合し、樹状細胞の共刺激分子の発現を低下させる[112]。また、CD83 も Treg の細胞表面に高発現しており、細胞接触を介した抑制機能の一部を担っている[153]。一方、Treg は液性因子の分泌によっても免疫細胞の機能を制御することが報告されている。IL-10 は樹状細胞における TNF- α 、IL-1、IL-12、IFN- γ などの Th1 サイトカインの分泌や MHC class II 分子や共刺激分子の発現低下を誘導し、T 細胞に対しても増殖抑制などの機能を発揮する[17, 18, 48, 172]。これらの報告では nTreg の抑制機能は部分的に IL-10 が担うことが示されている一方で nTreg は IL-10 を分泌しないという報告もある[47] ことから、特定の nTreg サブセットや病態依存的に nTreg が IL-10 を分泌するのではないかと考えられている[186]。また、nTreg は TGF- β を分泌することも報告されている。TGF- β には TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 の3つのサブタイプがあり、免疫細胞は TGF- β 1 を主に発現している[160]。TGF- β は多種多様な細胞に作用するが、T 細胞に対しては増殖能の低下やエフェクター機能の低下などの効果を持つ[111, 116]。Treg が TGF- β の分泌能を持つかどうかに関して議論があるが、TGF- β は Treg の細胞膜に結合して細胞間接着による抑制機能を発揮することが示唆されている[47, 95, 128, 129, 168]。さらに、Treg は Granzyme と Perforin の分泌や FasL を介した T 細胞のアポトーシスの誘導や、CD39 と CD73 の細胞外 Adenosine 産生による Adenosine receptors を介した T 細胞の機能抑制を引き起こすことが報告されている[45, 61, 65, 136, 149]。

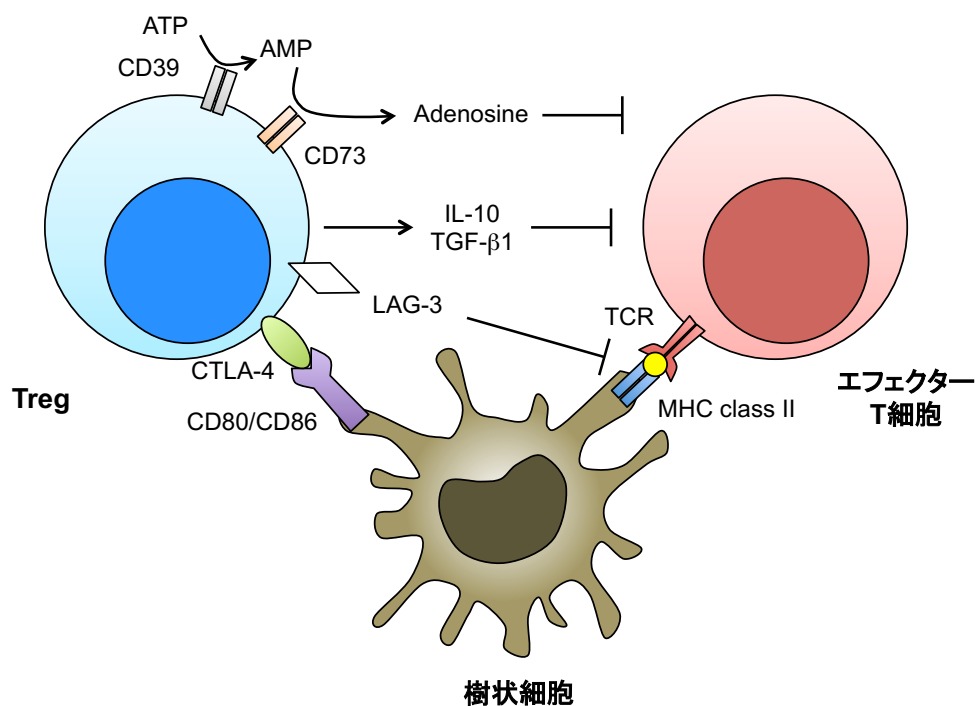


図 1.11 Treg による免疫抑制機能

Treg は細胞接着および非接着による抑制機能を有する。CTLA-4 と LAG-3 はそれぞれ樹状細胞の CD80/86 および MHC class II 結合することで抑制機能を示す。また、CD39 と CD73 により代謝されて生じる Adenosine および炎症抑制サイトカインである IL-10 と TGF- β は直接 T 細胞の機能を抑制する。

nTreg は基本的には適応免疫系を構成する細胞であり、ほとんどの研究は慢性炎症におけるエフェクター T 細胞の抑制機能に注目してきた。一方、Treg は TLR-2, -4, -5, -8 を特異的に発現しており、*in vitro* での TLR 単独刺激により増殖と抑制能を示すなど、自然免疫様の機能を持つことが報告されている[21, 176]。実際の急性炎症では nTreg がどのように活性化されるかは分かっていないが、急性炎症の早期に活性化して抑制機能を示すことが複数報告されている[22, 57, 137]。Con A 誘導性肝炎において、Con A 投与後 12 時間以内に Treg 細胞が活性化して TGF- β を分泌し、肝保護作用を示すことが示唆されている[181]。

1.6. AILI における T 細胞の役割

AILI における肝細胞障害は 24 時間以内に起こる急性応答であることから、成熟に一定期間を要する適応免疫系は関与しないとする説が根強かった。2002 年に石田らは、T 細胞を含むリンパ球が主に分泌する IFN- γ を全身性で欠損したマウスにおいてマクロファージや好中球の浸潤が減少し AILI が軽減することを報告した[85]。この研究では IFN- γ の分泌源は明らかにされなかったが、T 細胞が AILI の病態形成に関与することを示唆した。また、T 細胞における Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 3 の過剰発現や SOCS3 過剰発現 CD4⁺T 細胞の移入により AILI が増悪することが報告され、T 細胞が実際に AILI の急性肝障害に関与することが示された[134]。また、AILI 患者の血中サイトカインに関する研究において、T 細胞が主に分泌する IL-17 と IL-21 が増加していることが報告されたが、具体的な分泌細胞に関しては明確に示されなかった[110]。マウスの AILI においても同様に血中 IL-17 レベルが上昇し、IL-17 の産生は CD3⁺CD4⁺細胞が担っている可能性が示された[194]。CD3⁺CD4⁺細胞は一般的には古典的 CD4⁺T 細胞や NKT 細胞であると考えられるが、IL-17 分泌が APAP 投与後 6 時間と非常に早期の段階であり IL-17⁺細胞が α -GalCer CD1d tetramer に結合能を示さないことから、Th17 と NKT 細胞以外の T 細胞が分泌源であると考えられた。さらに、IL-17 分泌細胞を詳細に解析した他の研究によって、マクロファージが分泌した IL-23 により $\gamma\delta$ T 細胞が活性化し、IL-17A を分泌することが示された[179]。また、 $\gamma\delta$ T 細胞の除去実験や IL-17A の中和実験により好中球数の減少と肝障害の改善が認められたことから、 $\gamma\delta$ T 細胞は IL-17A の分泌を介して肝臓に好中球を動員することで AILI を増悪することが明らかとなった (図 1.12)。さらに、近年、タツナミソウ属の根から単離されたフラボノイド系化合物である Baicalin が、肝臓への IL-17A 型 $\gamma\delta$ T 細胞の浸潤を抑制することで IL-17A 依存的な肝障害を抑制することも報告されている[113]。

NKT 細胞も AILI に関与することが報告されているが、現在のところ一定の見解が得られていない (図 1.12)。NKT 細胞を持たない J α 18 欠損マウスおよび CD1d 欠損マウスにおいて、絶食時の肝臓の CYP2E1 発現増加が肝細胞障害を引き起こすことが報告されている[120]。一方、別の報告では、APAP による初期障害時に減少した GSH のレベルが J α 18 欠損マウスではより早く回復し、以降の肝細胞障害が抑制されるという全く逆の表現型が得られている[50]。なぜ相反する表現型が得られたかは不明であるが、マウスの遺伝的背景の違いが影響している可能性が考えられる。一方、FasL の受容体である Fas を欠損したマウスでは AILI における肝細胞障害が低下することが示されており、NKT 細胞が FasL シグナルを介して AILI を増悪する可能性が示唆されている[185]。

nTreg に関しては、AILI に対して保護的に働くことがわかっている (図 1.12)[178]。nTreg を除去する

CD25 中和抗体 の投与により肝障害が増悪し、 $CD4^+CD25^+$ Treg の移入により肝障害が改善する。また、CD25 中和抗体投与により肝臓の活性化 T 細胞 ($CD4^+CD44^{hi}CD62L^{low}$) が増加することから、Treg は他の $CD4^+$ T 細胞の機能を抑制することで AILI に対して保護的に働く可能性が示唆された。

以上のように、古典的 T 細胞が AILI に関与するという決定的な証拠は得られていないが、自然免疫様 T 細胞や nTreg などの早期応答性 T 細胞が他の免疫細胞や APAP 代謝の制御を介して AILI の病態形成に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。しかしながら、AILI におけるこれらの細胞の活性化機構や病態形成メカニズムについては十分に理解されておらず、更なる研究が必要であるといえる。

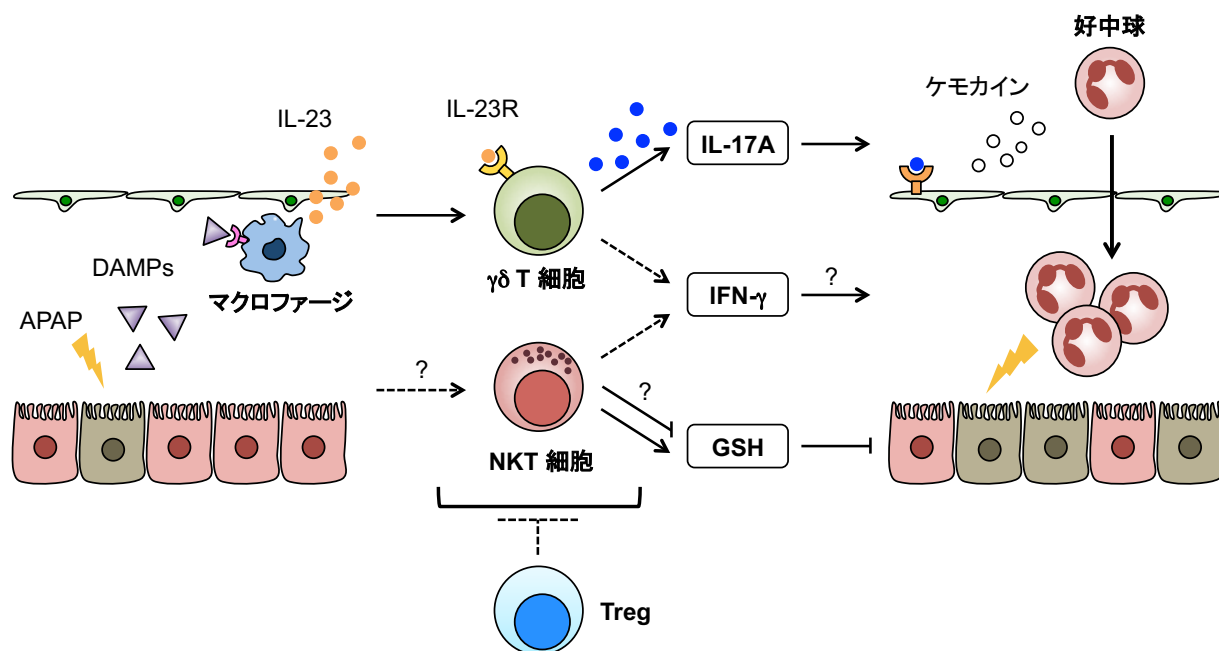


図 1.12 AILI における T 細胞の関与

$\gamma\delta$ T 細胞は IL-17A の分泌を介して好中球浸潤を介して肝障害を促進する。NKT 細胞については一貫した報告はないが、GSH 代謝を制御することが報告されている。Treg は何らかの T 細胞の活性を制御することで肝障害に対して保護的に作用すると考えられている。

1.7. T 細胞における低酸素応答因子 HIF の役割

低酸素応答因子 Hypoxia-inducible factor (HIF) は、生体の低酸素適応応答において中心的な役割を果たす分子である[119]。HIF は二量体からなる転写因子であり、酸素濃度に応答する α サブユニット (HIF- α) と恒常的に発現している β サブユニット (HIF-1 β) によって構成されている。HIF- α に関して、HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α の 3 つのサブタイプが存在する。HIF- α の安定性は、組織環境における酸素濃度によって厳密に調節されている (図 1.13)。酸素存在下において、HIF- α は Prolyl hydroxylase domain protein (PHD1, PHD2, PHD3) によって特定のプロリン残基の水酸化を受ける[97]。プロリン水酸化を受けた HIF- α は E3 ユビキチンリガーゼである von Hippel-Lindau protein (pVHL) によって認識され、ユビキチン化を受けてプロテアソーム系によるタンパク質分解を受ける。また、Factor inhibiting HIFs (FIH) は HIF- α のアスパラギン残基を水酸化することでヒストンアセチル化酵素である CBP/p300 との相互作用を抑制し、HIF の転

写活性を阻害する[180]。一方、酸素非存在下において、HIF- α はプロテアソーム分解や転写活性抑制を受けず、核内に移行してHIF-1 β とヘテロ二量体を形成し、下流遺伝子の転写調節を行う。HIF-3は転写活性を持たないが、HIF-1およびHIF-2はErythropoietin (EPO), Vascular endothelial growth factor (VEGF) およびPlatelet derived growth factor (PDGF)などの赤血球新生や血管形成などに関わる共通の遺伝子の発現制御を行う[68, 80, 119]。一方で、サブタイプ特異的な発現制御を受ける遺伝子も存在する。HIF-1は特に固形腫瘍や幹細胞においてGlucose transporter (GLUT) 1, 解糖系酵素群, Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs), Lactate dehydrogenase (LDH)などの解糖系関連遺伝子の発現制御を行う[62, 80, 166]。HIF-2はSuperoxide dismutase (SOD) 2やHeme oxygenase (HO) 1などの抗酸化物質の発現制御に関与する[10, 62]。

炎症部位には免疫細胞が多数浸潤することから、局所的な酸素需要の増加により低酸素状態が形成される[52]。AILIを含む多くの炎症性疾患では、炎症部位にPimonidazole陽性細胞およびHIF-1 α の活性化が認められる[25, 34, 67, 130]。免疫細胞は炎症部位に浸潤してサイトカイン産生や貪食などの機能を発揮するが、これらの過程には多くのエネルギーを要する。低酸素環境下ではミトコンドリア呼吸鎖の電子の受容物質である酸素分子が不足するため、酸化的リン酸化によるATP産生の効率は低下する。そこで、マクロファージやエフェクターT細胞などの免疫細胞は、HIF-1依存的に酸化的リン酸化から解糖系の代謝にシフトすることで免疫機能を発揮するのに十分なATPを獲得している。HIF-1は、マクロファージや活性化CD4⁺T細胞でのGLUT1, PDKs, LDHの発現を亢進することで解糖系依存的なATP合成を亢進することが報告されている[99, 142]。また、マクロファージにおける2-Deoxyglucose (2-DG)による解糖系の阻害やHIF-1 α 欠損によって細胞内のATP量が低下するとともに、IL-1 β などのサイトカイン分泌の減少と細菌に対する貪食能および殺菌能力の低下が認められる[146, 169, 171]。また、低酸素環境にお

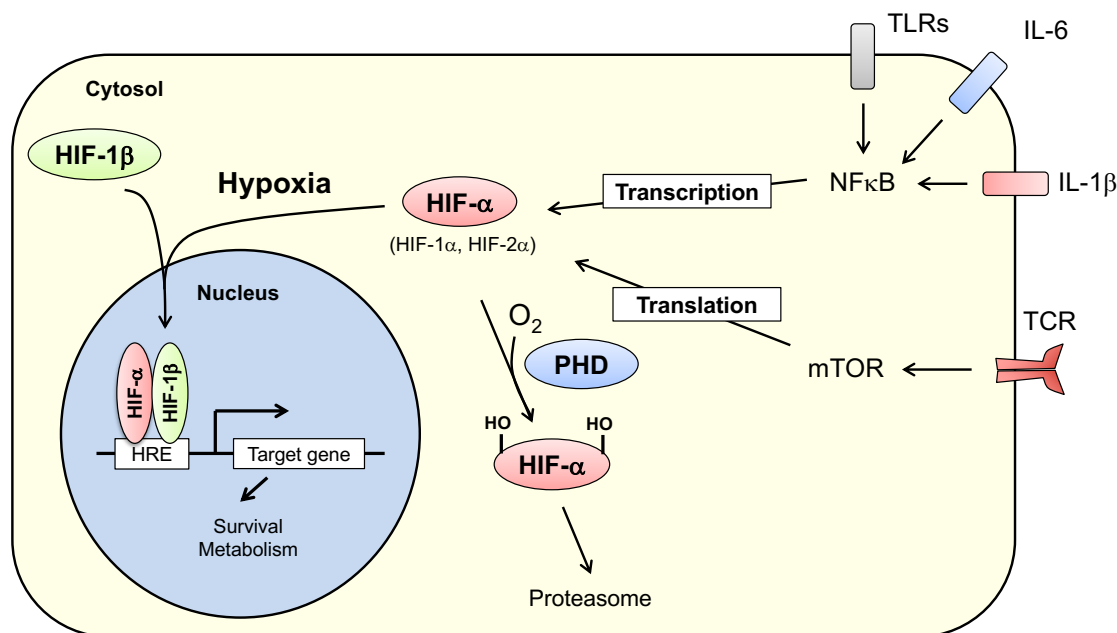


図 1.13 免疫細胞における HIF の活性化機構

HIF の発現制御には、従来の酸素依存的な α サブユニットの分解制御に加えて、免疫経路を介した α サブユニットの転写と翻訳が活性化に重要であることが示されている。

いて、HIF-1は解糖系の制御に加え、IL-1 β やIL-6などの一部の炎症性サイトカインの発現を直接的に制御する[80, 141]。一方、低酸素状態以外にも様々な要因もHIF-1 α の活性化を誘導する(図 1.13)[141, 174]。Lipopolysaccharide (LPS) 刺激は、TLR4を介してErk経路とNF κ B経路を活性化しHIF-1 α の転写を促進する[14, 37, 55, 155]。また、T細胞のTCR $\alpha\beta$ の活性化により、PI3K-Akt-mTOR経路を介して5'-cap依存的なHIF-1 α mRNAの翻訳が活性化されることが報告されている[63, 94]。さらに、mTORのサブユニットであるRaptorがHIF-1 α を活性化することや、mTORがHIF-1 α タンパク質を安定化させることも示唆されている[103, 106]。以上のように、免疫細胞におけるHIF-1 α は低酸素状態や免疫刺激によって活性化され、解糖系を介したエネルギー代謝の促進および炎症関連因子の発現亢進など免疫細胞の活性化に重要な役割を果たしている。

T細胞におけるHIF-1 α の機能は、主に古典的T細胞の機能や分化に注目して解析が行われてきた。Th1の研究では、HIF-1 α はTh1のIFN- γ 分泌を抑制することが分かっている[163]。また、活性化したCD8⁺T細胞では、mTOR-HIF-1 α 経路を介して解糖系やリンパ節からの遊出が促進されることが報告されている[49]。また、Th17/Tregバランスはアレルギーや自己免疫疾患を制御するという説が提唱されているが、HIF-1はTh17およびTregの分化を調節する重要な因子であることが分かってきた。TGF- β とIL-6刺激によりnaïve CD4⁺T細胞をTh17に分化させた場合、HIF-1はSignal transducer of activator and transcription (STAT)3と協調的にROR γ tの発現を上昇させるとともに、ROR γ t/HIF-1転写複合体を形成してCBP/p300をIL-17A promoterに動員することでIL-17Aの発現を亢進する[40]。また、同条件において、HIF-1はFoxp3のエピキチン化を促進することでTreg分化を抑制する。さらに、mTORによるHIF-1の発現亢進は解糖系依存的にTh17分化を促進することも報告されている[164]。これらの報告とは逆に、HIF-1はTregの免疫抑制機能を亢進することも知られている。脾臓細胞に対してTreg分化刺激であるTGF- β とともに低酸素処置を行うと、CD4⁺T細胞に占めるFoxp3陽性細胞の割合が増加する[32]。また、HIF-1はFoxp3 promoterに結合してFoxp3の転写を促進する。この研究では、Treg分化に対するHIF-1の影響は明らかにされなかったが、HIF-1はTregのエフェクターT細胞抑制機能を部分的に担っていることが分かった。この報告と一致して、我々は、T細胞におけるHIF-1はTh17/TregバランスをTregに傾倒することでDextran sulfate sodium (DSS) 誘導性腸炎に対して保護的に作用することを示している[75]。以上のような分化条件によるTh17/Tregバランスの複雑な制御において、病態依存的なサイトカイン環境の違いや組織特異的なT細胞亜集団の違いがT細胞分化に影響している可能性が考えられる。

これまでは上記のような古典的T細胞におけるHIF-1の機能が中心的に解析されてきた。一方、近年、腎虚血再灌流障害においてHIF-2がNKT細胞の細胞障害能に対して抑制的に働くことが示された[184]。しかしながら、自然免疫様T細胞におけるHIFの機能についての理解は不十分である(図 1.14)。T細胞サブセット特異的なHIFの機能解析を行うことを通して、低酸素疾患における自然免疫様T細胞のHIFの役割を明らかにする必要がある。

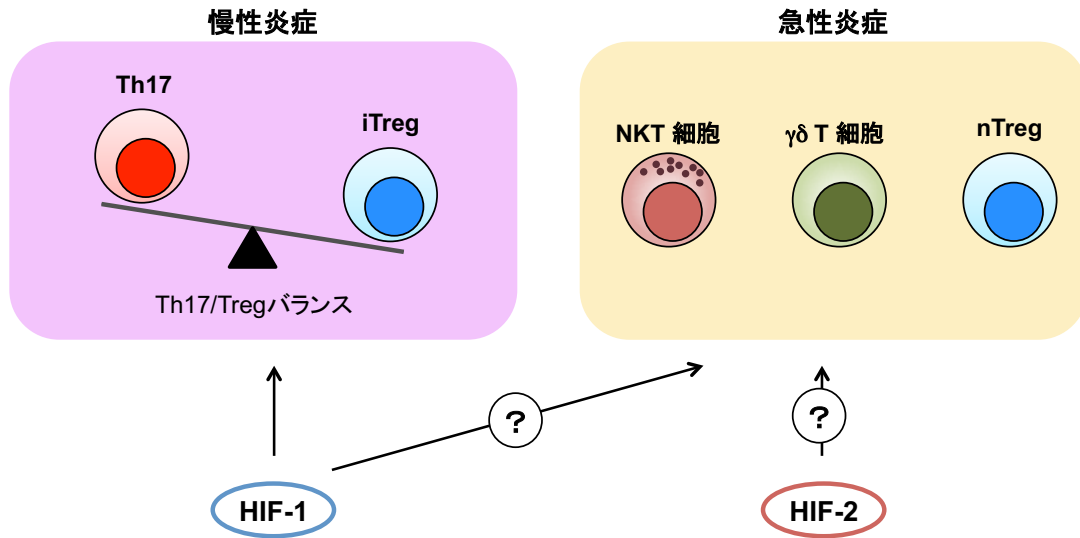


図 1.14 T 細胞における HIF の機能

慢性炎症では HIF-1 が Th17 と Treg の分化を制御することが知られているが、急性炎症における HIF-1 および HIF-2 の機能は明らかにされていない。

1.8. 研究目的

AILI は、肝臓の急性炎症応答を示す低酸素疾患の一つである。肝臓における低酸素状態は低酸素応答因子 HIF の発現を亢進する。これまで、マクロファージや古典的 T 細胞における HIF の役割が精力的に研究されてきたが、自然免疫様 T 細胞および nTreg などの急性応答に関与する T 細胞における HIF の役割はほとんど理解されていない。本研究では、T 細胞特異的 HIF-1 α 欠損マウスおよび T 細胞特異的 HIF-2 α 欠損マウスを用いて、AILI の急性免疫応答での T 細胞の HIF の役割を明らかにすることを目的とする。

2. 実験方法

2.1. 遺伝子改変マウスの作製・維持

Tリンパ球特異的に Hif-1 α 遺伝子, Hif-2 α 遺伝子を欠損させたマウスを作製した。各遺伝子欠損マウスは, 下記 2 系統を用いて, Cre-loxP システムにより作製した。

- A) ゲノム上の Hif-1 α 遺伝子または Hif-2 α 遺伝子の exon2 の両端に loxp 配列を組み込んだマウス (Hif-1 α ^{flox/flox} マウスまたは Hif-2 α ^{flox/flox} マウス)
- B) Tリンパ球特異的な遺伝子である Lck (lymphocyte protein tyrosine kinase) の Proximal promoter の下流に Cre recombinase を組み込んだマウス (LckCre マウス)

交配により得られた, LckCre;HIF-1 α ^{flox/flox} (THIF-1KO) マウスまたは LckCre;Hif-2 α ^{flox/flox} (THIF2KO) マウスを, Hif-1 α ^{flox/flox} (WT) マウスまたは Hif-2 α ^{flox/flox} (WT2) マウスと交配することにより系統を維持した。THIF-1KO マウスおよび THIF2KO マウスについては, 過去の報告において, 90%以上の高効率で遺伝子欠損が引き起こされることが確認されている。

2.2. マウス遺伝子型同定

【実験材料】

- ・ 片刃トリミング用カミソリ (日新 EM 株式会社, 62-0161)
- ・ 水酸化ナトリウム (Wako, 198-13765)
- ・ 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris) (Wako, 207-06275)
- ・ 塩酸 (Tris buffer の pH 調節用) (Wako, 080-01066)
- ・ Taq polymerase (自家製)
- ・ Primer (表 2.1 参照)
- ・ dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP mix)
- ・ 10X PCR Buffer (Applied Biosystems, 4376212)
- ・ MgCl₂ Solution (Applied Biosystems, 361691)
- ・ アガロース S (株式会社ニッポンジーン, 313-90231)
- ・ エチジウムブロマイド

表 2.1 Primer 配列

対象配列	Forward/Reverse	プライマー配列 (5'→3')
<i>LckCre</i>	F	CCTGGTGGAGGAGGGTGAATGAA
	R	GAGCCTGTTTGCACGTTACCGG
<i>Cre</i>	F	GCAAGTTGAATAACCGGAAATGG
	R	GAGCCTGTTTGCACGTTACCGG
<i>HIF-1α</i>	F	AAAATGTAGTCCTGTTGGTTGTGC

【実験方法】

- 1) マウスの尾をカミソリで 5 mm ほど 1.5 mL チューブに採取する。
- 2) 50mM 水酸化ナトリウム水溶液を 500 μ L 加えた後、100°Cに熱したヒートブロックで 25 分間加熱する。
- 3) 1M Tris-HCL を 50 μ L 加え、遺伝子型同定を行うまで 4°Cで保存する。
- 4) サンプルを 15,000 rpm で 1 分間遠心する。
- 5) 8 連チューブにサンプルを 5 μ L 添加し、8 連チューブごとサンプルを氷上で冷やす。
- 6) 表 2.2 の組成の Mix を作製する。ただし、Taq polymerase 以外の試薬を先に調整しておき、十分冷やした後に Taq polymerase を加え、タッピングによって混合する。

表 2.2 Genotyping Mix 組成

試薬名	使用量
MilliQ	13.75 μ L
25mM dNTP	0.25 μ L
25mM Primers	0.25 μ L each
10X PCR Buffer	2.5 μ L
MgCl ₂ Solution	2.5 μ L
Taq polymerase	0.5 μ L

- 7) 1 サンプルにつき 20 μ L の Mix をファーストノックで加える。
- 8) Hot start に設定しておいた Thermal Cycler に 8 連チューブを設置し、図 2.1 の条件に従って PCR を開始する。アニーリング温度とサイクル数に関しては、表 2.3 に示す。

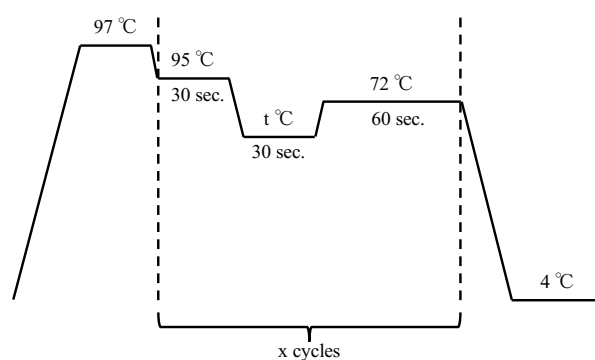


図 2.1. Genotyping の PCR 条件

表 2.3 Genotyping PCR アニーリング温度およびサイクル数

対象配列	アニーリング温度 t	サイクル数 x
<i>Lck</i>	65 °C	30
<i>Cre</i>	65.0 °C	30
<i>Hif-1α</i>	60.0 °C	35
<i>Hif-2α</i>	62.0 °C	35

9) 2%アガロースゲルを作製し、サンプルを 120 V で電気泳動する。ただし、サンプルは負電極の方向に流れる事に留意してゲルを設置する。

10) UV ランプ下でゲルの撮影を行い、遺伝子型の判別を行う。

2.3. AILI モデルマウスの作製

本研究では、THIF-1KO マウスとその対照群 WT, および、THIF2KO とその対照群 WT2 を用いて行った。AILI モデルマウスは、8-10 週齢のマウスに対して、24 時間の絶食の後、アセトアミノフェンを 250 mg/kg mouse の容量で腹腔内に投与することで作製した。生存実験などに関しては 500 mg/kg の容量を用いた。また、Rag2^{fl}では 150 mg/kg mouse の容量で投与した。

【実験材料】

- APAP (Sigma-Aldrich, A7085-100G)
- PBS (Wako, 045-29795)
- MILLEX GV filter unit 0.22 μ M (Merck Millipore, SLGU033RS)
- シリンジ (TERUMO, SS-01T)
- 注射針 26 G (TERUMO, NN-2613S)

【実験方法】

- 1) PBS 20 mL を 60°Cまで加熱する。
- 2) 60 °Cに加熱された PBS にアセトアミノフェンを 500 mg 加え、25 mg/mL のアセトアミノフェン溶液を作製する。60 °Cで 10-15 分間攪拌する。
- 3) アセトアミノフェン溶液をクリーンベンチ内で、0.22 μ m フィルターで滅菌する。
- 4) マウス 1 匹あたり、アセトアミノフェン溶液を、体重 (g) \times 10 μ L の容量で腹腔内に注射する。この際、42 °Cの水道水でアセトアミノフェン溶液を湯煎しながらアセトアミノフェンが析出しないように注意する。

2.4. アセトアミノフェン誘導性肝炎モデルマウスのサンプル採取

【実験材料】

- Tribromo ethanol
- 2-Methyl-2-butanol
- 片刃トリミング用カミソリ (日新 EM 株式会社, 62-0161)
- シリンジ (TERUMO, SS-01T)
- 注射針 25 G (TERUMO, NN-2516R)
- 注射針 26 G (TERUMO, NN-2516R)

アセトアミノフェン投与後, 0 時間, 6 時間, 12 時間, 24 時間, 48 時間, 72 時間の時点で, マウスを解剖しサンプルを回収した。サンプル回収時は, マウスに対し, Avertin (表 2.4)を 20 $\mu\text{L/g mouse}$ の容量で腹腔内に投与することで麻酔を施した。心臓血を採取し, 20 mL の冷 PBS を用いて門脈還流をした後, 肝臓を採取した。心臓血は, 1.5 mL チューブに採取し, 室温で 2 時間静置した後に, 2000 G で 20 分間遠心して上清を採取し, 液体窒素で凍結して解析に使用するまで -80°C で保存した。肝臓に関しては, 外側左葉は, カミソリで 5-10 mm 四方に切り取り, PLP 固定液にて一晩浸透固定した。左内側葉, 右内側葉および右外側葉は 1.5 mL チューブに採取し, 液体窒素で凍結し, 解析に使用するまで -80°C で保存した。

表 2.4 Avertin の組成 (25g の 1 個体あたりの分量)

試薬名	使用量
Tribromo ethanol	6.25 mg
2-Methyl-2-butanol	12.5 μL
PBS	500 μL

2.5. 組織切片作製法

2.5.1. PLP 固定液の調製

【実験材料】

- リン酸水素二ナトリウム十二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Wako, 196-02835)
- リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Wako, 192-02815)
- L-リジン塩酸塩 (Wako, 123-01461)
- パラフォルムアルデヒド (PFA) (Merck KGaA, 30525-89-4)
- 10N 水酸化ナトリウム溶液 (Wako, 198-13765)
- MILLEX HA Filter Unit 0.45 μm (Merck Millipore Ltd., SLHA033SS)

【PLP 固定液作製法】

保存液 A (0.01M リジン, 0.05M PB)

- 1) MilliQ 1L に $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.96 g と $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29.01 g を加え, 0.1M リン酸緩衝液 (PB) pH7.4 を作製する.
- 2) MilliQ 50mL に L-リジン塩酸塩 1.827 g を加えて 0.2 M リジン塩酸溶液を作製する.
- 3) 0.1 M Na_2PO_4 を滴下して pH7.4 に補正する. (50mL あたり約 10mL 必要.)
- 4) 0.1 M PB を加えて全量を 100mL にする.
- 5) 4°C で保存する. (10 日間保存可能.)

保存液 B (8% PFA) 作製

- 1) MilliQ 100 mL を 60°C まで温める.
- 2) PFA 8 g を葉包紙に取って加える.
- 3) 10 N 水酸化ナトリウムを 2 滴加える.
- 4) 氷水中にビーカーを入れて冷却する.
- 5) 0.45 μm フィルターを使って濾過する.
- 6) 4°C で保存する. (7 日間保存可能.)

PLP 固定液作製

- 1) 保存液 A と保存液 B を 3:1 の割合で混合する.
- 2) メタ過ヨウ酸ナトリウムを 2.14 mg/mL の割合で添加して混合する.

2.5.2. パラフィン切片作製法

【実験材料】

- エタノール (Wako, 005-00457)
- キシレン (Wako, 244-00081)
- バソプレップ 568 (Wako, 162-18961)
- ユニ・カセット (Tissue-Tek, 1448914)

【実験方法】

- 1) 肝臓を採取し, 外側左葉からカッターで 10 mm 四方の肝臓片を切り取り, PLP 固定液に一晩つける.
- 2) 70%エタノールに数時間浸ける.
- 3) サンプルをユニ・カセットに入れ, ASP300 を用いて以下の手順 (表 2.5) でサンプルをパラフィン置換する.

表 2.5 パラフィン置換プロトコル

手順	置換液	処理時間
1	70 %エタノール	2 時間
2	80 %エタノール	2 時間
3	90 %エタノール	2 時間
4	100 %エタノール I	2 時間
5	100 %エタノール II	2 時間
6	100 %エタノール III	2 時間
7	エタノール/キシレン等量混合液	2 時間
8	キシレン I	1 時間
9	キシレン II	1 時間
10	キシレン III	1 時間
11	パラフィン I	3 時間
12	パラフィン II	3 時間

- 4) サンプルを鋳型に入れ、-4°Cに冷却したプレートの上でパラフィン包埋を行う。サンプルは常温保存可能である。
- 5) サンプルブロックを滑走式マイクロトームに設置し、刃角 10°，厚み 5μm に設定してサンプルを薄切りする。
- 6) 42°Cの湯浴にサンプルを浮かべて伸展を行い、スライドガラスにサンプルを載せる。
- 7) 十分水切りした後、37°Cプレート上で一晚乾燥させる。
- 8) 切片は染色前に下記の手順 (表 2.6) に従って脱パラ操作を行う。

表 2.6 パラフィン除去操作

手順	試薬	処理時間
1	キシレン I	10 分
2	キシレン II	10 分
3	キシレン III	15 分
4	100 %エタノール I	10 回洗浄
5	100 %エタノール I	10 回洗浄
6	70 %エタノール	10 回洗浄

2.6. 組織切片染色法

2.6.1. Hematoxylin Eosin (H.E.) 染色

【実験材料】

- ・ マイヤーヘマトキシリン (武藤化学, 3000-2)
- ・ 1 % エオジン Y 液 (武藤化学, 3200-2) : 1 %エオジン Y 液 83 mL に対して, 60 %エタノール (Wako, 005-00457) 166 mL, 酢酸 (Wako, 017-00256) 1.25 mL を添加して pH 4.8~5.0 の使用液

とする。

- エタノール (Wako, 005-00457)
- キシレン (Wako, 244-00081)
- マリノール (武藤化学, 2009-1)
- カバーガラス (MATSUNAMI, 25x50 mm)

【実験方法】

- 1) スライドガラスをマイヤーヘマトキシリン液に 20 分間つけて核染色を行う。
- 2) 流水で 5 分間洗浄する。
- 3) 80 %エタノールに 1 分程度浸す。
- 4) エオジン溶液に 5 分間浸して細胞質染色を行う。
- 5) 以下の表 2.7 に示す手順で透徹を行う。

表 2.7 透徹操作

手順	試薬	処理時間
1	70 %エタノール	10 回洗浄
2	100 %エタノール I	10 回洗浄
3	100 %エタノール I	10 回洗浄
4	キシレン III	10 回洗浄
5	キシレン III	10 回洗浄
6	キシレン III	10 回洗浄

- 6) キシレンを軽く拭き取り, マリノールを切片上に数滴垂らし, カバーガラスを被せる。
- 7) 2~3 日程度乾燥させる。
- 8) H.E.染色像の肝障害領域解析は, Photoshop を用いて白抜きの肝障害領域の面積を肝実質領域の面積で割った割合として解析した。

2.6.2. 免疫染色

【実験材料】

- PBS (自作)
- Bovine serum albumine (Wako, 017-23294)
- 賦活化用試薬: EDTA (Wako, 345-01865)
- Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, SP-2001)
Avidin Blocking 溶液, Biotin Blocking 溶液
- 1 次抗体: Purified anti-mouse Ly6G (Biolegend, 1A8, 127601)
900 μ L 1% BSA/PBS, 100 μ L マウス血清, 5 μ L 1 次抗体を混合する

- 1次抗体: Ki-67 (D3B5) Rabbit mAb (Mouse Preferred; IHC Formulated) (Cell signaling #12202S)
PBS で 300 倍希釈する
- Vectorstain Elite ABC HRP Kit (Vectorstain, PK6100)
Rat 血清 (Ly6G), Goat 血清 (Ki67)
ABC 溶液 : 使用 30 分前に 960 μ L PBS, 20 μ L Reagent A, 20 μ L Reagent B を混合
2次抗体 : anti-rat IgG biotinylated antibody (Ly6G), anti-rabbit IgG biotinylated antibody (Ki67)
- H₂O₂ (Wako, 081-04215)
- 3,3-diaminobenzidine tetrachloride
- 2 M Tris-HCl pH 7.6
- Sodium azide
- NaCl
- D₂W
- Pap pen

【実験操作】

- 1) スライドガラスを PBS に浸す。
- 2) 賦活化を沸騰した 1 mM EDTA (pH8.0)溶液中で、50 分間行う。
- 3) 流水で室温まで冷却し、PBS で洗浄する。
- 4) 切片周りの水分を丁寧に除き、切片の周囲をポップペンで囲む。
- 5) 切片を Avidin blocking 溶液で覆い、室温で 10 分間静置する。
- 6) PBS につけて、5 分間、時々揺らして洗浄する。
- 7) 切片を Biotin blocking 溶液で覆い、室温で 10 分間静置する。
- 8) PBS につけて、5 分間、時々揺らして洗浄する。
- 9) 2次抗体を作製した動物種の血清溶液で覆い、室温で 30 分間静置する。
- 10) 血清溶液を払い、切片周りの残液をキムワイプで丁寧に拭き取る。
- 11) 1次抗体を 1% BSA/PBS で希釈し、切片上に載せ、4 $^{\circ}$ C で一晩抗体反応する。
- 12) PBS 中で 5 分間洗浄を 3 回繰り返す。
- 13) 切片周りの残液をキムワイプで丁寧に拭き取る。
- 14) 2次抗体を切片上に載せ、室温で 30 分間静置し、抗体反応する。
- 15) PBS 中で 5 分間洗浄を 3 回繰り返す。
- 16) 0.3% H₂O₂/PBS 中に浸し、室温で 30 分間静置する。
- 17) PBS 中で 5 分間洗浄を 3 回繰り返す。
- 18) ABC 溶液で切片を覆い、遮光して室温で 30 分間反応させる。
- 19) PBS 中で 5 分間洗浄を 3 回繰り返す。
- 20) DAB 溶液を表 2.8 の組成で作製する。

表 2.8 DAB 溶液組成

試薬	使用量
3,3-diaminobenzidine tetrachloride	10 mg
2 M Tris-HCl pH7.6	1.25 mL
Sodium azide	32.5 mg
NaCl	0.45 g
D ₂ W	50 mL までメスアップ
H ₂ O ₂	使用直前に 8.5 μ L 添加

- 21) DAB 溶液中に浸して、室温で反応させる (Ly6G: 5 分間, Ki67: 10 分間)。この際、適宜顕微鏡で観察しながら、反応時間を調整する。
- 22) PBS 中で 5 分間洗浄を 3 回繰り返す。
- 23) MilliQ 中でゆらしながら洗浄する。
- 24) 表 2.7 に示した透徹作業を行う。
- 25) マリノールで封入する。

2.7. 血清 Alanine aminotransferase (ALT) 活性測定法

【実験材料】

- ・ トランスアミナーゼ CII-テストワコー (Wako, 431-30901)
- ・ 血清

【実験方法】

- 1) 100 Karmen 基準液より、MilliQ を用いて段階希釈することで、0, 12.5, 25, 50 Karmen の標準溶液を作製する。
- 2) 血清サンプルを適宜希釈し、氷上に置いておく。
- 3) 基準液と発色試薬を等量混合し、基質発色液を作製する。
- 4) 基質発色液を 400 μ L ずつ 1.5 mL チューブにファーストロックで分注し、37°C で 5 分間加温する。
- 5) 希釈した血清サンプルを 8 μ L 加えて混合する。
- 6) 37°C で 20 分間加温する。
- 7) 反応停止液を 800 μ L 加えて混合し、室温で 5 分間静置する。
- 8) サンプルをキュベットに移した後、分光光度計を用いて標準溶液およびサンプルの 555 nm 吸収光度を測ることで血清 ALT 活性を算出する。

2.8. Enzyme linked immune solvent assay (ELISA)による血清中サイトカインの定量

【実験材料】

- Mouse Quantikine ELISA kit
IL-17 (R&D, M1700), IFN- γ (R&D, MIF00), OPN (R&D, MOST00)
- 血清
- Benchmark Plus (Beckman Coulter)

【実験方法】

- 1) 使用する全てのサンプルと試薬を室温に戻す。
- 2) 高濃度の基準液を、Calibrator Diluent RD6-12 を用いて希釈し、IL-17 の場合は、700, 350, 175, 87.5, 43.8, 21.9, 10.9 pg/mL, IFN- γ の場合は、600, 300, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.4 pg/mL, OPN の場合は、1250, 625, 313, 156, 78, 39 pg/mL の基準液を作製する。
- 3) OPN の場合は、サンプルを Calibrator Diluent RD6-12 で 2000 倍希釈する。IL-17, IFN- γ に関しては、血清を原液で使用する。
- 4) 必要なストリップのみ取り出し、各ウェルに Assay Diluent RD1-63 を 50 μ L ずつ加える。
- 5) 各ウェルにサンプルまたは基準液を 50 μ L ずつ加え、溶液をこぼさないように、注意しながらタッピングを 1 分間行い、ウェル内の溶液に均一にする。
- 6) ストリップにカバーを貼り付け、室温で 2 時間静置する。
- 7) 各ウェルの溶液をアスピレーターで吸いとり、Wash Buffer 400 μ L で 5 回洗浄する。
- 8) 5 回目の洗浄後は、新しいキムタオルの上にウェルを軽く叩きつけ、ウェル内の水分を取り去る。
- 9) 各ウェルに Conjugate を 100 μ L ずつ加え、ストリップに新しいカバーを貼り付け、室温で 2 時間静置する。
- 10) 各ウェルの溶液をアスピレーターで吸いとり、Wash Buffer 400 μ L で 5 回洗浄する。
- 11) 5 回目の洗浄後は、新しいキムタオルの上にウェルを軽く叩きつけ、ウェル内の水分を取り去る。
- 12) Color Reagent A と Color Reagent B を等量混合し、Substrate Solution とする。
- 13) 各ウェルに、100 μ L ずつ Substrate Solution を加え、アルミホイルで覆い遮光しながら、室温で 30 分静置する。
- 14) Stop Solution を 100 μ L ずつ加え、溶液をこぼさないように、注意しながらタッピングを 1 分間行い、ウェル内の溶液に均一にする。
- 15) Stop Solution を加えてから 30 分以内に、Microplate Reader で 450 nm の吸光度から 540 nm の吸光度を差し引いた値を測定する。

2.9. DTNB-glutathione recycling method

【実験材料】

- マウス肝臓

- GSSG/GSH Quantification Kit (DOJINDO, G257)
- 5-スルホサリチル酸 (SSA)

【実験方法】

- 1) 肝臓 100 mg を 500 μ L の 5% SSA 水溶液でホモジナイズする。
- 2) 8,000 G, 10min, 室温で遠心する。
- 3) 上清を新しいチューブに移す。
- 4) D₂W で SSA 濃度が 0.5%になるように希釈して測定試料とする。Total GSH 測定の際は D₂W で 100 倍希釈, GSSG 測定の際は D₂W で 20 倍希釈を 0.5% SSA を用いて行う。
- 5) 100 μ mol/L GSSG standard solution を 25.0 μ mol/L に希釈して, 段階希釈によって 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.78 μ mol/L のスタンダード溶液を作製する。200 μ mol/L GSH standard solution を 50.0 μ mol/L に希釈して, 段階希釈によって 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57 μ mol/L のスタンダード溶液を作製する。
- 6) GSSG 測定の際には, 50 μ L のスタンダード溶液およびサンプルに 1 μ L の Masking solution を加える。
- 7) GSH スタンダード, GSH 測定用サンプル, あるいは, GSSG スタンダード, GSSG 測定用サンプルをそれぞれ 40 μ L ずつ 96 well plate に加える。
- 8) Buffer solution 60 μ L を各ウェルに添加する。
- 9) 37 °C, 1 h インキュベートする。
- 10) Substrate working solution 60 μ L を各ウェルに添加する。
- 11) Enzyme/coenzyme working solution 60 μ L を各ウェルに添加する。
- 12) 37 °C, 1 h インキュベートする。
- 13) マイクロプレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定する。
- 14) TotalGSH から GSSG の濃度を差し引くことで GSH 濃度を算出する。

2.10. 免疫細胞の分離

2.10.1. 肝臓からの免疫細胞の分離

【実験材料】

- マウス肝臓
- スチールメッシュ 200 G
- 20 mL シリンジのピストン部分
- 滅菌ディッシュ (IWAKI, SH90-15)
- 50 mL 遠沈管 (FALCON, 352070)
- D-MEM basic 1 X (Gibco, C11885500BT)
- HEPES (同仁化学, 340-01371)
- FBS

- Percoll (GE Healthcare, 17-0891-02)
- 10×PBS (自作)
- Sodium Bicarbonate (Wako, 166-03275)
- ヘパリン (持田製薬, 日本薬局方ヘパリンナトリウム注射液)
- Lysing Buffer
- BSA (Wako, 017-23294)
- ナイロンメッシュ

【実験方法】

- 1) ディッシュの上にスチールメッシュの上に置き、その上に肝臓を置く。肝臓の上から MEM-HEPES を 5 mL かけ、ピストンですり潰す。ピストンの滑りが悪くなる前に MEM-HEPES をさらに 5 mL かけることを 4 回繰り返す、肝臓をスチールメッシュに通し切る。MEM-HEPES の組成は、表 2.9 に示す。

表 2.9 MEM-HEPES 組成

試薬	使用量
D-MEM	500 mL
1 M HEPES	3.8 mL
FBS	10 mL

- 2) ディッシュに溜まった肝臓の破砕液をオートピペッターで吸い、ディッシュ底に押し付けて、破砕液をさらに細かくする。
- 3) 破砕液を 50 mL チューブに移し、さらにディッシュを新しい MEM-HEPES 5 mL で洗って回収する。
- 4) 室温、800 G で 10 分間遠心する。
- 5) 上清をアスピレーターで吸いとり、35% Percoll を 15 mL ずつ加え、20 秒激しく振り、Vortex を 5 秒間行う。Percoll の組成は表 2.10 に従う。

表 2.10 35%Percoll 組成

試薬	使用量
《100% Percoll》	
Percoll	92.5 mL
10×PBS	7.2 mL
Sodium Bicarbonate	1.3 mL
《35% Percoll》	
100 % Percoll	5.25 mL
MEM-HEPES	9.75 mL

ヘパリン 1 mL

- 6) 室温, 800 G で 30 分間遠心する。
- 7) 遠心後の破碎液は, 3 層に分かれる (図 2.2)。最下層の層のみ残し, 上の層はアスピレーターで吸い取る。

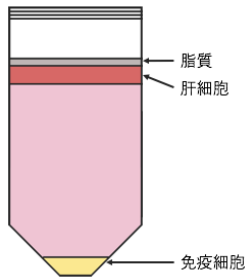


図 2.2 Percoll で分離後の破碎液の様子

- 8) 新しい 50 mL 遠沈管に免疫細胞の層を MEM-HEPES 2 mL に懸濁して移す。遠沈管に免疫細胞を取り残さないように, もう一度, MEM-HEPES 2 mL で新しい遠沈管に細胞を回収する。この際, 遠沈管の内側壁面には, 免疫細胞以外の物が張り付いているため, 細胞懸濁液を移す際に触れてコンタミすることのないように注意する。
- 9) 4°C, 800 G で 10 分間遠心する。
- 10) 上清を少し残すようにしてアスピレーターで吸う。チューブをタッピングして, 細胞を残した上清に懸濁する。
- 11) Lysing Buffer (表 2.11) を 15 mL ずつ加えて vortex し, 3 分間氷冷する。

表 2.11 Lysing buffer 組成 (500 mL 分)

試薬	使用量
NH ₄ Cl (Wako, 017-02995)	3.74 g
KHCO ₃ (Wako, 166-03275)	0.45 g
EDTA-2NA (同仁化学, 345-01865)	0.17 g
170 mM Tris pH 7.65 (Wako, 207-06275)	50 mL
MilliQ	Up to 500 mL

- 12) MEM-HEPES を 20 mL 加え, 溶血を止める。
- 13) 4°C, 500 G で 10 分間遠心する。
- 14) MEM-HEPES で 2 回洗浄する。
- 15) 0.5% BSA/PBS 3 mL に細胞を懸濁し, ナイロンメッシュに通した後, 血球計算版で細胞数を数える。

2.10.2. 脾臓からの免疫細胞の分離

【実験材料】

- マウスの脾臓
- 70 μm のセルストレーナー (FALCON, 352350)
- MEM-HEPES
- 20 mL シリンジのピストン部分
- 50 mL 遠沈管 (FALCON, 352070)
- Lysing buffer

【実験方法】

- 1) セルストレーナーを遠沈管にセットし、脾臓をその上に置き、解剖バサミで脾臓を粗く切る。
- 2) 脾臓の上に MEM-HEPES を 1 mL 加え、ピストンですり潰す。この作業を 3 回繰り返す。
- 3) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、400 G で 10 分間遠心する。
- 4) 上清を少し残すように、アスピレーターで吸い取る。チューブをタッピングして、細胞を残した上清に懸濁する。
- 5) Lysing Buffer を 15 mL ずつ加え、vortex し、3 分間氷冷する。
- 6) MEM-HEPES を 20 mL 加え、溶血を止める。
- 7) Lysing Buffer を 15 mL ずつ加え、vortex し、3 分間氷冷する。
- 8) MEM-HEPES を 20 mL 加え、溶血を止める。
- 9) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 G で 10 分間遠心する。
- 10) MEM-HEPES を 3 mL 加え洗浄する。
- 11) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 G で 5 分遠心する。
- 12) 0.5 % BSA/PBS を 10 mL 加え、ナイロンメッシュに通したのち、血球計算版で細胞数を数える。

2.11. Flow cytometry と Cell sorting

2.11.1. Flow cytometry

肝臓および脾臓中の免疫細胞の数およびサイトカイン産生能を、フローサイトメトリーを用いて解析した。

【実験材料】

- マウス免疫細胞
- ナイロンメッシュ
- BSA (Wako, 017-23294)
- FC ブロック Purified anti-mouseCD16/32 (Biolegend, 93, 101302)
- BD Cytotfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop (BD Bioscience, 554715)

- PMA (Sigma, P8139)
- Ionomycin (Sigma, I0634)
- RPMI-1640 (Wako, 189-02025)
- True Nuclear Transcription Factor Buffer Set (Biolegend, 424401)
- Cytomics FC500 flow cytometer (Beckman Coulter)
- 蛍光標識抗体 (表 2.12 参照)

表 2.12 蛍光標識抗体による免疫細胞の検出法

評価対象	抗体	製造先	目的
マクロファージ/ 好中球	FITC-CD11b (M1/70)	eBioscience	検出
	PE-F4/80 (BM8)	BioLegend	
	Alexa Fluor 647-Ly6G (1A8)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
Treg	PE-CD25 (PC61)	BioLegend	検出 (細胞内染色)
	PE/Cy5-CD4 (GK1.5)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
	FITC-Foxp3 (150D)	BioLegend	
Treg	Alexa Fluor 488-CD25 (PC61)	BioLegend	アポトーシス評価
	APC-CD4 (GK1.5)	BioLegend	
	APC/Cy7 CD127 (A7R34)	BioLegend	
	PE-Annexin V	BioLegend	
Treg	Alexa488-CD25 (PC61)	BioLegend	細胞分離
	APC-CD4 (GK1.5)	BioLegend	
	APC/Cy7 CD127 (A7R34)	BioLegend	
$\gamma\delta$ T 細胞	PE-TCR γ/δ (GL3)	BioLegend	検出
	PE-Cy5-CD3 ϵ (145-2C11)	eBioscience	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
$\gamma\delta$ T 細胞	FITC-TCR γ/δ (GL3)	BioLegend	Migration 評価 細胞分離
	Alexa647-CD3 ϵ (145-2C11)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
$\gamma\delta$ T 細胞	Mito Tracker Green FM	Invitrogen	ミトコンドリア解析
	PE-TCR γ/δ (GL3)	BioLegend	
	Alexa647-CD3 ϵ (145-2C11)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
$\gamma\delta$ T 細胞	FITC-TCR γ/δ (GL3)	BioLegend	CD69 発現
	PE-CD69 (H1.2F3)	BioLegend	
	Alexa647-CD3 ϵ (145-2C11)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
	FITC-TCR γ/δ (GL3)	Invitrogen	

γδ T 細胞	PE-CCR6 (29-2L17)	BioLegend	CCR6 発現
	Alexa647-CD3ε (145-2C11)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
IL-17A ⁺ 細胞	PE-TCR γ/δ (GL3)	BioLegend	検出 (細胞内染色)
	PE-Cy5-CD3ε (145-2C11)	eBioscience	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
	Alexa Fluor 488-IL-17A (TC11-18H10.1)	BioLegend	
IFN-γ ⁺ cells	PE-NK1.1 (PK136)	BioLegend	検出 (細胞内染色)
	PE-Cy5-CD3ε (145-2C11)	eBioscience	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
	PE-IFN-γ (XMG1.2)	BioLegend	
NK/NKT/CD3T 細胞	PE-NK1.1 (PK136)	BioLegend	検出
	PE-Cy5-CD3ε (145-2C11)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
NK/NKT/CD3T 細胞	FITC-NK1.1 (PK136)	BioLegend	検出 (細胞内染色)
	PE-OPN (Polyclonal)	R&D	
	Alexa647-CD3ε (145-2C11)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
NKT 細胞	FITC-NK1.1 (PK136)	BioLegend	CD69 発現
	PE-CD69 (H1.2F3)	R&D	
	Alexa647-CD3ε (145-2C11)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	
NKT 細胞	Alexa488-TCR β chain (PK136)	BioLegend	FasL 発現
	PE-FasL (MFL3)	BioLegend	
	APC-NK1.1 (145-2C11)	BioLegend	
	PE/Cy7-CD45 (30-F11)	BioLegend	

【実験方法】

- 1) 免疫細胞の細胞数を1サンプルあたり、 $0.5-1 \times 10^6$ の範囲に揃える。
サイトカイン産生能のアッセイを行う場合は、以下の2)から6)の操作を行う。
- 2) 細胞を終濃度がPMAは50 ng/mL, Ionomycinは1 μg/mL, GolgiStopは0.64 μL/mLになるように添加したRPMI complete medium (RPMI-1640, 10% FBS) 5 mLに懸濁する。
- 3) 37 °CのCO₂インキュベーターで4時間培養する。
- 4) 4 °Cに冷やした0.5% BSA/PBSを10 mL加える。
- 5) 4 °C, 500 Gで10分間遠心し、上清を吸い取る
- 6) 0.5% BSA/PBS 1 mLを加え、4 °C, 500 Gで5分間遠心し、上清を吸い取る
以下は抗体染色の手順を示す。
- 7) 1サンプルあたり100 μLの0.5% BSA/PBSに1 μLのFCブロックを添加したバッファーで懸濁す

る。

- 8) 氷上で 15 分間静置する。
- 9) 1 サンプルあたり、細胞表面染色用の各蛍光標識抗体を 1 μ L 加え、vortex し、氷上で遮光しながら 30 分間静置する。
- 10) 0.5% BSA/PBS を 1 mL 加え、4 $^{\circ}$ C, 500 G で 5 分間遠心し、上清を吸う。この操作を 2 回繰り返す。
- 11) 細胞表面染色のみの場合は、洗浄が終了後、600-1000 μ L の 0.5% BSA/PBS600 に懸濁し、ナイロンメッシュに通したのち、Cytomics FC500 で測定する。

さらに細胞内抗原の染色も行う場合は、11)で表面抗原を染色した後に細胞の固定を行う。使用する固定液については、Treg 細胞を染色する場合は、True Nuclear Transcription Factor Buffer を、その他の細胞を染色する場合は、BD Cytofix/Cytoperm を用いた。

- 12) True Nuclear Transcription Factor Buffer の場合は、1 サンプルあたり 200 μ L の Transcription Factor 1 \times Fix solution を、BD Cytofix/Cytoperm の場合は、100 μ L の Cytofix/Cytoperm solution を加える。但し、固定液を加える直前に、vortex をし、細胞ペレットを崩し、固定液を加えると同時にピペッティングを行うことで、細胞の凝集を抑えるよう注意する。
- 13) True Nuclear Transcription Factor Buffer の場合は、室温で 30 分間、BD Cytofix/Cytoperm の場合は、4 $^{\circ}$ C で 30 分間遮光しながら静置する。
- 14) True Nuclear Transcription Factor Buffer の場合は、Transcription Factor 1 \times Perm Buffer を 200 μ L、BD Cytofix/Cytoperm の場合は、BD Perm/Wash Buffer を 1 mL ずつ加え、4 $^{\circ}$ C、500 G で 5 分間遠心する。
- 15) 0.5% BSA/PBS を 1 mL 加え、4 $^{\circ}$ C, 500 G で 5 分間遠心し、上清を吸う。この操作を 2 回繰り返す。
- 16) 1 サンプルあたり、100 μ L の Transcription Factor 1 \times Perm Buffer または BD Perm/Wash Buffer に抗体を 1 mL 加え、細胞内染色を行う。
- 17) 遮光して、氷上で 30 分間静置する。
- 18) True Nuclear Transcription Factor Buffer の場合は、Transcription Factor 1 \times Perm Buffer を 200 μ L、BD Cytofix/Cytoperm の場合は、BD Perm/Wash Buffer を 1 mL ずつ加え、4 $^{\circ}$ C、500 G で 5 分間遠心する。
- 19) 0.5% BSA/PBS を 1 mL 加え、4 $^{\circ}$ C, 500 G で 5 分間遠心し、上清を吸う。この操作を 2 回繰り返す。
- 20) 600-1000 μ L の 0.5% BSA/PBS600 に懸濁し、ナイロンメッシュに通したのち、Cytomics FC500 で測定する。

2.11.2. Cell sorting

【実験材料】

- ・ マウス免疫細胞
- ・ ナイロンメッシュ
- ・ Easy Sep Mouse T Cell Isolation Kit (STEMCELL, 19851)
- ・ Rat 血清
- ・ 抗体カクテル

RapidSpheres

- Easy Sep Buffer (STEMCELL, 20144)
- Easy Sep Magnet (STEMCELL, 18000)
- BSA (Wako, 017-23294)
- FC ブロック Purified anti-mouseCD16/32 (Biolegend, 93, 101302)
- FACS Aria II flow cytometer (BD Bioscience)
- 蛍光標識抗体
- 70 μ m/80 μ m 径ノズル (BD Bioscience)

【実験方法】

セルソーターにより目的細胞をソーティングする前に、磁気ビーズを用いた CD3⁺T 細胞のネガティブセレクションを行なった。

- 1) 細胞を 1×10^8 cells/mL になるように EasySep Buffer で懸濁する。磁気による分離一回あたり細胞懸濁液量を 0.1 mL - 2 mL にする。
- 2) サンプル 1mL あたり 50 μ L Rat 血清を加える。
- 3) サンプルを FACS チューブ (ポリスチレン製) へ移す。
- 4) サンプル 1mL あたり 50 μ L の抗体カクテルを加え、室温で 10 分間置く。
- 5) RapidSphere を 30 秒間 vortex した後、サンプル 1 mL あたり 75 μ L 加え、2.5 分間置く。
- 6) 懸濁液が 2.5 mL になるように EasySep Buffer を加える。
- 7) マグネットに設置し、2.5 分間置く
- 8) チューブをマグネットに設置したまま、逆さにし、新しいチューブに上清を移す。
- 9) 6)から 8)の操作をもう一度繰り返す。
- 10) 得られた上清を CD3⁺T 細胞の懸濁液とし、細胞表面染色へ進む。細胞の染色方法は、3.10.1 に示した通り行う。
- 11) サンプルを $5 - 8 \times 10^6$ cells/mL 程度に調製する
- 12) 70 μ m 径のノズルを FACS Aria II にセットする。
- 13) ソートされた細胞を受けるチューブを、あらかじめ 1% BSA/PBS でコーティングしておく。さらに、2 mL 程度の 1% BSA/PBS を入れることで、ソーティングの際の細胞への衝撃を緩和する。
- 14) Flow Rate 3 以下で必要な細胞数が得られるまでソーティングを行う。

2.12. 免疫細胞移入実験

絶食を施した TH1F-1KO に上記の Cell sorting によって回収した CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg を APAP 投与 12 時間前に 1×10^6 /mouse で尾静脈に投与し、絶食後 24 時間の時点で APAP を 250 mg/kg の容量で投与した。同様に、絶食を施した Rag2^{-/-}に対して Cell sorting によって回収した CD45⁺CD3⁺TCR γ/δ ⁺ $\gamma\delta$ T 細胞を APAP 投与直前に 2.5×10^5 /mouse で尾静脈に投与し、絶食後 24 時間の時点で APAP を 150 mg/kg の容量で

投与した。

2.13. 免疫細胞除去実験

好中球除去実験では、APAP 投与の 24 時間前に抗マウス Gr-1 抗体 (RB6-8C5, BioLegend) を 250 μg で尾静脈注射により投与し、コントロール群にはラット IgG2b κ (RTK4530, BioLegend) を投与した。一方、IL-17A の中和実験では、APAP 投与直前に抗マウス IL-17A 抗体 (TC11-18H10.1, BioLegend) を 200 μg で尾静脈注射により投与し、コントロール群には抗ラット IgG1 κ (RTK2071, BioLegend) を投与した。

2.14. DNA 合成

2.14.1. RNA 抽出

【実験材料】

- NucleoSpin RNA Plus (Machery Nagel)
- マウス肝臓サンプル

【実験方法】

- 1) 肝臓片 30 mg を LBP buffer 350 μL で冷やしながらか 1,200 rpm でホモジナイズする。
- 2) 肝臓破砕液を gDNA removal カラムへ移してチューブに挿し、室温、11,000 G で 30 秒間遠心する。
- 3) チューブへ落ちた肝臓破砕液に LBP buffer 100 μL を加える
- 4) サンプルを Nucleospin RNA Plus カラムへ移し、室温、11,000 G で 15 秒遠心する。
- 5) WB1 buffer 200 μL 加え 11,000 G で 15 秒間遠心する。
- 6) WB2 buffer 600 μL 加え 11,000 G で 15 秒間遠心する。
- 7) WB2 buffer 250 μL 加え 11,000 G で 2 分間遠心する。
- 8) カラムを新しい 1.5mL チューブに移し、メンブレンの中央に DEPEC 水 30 μL を加え、11,000 G で 1 分間遠心する。
- 9) 吸光度計を起動し、DEPEC 水でブランクを取ってサンプルの RNA 濃度を測定する。
- 10) RNA 濃度が 500 nL/ μL になるように、サンプルを DEPEC 水で希釈する。

2.14.2. 逆転写反応

【実験材料】

- GoScript Reverse Transcription System (Promega, A5004)
- Random primers (invitrogen, 48190-011)
- Oligo dT₂₀ primers (Eurofins)
- dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP mix) (Takara, 4029)

【実験方法】

- 1) 表 2.13 に従って, RNA/Primer Mix を作製する。

表 2.13 RNA/Primer Mix の組成

試薬	使用量
Total RNA solution	5 μg (x μL)
0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Random primer	1 μL
0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Oligo dT primers	1 μL
DEPEC water	(8 -x) μL

- 2) 70 $^{\circ}\text{C}$ のヒートブロックで5分間加温する。
- 3) 直ちに氷上で5分間冷やす。
- 4) 表 2.14 に従って Reverse transcription mix を作製する。

表 2.14 Reverse Transcription Mix の組成

試薬	使用量
GoScript 5 X Reaction Buffer	4 μL
25 mM MgCl_2	2 μL
10 mM dNTP	1 μL
GoScript Reverse Transcriptase	0.7 μL
DEPEC water	2.3 μL

- 5) RNA/primer mix 10 μL に対し, Reverse transcription mix 10 μL を加える。
- 6) 25 $^{\circ}\text{C}$ ヒートブロックで5分加温することで, アニーリングを行う。
- 7) 42 $^{\circ}\text{C}$ ヒートブロックで1時間加温することで, 伸長反応を行う。
- 8) 70 $^{\circ}\text{C}$ ヒートブロックで15分間加温することで, 伸長反応を停止する。
- 9) D_2O で5 - 10 倍に希釈する
- 10) -20 $^{\circ}\text{C}$ で保存する。

2.15. スタンダードベクターの作製

2.15.1. TA クローニングおよび目的 DNA の大腸菌への導入

【実験材料】

- Crimson Taq DNA Polymerase (BioLabs, M0324S)
- 5 \times Crimson Taq Reaction Buffer (BioLabs, B0324S)
- アガロース S (株式会社ニッポンジーン, 313-90231)
- 片刃トリミング用カミソリ (日新 EM 株式会社, 62-0161)

- PCR clean-up Gel extraction (MACHEREY-NAGEL, 740609.250)
- pGEM-T Easy (Promega, A137A)
- Ligation Mix (TaKaRa, 6023)
- Competent cell (DH5 α) (自家製)
- SOC 培地 (表 2.15)
- LB 培地, LB プレート (表 2.16)
- 10 mg/mL アンピシリン (Wako, 018-10372)

表 2.15 SOC 培地の組成

試薬	使用量
Bacto Tryptone (Becton Dickinson and Company, 211705)	20 g
Bacto Yeast Extract (Becton Dickinson and Company, 212750)	5 g
塩化ナトリウム (Wako, 191-01665)	0.5 g
5 N 水酸化ナトリウム水溶液 (Wako, 198-13765)	0.2 mL
MilliQ	–
	960 mL
+ 1 M グルコース (Wako, 041-00595)	20 mL
+ 1 M 塩化マグネシウム水溶液 (Wako, 135-00165)	10 mL
+ 1 M 硫酸マグネシウム (Wako, 131-00405)	10 mL

表 2.16 LB 培地および LB プレートの組成

試薬	使用量
Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
塩化ナトリウム	10 g
5 N 水酸化ナトリウム水溶液	0.2 mL
MilliQ	–
	1 L
+ (LB プレート) Bacto Agar (Becton Dickinson and Company, 214010)	15 g

上記試薬をオートクレーブ後, LB 培地は使用可能である。LB プレートは 10 cm dish に 10 mL ずつ分注し, 固まったら冷蔵保存する。

【実験方法】

- 1) 表 2.17 に従って Mixture を作成する。

表 2.17 Crimson Taq Mixture 組成

試薬	使用量
5× Crimson Taq Reaction Buffer	5 μ L
2.5 mM dNTP	2 μ L
25 mM Primers	0.2 μ L each
Taq polymerase	0.125 μ L
DNA solution	5 μ L
MilliQ	12.5 μ L

- 2) Thermal Cycler を用いて、図 2.3 のプロトコルで PCR 反応を行う。

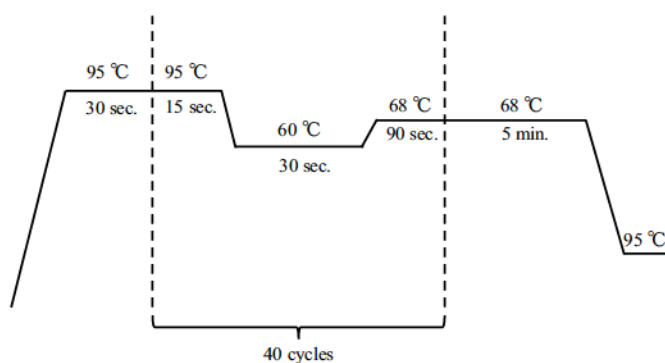


図 2.3 CrimsonTaq PCR プロトコル

- 3) 1%アガロースゲルで電気泳動を行う。UV ランプでバンドの位置を確認し、目的遺伝子のバンドをカミソリで切り出し、ゲルの重さを測定する。ただし、UV による DNA への損傷を抑えるため、UV ランプは出力の低い長波長を利用し、短時間の照射にする。
- 4) ゲル 1 mg あたり 2 μ L の NT を加え、50 °C で 10 分間加温して、ゲルを溶かす。
- 5) ゲル溶液をカラムに移し、11,000 g で 1 分間遠心する。
- 6) NT3 を 700 μ L 加え、11,000 g で 1 分間遠心して、メンブレンの洗浄を行う。
- 7) 6) の操作をもう一度行う。
- 8) 11,000 g、1 分間空遠心を行い、有機溶媒を完全に排除する。
- 9) NE を 30 mL メンブレンの中央に加え、11,000 g で 1 分間遠心し、DNA を溶出する。
- 10) 表 2.18 の組成で Ligation Mixture を作成する。16 °C で 30 分間インキュベートし、pGEM-T Easy に目的配列を挿入する。

表 2.18 Ligation Mixture の組成

試薬	使用量
pGEM-T Easy	0.25 μ L
Ligation Mix	5 μ L
Insert	4.75 μ L

- 11) Competent cell 100 μ L を氷上で融かす。
- 12) Competent cell の 1/10 量を上限として目的配列を挿入したベクターを加え、軽くピペッティングする。
- 13) 10 - 30 分間氷上に静置する。
- 14) 42 $^{\circ}$ C で 45 秒間加温し、ヒートショック処理を行う。
- 15) 2 - 3 分間氷上に静置する。
- 16) あらかじめ 37 $^{\circ}$ C に加温しておいた SOC 培地 1 mL を Competent cell に加える。
- 17) 37 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 30 分間賦活化する。
- 18) 3000 rpm で 5 分間遠心する。
- 19) アンピシリン 50 μ L で懸濁
- 20) アンピシリン入りの LB 培地を温めておき、大腸菌を LB プレートに播いて一晩培養する。
- 21) LB 培地 2 mL に対し、アンピシリン溶液 1 μ L を加えた培地をラウンドチューブに入れる。コロニーを爪楊枝でつつき、ラウンドチューブに爪楊枝を入れる。
- 22) 37 $^{\circ}$ C の湯浴にラウンドチューブを設置し、6 時間以上振盪培養する。
- 23) 培養後の大腸菌液は Mini prep を行うまで 4 $^{\circ}$ C で 1 週間程度まで保存可能である。

2.15.2. Mini Prep (ボイル法)

【実験材料】

- ボイル法バッファー (表 2.19)
- 10 mg/mL Lysozyme
- 2-プロパノール (Wako, 166-04836)
- エタノール (Wako, 005-00457)
- RNase A (Sigma, R4642)

表 2.19 ボイル法バッファーの組成

試薬	使用量
1 M Tris-HCL (pH 7.5) (Wako, 207-06275)	5 mL
0.5 M EDTA-2Na (pH 8.0) (同仁化学研究所, 345-01865)	12.5 mL
塩化リチウム (Wako, 123-05241)	10.6 g
MilliQ	-

	96 mL
TritonX-100 (Wako, 168-11805)	4 mL

【実験方法】

- 1) 培養した大腸菌液 1 mL を 1.5 mL チューブに回収し，遠心した後，上清を除去する。
- 2) 1 サンプルあたり，ボイル法バッファーを 200 mL，10 mg/mL Lysozyme solution を 15 μ L 加え，よく混合する。
- 3) 100 °C のヒートブロックで 2 分間加温する。
- 4) 氷上に 2 分間放置する。
- 5) 15,000 rpm，4 °C で 10 分間遠心する。
- 6) 未滅菌爪楊枝で沈殿物を除去する。
- 7) 2-プロパノールを 200 μ L 加えてよく混ぜる。
- 8) 15,000 rpm，4 °C で 10 分間遠心する。
- 9) 上清を除去し，70 % エタノールを 500 μ L 加える。
- 10) 15,000 rpm，4 °C で 5 分間遠心する。
- 11) 上清を除去し，エタノールが揮発するまで乾燥する。
- 12) RNaseA 入りの滅菌水 (10 μ g/ μ L) を 30-100 μ L 加え，溶解する。

2.15.3. Large prep

【実験材料】

- Solution I (表 2.20)
- Solution II (表 2.20, 用事調整)
- Solution III (表 2.20)
- クロロホルム (Wako, 038-02606)
- PEG8000 solution (表 2.21)
- 2-プロパノール (Wako, 166-04836)
- エタノール (Wako, 005-00457)
- RNase A (Sigma, R4642)

表 2.20 Solution I, II, III の組成

Solution I		Solution II		Solution III	
試薬	使用量	試薬	使用量	試薬	使用量
D-glucose (Wako, 041-00595)	4.5 g	10 N 水酸化ナトリウム 水溶液	0.2 mL	酢酸カリウム (Wako, 160-03175)	147 g
2 M Tris-HCl	6.25 mL				

0.5 M EDTA-2Na	10 mL	20 % ドデシル硫酸ナト	0.5 mL	酢酸	57.5 mL
MilliQ	-	MilliQ	9.3 mL	MilliQ	-
Total	500 mL		10 mL		500 mL

表 2.21 PEG 8000 solution の組成

試薬	使用量
塩化ナトリウム (Wako, 191-01665)	9.35 g
PEG8000 (MP Biochemicals, 195445)	13 g
MilliQ	-
	100 mL

上記試薬をオートクレーブにより滅菌後使用する。

【実験方法】

- 1) 大量培養した大腸菌を 50 mL 遠沈管に入れ, 3,500 rpm, 4°Cで 15 分間遠心する。
- 2) 上清を除去する。
- 3) Solution I を 6 mL 加え, よく混ぜる。
- 4) 10 mg/mL Lysozyme 600 mL を加えてよく混ぜ, 室温で 15 分間静置する。
- 5) Solution II を 10 mL 加え, 10 回程度転倒混和を行い, 10 分間氷上に静置する。
- 6) Solution III を 7.5 mL を加え, 10 回程度転倒混和を行い, 30 分間氷上に静置する。
- 7) クロロホルムを 5 mL 加えてよく混ぜる。
- 8) 3,500 rpm, 4°Cで 10 分間遠心する。
- 9) 新しい 50 mL 遠沈管に上清を移す。
- 10) 7)から 9)の操作をもう一度行う。
- 11) 2-プロパノールを 35 mL 加えてよく混ぜる。
- 12) 3,500 rpm, 4°Cで 15 分間遠心する。
- 13) デカンテーションで上清を除去する。
- 14) 70 %エタノールを適量加え, 3,500 rpm, 4°Cで 2 分間遠心する。
- 15) エタノールが揮発するまで十分乾燥し, 滅菌水 1 mL を加える。
- 16) 10 mg/mL RNaseA 10 μ L を加え, 37°Cで 30 分間処理する。
- 17) PEG 8000 solution を 1 mL 加えてよく混合し, 30 分間氷上に静置する。
- 18) 1.5 mL チューブに移し, 13,000 rpm, 4°Cで 15 分間遠心する。
- 19) 上清を除去し, 適量の 70%エタノールで 2 回洗浄する。
- 20) エタノールが揮発するまで乾燥し, 500-1000 μ L の滅菌水を加えて溶解する。
- 21) 精製したスタンダードベクターの量を測定し, 1 μ g/ μ L に調整して-20°Cに保存する。

2.16. SYBR Green qPCR/TaqMan qPCR

【実験材料】

- GoTaq qPCR Master Mix (Promega, A6002)
- FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche, 04 913 957 001)
- Primer (表 2.22, 表 2.23 参照)
- 1 µg/µL スタンダードベクター (3.12 に従い作製したもの)
- TaqMan Probe (Applied Biosystems) (表 2.23 参照) Fast Reaction Tubes (8 Tubes/Strip) (Applied Biosystems, 4358293)
- MicroAmp Optical 8-Cap Strip (Applied Biosystems, 4323032)
- MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 mL) (Applied Biosystems, 4346907)
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, 4360954)
- StepOne Plus (Applied Biosystems)

表 2.22 Primer 配列 (SYBR Green qPCR)

目的遺伝子	Forward/Reverse	プライマー配列 (5'→3')
<i>Cxcl1</i>	F	ACCGAAGTCATAGCCCACTC
	R	TTGTCAGAAGCCAGCGTTCA
<i>Cxcl2</i>	F	TCCAGAGCTTGAGTGTGACG
	R	GGCACATCAGGTACGATCCA
<i>Elane</i>	F	CTGTGTGAACGGCCTAAATTTC
	R	TCACAATGTCGTTTCAGCAGTTG
<i>Pena</i>	F	TGTGGATAAAGAAGAGGAGGCG
	R	TTCAGGTACCTCAGAGCAAACG
18S rRNA	F	GCTCGCTCCTCTCCTACTTG
	R	CCCGTCGGCATGTATTAGCT

表 2.23 Primer 配列 (TaqMan qPCR)

目的遺伝子	F/R	プライマー配列 (5'→3')	Probe 配列 (5'→3')
<i>TNF-α</i>	F	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	CACGTCGTAGCAAACCACCAAGTGGA
	R	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	
<i>FasL</i>	F	AAGAAGGACCACAACACAAATCTG	TGCAGAAGGAACTGGCAGAACTCCG
	R	CCCTGTAAATGGGCCCACT	
<i>Il-12p40</i>	F	GGAAGCACGGCAGCAGAATA	CATCATCAAACCAGACCCGCCAA
	R	AACCTGAGGGAGAAGTAGGAATGG	
<i>IFN-γ</i>	F	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	TCACCATCCTTTTGCCACTTCCTCCA
	R	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	

OPN の Taqman primer-probe は Applied Biosystems から購入した。配列情報は不明である。

【実験方法】

- 1) 1 µg/µL スタンダードベクターを MilliQ で段階希釈し、 10^{-5} ~ 10^{-12} のスタンダード溶液を作製する。
- 2) 8 連チューブまたは 96 ウェルプレートに、ネガティブコントロール (MilliQ)、サンプル、スタンダードの順でそれぞれ 5 mL ずつアプライし、コンタミしないようにカバーをし、氷上に置いておく。
- 3) SYBR Green qPCR mix または、TaqMan qPCR mix を表 2.24, 表 2.25 に従い作製し、氷上で冷やしておく。

表 2.24 SYBR Green qPCR mix 組成

試薬	使用量
2× GoTaq qPCR Master Mix	10 µL
20 µM Primers (F/R)	各 0.5 µL
MilliQ	3.8 µL
CXR (reference dye)	0.2 µL

表 2.25 TaqMan qPCR mix 組成

試薬	使用量
FastStart Universal Probe Master (Rox)	10 µL
Primers (F/R)	Final conc.が 900 nM になるように各 x µL
TaqMan Probe	Final conc.が 250 nM になるように y µL
MilliQ	(5-x-2y) µL

- 4) ネガティブコントロール (MilliQ)、サンプル、スタンダードの順に、qPCR mix を 15 mL ずつアプライする。
- 5) 8 連チューブまたは 96 well プレートに StepOne PLUS Real-time PCR system にセットし、図 2.4 または図 2.5 のプロトコルに従って、PCR 反応を行う。

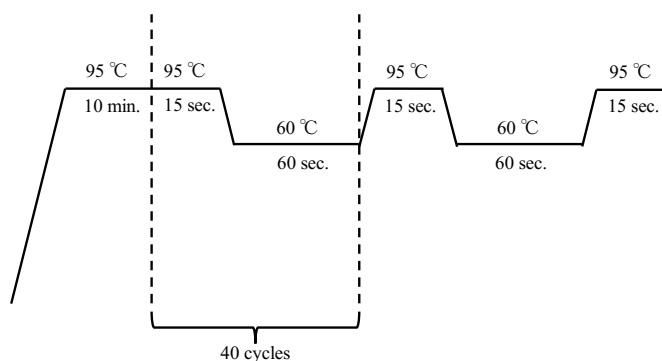


図 2.4 SYBR Green qPCR のプロトコル

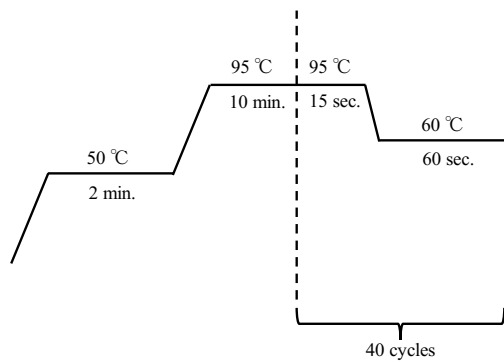


図 2.5 TaqMan qPCR のプロトコル

2.17. Migration assay

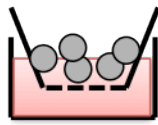
【実験材料】

- ・ 脾臓細胞
- ・ RPMI-1640 (0.5%BSA, 10 mM HEPES)
- ・ 3 μ m pore 24-well transwell plate (Corning)
- ・ Oligomycin (Wako, 1404-19-9)

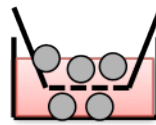
【実験方法】

- 1) CCL20 を 0 ng/mL または 50 ng/mL で添加した RPMI-1640 (0.5%BSA, 10 mM HEPES) を 3 μ m pore 24-well transwell plate の Lower chamber に 600 μ L ずつ分注した後, Upper chamber を設置する。実験により, Oligomycin を 300 μ g/mL の濃度で添加する。
- 2) 脾臓細胞を 0.5%BSA と 10 mM HEPES を含む RPMI-1640 に 1.5×10^7 cells/mL で懸濁し, 200 μ L (3×10^7 cells) を 3 μ m pore 24-well transwell plate の Upper chamber に加える。実験により, Oligomycin を 300 μ g/mL の濃度で添加する。Oligomycin の事前処置は行わない。
- 3) 37°C CO₂ インキュベーターで 4 時間培養して migration させる。
- 4) Lower chamber および Upper chamber 下部の細胞を回収し, CD45, CD3, TCR γ/δ に対する抗体で染色する。
- 5) 細胞を 0.5%BSA 300 μ L に懸濁する。
- 6) Aria II flow cytometer で Flow rate 3 にて 3 分間測定を行う。
- 7) 50 ng/mL CCL20 の well から 0 ng/mL CCL20 の well の細胞数を引き算することで, CCL20 依存的に Lower chamber に移動した細胞を算出する。

脾臓細胞 3×10^6 cells
3 mm pore



4 h



•RPMI-1640, 0.5%BSA, 10mM
HEPES
•CCL20 (0 ng/mL, 50 ng/mL)

FACS解析

• $\gamma\delta$ T cells (CD45⁺CD3⁺TCR γ/δ ⁺)
•Other T cell (CD45⁺CD3⁺TCR γ/δ ⁻)

図 2.6 Migration assay の条件

2.18. 統計解析

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。2群間の比較には、Mann-Whitney U test を用いた。多群間の比較には One way ANOVA を行った後、Turkey-Kramer test を群間の有意性を検定した。また、生存率に関しては、Log rank test を用いた。全てのデータは、 $p < 0.05$ となるものを有意な結果として示した。

3. 実験結果

3.1. AILI における肝障害および生存率に対する T 細胞の HIF-1 および HIF-2 の影響

AILI における T 細胞の HIF-1 および HIF-2 の役割を明らかにするため、24 時間絶食を施したマウスに対する APAP 投与後の肝障害の評価を行った。APAP 投与前 0 時間の WT および THIF-1KO では肝障害マーカーである血清 ALT 活性は 20 Karmen 程度であり、両群間に有意な差は認めなかった (図 3.1A)。APAP 投与により WT では血清 ALT 活性が 6 時間をピークとして上昇し、それ以降で経時的に減少した (図 3.1A)。一方、THIF-1KO では 12 時間までは WT と同等の血清 ALT 活性を示したが、24 時間以降で WT よりも血清 ALT 活性が高値で維持された (図 3.1A)。また、肝臓内の還元型グルタチオン (GSH) は、WT で 6 時間までに低下して 24 時間までの以降の時間で徐々に回復した (図 S1)。THIF-1KO でも同様に 6 時間から 24 時間にかけて GSH 量は回復するが、24 時間では WT と比較して GSH 量が若干低下していた (図 S1)。一方、ALT の結果と一致して、WT では肝臓の H.E.染色像における肝障害領域が 24 時間以降で減少していくが、THIF-1KO では 48 時間以降でも肝障害領域が減少せずに維持された (図 3.1C, D)。また、肝臓における Ki67 陽性細胞数と *Pcna* 遺伝子発現に有意差が認められなかったことから、THIF-1KO における肝障害の増悪が肝再生の遅延によるものではないことが明らかになった (図 S2)。さらに、THIF-1KO では生存率の低下が認められた (図 3.1E)。以上の結果は、T 細胞における HIF-1 は AILI の障害初期の APAP 代謝依存的な肝障害や後期の肝再生には寄与せず、障害後期の免疫細胞依存的な肝障害に対して保護的に働くことを示唆している。一方、THIF-2KO では WT2 と比較して血清 ALT 活性に差を認めなかった (図 3.1B) ことから、T 細胞の HIF-1 が特異的に AILI に関与することが明らかとなった。

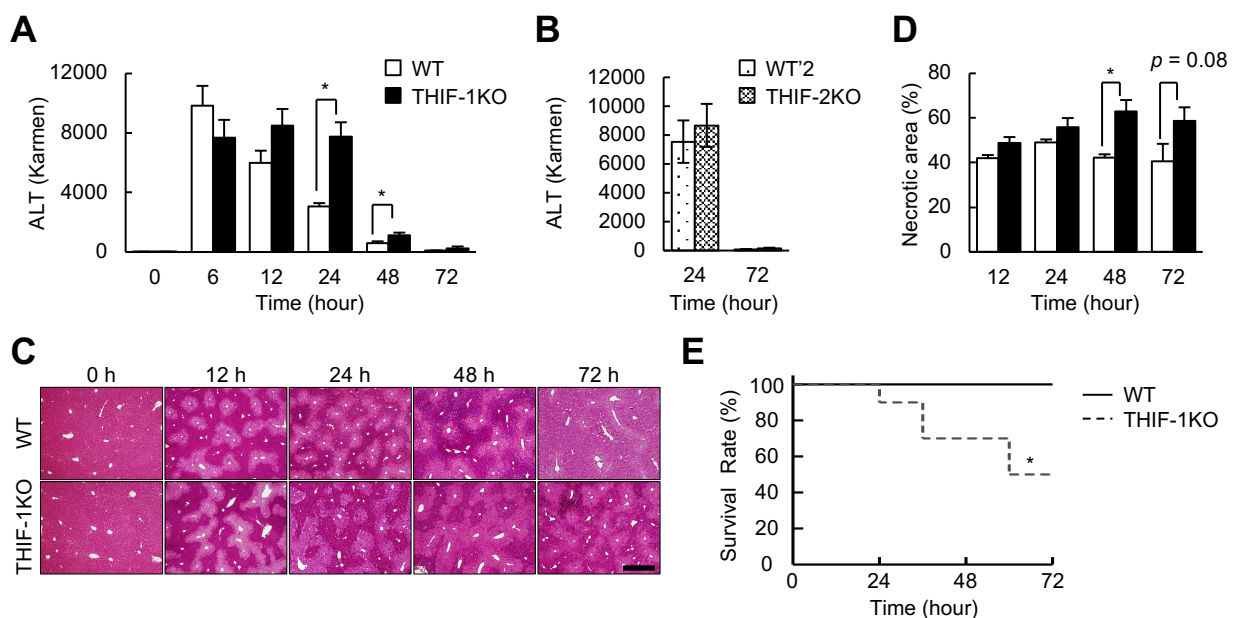
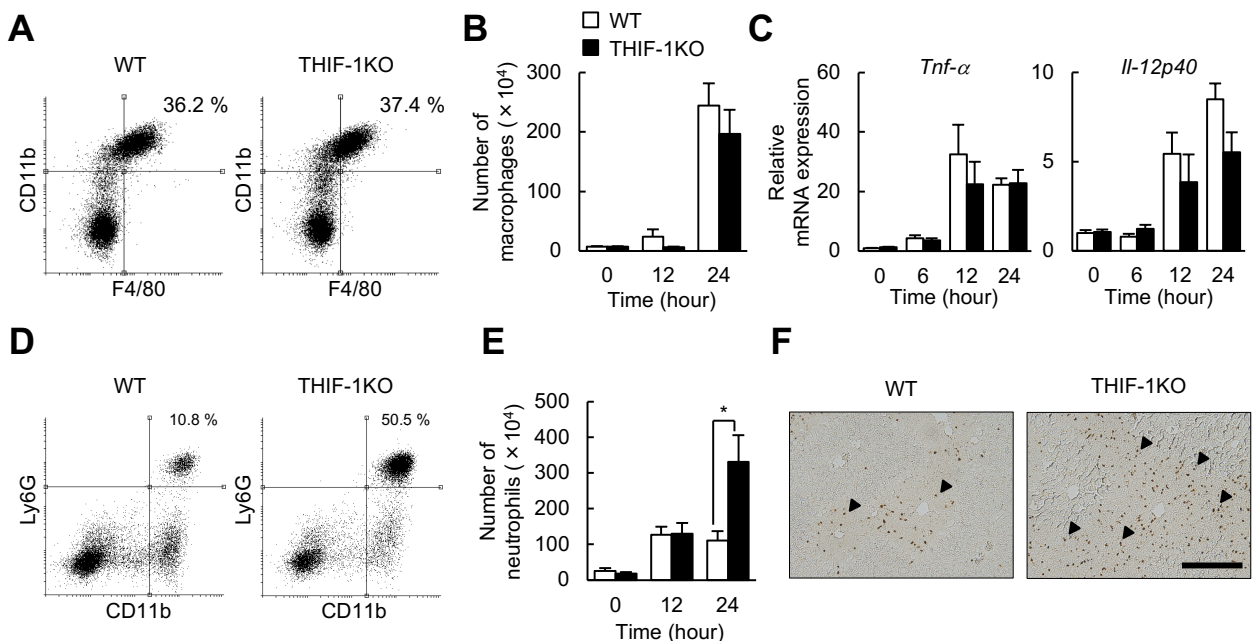


図 3.1 T 細胞特異的 HIF-1 α 欠損は AILI における肝障害および生存率を低下させる。

APAP 投与前および投与後の各時間帯における (A) THIF-1KO 群 (n = 6-10) および (B) THIF-2KO 群 (n = 7-11) の ALT 活性の評価。(C) 肝臓切片の H.E.染色像 (スケールは 500 μ m) および (D) 肝障害領域の評価 (n = 6-10)。(E) Kaplan-Meire 法による 250 mg/kg APAP 投与後の生存率の評価 (n = 5-10)。* $p < 0.05$ 。図 3.1A, C, D, E は Suzuki *et al.*, *Hepato Comm.*, 2018; 2 (5); 571-581. の Fig. 1 から引用。

3.2. THIF-1KO の肝障害増悪に対するマクロファージと好中球の関与

数多くの研究が AILI における肝障害に自然免疫細胞であるマクロファージと好中球が関与することを報告してきた[101]。一方、一般的に T 細胞はサイトカイン分泌を介して自然免疫細胞の機能を調節することが知られている。そこで、THIF-1KO の肝障害における自然免疫細胞の関与を評価した。APAP 投与により肝障害を起こした WT の肝臓では、マクロファージの細胞数が増加することが分かった (図 3.2B)。THIF-1KO でも APAP 投与後 24 時間においてマクロファージの細胞数は WT と同程度であった (図 3.2A, B)。さらに、炎症性 M1 マクロファージのマーカである *Tnf-α* および *Il-12p40* は APAP 投与前後の各時間において遺伝子発現が同程度であることが分かった (図 3.2)。以上のことから、AILI の病態形成において、T 細胞の HIF-1 はマクロファージの浸潤に影響しないことが分かった。好中球についてもマクロファージと同様に、WT の肝臓で APAP 投与後に細胞数の増加を認めた (図 3.2E)。一方、THIF-1KO では APAP 投与後 24 時間で WT よりも顕著な好中球数の増加を示した (図 3.2D, E)。同様に、APAP 投与後 24 時間の肝臓切片の Ly6G 染色像でも、肝小葉の肝障害領域において好中球の数が増加することがわかった (図 3.2F)。また、WT では肝臓における好中球誘導性ケモカイン (*Cxcl1*, *Cxcl2*) の遺伝子発現が 12 時間までに増加し、それ以降の時間においては減少した (図 3.2G)。一方、THIF-1KO では 24 時間でも *Cxcl1* および *Cxcl2* の発現が WT よりも有意に高い値を維持することが分かった (図 3.2G)。Elane に関しては WT と THIF-1KO の肝臓で APAP 投与後に発現の上昇を示すが、両群間で有意差は認めなかった (図 3.2H)。また、抗 Gr-1 抗体による好中球の除去により、既報と一致して WT における ALT 活性が低下することが分かった (図 3.2I)。さらに、コントロール群で WT と比較して上昇した THIF-1KO の ALT 活性が、抗 Gr-1 抗体投与群で WT と同程度まで低下することが分かった (図 3.2I)。以上の結果は、THIF-1KO での APAP 投与による肝障害の増悪は、肝臓における *Cxcl1* および *Cxcl2* の発現上昇による好中球浸潤によって誘導されることを示している。



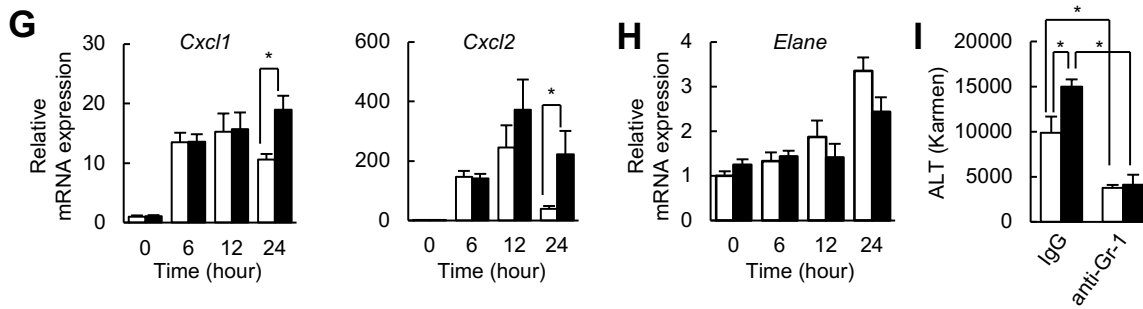


図 3.2 THIF-1KO では APAP 投与により肝臓への好中球浸潤が増加する。

(A) APAP 投与後 24 時間の肝臓のマクロファージ ($CD45^+Ly6G^-CD11b^+F4/80^+$) の Flow cytometry の結果, および, (B) APAP 投与前後の細胞数の推移 ($n = 6-10$)。 (C) 肝臓における炎症性サイトカイン ($TNF-\alpha$, $IL-12p40$) の遺伝子発現 ($n = 8-13$)。 (D) APAP 投与後 24 時間の肝臓の好中球 ($CD45^+F4/80^-CD11b^+Ly6G^+$) の Flow cytometry の結果, および, (E) APAP 投与前後の細胞数の推移 ($n = 6-10$)。 (F) 肝臓切片の Ly6G 染色像。 Arrow head は代表的な好中球を示し, スケールは $200\mu m$ である。 (G, H) 肝臓における好中球誘導性ケモカイン ($Cxcl1$, $Cxcl2$) および $Elane$ の発現 ($n = 8-13$)。 (I) 好中球除去が APAP 投与後 24 時間における ALT 活性に与える影響の評価 ($n = 4-5$)。 * $p < 0.05$ 。 図 3.2A-I は Suzuki *et al.*, *Hepatol Commun.*, 2018; 2 (5); 571-581. の Fig. 2 から引用。

3.3. THIF-1KO の肝障害増悪に対する NK 細胞と NKT 細胞の関与

次に NK 細胞および NKT 細胞の関与を評価した。 WT の肝臓において, APAP 投与後 24 時間での NK 細胞および NKT 細胞の細胞数の減少が確認された (図 3.3B, C)。 THIF-1KO では NK 細胞の細胞数は 0 時間で WT と同程度であるが, NKT 細胞に関しては APAP 投与後 24 時間で WT よりもリンパ球に占める割合および細胞数が低下することがわかった (図 3.3A, C)。 NKT 細胞は TCR 刺激により活性化誘導性細胞死を引き起こしやすい細胞であることから, THIF-1KO における NKT 細胞数の減少は NKT 細胞の活性化を示唆している。そこで, NKT 細胞のエフェクター機能を評価するため FasL の解析を行った。 WT の肝臓における $Fasl$ の遺伝子発現は APAP 投与後 24 時間でピークを迎えて次第に低下するが, 各時間においてその発現は WT と THIF-1KO で同程度であった (図 3.3E)。一方, NKT 細胞の細胞表面における FasL の発現は, WT では APAP 投与前 0 時間と投与後 24 時間で発現変化は認められなかった (図 3.3F)。また, 投与後 24 時間において WT と THIF-1KO の間で FasL の発現は同程度であった (図 3.3F)。この結果と一致して, NKT 細胞の TCR 活性化マーカーである CD69 に関して, WT では APAP の投与前と投与後 24 時間で発現変化は示さなかった (図 3.3G)。また, 投与後 24 時間で WT と THIF-1KO で発現量に変化は認められなかった (図 3.3G)。これらの結果は, AILI において NKT 細胞は活性化していないこと, および, HIF-1 は NKT 細胞のエフェクター機能の一部に影響を与えないことを示している。また, NK 細胞に関しても APAP 投与による FasL の活性化および APAP 投与後 24 時間における両群間の FasL 発現変化は認められなかった (図 3.3F)。以上により, NK 細胞および NKT 細胞は THIF-1KO における肝障害の増悪に関与している可能性は低いと考えられた。

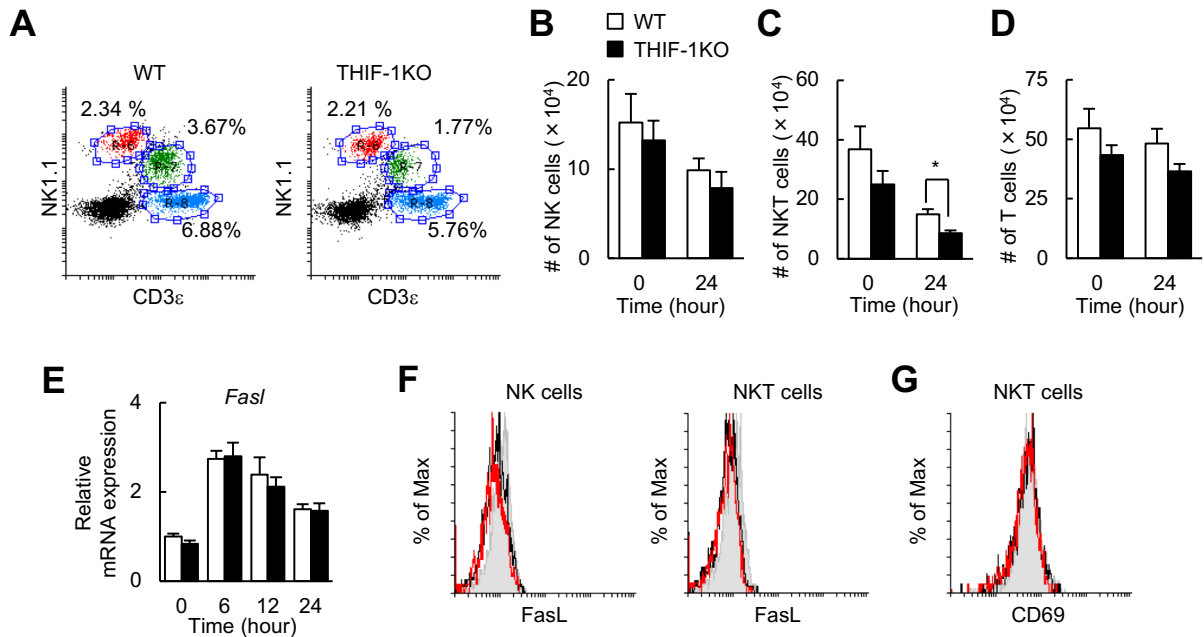


図 3.3 NK 細胞と NKT 細胞は THIF-1KO における肝障害の増悪に関与しない。

(A-D) APAP 投与後 24 時間での NK 細胞 ($CD45^+CD3\epsilon^-NK1.1^+$), NKT 細胞 ($CD45^+CD3\epsilon^+NK1.1^+$), T 細胞 ($CD45^+CD3\epsilon^+NK1.1^-$) の Flow cytometry の結果, および, APAP 投与前後の細胞数の推移 ($n=6-10$)。 (E) APAP 投与前後の各時間における肝臓の FasL の発現評価 ($n=8-13$), および, (F) APAP 投与後 24 時間における肝臓の免疫細胞の Flow cytometry による NK 細胞 ($CD45^+TGF-\beta^-NK1.1^+$) と NKT 細胞 ($CD45^+TGF-\beta^+NK1.1^+$) の細胞表面における FasL の発現解析。灰色塗りは APAP 非投与の WT, 黒線は APAP 投与の WT, 赤線は APAP 投与の THIF-1KO を示す。 (G) APAP 投与後 24 時間における肝臓の免疫細胞の Flow cytometry による NKT 細胞の細胞表面における活性化マーカー CD69 の発現評価。灰色塗りは APAP 非投与の WT, 黒線は APAP 投与の WT, 赤線は APAP 投与の THIF-1KO を示す。 * $p<0.05$ 。

図 3.3B, C, および, E は Suzuki *et al.*, *Hepatol Commun.*, 2018; 2 (5); 571-581. の Supplementary Fig. 3 と Fig. 2 から引用。

3.4. THIF-1KO の肝障害増悪に対する Treg の関与

これまでの解析において, THIF-1KO の肝臓では好中球の浸潤が特徴的に増加することが明らかとなった。過去の報告では, Treg は好中球の浸潤, 機能, および, 生存に対して抑制的に作用することが報告されている[109, 154]。一方, 我々を含めた複数の研究グループは, HIF-1 が Treg のエフェクター機能を亢進することで腸炎に対して保護作用を示すことを報告した[32, 75]。そこで, AILI モデルにおいても Treg の HIF-1 が保護的に働く可能性を考慮して Treg の評価を行った。APAP 投与前の健常なマウスでは WT と THIF-1KO で肝臓および脾臓の Treg の細胞数は同程度である (図 3.4C, D) ことから, HIF-1 は nTreg の分化に影響を及ぼさないことが示唆された。一方, APAP 投与後 24 時間では WT と THIF-1KO で $CD4^+$ T 細胞に占める Treg の割合に変化は認められない (図 3.4A) が, $CD4^+$ T 細胞の細胞数が THIF-1KO で有意に減少することを反映して Treg の細胞数は減少傾向を示した (図 3.4B, C)。THIF-1KO における Treg の減少の原因を明らかにするため, Annexin V を用いたアポトーシス評価を行った。その結果, APAP 投与後 24 時間において, THIF-1KO Treg のアポトーシスが差は小さいが WT よりも有意に増加することが

明らかになった (図3.4E)。THIF-1KOにおける肝障害の増悪がTregの減少による可能性を検討するため、THIF-1KOへのTreg投与実験を行った。過去の報告に反して、Treg非投与群とWTの脾臓から分離したTreg投与群でALT活性は同程度であった (図3.4F)。また、WTおよびTHIF-1KOの脾臓から分離したTregの投与実験において、両群間で血清ALT活性に有意差は認められなかった (図3.4E)。以上の結果により、HIF-1はAILIにおけるTregのアポトーシスに対して抑制的に働くが、AILIの病態進行には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

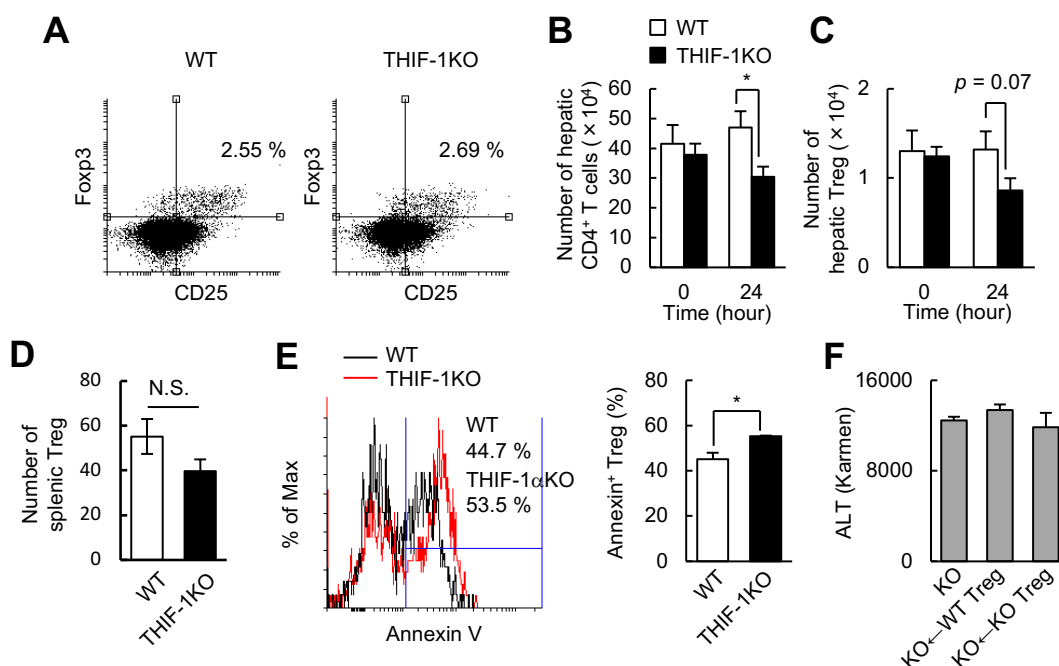


図 3.4 Treg は THIF-1KO における肝障害増悪に関与しない。

(A) APAP 投与後 24 時間での肝臓の Treg (CD45⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) の Flow cytometry の結果、および、APAP 投与前後の (B) CD4⁺ T 細胞 (CD45⁺CD4⁺) と (C) Treg の細胞数の推移 (n = 13-17)。 (D) APAP 投与前の脾臓の Treg (CD45⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) の細胞数 (n = 4-5) (E) Annexin V による APAP 投与後 24 時間における肝臓の Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) のアポトーシスの評価 (n = 5-6)。 (F) THIF-1KO に対する Treg 投与実験における ALT 活性の評価 (n = 4)。 **p*<0.05。

3.5. 好中球浸潤に関わる IFN- γ および OPN の関与

T 細胞および NKT 細胞が主に分泌するサイトカインである IFN- γ は、マクロファージおよび好中球の浸潤を増加させることで AILI を増悪することが示唆されている [85]。そこで、THIF-1KO において IFN- γ が肝障害を増悪する可能性を評価した。WT では APAP 投与前後で血清 IFN- γ レベルに明確な変化は認められなかった (図 3.5A)。一方、THIF-1KO では APAP 投与後 24 時間において WT と比較して顕著な血清 IFN- γ レベルの上昇が認められた (図 3.5A)。しかしながら、肝臓における IFN- γ の遺伝子発現は各時間帯で WT と THIF-1KO で有意差は認められなかった (図 3.5B)。また、APAP 投与後 24 時間の肝臓から分離した免疫細胞を PMA と Ionomycin で再刺激したところ、WT と THIF-1KO で IFN- γ 産生細胞の細胞数は同程度であった (図 3.5C)。一方、ConA 誘導性急性肝障害において、NKT 細胞から分泌された OPN は好

中球の浸潤および活性化により肝細胞障害を促進することが報告されている[46]。WT において、血清 OPN レベルは APAP 投与後 12 時間でピークを迎え、24 時間では減少することが分かった (図 3.5D)。一方、THIF-1KO では投与後 24 時間においても OPN が高いレベルで維持されることが分かった (図 3.5D)。しかしながら、肝臓の OPN の遺伝子発現に関しては各時間で両群間に有意差は認められなかった (図 3.5E)。また、予備検討において、APAP 投与後 24 時間の肝臓から分離した免疫細胞を PMA と Ionomycin で再刺激しても WT と THIF-1KO の NKT 細胞の OPN 産生に顕著な差は認められなかった (図 3.5F)。以上の結果より、IFN- γ と OPN は THIF-1KO での肝臓の好中球浸潤の増加には関与しない可能性が高いと考えられる。

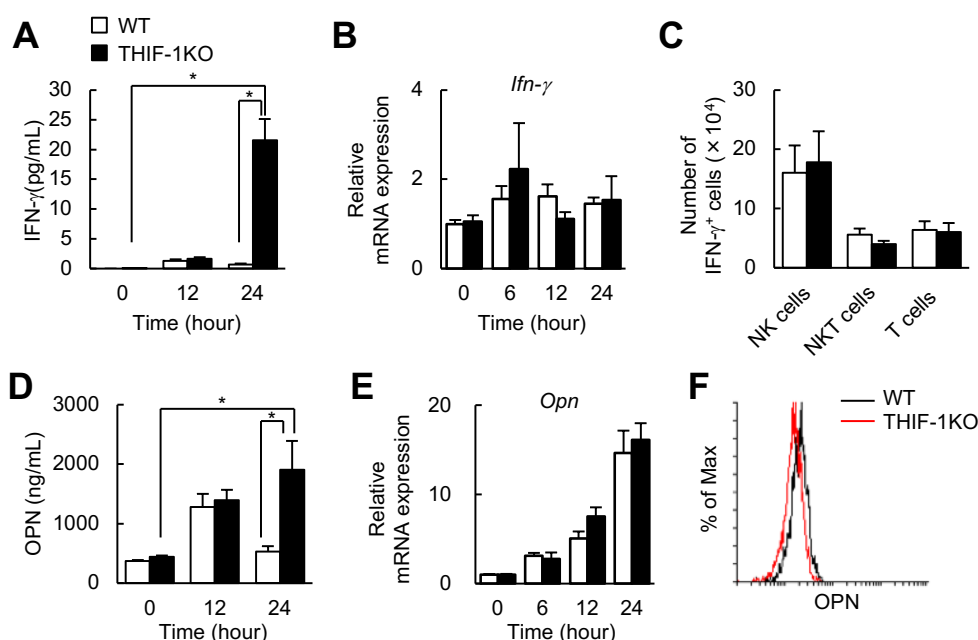


図 3.5 T 細胞特異的 HIF-1 α 欠損は肝臓での IFN- γ および OPN の発現に影響しない。

APAP 投与前後の各時間における (A) 血清 IFN- γ レベルの評価 (n = 11-17), および, (B) 肝臓の IFN- γ 発現の評価 (n = 8-13)。 (C) APAP 投与後 24 時間の肝臓の免疫細胞を PMA と Ionomycin で再刺激後の IFN- γ 陽性 NK 細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁻NK1.1⁺), NKT 細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁺NK1.1⁺), T 細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁻NK1.1⁻) の細胞数の評価 (n = 6)。 APAP 投与前後の各時間帯における (D) 血清 OPN レベルの評価 (n = 7-8), および, (E) 肝臓の OPN 発現の評価 (n = 8-13)。 **p* < 0.05。 (F) APAP 投与後 24 時間の肝臓から分離した免疫細胞を PMA と Ionomycin で再刺激後の NKT 細胞 (CD45⁺TCR β ⁺NK1.1⁺) の OPN 産生能の評価。

3.6. 好中球浸潤に関わる IL-17A の関与

IL-17A は、血管内皮細胞などにおける CXCL1 および CXCL2 の発現を亢進することで、好中球浸潤に対して促進的に作用する[87, 138]。また、IL-17A は AILI での好中球浸潤も制御することが知られている [179]。この報告に反して、WT の血清 IL-17A レベルは APAP の投与前後で変化しなかった (図 3.6A)。一方、THIF-1KO では APAP 投与後 24 時間において血清 IL-17A レベルの顕著な増加が認められた (図 3.6A)。THIF-1KO における肝障害および好中球浸潤に対する IL-17A の影響を検証することを目的に、APAP 投

与直前に WT および THIF-1KO に control IgG 抗体または IL-17A 中和抗体を投与した。WT に対する IL-17A 中和抗体の投与は肝障害および好中球浸潤には影響を及ぼさなかった (図 3.6B, C)。一方, control IgG 投与群では THIF-1KO の血清 ALT 活性が WT よりも上昇する一方, IL-17A 中和抗体の投与により血清 ALT 活性の上昇が抑制されることがわかった (図 3.6B)。同様に, control IgG 群で認められた THIF-1KO の好中球増加についても IL-17A 中和抗体の投与により抑制できることが示された (図 3.6C)。以上により, THIF-1KO では IL-17A 依存的に浸潤した好中球が肝障害の直接的な原因であることが明らかとなった。

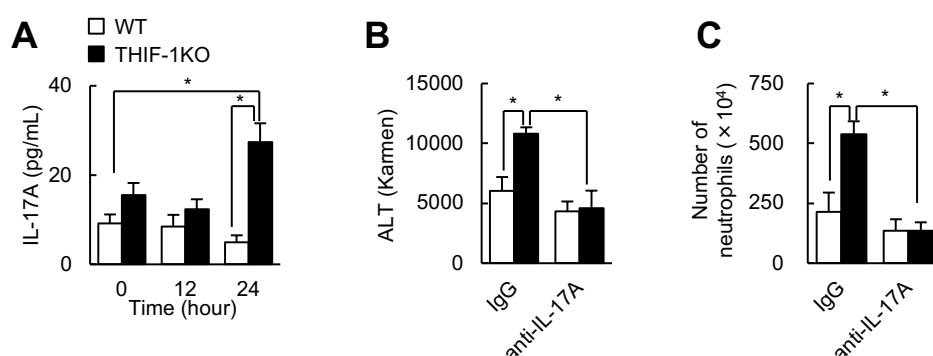


図 3.6 IL-17A は好中球浸潤を介して THIF-1KO での肝障害増悪を誘導する。

(A) APAP 投与前後の各時間における血清 IL-17A レベルの評価 (n = 11-17)。 (B, C) APAP 投与後 24 時間における血清 ALT 活性の測定および Flow cytometry による肝臓の好中球 (CD45⁺F4/80⁻CD11b⁺Ly6G⁺) の細胞数解析による IL-17A 中和抗体が肝障害に与える影響の評価 (n = 4-6)。 *p < 0.05。 図 3.6A-C は Suzuki *et al.*, *Hepatol Commun.*, 2018; 2 (5); 571-581. の Fig. 3 から引用。

3.7. THIF-1KO における肝障害増悪への IL-17A 分泌型 $\gamma\delta$ T 細胞の関与

次に, WT および THIF-1KO の肝臓における IL-17A の産生細胞の解析を行った。APAP 投与後 24 時間の肝臓から分離した免疫細胞を PMA と Ionomycin で再刺激した後, $\gamma\delta$ T 細胞とその他の T 細胞の IL-17A 産生能を評価した。APAP 投与により, WT では 24 時間の肝臓で IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が増加したが, THIF-1KO ではさらに顕著な IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の増加が認められた (図 3.7A, B)。また, WT において, IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞とその他の IL-17A 陽性 T 細胞が CD3⁺ T 細胞に占める比率およびそれらの細胞数に有意差は認められなかった (図 3.7A, C)。一方, IL-17A 陽性細胞における IL-17A の Mean fluorescence intensity (MFI) 解析により, $\gamma\delta$ T 細胞の方がその他の T 細胞よりも IL-17A 産生能が高いことがわかった (図 3.7D)。また, THIF-1KO では, その他の IL-17A 陽性 T 細胞の比率と細胞数は WT と同等であるが, IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞は WT よりも比率と細胞数が顕著に増加することが示された (図 3.7A, C)。ただし, WT と THIF-1KO の IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞における IL-17A の MFI が同程度であった (図 3.7D)。この結果と一致して, $\gamma\delta$ T 細胞の CD69 発現は両群間で差が認められなかった (図 3.7E)。一方, WT では APAP 投与前 0 時間よりも投与後 24 時間で $\gamma\delta$ T 細胞が有意に増加したが, THIF-1KO では 24 時間において WT よりも $\gamma\delta$ T 細胞が顕著に増加することが示された (図 3.7F)。また, T 細胞の HIF-1 は APAP 投与前 0 時間

の肝臓および脾臓における $\gamma\delta$ T 細胞の比率と細胞数に影響しないことがわかった (図 3.7F-I)。さらに、Rag2 欠損マウスに対して脾臓から分離した $\gamma\delta$ T 細胞の移入実験を行ったところ、THIF-1KO から分離した $\gamma\delta$ T 細胞が、WT から分離した $\gamma\delta$ T 細胞よりも顕著な血清 ALT 活性の上昇と肝臓への好中球浸潤の増加を促進することが示された (図 3.7J, K)。このことから、 $\gamma\delta$ T 細胞の HIF-1 が直接的に AILI における肝障害の増悪と好中球浸潤に関与するが明らかとなった。以上の結果より、HIF-1 は $\gamma\delta$ T 細胞の活性化および IL-17A 産生能には影響せず、 $\gamma\delta$ T 細胞の肝臓への浸潤を抑制する可能性が示された。

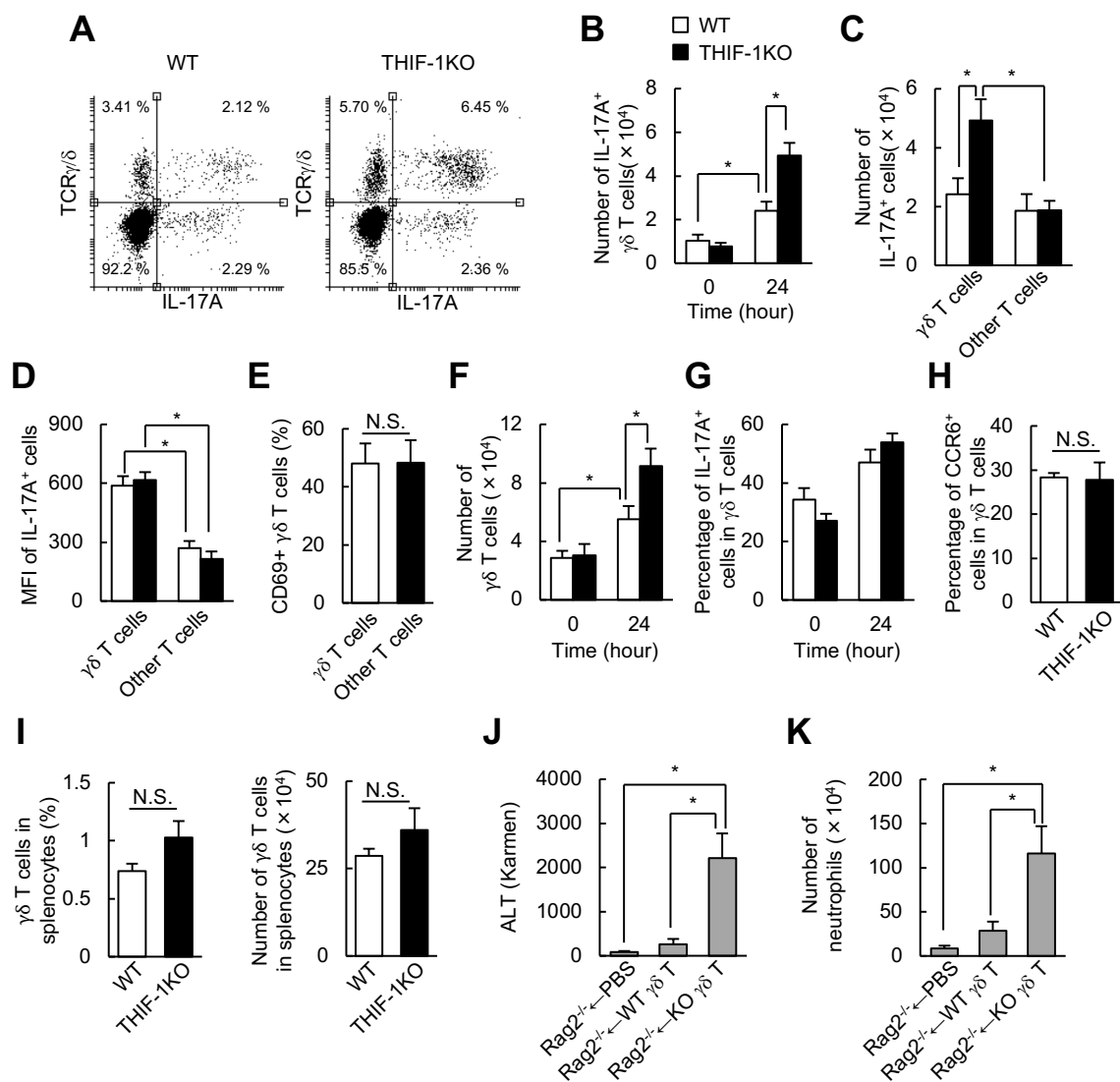


図 3.7 THIF-1KO の肝臓では主に $\gamma\delta$ T 細胞が IL-17A 分泌に関与する。

(A) APAP 投与後 24 時間の肝臓の免疫細胞を PMA と Ionomycin で再刺激後の IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁺TCR γ/δ ⁺) とその他の IL-17A 陽性 T 細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁺TCR γ/δ ⁻) の Flow cytometry の結果, (B) 0 時間と 24 時間における IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞, および, (C) 24 時間における IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞およびその他の IL-17A 陽性 T 細胞の細胞数 (n = 5-8)。 (D) Mean fluorescence intensity の解析による $\gamma\delta$ T 細胞およびその他の T 細胞の IL-17A 産生能の評価 (n = 5-8)。 (E) APAP 投与後 24 時間の肝臓 $\gamma\delta$ T 細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁺TCR γ/δ ⁺) の細胞表面の CD69 発現解析による活性化状態の評価 (n = 3)。 (F) APAP 投与前後の $\gamma\delta$ T 細胞数の推移 (n = 5-8)。 (G) 24 時間における肝臓の $\gamma\delta$ T 細胞に占める IL-17A 陽性細胞の比率 (n = 5-8)。 (H) 24 時間における肝臓の $\gamma\delta$ T 細胞に占める CCR6 陽性細胞の比率 (n = 3)。

(I) 0時間の脾臓における $\gamma\delta$ T細胞の比率および細胞数の評価 (n = 6)。Rag2欠損マウスに対する $\gamma\delta$ T細胞の投与実験における150 mg/kg APAP投与後24時間の (J) ALT活性, および, (K) 肝臓の好中球数 (n = 4-6)。* p <0.05。図3.7A, C, D, E, F, J, KはSuzuki *et al.*, *Hepatology*, 2018; 2 (5); 571-581.のFig. 4から引用。

3.8. $\gamma\delta$ T細胞のchemotaxisに対するHIF-1の影響の評価

肝線維症や肝再生の実験モデルにおいて、 $\gamma\delta$ T細胞はケモカインであるCCL20とその受容体であるCCR6依存的に肝臓に動員されることが報告されている[69, 152]。そこで、脾臓細胞を用いて、Boyden chamber assayにおけるCCL20に対する $\gamma\delta$ T細胞とその他のT細胞の遊走能の評価を行った。HIF-1 α 欠損 $\gamma\delta$ T細胞はコントロールの $\gamma\delta$ T細胞よりもBoyden chamberの下層に遊走した細胞数が多いことがわかった(図3.8A)。また、ミトコンドリアのATP synthaseの阻害薬であるOligomycinは非処理群と比較してコントロールの $\gamma\delta$ T細胞の遊走細胞数にほとんど影響を及ぼさないが、HIF-1 α 欠損 $\gamma\delta$ T細胞の遊走細胞数をコントロールの $\gamma\delta$ T細胞と同等程度に低下させることが分かった。このことは、 $\gamma\delta$ T細胞のHIF-1がミトコンドリアのATP合成依存的な細胞遊走を抑制することを示している。一方、 $\gamma\delta$ T細胞以外のT細胞では、遊走細胞数に対するHIF-1の影響は認められなかった(図3.8B)。また、Oligomycin処理により、コントロールのT細胞とHIF-1 α 欠損T細胞の遊走能は同等程度まで低下した(図3.8B)。HIF-1はc-Mycの阻害を介して下流遺伝子のPGC-1 β の発現を低下させ、ミトコンドリア生合成を抑制することが報告されている[190]。そこで、ミトコンドリア膜電位非依存的なMitotrackerを用いて $\gamma\delta$ T細胞のミトコンドリア量を評価した。その結果、コントロールの $\gamma\delta$ T細胞とHIF-1 α 欠損 $\gamma\delta$ T細胞ではミトコンドリア量は同等程度であることが分かった(図3.8C)。以上の結果により、HIF-1は $\gamma\delta$ T細胞特異的にミトコンドリア代謝依存的な細胞遊走を抑制することが明らかとなった。

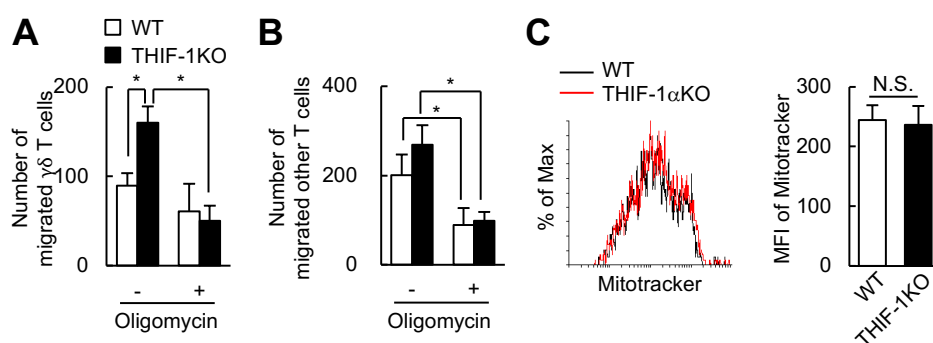


図3.8 $\gamma\delta$ T細胞のHIF-1はミトコンドリア代謝依存的な細胞遊走能を抑制する。

(A, B) 脾臓細胞を用いた Boyden chamber 法による Oligomycin 非存在下・存在下における $\gamma\delta$ T細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁺TCR γ/δ ⁺) およびその他の T細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁺TCR γ/δ ⁻)の CCL20 に対する遊走能の評価 (n = 6-7)。 (C) 膜電位非依存型 Mitotracker による脾臓の $\gamma\delta$ T細胞におけるミトコンドリア量の評価 (n = 3)。* p <0.05。図3.8A, B, CはSuzuki *et al.*, *Hepatology*, 2018; 2 (5); 571-581.のFig. 5から引用。

4. 考察

生体内の炎症は病原生物や腫瘍細胞の除去に働くだけでなく、障害を受けた組織の修復や免疫システムの恒常性維持においても重要な役割を果たす。この一連のプロセスが不備無く行われるためには、免疫システムが精密に制御される必要がある。感染や細胞障害が生じた組織の細胞は、ケモカインや炎症性サイトカインの分泌を介して免疫細胞の組織への動員および活性化を誘導する。炎症部位への T 細胞を適切に動員し活性化するシステムが破綻することにより、自己免疫疾患などの過剰な免疫応答が誘導されることがわかっている。また、炎症部位においては、免疫細胞の浸潤による局所的な酸素需要の上昇や炎症シグナルを介して HIFs が活性化される。これまで、HIF-1 は T 細胞の分化と機能を調節する中心因子であることが数多く報告されてきた。しかしながら、急性免疫応答における自然免疫様 T 細胞における HIF-1 の役割に関しては明らかにされてこなかった。本研究において、HIF-1 が 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、好中球による肝細胞障害に対して保護的に作用することを明らかにした。さらに、HIF-1 はミトコンドリアにおける ATP 合成を抑制することで $\gamma\delta$ T 細胞の細胞遊走を阻害する可能性を示した。

本研究は T 細胞の HIF-1 が特異的に AILI の病態に関与することを明らかにした。HIF-1 と HIF-2 は主に低酸素状態によって誘導される転写因子であり、VEGF などの共通の遺伝子の発現の制御に加えて解糖系や抗酸化遺伝子など個々に特異的な遺伝子の発現制御も行うことができる[119]。免疫細胞では低酸素刺激に加えて炎症シグナルが HIF-1 と HIF-2 を誘導し、これらは共通の制御と個別的な制御に関与することが分かっている。例えば、マクロファージの HIF-1 と HIF-2 は炎症性サイトカインの発現を亢進させることで敗血症や大腸炎を増悪することが報告されている[83, 133, 145]。また、IFN- γ による M1 分化刺激下では HIF-1 の発現が亢進することで iNOS 発現を介した NO 産生を増加させるが、IL-4 による M2 分化刺激下では HIF-2 の発現が亢進することで Arginase が NO 産生を抑制する[169]。一方、予備検討において、マクロファージの HIF-1 と HIF-2 は AILI における肝障害と組織修復に影響を及ぼさなかった(データ未掲載)。このように、HIF-1 と HIF-2 は病態や刺激依存的に同一の細胞でも異なる表現型を示すことがある。T 細胞の HIFs の研究では専ら HIF-1 を中心に機能解析が行われており、HIF-2 に関する報告は非常に少ない。我々はこれまで、DSS 腸炎モデルを中心に HIFs が CD4⁺ T 細胞の機能に及ぼす影響を解析してきた。DSS 腸炎モデルでは Th1, Th2, Th17, Treg が病態の形成に関与することが知られているが、HIF-1 は Foxp3 発現を亢進することで Th17/Treg バランスを Treg に傾倒させて DSS 腸炎に対して保護的に働くことを明らかにした[75]。T 細胞の HIF-2 に関しては DSS 腸炎の病態形成に対する影響は認められなかった(データ未掲載)。今回の研究では、HIF-1 は Th17/Treg バランスの制御ではなく $\gamma\delta$ T 細胞の機能を阻害することで AILI の肝障害を抑制することが明らかとなった。また、HIF-2 に関しては AILI における T 細胞の制御に関与しないことが分かった。以上のように、マクロファージの HIFs は AILI の肝障害に影響を及ぼさないが、T 細胞の HIF-1 は特異的に AILI の病態形成に関与する。本研究ではどのような上流刺激が T 細胞の HIF-1 α を活性化するかは明らかとなっていないが、TCR 刺激などの T 細胞特異的な刺激が T 細胞の HIF-1 α の発現誘導に関与する可能性が考えられる。一方、腎虚血再灌流障害のモデルでは、HIF-2 が NKT 細胞を介した細胞障害を抑制することが報告されている[191]。本研究では NKT

細胞の活性化は認められなかったが、Con-A や α GalCer による NKT 細胞誘導性肝障害では HIF-2 の影響が認められる可能性がある。また、NKT 細胞には、IFN- γ 分泌型、IL-4 分泌型、IL-17 分泌型、免疫抑制型などの様々なサブタイプが存在し、組織ごとにその分布も異なっている[197, 198]。そのため、肝臓と腎臓の NKT 細胞では存在する NKT 細胞サブセットや HIF-2 α の発現が異なる可能性がある。以上のように、本研究の AILI モデルにおける $\gamma\delta$ T 細胞特異的な HIF-1 の表現型は、T 細胞特異的な HIF- α の活性化刺激の存在や臓器特異的な T 細胞サブセットごとに HIF- α の発現が異なることが原因である可能性が考えられる。

本研究では、 $\gamma\delta$ T 細胞の HIF-1 α がどのように活性化されるかはいままのところ明らかに出来ていない。AILI を引き起こした肝臓は低酸素状態に暴露されるが、血中に遊出した $\gamma\delta$ T 細胞はリンパ組織および肝臓と比較して高い酸素濃度に晒されていると考えられる。従って、時間的な観点から考えると、肝臓にリクルートされた $\gamma\delta$ T 細胞が肝臓の低酸素状態による HIF-1 が安定化を介して遊走が制御されているとは考えづらい。一方、脾臓などのリンパ組織はもともと低酸素状態にあることから[82]、リンパ組織の $\gamma\delta$ T 細胞は恒常的に HIF-1 α の活性が高い可能性が考えられる。また、AILI を引き起こした肝臓は血清中にサイトカインや自己抗原を放出するが、それらのサイトカインによる NF κ B の活性化や自己抗原による TCR 刺激を介した mTOR の活性化などが遠隔的に HIF-1 α 活性を制御する可能性も考慮すべきである。ただし、Boyden chamber assay において、通常酸素状態で HIF-1 α は T 細胞の中でも $\gamma\delta$ T 細胞のみの遊走を特異的に阻害したことは、 $\gamma\delta$ T 細胞はその他の T 細胞と比べて HIF-1 α の発現が高い細胞である可能性があることを示している。今後の研究により、 $\gamma\delta$ T 細胞における HIF-1 α の発現制御機構を明らかにする必要がある。

THIF-1KO における AILI では肝臓への特徴的な好中球浸潤が認められた。これまで、好中球以外の免疫細胞に関しても AILI における肝細胞障害に寄与することが報告されてきたが、WT と THIF-1KO の両群間でマクロファージの浸潤と活性化状態、NK 細胞と NKT 細胞の FasL の発現に差は認められなかった。これらの結果は、T 細胞の HIF-1 が好中球浸潤を抑制することで肝細胞障害に対して保護的に働く可能性を示している。これまで、高用量の APAP 投与によって肝障害を誘導した場合、好中球誘導性ケモカインとして知られる CXCL1 と CXCL2 の受容体である CXCR1 欠損、および、好中球除去抗体の投与により、投与後 6 時間という早期段階においても AILI における肝細胞障害を抑制できることが報告されている[84]。同様に、本研究は THIF-1KO の肝臓では APAP 投与後 24 時間でも CXCL1 と CXCL2 の遺伝子発現が WT よりも高値で維持されることを示した。一方で、THIF-1KO での肝障害の悪化は APAP 代謝による初期障害以降の段階で引き起こされていると考えられる。血清 ALT 活性は APAP 投与後 12 時間までは WT と THIF-1KO の両群間で同程度であるが、24 時間以降で THIF-1KO が WT よりも高い値を示す。肝臓の好中球浸潤は APAP 投与後 12 時間までは両群間で同程度まで増加するが、24 時間では WT の好中球数は変化しない。一方で、THIF-1KO の好中球数は顕著に増加して血清 ALT 活性と同様の動態を示す。他の報告において、APAP を 300 mg/kg で投与した場合、肝臓の APAP は投与後 30 分でピークを迎えて急激に減少し、APAP-タンパク質複合体も 1 時間をピークに急激に減少する[124]。肝臓内の還元型グルタチオン (GSH) の量は WT と THIF-1KO で同様に APAP 投与後 6 時間まで同程度まで低下したこと

から、T細胞のHIF-1は初期のAPAP代謝には影響しないと考えられる。一方、WTとTHIF-1KOでは6時間から24時間にかけてGSH量が徐々に回復したが、24時間におけるGSH量がTHIF-1KOで若干低下していたことを考慮すると、THIF-1KOにおけるGSH量の回復遅延が肝障害の増悪に寄与する可能性が考えられる。GSH回復遅延による肝障害の増悪は好中球の浸潤を促す一方、免疫応答を介した肝細胞における酸化ストレスや細胞死は肝臓内のGSH量に影響する可能性があるため、THIF-1KOにおけるGSH量の回復の遅延と好中球浸潤を介した肝障害を完全に分離して現象を説明することは非常に困難である。しかしながら、少なくとも抗Gr-1抗体による好中球の除去によりTHIF-1KOでの肝障害がWTと同程度まで低下することから、THIF-1KOのAILI後期における肝障害の増悪は好中球によって誘導されると考えられる。さらに、Ki67陽性肝細胞数と*Pcna*遺伝子発現がWTとTHIF-1KOで同程度であったことから、THIF-1KOの表現型はGSH量の回復遅延の際によく認められる肝再生遅延によるものではないことがわかった。以上のことを踏まえると、THIF-1KOにおける肝障害の増悪はAPAP代謝による初期障害や以降の肝再生の遅延によるものではなく、12時間以降のステージにおける肝臓でのCXCL1およびCXCL2の発現誘導を介した好中球浸潤が直接的な原因であると考えられる。

IL-17Aは主にT細胞から分泌される炎症性サイトカインであり、骨髄における好中球の分化や組織への好中球の浸潤を誘導する。マウスにおけるIL-17A欠損は健常時は特に影響は無いが、放射線による骨髄破壊後の造血細胞の増殖能の低下や感染症に対する脆弱性を示す[38, 170]。T細胞から分泌されたIL-17AはGranulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)を介したGranulopoiesisにも関与することが示されている[33]。本研究のTHIF-1KOではAPAP投与前でもWTと比較してIL-17A血中レベルが有意差はつかないまでも若干高い傾向を示したが、肝臓の好中球数には影響は認められなかった。従って、THIF-1KOにおける肝障害の増悪はGranulopoiesisの亢進によるものではないと考えられる。また、IL-17Aは血管内皮細胞やマクロファージなどに働きかけてCXCL1とCXCL2の発現を強力に誘導し、AILIモデルにおいても好中球浸潤を引き起こすことが示されている[87, 138]。過去の研究では、APAP投与により血清IL-17Aレベルが増加することが示されてきた[110, 179]。一方、この結果に反して本研究の実験モデルでは、APAP投与後にWTの血清IL-17Aレベルの上昇は認められなかった。APAP投与後6時間のごく限られた時間帯でのみIL-17Aレベルの上昇が認められることが報告されていることから、0時間から12時間の間でIL-17Aレベルが一時的に上昇している可能性が考えられる。ただし、IL-17A中和抗体投与を行ってもWTの肝臓の好中球数と肝障害に変化が認められなかったことから、WTにおけるCXCL1およびCXCL2の発現上昇および好中球浸潤はTNF- α やOPNなどのIL-17A以外の因子によって誘導されていると考えられる。既報の結果との乖離の原因は定かではないが、本研究よりも多少高用量のAPAPを投与していることやマウスの遺伝的背景や飼育状況の違いが影響しているのではないかと考えられる。一方、APAP投与後24時間において、THIF-1KOでは顕著な血清IL-17Aレベルの上昇が認められた。さらに、IL-17A中和抗体投与によってTHIF-1KOの肝臓の好中球浸潤および血清ALT活性がWTと同程度まで低下することもわかった。これらの結果は、肝臓の好中球浸潤はIL-17A分泌がある閾値を上回ると誘導されて肝障害の直接的な原因となりうることを示している。IFN- γ も主にT細胞によって分泌されるサイトカインであり、AILIモデルではマクロファージと好中球の浸潤を引き起こすことが示唆されている[85]。

THIF-1KO では IFN- γ についても APAP 投与後 24 時間で顕著な血清レベルの増加が認められた。しかしながら、THIF-1KO においては好中球の浸潤のみが顕著に上昇し、マクロファージの細胞数に関しては両群間で有意差は認められなかった。また、肝臓における IFN- γ の遺伝子発現と肝臓 T 細胞による IFN- γ 産生能も WT と THIF-1KO で同程度であった。線維芽細胞において IFN- γ が CXCL1 と CXCL2 の発現を抑制することを考慮すると、IFN- γ はマクロファージなどの他の細胞の活性を制御することでマクロファージや好中球の浸潤を制御していると考えられる。しかしながら、少なくとも肝臓における M1 マクロファージマーカーの発現は両群間で変化しなかった。IL-17A と IFN- γ に加えて、Con-A 誘導性肝炎において NKT 細胞による OPN 分泌が好中球浸潤を引き起こすことが報告されている[46]。OPN についても THIF-1KO で血清レベルの上昇が認められたが、両群間で肝臓の遺伝子発現に有意差は認められなかった。また、予備検討において、APAP 投与後 24 時間の THIF-1KO の肝臓 NKT 細胞による OPN 産生は確認されなかった。以上のことを考慮すると、IFN- γ と OPN の血清レベルの上昇は THIF-1KO の肝臓からの分泌が原因ではなく肝障害の増悪によって引き起こされた二次的な現象であり、肝臓への好中球浸潤と肝障害には直接的には関与しない可能性が高い。すなわち、重篤な AILI の合併症として肺や腎臓で炎症が誘導されるが、肝臓以外の臓器で二次的に活性化した免疫細胞が IFN- γ と OPN を分泌している可能性が考えられる。THIF-1KO における肝障害の増悪は、IL-17A 分泌依存的な CXCL1 と CXCL2 の発現上昇による好中球浸潤の増加が原因であることが明らかになった。

IL-17A は発見された当初は Th17 により分泌されると考えられてきたが、現在では $\gamma\delta$ T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞などの自然免疫様細胞からも分泌されることがわかってきた。AILI モデルにおける IL-17A 分泌細胞は Th17 や NKT 細胞以外の早期応答性 T 細胞であることが示唆されていたが、近年、 $\gamma\delta$ T 細胞が主要な IL-17A 分泌細胞であることが明らかとなった[179]。本研究の実験モデルにおいて、APAP 投与後 24 時間の肝臓では $\gamma\delta$ T 細胞と NKT 細胞を含むその他の T 細胞の IL-17A 産生細胞数は同程度であることがわかった。一方、IL-17A 陽性細胞で MFI 解析を行うと、その他の T 細胞より $\gamma\delta$ T 細胞の方が IL-17A 産生能が高いことが示された。このことは AILI モデルにおける主要な IL-17A 産生細胞が $\gamma\delta$ T 細胞であるという過去の報告を支持している。しかし、WT における IL-17A 産生は実際には血清 IL-17A レベルや好中球浸潤には影響しなかった。THIF-1KO に関しては、その他の IL-17A 陽性 T 細胞の細胞数は WT と同程度であったが、IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞は WT よりも顕著に増加することが明らかになった。IL-17A 陽性細胞の MFI は WT と THIF-1KO で同程度であったことから、HIF-1 は $\gamma\delta$ T 細胞の IL-17A の産生能には影響しないことがわかる。一方、肝臓中の $\gamma\delta$ T 細胞の動態を経時的に解析した結果、APAP 投与後 24 時間において THIF-1KO の $\gamma\delta$ T 細胞の細胞数が WT よりも顕著に増加することがわかった。これらの結果より、THIF-1KO の肝臓中の主要な IL-17A 産生細胞は $\gamma\delta$ T 細胞であることと、HIF-1 α 欠損による IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の増加は肝臓への $\gamma\delta$ T 細胞浸潤の増加が原因であることが示された。

これまで、T 細胞の HIF-1 の機能は Th17/Treg バランスを中心に解析が行われ、HIF-1 は Th17/Treg バランスを病態依存的に制御することが報告されてきた。我々はマウスの DSS 腸炎モデルにおいて Treg の HIF-1 が腸炎に対して保護的に働くことを示した[75]。これらの研究における表現型は DSS 投与直後には認められないが 1 週間程度で現れることから、HIF-1 は CD4⁺ T 細胞の Treg への分化に影響しているの

はないかと推察される。一方, Treg には胎生期に分化する nTreg が存在しするため HIF-1 が nTreg の機能を調節している可能性も考えられる。また, Treg は皮膚炎モデルにおいて好中球浸潤を抑制し, 機能的な Treg の欠損により $\gamma\delta$ T 細胞の活性化を介した腸炎の増悪が引き起こされることも報告されている[154]。従って, 急性モデルにおける nTreg を介した好中球応答の制御に関しても考慮する必要がある。本研究の AILI モデルでは, T 細胞の HIF-1 α 欠損により APAP 投与後 24 時間で Treg の細胞数の減少とアポトーシス細胞の増加が認められた。しかしながら, WT および THIF-1KO の Treg を THIF-1KO に投与する実験を行ったが両群間で肝障害に差は認められなかった。従って, THIF-1KO の肝臓で認められた $\gamma\delta$ T 細胞の浸潤増加は Treg の HIF-1 α 欠損による間接的な影響ではなく, HIF-1 が $\gamma\delta$ T 細胞の遊走能を直接的に抑制することで肝臓への浸潤を阻害している可能性が示された。

特定の免疫細胞種が炎症部位に適切な時期に適切な細胞数が遊走することは, 免疫応答が適切に収束へ向かう上で非常に重要である。今回, 本研究は HIF-1 が $\gamma\delta$ T 細胞の遊走能を抑制することを明らかにした。この結果と一致して, 間葉系幹細胞と血管内皮細胞において, HIF-1 が細胞遊走を阻害することが報告されている[150, 182]。一方, 癌細胞とマクロファージでは HIF-1 が細胞遊走をむしろ促進することも多数報告されている。それでは, 細胞種による HIF-1 の作用の違いは何に起因するのであろうか。細胞遊走では, アクチンフィラメントと微小管の再構成, および, Stress fiber の収縮や細胞内小器官の移動などの過程で大量の ATP 消費を伴う。HIF-1 は解糖系酵素や PDKs の発現亢進によって低酸素環境におかれた細胞の解糖系依存的な ATP 合成を促進する。解糖系代謝に依存するマクロファージや好中球では, HIF-1 α の欠損は通常酸素下においても細胞内 ATP 量を激減させる[36, 162]。また, T 細胞も活性化すると解糖系依存的な代謝へとスイッチすることが知られている[175]。しかしながら, 解糖系への依存度が大きいマクロファージや好中球と異なり, T 細胞はミトコンドリア代謝にも依存することがメタボローム解析によって明らかにされている。T 細胞におけるミトコンドリア代謝は, T 細胞の活性化と免疫機能において重要な役割を果たす。T 細胞は APC から抗原提示を受ける際, APC との接合面 (Immunological synapse) にミトコンドリアが集積することが知られている[56]。集積したミトコンドリアは TCR 刺激により生じた IP₃ により小胞体から放出された Ca²⁺を取り込み, Ca²⁺は PDH, Isocitrate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase を活性化することで Tricarboxylic acid (TCA) 回路と酸化的リン酸化を介した ATP 合成を促進する。ATP 合成が促進される生化学的意義は明確にされていないが, *in vitro* において naïve T 細胞に活性化刺激を与えると同時に Oligomycin 処理を行うと T 細胞は活性化およびクローン増殖を起さない[24]。さらに, T 細胞の細胞遊走においてもミトコンドリアによる ATP 合成は非常に重要である。一般的に, 遊走細胞は極性化した構造を取り, 遊走する方向に Filopodia と呼ばれる突起を形成し, 遊走する方向とは逆側に uropod と呼ばれる構造を形成する[158]。Filopodia では Actin filament が伸びることで細胞を前方方向に押し進め, Uropod では Stress fiber が収縮することで後方の構造が前方に引っ張られることで細胞全体が移動する。Jurkat T 細胞では細胞遊走の際に Uropod にミトコンドリアの集積が観察され, Oligomycin 処理によって細胞遊走が抑制される[19]。このことは, Uropod におけるミトコンドリアの ATP 合成が T 細胞の細胞遊走に必須であることを示している。本研究では, $\gamma\delta$ T 細胞以外のコントロールの T 細胞は Oligomycin 処理により細胞遊走が抑制されたが, コントロールの $\gamma\delta$ T 細胞では

Oligomycin 処理は細胞遊走に影響を与えなかった。この結果は、 $\gamma\delta$ T 細胞はその他の T 細胞に比べて解糖系への依存度が大きいことを示唆している。実際、 $\gamma\delta$ T 細胞は古典的 T 細胞と異なり前活性化状態にあり、naïve T 細胞よりもエフェクター T 細胞に近い活性化状態にある[177]。そのため、活性化刺激が無い状態でもエフェクター T 細胞と同様に解糖系に依存した代謝様式を持つ可能性が考えられる。一方、HIF-1 α 欠損 $\gamma\delta$ T 細胞はコントロールの $\gamma\delta$ T 細胞よりも遊走能が顕著に高く、Oligomycin 処理により遊走能はコントロールの $\gamma\delta$ T 細胞と同程度まで低下した。この結果は、 $\gamma\delta$ T 細胞では HIF-1 がミトコンドリア量を低下させている可能性があること、または、 $\gamma\delta$ T 細胞は本質的にはミトコンドリア代謝を行う能力があるが HIF-1 がそれを阻害している可能性があることを示している。実際、前者に関連して、HIF-1 は c-Myc の阻害を介して下流遺伝子の PGC-1 β の発現を低下させ、ミトコンドリア合成を抑制することが報告されている[190]。しかしながら、 $\gamma\delta$ T 細胞のミトコンドリア量に対する HIF-1 の影響は認められなかった。従って、 $\gamma\delta$ T 細胞の HIF-1 はミトコンドリアへの代謝物の流入を抑制して解糖系依存的な代謝を促進することで、 $\gamma\delta$ T 細胞の細胞遊走を抑制している可能性が高いと考えられる。以上により、HIF-1 は $\gamma\delta$ T 細胞の細胞遊走を選択的に抑制することで APAP による肝障害に対して保護的に働くことが明らかとなった。

TCR 刺激を受けて活性化した T 細胞のケモカインに対する遊走能は、受容体の発現調節によって制御されることが知られている。抗 CD3 抗体で 24 時間刺激を受けた T 細胞ではリンパ節へのホーミング受容体である CCR7 の発現が上昇する一方、組織へのホーミング受容体である CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR6, CXCR3 および CXCR4 の発現が低下する[144, 157]。また、抗 CD3 抗体で刺激は CXCR4 のリガンドである CXCL12 に対する遊走能を低下させることも報告されている[44]。組織へのホーミング受容体の発現が低下する一方でリンパ節へのホーミング受容体の発現が上昇することから、活性化を受けた naïve T 細胞がリンパ節で持続的な TCR 刺激を受けてクローン増殖し適切な免疫応答を誘導する上で重要な意義があるのではないかと考えられる。本研究では、肝障害に応じて活性化した $\gamma\delta$ T 細胞の遊走が HIF-1 によって阻害されることを新たに見出した。このシステムは、古典的 T 細胞などにおいて、TCR 刺激を介した HIF-1 α 発現により T 細胞をリンパ節に止める上で重要な役割を果たしている可能性がある。一方、 $\gamma\delta$ T 細胞では HIF-1 α がどのように発現制御されているか定かではないが、刺激から活性化までの期間が非常に短い $\gamma\delta$ T 細胞では過剰な炎症応答を防ぐ一種の安全装置として作用しているのではないかと考えられる。すなわち、HIF-1 による $\gamma\delta$ T 細胞の遊走能の阻害は、急性炎症において炎症部位への過剰な $\gamma\delta$ T 細胞の集積を抑制することで組織障害を防ぐ役割があると考えられる。

本研究により、AILI において、HIF-1 は $\gamma\delta$ T 細胞の肝臓への集積を抑制することで好中球依存的な急性肝障害に対して保護的に作用することを明らかになった (図 4.1)。このことは、HIF-1 の活性化が AILI を含めた $\gamma\delta$ T 細胞依存的な急性炎症を抑制できる可能性を示している。また、腫瘍などにおける低酸素状態は免疫細胞の機能を抑制する。近年、 $\gamma\delta$ T 細胞や NKT 細胞による癌免疫療法が注目されているが、内在性 T 細胞および投与 T 細胞の HIF-1 を抑制することで腫瘍への効率的な T 細胞の動員を行える可能性も考えられる。今後、 $\gamma\delta$ T 細胞の細胞遊走における HIF-1 の機能がさらに詳細に解析されることで、 $\gamma\delta$ T 細胞の細胞遊走やその下流の好中球浸潤を薬剤標的とした新規治療法が開発されることが期待される。

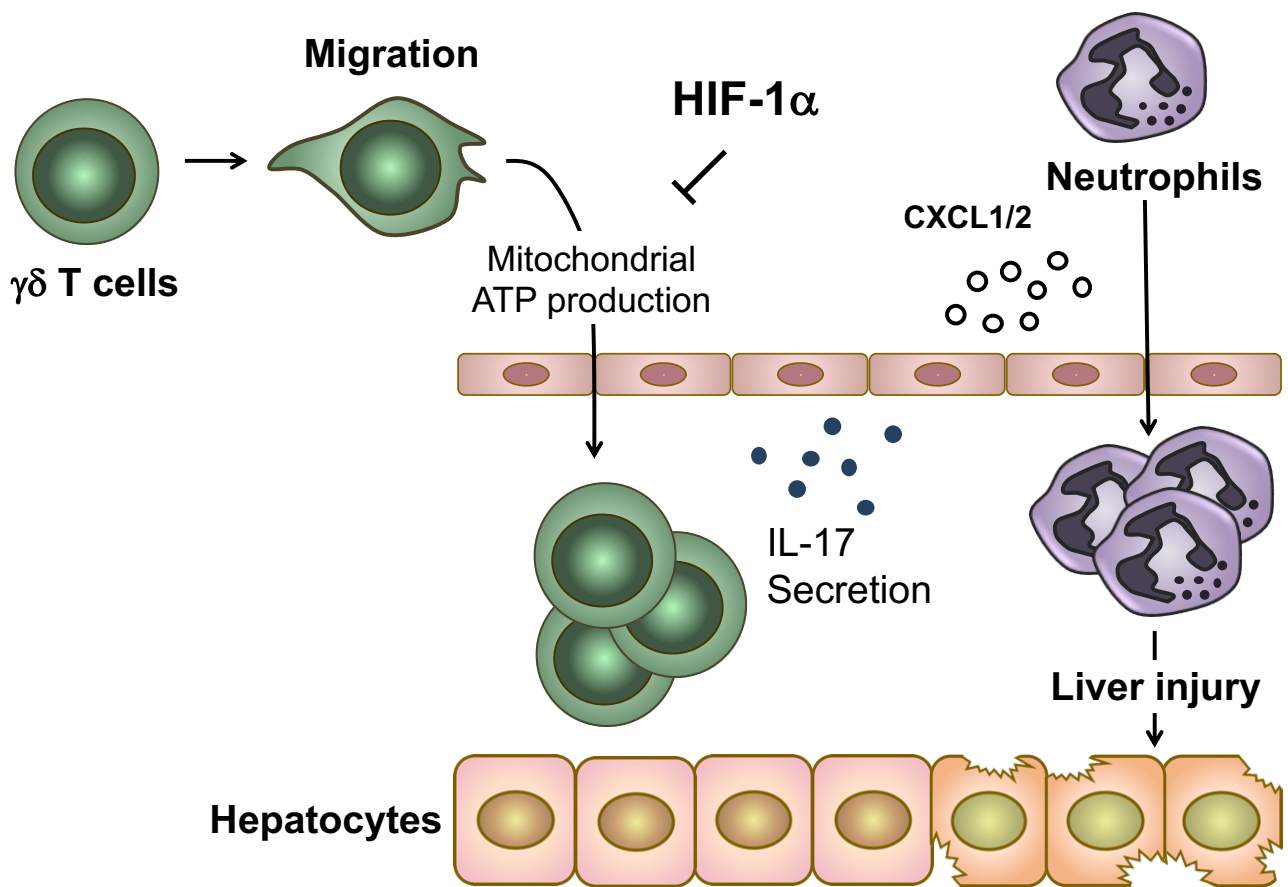


図 4.1 本研究で明らかとなった AILI における $\gamma\delta$ T 細胞の HIF-1 の機能

$\gamma\delta$ T 細胞の HIF-1 α の欠損により、肝臓へ浸潤した $\gamma\delta$ T 細胞による IL-17A 分泌を介した好中球炎症による肝障害が誘導される。また、HIF-1 α は $\gamma\delta$ T 細胞のミトコンドリア依存的な ATP 産生を抑制することで $\gamma\delta$ T 細胞の遊走能を阻害する可能性が示された。図 4.1 は Suzuki *et al.*, *Hepatol Commun.*, 2018; 2 (5); 571-581 の Fig. 6 から引用。

5. 参考文献

- [1] Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Paediatr Anaesth* 2008;18(10): 915-921.
- [2] Apte UM, Banerjee A, McRee R, Wellberg E, Ramaiah SK. Role of osteopontin in hepatic neutrophil infiltration during alcoholic steatohepatitis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207(1): 25-38.
- [3] Aydintug MK, Zhang L, Wang C, Liang D, Wands JM, Michels AW, et al. gammadelta T cells recognize the insulin B:9-23 peptide antigen when it is dimerized through thiol oxidation. *Mol Immunol* 2014;60(2): 116-128.
- [4] Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(5): G1188-1195.
- [5] Banerjee A, Apte UM, Smith R, Ramaiah SK. Higher neutrophil infiltration mediated by osteopontin is a likely contributing factor to the increased susceptibility of females to alcoholic liver disease. *J Pathol* 2006;208(4): 473-485.
- [6] Banerjee A, Burghardt RC, Johnson GA, White FJ, Ramaiah SK. The temporal expression of osteopontin (SPP-1) in the rodent model of alcoholic steatohepatitis: a potential biomarker. *Toxicol Pathol* 2006;34(4): 373-384.
- [7] Bautista AP. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002;27(1): 17-21.
- [8] Bautista AP, Spitzer JJ. Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. *Free Radic Res Commun* 1992;17(3): 195-209.
- [9] Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997;277(5329): 1094-1097.
- [10] Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, Lam JC, Ditsworth D, Keith B, et al. HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(34): 14391-14396.
- [11] Bilzer M, Lauterburg BH. Effects of hypochlorous acid and chloramines on vascular resistance, cell integrity, and biliary glutathione disulfide in the perfused rat liver: modulation by glutathione. *J Hepatol* 1991;13(1): 84-89.
- [12] Bird L. NKT cells: NKT cells join the IL-17 gang. *Nat Rev Immunol* 2008;8(5): 324.
- [13] Blazka ME, Elwell MR, Holladay SD, Wilson RE, Luster MI. Histopathology of acetaminophen-induced liver changes: role of interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha. *Toxicol Pathol* 1996;24(2): 181-189.
- [14] Blouin CC, Page EL, Soucy GM, Richard DE. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* 2004;103(3): 1124-1130.
- [15] Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 2010;10(7): 467-478.
- [16] Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 2013;13(4): 257-269.
- [17] Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1997;27(8): 1848-1852.
- [18] Buelens C, Willems F, Delvaux A, Pierard G, Delville JP, Velu T, et al. Interleukin-10 differentially regulates

B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 1995;25(9): 2668-2672.

[19] Campello S, Lacalle RA, Bettella M, Manes S, Scorrano L, Viola A. Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *J Exp Med* 2006;203(13): 2879-2886.

[20] Cao Z, Dhupar R, Cai C, Li P, Billiar TR, Geller DA. A critical role for IFN regulatory factor 1 in NKT cell-mediated liver injury induced by alpha-galactosylceramide. *J Immunol* 2010;185(4): 2536-2543.

[21] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003;197(4): 403-411.

[22] Carney EF. Acute kidney injury: Targeting Treg cells to protect the kidney. *Nat Rev Nephrol* 2017;13(8): 444.

[23] Chambers JW, LoGrasso PV. Mitochondrial c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling initiates physiological changes resulting in amplification of reactive oxygen species generation. *J Biol Chem* 2011;286(18): 16052-16062.

[24] Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Jr., Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 2013;153(6): 1239-1251.

[25] Chaudhuri S, McCullough SS, Hennings L, Letzig L, Simpson PM, Hinson JA, et al. Acetaminophen hepatotoxicity and HIF-1alpha induction in acetaminophen toxicity in mice occurs without hypoxia. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;252(3): 211-220.

[26] Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198(12): 1875-1886.

[27] Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol* 1996;14: 511-532.

[28] Chien YH, Meyer C, Bonneville M. gammadelta T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol* 2014;32: 121-155.

[29] Chiu H, Gardner CR, Dambach DM, Brittingham JA, Durham SK, Laskin JD, et al. Role of p55 tumor necrosis factor receptor 1 in acetaminophen-induced antioxidant defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(5): G959-966.

[30] Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ, Jaeschke H. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1): G1195-1200.

[31] Chougnet C. Role of CD40 ligand dysregulation in HIV-associated dysfunction of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 2003;74(5): 702-709.

[32] Clambey ET, McNamee EN, Westrich JA, Glover LE, Campbell EL, Jedlicka P, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(41): E2784-2793.

[33] Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 2015;522(7556): 345-348.

- [34] Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7(5): 281-287.
- [35] Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996;23(3): 506-514.
- [36] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003;112(5): 645-657.
- [37] Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(48): 18154-18159.
- [38] Cypowyj S, Picard C, Marodi L, Casanova JL, Puel A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol* 2012;42(9): 2246-2254.
- [39] Dambach DM, Watson LM, Gray KR, Durham SK, Laskin DL. Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 2002;35(5): 1093-1103.
- [40] Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011;146(5): 772-784.
- [41] Dar AA, Patil RS, Chiplunkar SV. Insights into the Relationship between Toll Like Receptors and Gamma Delta T Cell Responses. *Front Immunol* 2014;5: 366.
- [42] Darmoise A, Teneberg S, Bouzonville L, Brady RO, Beck M, Kaufmann SH, et al. Lysosomal alpha-galactosidase controls the generation of self lipid antigens for natural killer T cells. *Immunity* 2010;33(2): 216-228.
- [43] Dashtsoodol N, Watarai H, Sakata S, Taniguchi M. Identification of CD4(-)CD8(-) double-negative natural killer T cell precursors in the thymus. *PLoS One* 2008;3(11): e3688.
- [44] Day CE, Guillen C, Willars GB, Wardlaw AJ. Characterization of the migration of lung and blood T cells in response CXCL12 in a three-dimensional matrix. *Immunology* 2010;130(4): 564-571.
- [45] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204(6): 1257-1265.
- [46] Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, et al. Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 2004;21(4): 539-550.
- [47] Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193(11): 1303-1310.
- [48] Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 1993;151(3): 1224-1234.
- [49] Doedens AL, Phan AT, Stradner MH, Fujimoto JK, Nguyen JV, Yang E, et al. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol* 2013;14(11): 1173-1182.
- [50] Downs I, Aw TY, Liu J, Adegboyega P, Ajuebor MN. Valpha14iNKT cell deficiency prevents acetaminophen-induced acute liver failure by enhancing hepatic glutathione and altering APAP metabolism. *Biochem*

Biophys Res Commun 2012;428(2): 245-251.

- [51] Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, et al. Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity* 2005;22(6): 705-716.
- [52] Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011;364(7): 656-665.
- [53] Essani NA, Fisher MA, Farhood A, Manning AM, Smith CW, Jaeschke H. Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. *Hepatology* 1995;21(6): 1632-1639.
- [54] Fisher JE, McKenzie TJ, Lillegard JB, Yu Y, Juskewitch JE, Nedredal GI, et al. Role of Kupffer cells and toll-like receptor 4 in acetaminophen-induced acute liver failure. *J Surg Res* 2013;180(1): 147-155.
- [55] Fitzpatrick SF, Tambuwala MM, Bruning U, Schaible B, Scholz CC, Byrne A, et al. An intact canonical NF-kappaB pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia. *J Immunol* 2011;186(2): 1091-1096.
- [56] Fracchia KM, Pai CY, Walsh CM. Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling. *Front Immunol* 2013;4: 324.
- [57] Garibaldi BT, D'Alessio FR, Mock JR, Files DC, Chau E, Eto Y, et al. Regulatory T cells reduce acute lung injury fibroproliferation by decreasing fibrocyte recruitment. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;48(1): 35-43.
- [58] Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007;445(7129): 771-775.
- [59] Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002;2(5): 309-322.
- [60] Ghanem CI, Perez MJ, Manautou JE, Mottino AD. Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacol Res* 2016;109: 119-131.
- [61] Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005;174(4): 1783-1786.
- [62] Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* 2007;12(2): 108-113.
- [63] Gort EH, Groot AJ, Derks van de Ven TL, van der Groep P, Verlaan I, van Laar T, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression requires PI 3-kinase activity and correlates with Akt1 phosphorylation in invasive breast carcinomas. *Oncogene* 2006;25(45): 6123-6127.
- [64] Green GA. Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2. *Clin Cornerstone* 2001;3(5): 50-60.
- [65] Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004;21(4): 589-601.
- [66] Gujral JS, Hinson JA, Farhood A, Jaeschke H. NADPH oxidase-derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287(1): G243-252.
- [67] Haase VH. Inflammation and hypoxia in the kidney: friends or foes? *Kidney Int* 2015;88(2): 213-215.

- [68] Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev* 2013;27(1): 41-53.
- [69] Hammerich L, Bangen JM, Govaere O, Zimmermann HW, Gassler N, Huss S, et al. Chemokine receptor CCR6-dependent accumulation of gammadelta T cells in injured liver restricts hepatic inflammation and fibrosis. *Hepatology* 2014;59(2): 630-642.
- [70] Hammerich L, Tacke F. Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;5(2): 107-113.
- [71] Hampl J, Schild H, Litzberger C, Baron M, Crowley MP, Chien YH. The specificity of a weak gamma delta TCR interaction can be modulated by the glycosylation of the ligand. *J Immunol* 1999;163(1): 288-294.
- [72] Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem* 2008;283(20): 13565-13577.
- [73] Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000;18: 975-1026.
- [74] Hayworth JL, Mazzuca DM, Maleki Vareki S, Welch I, McCormick JK, Haeryfar SM. CD1d-independent activation of mouse and human iNKT cells by bacterial superantigens. *Immunol Cell Biol* 2012;90(7): 699-709.
- [75] Higashiyama M, Hokari R, Hozumi H, Kurihara C, Ueda T, Watanabe C, et al. HIF-1 in T cells ameliorated dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *J Leukoc Biol* 2012;91(6): 901-909.
- [76] Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol* 2010(196): 369-405.
- [77] Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhauser ML, Matsukawa A, Gosling J, Boring L, et al. Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor 2. *Am J Pathol* 2000;156(4): 1245-1252.
- [78] Hogestatt ED, Jonsson BA, Ermund A, Andersson DA, Bjork H, Alexander JP, et al. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem* 2005;280(36): 31405-31412.
- [79] Holt MP, Cheng L, Ju C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *J Leukoc Biol* 2008;84(6): 1410-1421.
- [80] Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23(24): 9361-9374.
- [81] Huebener P, Pradere JP, Hernandez C, Gwak GY, Caviglia JM, Mu X, et al. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. *J Clin Invest* 2015;125(2): 539-550.
- [82] Ikejiri A, Nagai S, Goda N, Kurebayashi Y, Osada-Oka M, Takubo K, et al. Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations. *Int Immunol* 2012;24(3): 137-146.
- [83] Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, et al. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* 2010;120(8):

2699-2714.

- [84] Ishida Y, Kondo T, Kimura A, Tsuneyama K, Takayasu T, Mukaida N. Opposite roles of neutrophils and macrophages in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *Eur J Immunol* 2006;36(4): 1028-1038.
- [85] Ishida Y, Kondo T, Ohshima T, Fujiwara H, Iwakura Y, Mukaida N. A pivotal involvement of IFN-gamma in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *Faseb J* 2002;16(10): 1227-1236.
- [86] Ishida Y, Kondo T, Tsuneyama K, Lu P, Takayasu T, Mukaida N. The pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55 in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Leukoc Biol* 2004;75(1): 59-67.
- [87] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 2011;34(2): 149-162.
- [88] Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(6): G1083-1088.
- [89] Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(1): G15-26.
- [90] Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism. *Am J Physiol* 1991;261(6 Pt 1): G1051-1056.
- [91] Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *Faseb J* 1990;4(15): 3355-3359.
- [92] Jaeschke H, Ho YS, Fisher MA, Lawson JA, Farhood A. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* 1999;29(2): 443-450.
- [93] James LP, McCullough SS, Knight TR, Jaeschke H, Hinson JA. Acetaminophen toxicity in mice lacking NADPH oxidase activity: role of peroxynitrite formation and mitochondrial oxidant stress. *Free Radic Res* 2003;37(12): 1289-1297.
- [94] Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001;12(7): 363-369.
- [95] Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettgenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001;193(11): 1285-1294.
- [96] Ju C, Reilly TP, Bourdi M, Radonovich MF, Brady JN, George JW, et al. Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem Res Toxicol* 2002;15(12): 1504-1513.
- [97] Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008;30(4): 393-402.
- [98] Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997;278(5343): 1626-1629.

- [99] Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* 2015;25(7): 771-784.
- [100] Kim JH, Kim HS, Kim HY, Oh SJ, Chung DH. Direct engagement of TLR4 in invariant NKT cells regulates immune diseases by differential IL-4 and IFN-gamma production in mice. *PLoS One* 2012;7(9): e45348.
- [101] Krenkel O, Mossanen JC, Tacke F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3(6): 331-343.
- [102] Laffman-Johnson E. FDA limits acetaminophen in prescription combination products. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(4): 476-476.
- [103] Land SC, Tee AR. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem* 2007;282(28): 20534-20543.
- [104] Larsen FS, Wendon J. Understanding paracetamol-induced liver failure. *Intensive Care Med* 2014;40(6): 888-890.
- [105] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007;26(3): 371-381.
- [106] Lee SH, Jee JG, Bae JS, Liu KH, Lee YM. A group of novel HIF-1alpha inhibitors, glyceollins, blocks HIF-1alpha synthesis and decreases its stability via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway and Hsp90 binding. *J Cell Physiol* 2015;230(4): 853-862.
- [107] Lee WM. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 2004;40(1): 6-9.
- [108] Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG, Miller FN, Edwards MJ. Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and Kupffer cells. *Hepatology* 1998;27(2): 507-512.
- [109] Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchorzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol* 2006;177(10): 7155-7163.
- [110] Li J, Zhu X, Liu F, Cai P, Sanders C, Lee WM, et al. Cytokine and autoantibody patterns in acute liver failure. *J Immunotoxicol* 2010;7(3): 157-164.
- [111] Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006;25(3): 455-471.
- [112] Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008;180(9): 5916-5926.
- [113] Liao CC, Day YJ, Lee HC, Liou JT, Chou AH, Liu FC. Baicalin Attenuates IL-17-Mediated Acetaminophen-Induced Liver Injury in a Mouse Model. *PLoS One* 2016;11(11): e0166856.
- [114] Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* 2007;8(4): 359-368.
- [115] Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for

the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991;174(3): 561-569.

- [116] Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2008;9(6): 632-640.
- [117] Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 2006;43(6): 1220-1230.
- [118] Maher JJ, Scott MK, Saito JM, Burton MC. Adenovirus-mediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induces a neutrophilic hepatitis. *Hepatology* 1997;25(3): 624-630.
- [119] Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 2010;40(2): 294-309.
- [120] Martin-Murphy BV, Kominsky DJ, Orlicky DJ, Donohue TM, Jr., Ju C. Increased susceptibility of natural killer T-cell-deficient mice to acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 2013;57(4): 1575-1584.
- [121] Minami K, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Shinohara N, Harabayashi T, Nonomura K, et al. Negative feedback regulation of T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions. *Blood* 2005;106(5): 1685-1693.
- [122] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11(10): 763-776.
- [123] Miyamoto S, Kimball SR, Safer B. Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1494(1-2): 28-42.
- [124] Mohar I, Stamper BD, Rademacher PM, White CC, Nelson SD, Kavanagh TJ. Acetaminophen-induced liver damage in mice is associated with gender-specific adduction of peroxiredoxin-6. *Redox Biol* 2014;2: 377-387.
- [125] Morse HN. Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. *Ber Deutscher Chem Ges* 1878;11(1): 232-233.
- [126] Mossanen JC, Krenkel O, Ergen C, Govaere O, Liepelt A, Puengel T, et al. Chemokine (C-C motif) receptor 2-positive monocytes aggravate the early phase of acetaminophen-induced acute liver injury. *Hepatology* 2016;64(5): 1667-1682.
- [127] Nagarajan NA, Kronenberg M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2007;178(5): 2706-2713.
- [128] Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 2004;172(2): 834-842.
- [129] Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001;194(5): 629-644.
- [130] Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology* 2012;55(2): 622-633.
- [131] Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, et al. Human CD4(+)/CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001;98(9): 2736-2744.

- [132] Niehorster M, Tiegs G, Schade UF, Wendel A. In vivo evidence for protease-catalysed mechanism providing bioactive tumor necrosis factor alpha. *Biochem Pharmacol* 1990;40(7): 1601-1603.
- [133] Nishi K, Oda T, Takabuchi S, Oda S, Fukuda K, Adachi T, et al. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(5): 983-995.
- [134] Numata K, Kubo M, Watanabe H, Takagi K, Mizuta H, Okada S, et al. Overexpression of suppressor of cytokine signaling-3 in T cells exacerbates acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Immunol* 2007;178(6): 3777-3785.
- [135] Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* 2010;32(2): 95-106.
- [136] Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(35): 13132-13137.
- [137] Okeke EB, Okwor I, Mou Z, Jia P, Uzonna JE. CD4+CD25+ regulatory T cells attenuate lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory responses and promotes survival in murine *Escherichia coli* infection. *Shock* 2013;40(1): 65-73.
- [138] Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010;129(3): 311-321.
- [139] The WHO Expert Committee. WHO Model List of Essential Medicines. 20 ed: Genève: The WHO Expert Committee; 2017. p. 1-58.
- [140] Pacholczyk R, Kern J. The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology* 2008;125(4): 450-458.
- [141] Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 2014;41(4): 518-528.
- [142] Palmer CS, Ostrowski M, Balderson B, Christian N, Crowe SM. Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. *Front Immunol* 2015;6: 1.
- [143] Patil RS, Bhat SA, Dar AA, Chiplunkar SV. The Jekyll and Hyde story of IL17-Producing gammadeltaT Cells. *Front Immunol* 2015;6: 37.
- [144] Peacock JW, Jirik FR. TCR activation inhibits chemotaxis toward stromal cell-derived factor-1: evidence for reciprocal regulation between CXCR4 and the TCR. *J Immunol* 1999;162(1): 215-223.
- [145] Peyssonnaud C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol* 2007;178(12): 7516-7519.
- [146] Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, et al. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 2005;115(7): 1806-1815.
- [147] Prescott LF, Park J, Ballantyne A, Adriaenssens P, Proudfoot AT. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet* 1977;2(8035): 432-434.

- [148] Prinz I, Sansoni A, Kissenpfennig A, Ardouin L, Malissen M, Malissen B. Visualization of the earliest steps of gammadelta T cell development in the adult thymus. *Nat Immunol* 2006;7(9): 995-1003.
- [149] Qin HY, Mukherjee R, Lee-Chan E, Ewen C, Bleackley RC, Singh B. A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int Immunol* 2006;18(7): 1001-1015.
- [150] Raheja LF, Genetos DC, Wong A, Yellowley CE. Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1alpha. *Cell Biol Int* 2011;35(10): 981-989.
- [151] Ramachandran A, McGill MR, Xie Y, Ni HM, Ding WX, Jaeschke H. Receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *Hepatology* 2013;58(6): 2099-2108.
- [152] Rao R, Graffeo CS, Gulati R, Jamal M, Narayan S, Zambirinis CP, et al. Interleukin 17-producing gammadeltaT cells promote hepatic regeneration in mice. *Gastroenterology* 2014;147(2): 473-484 e472.
- [153] Reinwald S, Wiethe C, Westendorf AM, Breloer M, Probst-Kepper M, Fleischer B, et al. CD83 expression in CD4+ T cells modulates inflammation and autoimmunity. *J Immunol* 2008;180(9): 5890-5897.
- [154] Richards H, Williams A, Jones E, Hindley J, Godkin A, Simon AK, et al. Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology* 2010;131(4): 583-592.
- [155] Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 2008;453(7196): 807-811.
- [156] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133(5): 775-787.
- [157] Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, Hoy A, Ponath P, Qin S, et al. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol* 1999;29(6): 2037-2045.
- [158] Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* 1999;18(3): 501-511.
- [159] Schlayer HJ, Laaff H, Peters T, Woort-Menker M, Estler HC, Karck U, et al. Involvement of tumor necrosis factor in endotoxin-triggered neutrophil adherence to sinusoidal endothelial cells of mouse liver and its modulation in acute phase. *J Hepatol* 1988;7(2): 239-249.
- [160] Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *Faseb J* 2012;26(6): 2253-2276.
- [161] Schwartzberg PL, Finkelstein LD, Readinger JA. TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005;5(4): 284-295.
- [162] Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, et al. HIF-1alpha-PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nat Commun* 2016;7: 11635.
- [163] Shehade H, Acolty V, Moser M, Oldenhove G. Cutting Edge: Hypoxia-Inducible Factor 1 Negatively Regulates Th1 Function. *J Immunol* 2015;195(4): 1372-1376.
- [164] Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway

- orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med* 2011;208(7): 1367-1376.
- [165] Shibata K, Yamada H, Nakamura M, Hatano S, Katsuragi Y, Kominami R, et al. IFN-gamma-producing and IL-17-producing gammadelta T cells differentiate at distinct developmental stages in murine fetal thymus. *J Immunol* 2014;192(5): 2210-2218.
- [166] Simon MC. Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3(3): 150-151.
- [167] Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009;31(2): 331-341.
- [168] Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001;31(4): 1122-1131.
- [169] Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, et al. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev* 2010;24(5): 491-501.
- [170] Tan W, Huang W, Zhong Q, Schwarzenberger P. IL-17 receptor knockout mice have enhanced myelotoxicity and impaired hemopoietic recovery following gamma irradiation. *J Immunol* 2006;176(10): 6186-6193.
- [171] Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* 2013;496(7444): 238-242.
- [172] Taylor A, Verhagen J, Akkoc T, Wenig R, Flory E, Blaser K, et al. IL-10 suppresses CD2-mediated T cell activation via SHP-1. *Mol Immunol* 2009;46(4): 622-629.
- [173] Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6(12): 883-894.
- [174] Unwith S, Zhao H, Hennah L, Ma D. The potential role of HIF on tumour progression and dissemination. *Int J Cancer* 2015;136(11): 2491-2503.
- [175] van der Windt GJ, Pearce EL. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol Rev* 2012;249(1): 27-42.
- [176] van Maren WW, Jacobs JF, de Vries IJ, Nierkens S, Adema GJ. Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology* 2008;124(4): 445-452.
- [177] Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 2013;13(2): 88-100.
- [178] Wang X, Sun R, Chen Y, Lian ZX, Wei H, Tian Z. Regulatory T cells ameliorate acetaminophen-induced immune-mediated liver injury. *Int Immunopharmacol* 2015;25(2): 293-301.
- [179] Wang X, Sun R, Wei H, Tian Z. High-mobility group box 1 (HMGB1)-Toll-like receptor (TLR)4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: Interaction of gammadelta T cells with macrophages. *Hepatology* 2013;57(1): 373-384.

- [180] Webb JD, Coleman ML, Pugh CW. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(22): 3539-3554.
- [181] Wei HX, Chuang YH, Li B, Wei H, Sun R, Moritoki Y, et al. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. *J Immunol* 2008;181(10): 7221-7229.
- [182] Weidemann A, Breyer J, Rehm M, Eckardt KU, Daniel C, Cicha I, et al. HIF-1alpha activation results in actin cytoskeleton reorganization and modulation of Rac-1 signaling in endothelial cells. *Cell Commun Signal* 2013;11: 80.
- [183] Wiedow O, Meyer-Hoffert U. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. *J Intern Med* 2005;257(4): 319-328.
- [184] Williams CD, Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Acetaminophen-induced hepatic neutrophil accumulation and inflammatory liver injury in CD18-deficient mice. *Liver Int* 2010;30(9): 1280-1292.
- [185] Williams CD, McGill MR, Farhood A, Jaeschke H. Fas receptor-deficient lpr mice are protected against acetaminophen hepatotoxicity due to higher glutathione synthesis and enhanced detoxification of oxidant stress. *Food Chem Toxicol* 2013;58: 228-235.
- [186] Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 2008;322(5899): 271-275.
- [187] Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc Biol* 1994;55(1): 105-111.
- [188] Yamaguchi Y, Ohshiro H, Nagao Y, Odawara K, Okabe K, Hidaka H, et al. Urinary trypsin inhibitor reduces C-X-C chemokine production in rat liver ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 2000;94(2): 107-115.
- [189] You Q, Holt M, Yin H, Li G, Hu CJ, Ju C. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. *Biochem Pharmacol* 2013;86(6): 836-843.
- [190] Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 2007;11(5): 407-420.
- [191] Zhang J, Han C, Dai H, Hou J, Dong Y, Cui X, et al. Hypoxia-Inducible Factor-2alpha Limits Natural Killer T Cell Cytotoxicity in Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(1): 92-106.
- [192] Zhou D, Mattner J, Cantu C, 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, et al. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 2004;306(5702): 1786-1789.
- [193] Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010;28: 445-489.
- [194] Zhu X, Uetrecht J. A novel T(H)17-type cell is rapidly increased in the liver in response to acetaminophen-induced liver injury: T(H)17 cells and the innate immune response. *J Immunotoxicol* 2013;10(3): 287-291.

- [195] Zigmond E, Samia-Grinberg S, Pasmanik-Chor M, Brazowski E, Shibolet O, Halpern Z, et al. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J Immunol* 2014;193(1): 344-353.
- [196] Zygmunt PM, Chuang H, Movahed P, Julius D, Hogestatt ED. The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* 2000;396(1): 39-42.
- [197] 岩渕和也. ナチュラルキラーT (natural killer T: NKT) 細胞の分化と機能 -前編-. *北里医学* 2011;41: 99-109.
- [198] 岩渕和也. ナチュラルキラーT (natural killer T: NKT) 細胞の分化と機能 -後編-. *北里医学* 2012;42: 19-31.
- [199] 吉開康信. gamma delta 型 T 細胞の発見と完成防御機構での役割の解明. *モダンメディア* 2012;58(2): 38-45.
- [200] 厚生労働省医薬食品局. 医薬品・医療機器等安全性情報. No.290: 東京都: 厚生労働省医薬食品局; 2012. p. 1-41.

6. 補足

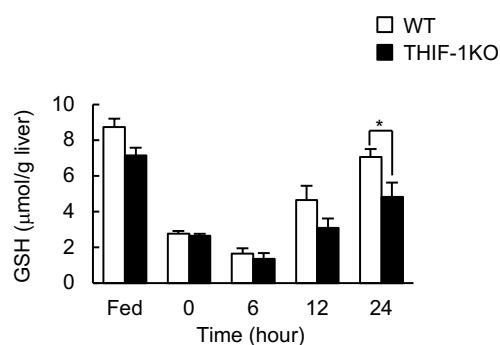


図 S1. APAP 投与後の肝臓の還元型グルタチオン量の評価

DTNB-glutathione recycling method により APAP 投与後の肝臓の還元型グルタチオンレベルの測定を行った。Fed は食事制限を行っていないマウスを示す (n = 7-8)。* $p < 0.05$ 。図 S1 は Suzuki *et al.*, *Hepatol Commun.*, 2018; 2 (5); 571-581. の Supplementary Fig. 1 から引用。

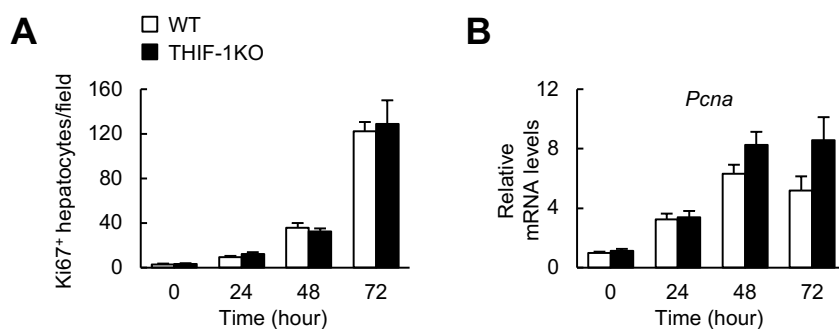


図 S2. APAP 投与後の肝再生の評価

肝障害後の肝再生を (A) 肝臓切片の低倍率における一視野内の Ki67 陽性細胞数 (n = 5), および, (B) 肝臓における PcnA 遺伝子発現 (n = 5-8) により評価した。図 S1 は Suzuki *et al.*, *Hepatol Commun.*, 2018; 2 (5); 571-581. の Supplementary Fig. 2 から引用。

7. 謝辞

本研究の遂行，展開および日頃の研究生生活において，七年間に亘って大変貴重なご指導，ご助言を頂きました合田亘人先生に深く感謝しますと共に，厚く御礼申し上げます。

博士学位の審査に当たり，それぞれの専門的なご視点からご指導いただき研究成果の完成にご尽力いただいた仙波憲太郎先生および田中稔先生に深く感謝しますと共に，厚く御礼申し上げます。

また，研究生生活を様々な面でサポートをして頂きました新莊聡子先生に感謝しますと共に，厚く御礼申し上げます。

日頃より切磋琢磨し合い，ともに研究生生活を公私ともに支えて頂きました合田研究室の学生各位に感謝いたします。山崎貴史くんには，忙しい中で論文のリバイス実験にご協力いただき，ありがとうございました。特に，皆川祥子さんには，本研究の遂行に当たって研究方針や実験の遂行の面で多大なるサポートを頂き，大変お世話になりました。厚く感謝いたします。

最後に，経済的にも精神的にも長期にわたって学生生活と研究生生活を支えて頂いた両親に，心から感謝申し上げます。

上記のように，本研究は様々な方のご協力を受けて完遂することができました。今後とも研究生生活は続きますが，今後も皆様のご助言を頂いてより良い研究を行い，一流の研究者になって恩返しさせていただきたいと考えております。未熟者ではありますが，今後ともご指導のほど何卒よろしく願いいたします。

2018年5月 鈴木智大

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"> ○Suzuki T, Minagawa S, Yamazaki T, Arai T, Kanak M, Shinjo S, Goda N, “Loss of hypoxia inducible factor-1α aggravates $\gamma\delta$ T cell-mediated inflammation during acetaminophen-induced liver injury” <i>Hepatology Communications</i> 2018 May; 2; 571-581. 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. 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.
総説	<ol style="list-style-type: none"> <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.
講演	<ol style="list-style-type: none"> <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. <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) <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. 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. <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) <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. <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.
その他 (商業誌)	<ol style="list-style-type: none"> <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. <u>鈴木智大</u>, 合田亘人, 「低酸素応答因子と SDB」 <i>呼吸器 NEWS&VIEWS</i> (ライフサイエンス出版) 2012; 40; 6-8.