

博士論文審査報告書

論文題目

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

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

申請者

鈴木	智大
Tomohiro	SUZUKI

生命医科学専攻 分子病態医化学研究

2018年6月

1. 論文内容の要旨

解熱鎮痛薬として広く利用されているアセトアミノフェン (APAP) の過剰摂取は、重篤な急性肝障害 (AILI) を引き起こす。炎症疾患では、低酸素状態や炎症刺激による低酸素応答因子 Hypoxia inducible factor (HIF) の活性化が認められる。HIF は、慢性炎症疾患モデルにおいて T 細胞の分化や機能を調節することが知られている。一方、急性炎症で活性化する自然免疫様 T 細胞における HIF の機能はこれまで明らかにされていなかった。

本研究は、AILI における自然免疫様 T 細胞の HIF の機能を明らかにするために、T 細胞特異的 HIF α 欠損マウス (THIF-1KO と THIF-2KO) を用いて研究を行った。APAP を投与したところ、野生型マウス (WT) と THIF-2KO では血清 ALT 活性および肝小葉の細胞死領域には差が認められず肝障害は同程度であった。一方、THIF-1KO では、WT と比較して APAP 投与後 12 時間までの初期障害は同程度であったが、24 時間以降で肝障害が増悪した。この増悪は、肝小葉の細胞死領域への好中球浸潤の増加と肝臓の好中球誘導ケモカイン CXCL1 および CXCL2 の発現上昇を伴うことがわかった。また、抗 Gr-1 抗体投与によって好中球除去を行うことで、THIF-1KO の ALT 活性が WT と同程度まで低下することが見出された。さらに、THIF-1KO では、好中球誘導ケモカインの発現を制御する IL-17A の血清レベルが APAP 投与後 24 時間で上昇しており、IL-17A 中和抗体の投与により THIF-1KO の血清 ALT 活性と好中球浸潤が WT と同程度まで減少した。IL-17A 分泌細胞を Flow cytometry で評価したところ、THIF-1KO では IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の数が上昇していた。また、IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞数の上昇は肝臓への $\gamma\delta$ T 細胞の浸潤の増加によることが示された。さらに、Rag2 欠損マウスに対する $\gamma\delta$ T 細胞の移入実験を行ったところ、WT 細胞と比べて、THIF-1KO 細胞を移入したマウスでは有意に ALT 活性と好中球浸潤が上昇することが示された。In vitro で $\gamma\delta$ T 細胞の CCL20 への遊走能を評価したところ、WT よりも THIF-1KO の $\gamma\delta$ T 細胞の遊走能が有意に高いことが明らかとなった。また、ミトコンドリアの ATP synthase の阻害剤である Oligomycin 処理により、THIF-1KO $\gamma\delta$ T 細胞の遊走能が WT と同程度になることが示された。以上により、HIF-1 が肝臓への $\gamma\delta$ T 細胞の浸潤を抑制することで、好中球浸潤による APAP 誘導性急性肝障害を抑制することを示した。また、HIF-1 がミトコンドリアの 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見出した。

以上の知見は、AILI を始めとした $\gamma\delta$ T 細胞依存的な炎症疾患の治療において、 $\gamma\delta$ T 細胞の HIF-1 や下流の好中球依存的な肝障害経路が有効な薬剤標的となる可能性を示している。

2. 論文審査結果

2018 年 3 月 29 日の公聴会では、論文内容の説明と質疑応答が行われた。その概要を以下に記載する。

- 1) 統一的な見解として HIF はこういった役割を持つ遺伝子と考えることができるのかという質問があった。低酸素以外にも細胞に有害な酸化ストレスなど

が HIF α の発現を亢進し，HIF-2は anti-oxidant gene の発現を促すことで細胞を酸化ストレスから保護する。また，本研究で示されたように過剰な炎症に対して HIF が抑制的に作用する例が複数報告されている。これらを考慮すると，HIF は細胞レベルでは基本的に細胞の生存に対して不利に働く刺激に対して適応を促す因子であると考えられるという回答がなされた。

- 2) $\gamma\delta$ T 細胞において，HIF-1 はどのようなメカニズムで発現制御を受けるのかという質問があった。これに対して，低酸素状態や炎症刺激が HIF-1 の活性化因子であることが知られているが，Migration assay で通常酸素下でも HIF-1 が $\gamma\delta$ T 細胞の遊走能を抑制したことは，通常酸素状態でも HIF-1 が活性化するメカニズムが存在する可能性を示唆しているという回答がなされた。
- 3) $\gamma\delta$ T 細胞の機能は浸潤した先の肝臓の低酸素状態によっても制御されるのかという質問があった。これに対し，肝臓の低酸素状態を感知してから HIF-1 が $\gamma\delta$ T 細胞の浸潤を調節するのではタイムコース的に遅いため，少なくとも浸潤に関してはもともと $\gamma\delta$ T 細胞に発現していた HIF-1 によって制御されていると考えているという回答がなされた。
- 4) APAP 投与後 12 時間の時点における WT の CXCL の発現上昇は IL-17A と独立したものと考えて良いのかという質問があった。これに対して，この時点で血清 IL-17A レベルが投与前と比較して変化していない点と，好中球除去により WT で ALT 活性が低下する一方で IL-17A 中和抗体投与では ALT 活性および好中球浸潤が低下しない点を考慮すると，CXCL の発現は IL-17A 非依存的に TNF- α などによって制御される可能性があるという回答がなされた。
- 5) APAP 投与後 24 時間で THIF-1KO の IFN- γ と OPN の血清レベルが上がる一方で肝臓内ではこれらの因子の発現や産生に両群間で差がないが，末梢由来の IFN- γ と OPN が肝臓の表現型に影響する可能性があるのではないかという質問があった。WT と比較して THIF-1KO の肝臓で IL-17A 産生細胞の増加が認められ，IL-17A 中和抗体の投与によって THIF-1KO で認められた肝障害の増悪が WT と同程度まで低下した。これを考慮すると，IFN- γ と OPN が遠隔的に肝障害を制御しているというよりは，IL-17A の肝臓局所での分泌が THIF-1KO の肝障害の増悪に関与すると考えられるという回答がなされた。
- 6) WT の肝臓では IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が増加しているにも関わらず血清 IL-17A レベルが低下しているように見えるのはなぜかという質問があった。これに対して，末梢からの IL-17A 産生が低下したことによる影響であると考えるのが合理的であるという回答がなされた。
- 7) Rag2KO への $\gamma\delta$ T 細胞の移入実験では，実際に THIF-1KO で $\gamma\delta$ T 細胞の浸潤が増加しているという証拠はあるのかという質問があった。これに対して，一度染色した細胞を再度染色して検出するというの一般的なでないため，in vivo で浸潤を評価するということであれば，CD45 のコンジェニックマウスを用いた実験で示すことができるという回答がなされた。
- 8) 肝臓に浸潤する $\gamma\delta$ T 細胞の由来はどこかという質問があった。これに対して，

ウイルス性肝障害において腸管からの T 細胞の移入が認められるという報告があることや、腸管は $\gamma\delta$ T 細胞が非常に豊富な組織としても知られることを考慮すると腸管が $\gamma\delta$ T 細胞の由来である可能性が高いという回答がなされた。

- 9) HIF-1 を活性化させることが実際に治療標的になりうるのか、また、病態のどのタイミングまでなら治療標的となりうるのかという質問があった。これに対して、PHD 阻害剤の投与により $\gamma\delta$ T 細胞の HIF-1 を活性化して治療を行うという戦略は可能であると考えられる。また、今回の発見では $\gamma\delta$ T 細胞は 12 時間から 24 時間の間の段階で浸潤して肝障害を増悪するため、この時間帯に阻害剤を投与するという戦略は現実的な治療法になる可能性があるという回答がなされた。
- 10) Oligomycin 処理で HIF-1 を欠失した $\gamma\delta$ T 細胞の移動能は低下するが、実際に HIF-1 がエネルギーの不足を誘導することで細胞浸潤を抑制していると結論づけて良いのかという質問があった。これに対して、現状のデータだけで上記の判断をすることは難しいが、逆にミトコンドリアへの代謝流量を増やすことで WT と THIF-1KO の $\gamma\delta$ T 細胞の移動能が同程度になることや、メタボローム解析で実際に HIF-1 の有無で代謝様式が変わることを示すことで、HIF-1 によるエネルギー代謝制御が移動能に関与する可能性を強めることができると考えているという回答がなされた。
- 11) $\gamma\delta$ T 細胞は肝臓に浸潤しすぎると肝障害を増悪するが、もともと肝臓にいる $\gamma\delta$ T 細胞などは必要と考えられるのかという質問があった。これに対して、部分肝切除の系で IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞によって分泌される IL-22 が肝再生を促進することや、IL-17A が LPC の増殖を誘導することが報告されていることを考慮すると、肝臓の $\gamma\delta$ T 細胞は過剰に浸潤すると肝障害を誘導する一方で、肝再生の局面では必要な細胞であるとの回答がなされた。

以上の研究内容の説明と質疑応答を通して、申請者が本研究の意義と目的を理解し、本学問領域の十分な学識を備えていると判断した。また、本研究成果は HIF-1 が自然免疫様 T 細胞である $\gamma\delta$ T 細胞の機能抑制を介してアセトアミノフェン肝障害の増悪に関与することを初めて見出した報告であり、これは申請者の博士（理学）の学位論文として相応しい内容であると判断した。

2018 年 5 月

主査 早稲田大学 教授 博士（医学） 慶應義塾大学 合田 亘人

副査 早稲田大学 教授 理学博士 東京大学 仙波 憲太郎

副査 早稲田大学 客員准教授 博士（農学） 東京大学 田中 稔