



Ursodeoxycholic acid impairs liver-infiltrating T-cell chemotaxis through IFN- γ and CX3CL1 production in primary biliary cholangitis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2021-10-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 下山, 真 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003905

博士（医学） 下山 真

論文題目

Ursodeoxycholic acid impairs liver-infiltrating T-cell chemotaxis through IFN- γ and CX3CL1 production in primary biliary cholangitis

(ウルソデオキシコール酸は原発性胆汁性胆管炎において IFN- γ 及び CX3CL1 産生抑制を介して肝内浸潤 T 細胞の走化性を阻害する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

原発性胆汁性胆管炎(PBC)は門脈域への抗原特異的 1 型ヘルパーT(Th1)細胞を中心としたリンパ球浸潤と肝内胆管上皮細胞(IHBEC)の選択的破壊、抗ミトコンドリア抗体の発現が特徴的な自己免疫性肝疾患である。病態として、Th1 細胞からのインターフェロン- γ (IFN- γ)産生により IHBEC での C-X3-C モチーフケモカインリガンド 1(CX3CL1)の発現増加が誘導され、C-X3-C モチーフケモカイン受容体 1 陽性リンパ球の浸潤による胆管炎と考えられている。

PBC の治療薬はウルソデオキシコール酸(UDCA)が第一選択薬として用いられ、生化学所見を改善し、長期治療によって組織学的進行を遅らせ、特に早期 PBC 患者の生存率を改善させる。UDCA は胆汁酸置換作用、細胞膜保護作用、抗アポトーシス作用、抗酸化作用および潜在的な免疫調節効果など複数のメカニズムを通じて IHBEC の傷害を軽減するが、PBC に対する UDCA の免疫調節作用のメカニズムは十分に解明されていない。UDCA は抗酸化ストレス応答転写因子 *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2(NFE2L2)*を活性化することが知られている。近年、*NFE2L2* が炎症性サイトカインの発現にも関与することが報告されている。

本研究では PBC の in vitro および in vivo モデルを使用して、肝内浸潤性 T 細胞による IFN- γ 産生および IHBEC における CX3CL1 発現に対する UDCA の影響を検討した。

[材料ならびに方法]

1. PBC 患者から採取した UDCA 治療前後の肝生検組織を用いて、病理組織学的評価、qPCR によるサイトカイン、ケモカイン及び Western blot で *NFE2L2* の発現を評価した(浜松医科大学臨床研究倫理委員会承認番号 14-214)。
2. ヒト白血病 T 細胞由来細胞株 Jurkat 細胞を用いて、UDCA による *NFE2L2* 発現と活性化を qPCR および Luciferase assay にて検証した。
3. 2-オクチン酸(2OA)による PBC モデルマウスを *NFE2L2*^{-/-}、*NFE2L2*^{+/-}および *NFE2L2*^{+/+}マウスを用いて作成し、病理学的評価、Flow cytometry による肝内浸潤単核球(MNC)数および T 細胞内の炎症性サイトカインの発現、血清および肝組織中 IFN- γ の発現を評価した(浜松医科大学動物実験委員会承認番号

201352、浜松医科大学組換え DNA 実験安全委員会承認番号 25-36)。

4. 次に C57BL/6 マウスによる 2OA-PBC モデルに *NFE2L2* 活性化剤であるスルフォラファン(SFN)を投与し、3.と同様の検討を行った。
5. ヒト胆管がん細胞由来細胞株 HuCC-T1 および PBC 患者から採取した IHBEC を用いて、IFN- γ 及び UDCA による CX3CL1 とリン酸化 STAT-1 の発現について、qPCR、Western blot、ELISA にて検討した。

[結果]

1. UDCA 治療後の病理組織学的改善($n = 15$, $p < 0.01$)、IFN- γ mRNA 発現の有意な減少($n = 15$, $p < 0.01$)、IFN- γ と CX3CL1 mRNA 発現の正の相関($n = 15$, $p < 0.05$)を確認した。また *NFE2L2* の発現増加も確認された($n = 12$, $p < 0.05$)。
2. コントロール群と比較し、UDCA 群で *NFE2L2* と抗酸化剤応答配列の増加が確認された($n = 4$, $p < 0.001$)。
3. *NFE2L2*^{-/-}+2OA マウス($n = 12$)は *NFE2L2*^{+/+}+2OA マウス($n = 14$)と比較して、病理組織学的悪化($p < 0.01$)、肝内浸潤 MNC 数($p < 0.05$)と CD8 T 細胞数($p < 0.01$)の増加、肝内浸潤 CD4 T 細胞における IFN- γ 産生増強($p < 0.01$)、血清および肝組織中の IFN- γ の発現が増加($p < 0.05$)していた。
4. SFN を投与した 2OA-PBC モデルマウス($n = 10$)はコントロール($n = 12$)と比較し、肝内浸潤 MNC 内の *NFE2L2* mRNA の発現が増強し($p < 0.05$)、lobular inflammation と interface hepatitis の病理組織学的改善($p < 0.05$)と肝内浸潤 T 細胞の IFN- γ 産生低下($p < 0.05$)が確認された。
5. IFN- γ 刺激により HuCC-T1 細胞内の CX3CL1 mRNA の発現は有意に用量依存性に誘導された($n = 4$, $p < 0.001$)。UDCA は IFN- γ と IFN- γ 受容体の結合を抑制する事で、IFN- γ 誘導性のリン酸化 STAT1 と CX3CL1 の発現を抑制していた($n = 4$, $p < 0.05$)。

[考察]

自己免疫性肝疾患の一種である PBC に対して、UDCA は血液学的所見のみならず組織学的所見も改善させるが、UDCA の作用機序は十分に解明されていない。本研究において UDCA 治療後に肝組織内の IFN- γ mRNA の発現低下と IFN- γ と CX3CL1 mRNA の有意な相関が確認されたことから、UDCA の免疫学的作用が証明された。次に UDCA の免疫調節能を持つ *NFE2L2* の活性化作用に注目し、*NFE2L2* ノックアウトマウスと *NFE2L2* 活性化剤を使用した PBC モデルマウスを用いて、肝内浸潤 T 細胞の *NFE2L2* が活性化により IFN- γ 産生を減少させることを示した。更に UDCA による IHBEC 上の受容体への IFN- γ 結合抑制も本研究から示唆された。これらの結果から、IHBEC の CX3CL1 発現が抑制され、肝内浸潤 T 細胞の走化性が弱まり、胆管炎を改善することが推察された。

[結論]

UDCA は PBC において肝内浸潤 T 細胞内の *NFE2L2* 活性化による IFN- γ 産生低

下および IFN- γ の IHBEC の IFN- γ 受容体との結合を阻害することで、IHBEC の CX3CL1 発現を抑制し、肝内浸潤 T 細胞の走化性および接着能力を弱め胆管炎を改善させる。