

氏名 (本籍)	岩本直樹 (愛知県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 768 号
学位授与日付	平成 20 年 4 月 16 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocyte during acute hepatitis caused by hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes <i>in vivo</i>
審査委員	(主査) 教授 清島 満 (副査) 教授 森脇久隆 教授 高見 剛

論文内容の要旨

【背景および目的】

ウイルス性劇症肝炎は、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) によるウイルス感染肝細胞に対する障害が引き金となり、広範な肝壊死へと進展していくものと考えられている。

近年、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) が、トリプトファンの代謝分解酵素の役割を有しており、トリプトファンを枯渇させることで T 細胞の増殖を抑制することが示され、免疫系の制御に深く関連があるとして注目されている。この酵素はインターフェロン (IFN) γ などの炎症性サイトカインによって誘導されるため、免疫学的機序により発症すると考えられている劇症肝炎・急性肝炎においても IDO が何らかの関与を持つことが予測される。

そこで本研究では、B 型肝炎ウイルス (HBV)・トランスジェニックマウスを用いたマウス劇症肝炎モデルにおけるトリプトファン代謝および IDO の動態について検討した。

【研究材料と方法】

Dr Chisari から供与された HBV トランスジェニックマウスは、アルブミンプロモーターによって HBV envelope 蛋白の発現が制御されており、肝細胞特異的にこの蛋白が発現される。HBs 抗原の残基 28 と 39 の間に位置するエピトープ (IPQSLDSWWTSL) を認識する CD8+ CTL クローン (HBV 特異的 CTL) を、この HBV トランスジェニックマウスの尾静脈から移入することによって、B 型劇症肝炎モデルを作製することができる。肝障害の程度は、血清 ALT 活性の測定および組織学的所見 (H.E.染色) にて評価した。

HBV 特異的 CTL 移入後の肝組織を用いて IDO の免疫染色を行い、またトリプトファンの代謝産物として血清中の L-kynurenine (L-Kyn) 濃度を測定した。

さらに肝をホモジネートした試料とコラゲナーゼ処理によって単離した肝実質細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 及びリアルタイム RT-PCR によりそれぞれの IDO mRNA 量を測定した。

また、HBV トランスジェニックマウス及び非 HBV トランスジェニックマウスから肝実質細胞を単離し初代培養に供した。この培養肝細胞を *in vitro* にてリコンビナントマウス IFN- γ で刺激後、mRNA を抽出し RT-PCR で IDO mRNA の発現を検討した。

【結果】

HBV トランスジェニックマウスに HBV 特異的 CTL を移入すると、非 HBV トランスジェニックマウスと比較し、1 日後に血清 ALT の有意な上昇および著明な炎症細胞浸潤が認められた。そして、肝組織の免疫染色において肝実質細胞での IDO 蛋白が、HBV 特異的 CTL 移入 1 日後から 7 日後にかけて、徐々に強く発現することが確認された。また IDO がトリプトファンを代謝して生じる L-Kyn の血清濃度も、移入 1 日後に非 HBV トランスジェニックマウスと比べ有意な上昇を示した。

さらに、HBV 特異的 CTL を移入後の肝実質細胞を分離し、RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR で IDO の mRNA 発現を検討した結果、非実質細胞では IDO が発現していないにもかかわらず、肝実質細胞では IDO を発現していた。

これらの結果が劇症肝炎モデルマウスの肝実質細胞に特異的なものなのかどうかを調べるため、HBV トランスジェニックマウスおよび非 HBV トランスジェニックマウスの肝実質細胞を初代培養し、IFN- γ を添加した。その結果、HBV トランスジェニックマウスおよび非 HBV トランスジェニックマウス共に、初代培養された肝実質細胞で IDO が発現することを確認した。

【考察】

本研究では、HBV トランスジェニックマウスに HBV 特異的 CTL を移入することにより、肝実質細胞に IDO が発現し、血清 L-Kyn 濃度が上昇することを明らかにした。これまで肝におけるトリプトファン代謝は主に tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) にて行われ、IDO の関与は少ないと考えられていたが、本研究において、少なくとも劇症及び急性肝炎の状態では、肝実質細胞自身が IDO を発現するという新知見を得た。

また、本研究におけるこの劇症肝炎モデルは、HBV 特異的 CTL を移入することにより抗原を認識した CTL が大量の IFN- γ を産生することが知られている。そのため、HBV 特異的 CTL 移入による肝実質細胞の IDO 発現のメカニズムの一つとして、この IFN- γ の産生の関与が考えられる。

IDO はトリプトファンの代謝分解酵素であり、IDO によるトリプトファンからキヌレニンへの代謝が、T 細胞の増殖を抑制し、妊娠期の胎児拒絶免疫寛容誘導に重要な役割をしているといわれている。一方でトリプトファンの代謝産物も免疫寛容を誘導することが知られている。このことから、劇症肝炎モデルの肝実質細胞における IDO の発現は、T 細胞や NK 細胞の増殖抑制や炎症細胞の浸潤を抑制しているとも考えられる。これらのメカニズムを明らかにするためには HBV トランスジェニック/IDO 欠損マウスを樹立し、このマウスを用いた劇症肝炎モデルの研究が期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者 岩本直樹は、B 型肝炎ウイルス・トランスジェニックマウスへの特異的細胞障害性 T 細胞移入によって誘導される劇症肝炎モデルを用い、肝実質細胞において IDO が発現していることを証明し、劇症・急性肝炎における IDO の関与が示唆された。

この知見は、肝臓病学及び免疫学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Takehito Kondo, Genzou Takemura, Ken-ichiro Kosai, Takamasa Ohno, Tomoyuki Takahashi, Masayasu Esaki, Kazuko Goto, Rumi Maruyama, Ichijiro Murata, Shinya Minatoguchi, Takako Fujiwara, Hisayoshi Fujiwara. : Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocyte during acute hepatitis caused by hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* Liver International 29, 277-283 (2009).