

氏名（本籍）	伊藤 大輔	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1209号	
学位授与日付	令和4年9月14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	D-mannose administration improves autoimmune hepatitis by upregulating regulatory T cells	
審査委員	（主査）教授	前川 洋一
	（副査）教授	大西 秀典 教授 永井 宏樹

論文内容の要旨

【背景】

D-マンノースは生理的血中濃度がブドウ糖の50分の1未満の単糖であり、体液や組織に広く分布している。制御性T細胞（Treg）は免疫寛容の誘導と維持、および炎症と自己免疫疾患の予防と抑制に必須の免疫調節細胞であるが、D-マンノースは自己免疫性糖尿病や気道炎症マウスモデルにおいて、免疫応答による組織損傷を抑制し、Tregを増加させることが報告されている。

自己免疫性肝炎（AIH）は原因不明の免疫関連肝障害であり、その発症・進展には自己抗体やTregの機能障害が関与している。AIHの治療として免疫抑制療法を行うが、免疫抑制剤の副作用および免疫抑制療法への不応は、AIH診療における大きな課題である。concanavalin A（ConA）および α -galactosylceramide（GalCer）は、それぞれT細胞およびnatural killer T（NKT）細胞の動員と活性化によって肝障害を誘導する。本研究では、ConAまたはGalCerを用いた自己免疫性肝障害マウスモデルを作製し、同モデルにおけるD-マンノース投与の免疫応答について詳細な解析を行うことで、D-マンノースのAIH治療への応用の可能性について検証した。

【対象と方法】

8-10週齢の雄C57BL/6マウスにConA（10mg/kg/体重、静脈内）またはGalCer（3 μ g/mouse、腹腔内）を投与し、AIHマウスモデルを作製した。同モデルマウスに、D-マンノースを薬剤投与1週間前より自由飲水投与（1.1M）、もしくは薬剤投与3時間後および6時間後に経口投与（200 μ l, 20%（w/v））した。肝障害の重症度は、血清ALT・ASTレベルおよび肝臓組織のH&E染色により評価し、Tregへの誘導を促進するTGF- β 1の活性化をELISA法にて測定した。D-マンノース投与による免疫抑制効果を調べるために、肝臓および脾臓に存在するTregをフローサイトメトリーにて解析し、同部位で産生される各種サイトカインのmRNA発現量をqRT-PCR法にて検討した。同様の実験をIndoleamine 2,3-dioxygenase（IDO）1遺伝子欠損マウス（IDO1-KOマウス）でも行い、D-マンノースがIDO1依存的にTregの誘導を介してAIHマウスモデルにおける免疫抑制効果を誘発するかを検討した。また、ConAまたはGalCerで処理されたリンパ球の増殖に対するD-マンノースの効果を検討するために、試験管内細胞増殖アッセイを施行した。さらに、Tregの誘導に対するD-マンノースの効果を評価するために、マウス脾細胞（2 \times 10⁶ cells）をD-マンノース（25mM）、GalCer（200ng/ml）、D-マンノースおよびGalCerで3日間培養し、細胞の動態をフローサイトメトリーにて解析した。

【結果】

D-マンノースの投与により、ConA または GalCer 投与後の血清 ALT および AST レベルは有意に低下し、肝臓組織の出血や炎症、肝細胞の核濃縮および壊死は大幅に減少した。D-マンノースの投与によって肝臓における IFN- γ や TNF- α 等の炎症性サイトカインの mRNA の発現は有意に低下する一方、IDO1 および抗炎症性サイトカイン IL-10 の mRNA の発現は増加した。試験管内細胞増殖アッセイにおいて ConA および GalCer の添加はリンパ球数を大幅に増加させたが、D-マンノースによりリンパ球の増加は有意に抑制された。一方で、Treg は肝臓および脾臓において D-マンノース投与後に有意に増加することが示された。また、D-マンノース処理による血清 TGF- β 1 や同 mRNA の発現上昇は認められなかったが、血清中での活性型 TGF- β 1 および Smad7 mRNA の発現は有意に増加していた。IDO1-K0 マウスを使用した AIH モデルマウスでは、D-マンノース投与による肝障害の軽減および Treg の増加を認めなかった。

【考察】

近年、AIH に代表される免疫関連肝障害が増加している。GalCer および ConA 誘発性肝炎モデルは NKT 細胞、NK 細胞、T 細胞等の活性化を介して肝障害を惹起することが報告されており、免疫関連肝障害の病態解析に有用である。本研究において、D-マンノースが Treg を増加させることで、AIH マウスモデルの肝障害を抑制することが明らかになった。D-マンノースは NK 細胞や T 細胞の活性化を抑制することで IFN- γ 、TNF- α 、CCL2、CXCL10 の発現を低下させるとともにマクロファージの活性化を抑制し IL-1 β の発現低下を誘導することが明らかとなっている。本研究から、D-マンノースは同様の機序にて免疫関連肝障害を軽減させる可能性が示唆された。D-マンノース投与による AIH の抑制機序には Treg の関与が考えられ、TGF- β 1 シグナル伝達経路の増強が確認された。

IDO1 も Treg の増加・活性化を介して T 細胞応答の抑制を制御することが報告されている。本研究において、D-マンノースの投与は IDO1 mRNA の発現を有意に増加させた一方、D-マンノースによる Treg の増加と肝障害の抑制は IDO1-K0 マウスでは認めなかった。これらの結果は、AIH における D-マンノースの免疫抑制効果において、IDO1 を介した Treg の増加が重要な役割を果たしていることを示唆するものである。また、今回の研究で用いた D-マンノースの濃度はヒトやマウスでの血中最大許容濃度以下であり、同濃度の D-マンノースが免疫関連肝障害を抑制した本研究結果は、AIH や免疫関連肝障害の治療における D-マンノースの応用を見据えた際にも重要であると考えられた。

【結論】

自己免疫性肝炎モデルマウスにおいて、D-マンノースは TGF- β 1 と IDO1 の活性化を介して制御性 T 細胞を誘導し、IFN- γ や TNF- α 等の炎症性サイトカインを低下させることで、肝炎・肝障害を抑制した。D-マンノースは、AIH や免疫関連肝障害の新規治療薬として有用な可能性がある。

論文審査の結果の要旨

申請者 伊藤 大輔 は、自己免疫性肝炎モデルマウスを用いて D-マンノースの肝障害抑制作用を検証した。その結果、D-マンノースは制御性 T 細胞の増殖と活性化を介して肝障害を軽減させることを見出した。この成果は免疫関連肝障害の新規治療法につながる可能性があり、消化器内科学ならびに免疫関連肝障害疾患領域研究の発展に少なからず寄与するものである。

[主論文公表誌]

Daisuke Ito, Hiroyasu Ito, Takayasu Ideta, Ayumu Kanbe, Masahito Shimizu : D-mannose administration improves autoimmune hepatitis by upregulating regulatory T cells
Cell Immunol, doi: 10.1016/j.cellimm.2022.104517.