

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15495

研究課題名(和文) 脂肪性肝炎における肝臓迷走神経を介した代謝と炎症制御機構の探究

研究課題名(英文) Regulation of metabolism and inflammation through hepatic vagus nerve system in steatohepatitis

研究代表者

田浦 康二郎 (Taura, Kojiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80378629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、脂肪肝を背景とした進行性の炎症を特徴とする慢性肝疾患である。NASHにおいて、肝臓マクロファージであるKupffer細胞の自然免疫応答が、その炎症の進展に中心的な役割を担う。一方、迷走神経の遠心性シグナルが、免疫細胞に対して7ニコチン性アセチルコリン受容体(7nAChR)を介した抗炎症作用を持つことが知られている。本研究は、マウスを用いたNASHの動物実験モデルの検証により、肝臓迷走神経の活動が7nAChRを介してKupffer細胞の活性化を制御し、NASHの進展に対して抑制的な効果を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a chronic liver disease characterized by steatosis with progressive inflammation. Kupffer cells, which are liver-resident macrophages, play a central role in promoting hepatic inflammation by innate immune responses in NASH. The efferent vagus nerve signaling is known to have an anti-inflammatory effect on immune cells via the 7 nicotinic acetylcholine receptor (7nAChR) pathway. This study demonstrated that the hepatic vagus nerve plays a key role in regulating the inflammatory response in Kupffer cells via the 7nAChR pathway and eventually contributed to the suppression of NASH progression, by using mouse experimental model of NASH.

研究分野：肝臓外科 肝線維化 肝移植

キーワード：NASH 迷走神経 クッパー細胞 ニコチン性アセチルコリン受容体 7

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、脂肪肝を背景とした肝臓の炎症像を特徴とする慢性肝疾患である。Kupffer 細胞による免疫応答が、NASH における炎症の進展において中心的な役割を担う。Kupffer 細胞の活性化を制御する機序の解明は、NASH に対する予防的・治療的戦略において重要な課題であるといえる。近年、迷走神経の遠心性シグナルが、免疫細胞に対して $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7nAChR$) を介した抗炎症作用を持つことが知られている。本研究は、肝臓への特異的な迷走神経シグナルが、 $\alpha 7nAChR$ 刺激を介して Kupffer 細胞の炎症性活動を制御することにより、NASH に対して抑制的な効果を持つ可能性に着目した。

2. 研究の目的

肝臓迷走神経が $\alpha 7nAChR$ を介して Kupffer 細胞の活性化を制御し、NASH の進展に対して抑制的に働くという仮説に基づき、マウスの NASH モデルを用いた動物実験による検証を目的とした。

3. 研究の方法

迷走神経肝枝切離モデル

C57BL/6 野生型 (WT) マウスに対して、迷走神経肝枝切離 (HV) または sham 手術を行い、メチオニン・コリン欠損 (MCD) 食を 1 週間給餌することによって NASH を誘発し、両群の比較検証を行った。

初代 Kupffer 細胞に対する $\alpha 7nAChR$ 刺激 *in vitro* において、WT マウスの肝臓から分離した Kupffer 細胞に対して、リポ多糖とパルミチン酸を用いて NASH を再現した炎症を誘発し、 $\alpha 7nAChR$ 作動薬の投与による抗炎症作用を評価した。

$\alpha 7nAChR$ 欠損キメラマウスによる検証
クロドロン酸リポソームの投与により Kupffer 細胞を除去した WT のレシピエントに、ドナーとして $\alpha 7nAChR$ 欠損 ($\alpha 7KO$) マウスの骨髓細胞を移植することで、Kupffer 細胞を特異的に $\alpha 7KO$ に置換したキメラマウスを作成し、MCD 食による NASH への影響を検証した。

4. 研究成果

肝臓迷走神経切離により Kupffer 細胞の活性化が亢進し NASH が増悪する

HV 群のマウスは sham 手術群に比較して、

組織学的に有意な NASH の増悪をきたし、肝逸脱酵素の上昇も認めた (Fig.1)。肝臓組織における real-time PCR では、HV 群の肝臓において TNF α 、IL-12、MCP-1 に代表される炎症性サイトカインの発現が亢進し、PPAR α 経路に関連する脂質代謝制御因子の発現低下を認めた (Fig.2)。また、免疫組織学的評価では、HV 群において Kupffer 細胞 (F4/80+) における NF- κ B (p65) のリン酸化と核内移行が亢進し、Kupffer 細胞の高度な活性化を認めた (Fig.3)。

Fig.1

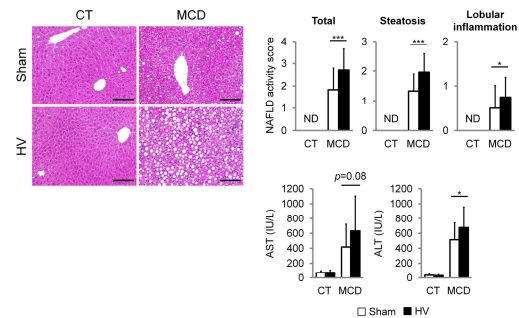


Fig.2

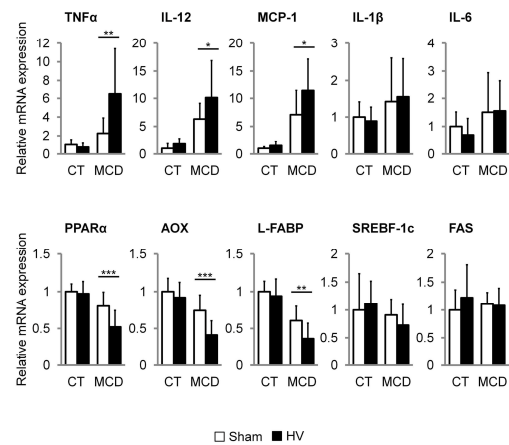
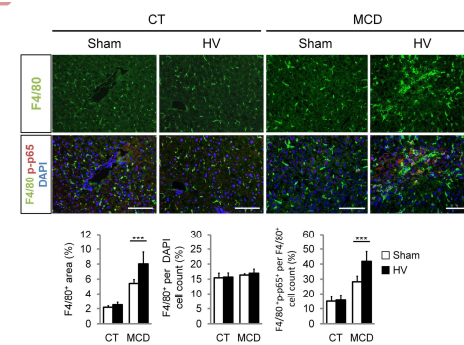


Fig.3



$\alpha 7nAChR$ 刺激は Kupffer 細胞の炎症性応答を抑制する

初代培養 Kupffer 細胞に対して、リポ多糖とパルミチン酸による炎症誘発下に $\alpha 7nAChR$ 作動薬を投与すると、TNF α 、IL-12、MCP-1 に代表される炎症性サイトカインの発現上

昇が抑制された (Fig.4). また, ウェスタンブロットにて $\alpha 7nAChR$ 刺激は NF- κ B のリン酸化の阻害を介して炎症性サイトカインの発現を抑制する機序が示唆された (Fig.5).

Fig.4

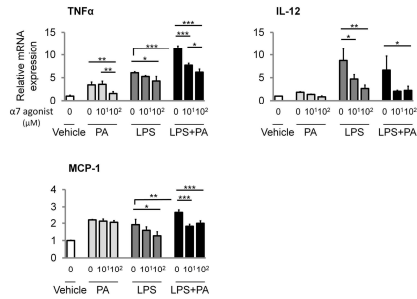
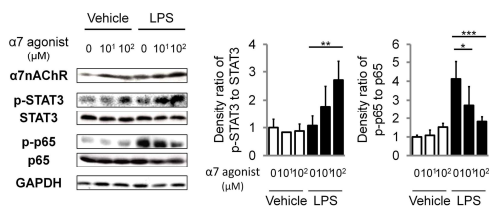


Fig.5



Kupffer 細胞における $\alpha 7nAChR$ 欠損により NASH は増悪する

Kupffer 細胞を特異的に $\alpha 7KO$ に置換したキメラマウスに対して, MCD 食による NASH を誘発した. $\alpha 7KO$ キメラマウスは, 対象の WT キメラマウスに比較して, 組織学的に高度に進展した NASH をきたした (Fig.6). 同マウスの Kupffer 細胞は, NF- κ B のリン酸化亢進を伴う活性化の増強を認めた (Fig.7). その肝臓では TNF α , IL-12, MCP-1 の発現が亢進し, 一方で SREBF-1c の発現亢進に代表される脂質代謝異常の増悪を認めた (Fig.8).

Fig.6

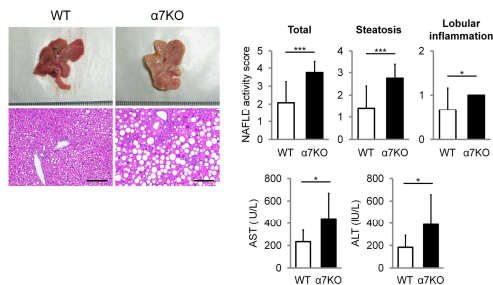


Fig.7

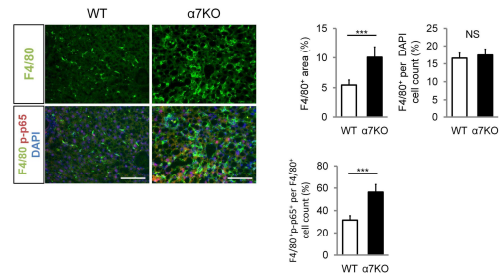
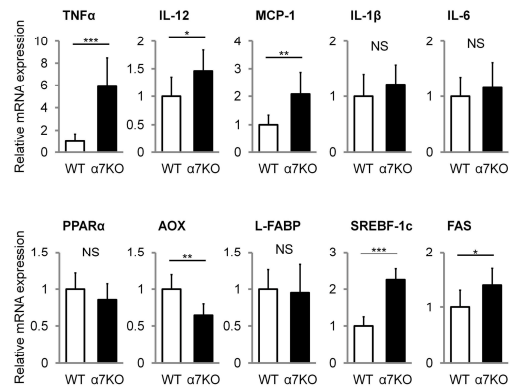


Fig.8



以上より, 肝臓迷走神経は, Kupffer 細胞に対して $\alpha 7nAChR$ を介した炎症制御を行い, 炎症惹起が誘因となる早期の NASH において, その進展の抑制に關与する可能性が示唆された.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Nishio T, Taura K, Iwaisako K, Koyama Y, Tanabe K, Yamamoto G, Okuda Y, Ikeno Y, Yoshino K, Kasai Y, Okuno M, Seo S, Sakurai T, Asagiri M, Hatano E, Uemoto S.

Hepatic vagus nerve regulates Kupffer cell activation via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in nonalcoholic steatohepatitis.

J Gastroenterol. 2017 Jan 2. doi: 10.1007/s00535-016-1304-z. [Epub ahead of print]

PMID: 28044208

査読あり

Okuda Y, Taura K, Yoshino K, Ikeno Y, Nishio T, Yamamoto G, Tanabe K, Koyama Y, Hatano E, Tanaka S, Uemoto S.

Usefulness of Mac-2 Binding Protein Glycosylation Isomer for Prediction of

Posthepatectomy Liver Failure in Patients With Hepatocellular Carcinoma.
Ann Surg. 2017 Jun;265(6):1201-1208. doi: 10.1097/SLA.0000000000001836.
PMID: 27355265
査読あり

Koyama Y, Wang P, Liang S, Iwaisako K, Liu X, Xu J, Zhang M, Sun M, Cong M, Karin D, Taura K, Benner C, Heinz S, Bera T, Brenner DA, Kisseleva T.
Mesothelin/mucin 16 signaling in activated portal fibroblasts regulates cholestatic liver fibrosis.
J Clin Invest. 2017 Apr 3;127(4):1254-1270. doi: 10.1172/JCI88845. Epub 2017 Mar 13. PMID: 28287406
査読あり

Nishio T, Taura K, Koyama Y, Tanabe K, Yamamoto G, Okuda Y, Ikeno Y, Seo S, Yasuchika K, Hatano E, Okajima H, Kaido T, Tanaka S, Uemoto S.
Prediction of posthepatectomy liver failure based on liver stiffness measurement in patients with hepatocellular carcinoma.
Surgery. 2016 Feb;159(2):399-408. doi: 10.1016/j.surg.2015.06.024. Epub 2015 Jul 21. PMID: 26209567
査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

西尾太宏、田浦康二郎、田邊和孝、山本玄、奥田雄紀浩、祝迫恵子、波多野悦朗、上本伸二
肝臓迷走神経遮断は代謝調節および免疫応答制御の異常を介して非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を悪化させる
第 115 回 日本外科学会定期学術集会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田浦 康二郎 (TAURA, Kojiro)
京都大学 大学院医学研究科 講師
研究者番号：80378629

(2)研究分担者

波多野 悦朗 (HATANO, Etsuro)
京都大学 大学院医学研究科 准教授
研究者番号：80359801

上本 伸二 (UEMOTO, Shinji)
京都大学 大学院医学研究科 教授
研究者番号：40252449

(3)連携研究者

(4)研究協力者

西尾 太宏 (NISHIO, Takahiro)
京都大学 大学院医学研究科 大学院生

山本 玄 (YAMAMOTO Gen)
京都大学 大学院医学研究科 大学院生

田邊 和孝 (TANABE Kazutaka)
京都大学 大学院医学研究科 大学院生

奥田 雄紀浩 (OKUDA Yukihiro)
京都大学 大学院医学研究科 大学院生

池野 嘉信 (IKENO Yoshinobu)
京都大学 大学院医学研究科 大学院生