

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15919

研究課題名(和文)慢性肝疾患における肝内自律神経の変化と機能の解明

研究課題名(英文)Changes and functions of liver innervation in chronic liver diseases

研究代表者

水野 恵 (Mizuno, Kei)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：00715394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NASHやウイルス性肝炎といった代表的な慢性肝疾患における肝内神経線維の変化と機能の解明を目的とし、肝生検標本を用いて免疫組織化学染色にて神経線維を同定し、正常肝と比較検討した。これにより、慢性肝疾患では神経線維が減少していることと、肝疾患の原因によって差がある可能性が示された。また、肝線維化が高度な群では、軽度な群よりも有意に神経線維量が減少していたことから、線維化と神経線維量が関連していることが示唆された。更に、C型慢性肝炎の抗ウイルス治療前後で肝生検を施行された症例では、治療後に肝内神経線維量が回復傾向にあることが示され、肝内神経線維の変化は可逆的であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓内の神経線維は肝血流量、胆汁分泌、代謝などの調節を行い、肝線維化にも自律神経系が関わっていると考えられている。

本研究では、ヒトの代表的な慢性肝疾患である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)とウイルス性肝炎の肝生検標本を用いて、肝内神経線維量について検討した。肝線維化が高度な群では神経線維が有意に減少しており、肝炎の原因によっても差があることが示された。抗ウイルス治療により肝線維化が改善した症例では肝内神経線維量も回復しており、肝内神経線維の可逆性が認められた。このことから、慢性肝炎の病態に肝内神経線維が関係している可能性が示唆され、神経系を介した新たな治療法の足掛かりとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the changes and functions of intrahepatic nerve fibers in typical chronic liver diseases such as NASH and viral hepatitis, and compared it with normal liver. We identified nerve fibers by immunohistochemical staining using human liver biopsy specimens. This indicates that there is a decrease in nerve fibers in chronic liver disease and that there may be differences depending on the cause of liver disease. Moreover, in the group with severe fibrosis, the amount of nerve fiber was significantly decreased as compared with the group with mild fibrosis, suggesting that fibrosis and amount of nerve fiber are related. Furthermore, comparison of samples obtained before and after antiviral treatment for HCV demonstrated recovery of the amount of nerve fiber along with improvement of liver fibrosis. It was suggested that changes in intrahepatic nerve fibers were reversible.

研究分野：肝臓内科

キーワード：肝内神経線維 肝神経支配 慢性肝炎 肝線維化

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

消化器疫学において、消化管と自律神経系との関連は古くからよく知られている。また、代謝調節に関する臓器間ネットワークにおいては、肝臓と自律神経系が重要な位置を占めていることが明らかにされている¹。しかし、肝内の自律神経線維の役割に関する報告はこれまで非常に少ない。

肝臓は交感神経と副交感神経の両方の自律神経の支配を受けている。これらの神経線維は、肝門部から肝内に入り、門脈域に沿って分布している²。ヒトの肝臓では、交感神経線維は肝小葉内まで伸びているのに対して、副交感神経は門脈域にしか分布していない³。動物種によって分布が異なっているが、ほとんどの種において、自律神経線維は肝動脈、門脈、胆管を囲むように認められている⁴。

肝内神経線維は、求心性線維により肝内の浸透圧、糖や脂質の濃度などの情報を脳に伝達し、遠心性線維により血流量、胆汁分泌、代謝などの調節を行っていると考えられている²。肝移植において血管や胆管は吻合されるが、神経は切断されたままとなる。その結果、移植後の肝臓は中枢からの神経支配の無い状態と考えられるが、通常、レシピエントの体内で問題なく機能している。しかし、肝移植後のレシピエントでは、肥満、脂質異常、高血圧、糖尿病の合併が多いとの報告がある⁵。これには、脱神経支配による代謝調節の不具合が関与している可能性がある。

一方、肝臓におけるメタボリックシンドロームの表現型として、近年非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が注目されている。病理学的には脂肪沈着や肝細胞の風船様変性が見られるが、これまでにNASH患者の肝内神経線維についての詳細な評価はされていない。マウスでは、肝の迷走神経切断術を施行した後にNASHを誘発する食餌であるメチオニン-コリン欠乏食を与えたところ、コントロールよりもNASHの病態が悪化していたという報告がある⁶。しかし、NASHによる肝内神経線維の変化を検討した報告はない。

C型肝炎に対しては、近年直接作用型抗ウイルス薬（DAAs）の登場により、ほとんどの症例でSVR達成が可能となっている。インターフェロン時代から、HCV除去により肝線維化の改善や発癌率の低下が認められており、DAAsでも同様の効果が期待されている。B型肝炎に対しては、新規の核酸アナログによりHBVの制御がほぼ可能となっている。しかし、比較的研究が進んでいるはずのウイルス性肝炎についても、肝内神経線維に関する十分な検討はされていない。

肝内神経線維は、前述した代謝や血流などの他、肝線維化や肝再生にも関わっていると言われている。肝星細胞は肝傷害時に活性化され、膠原線維を産生する筋線維芽細胞様の形態となる。肝星細胞にはアドレナリン受容体が発現しており、交感神経刺激により肝星細胞の増殖が促進され、線維化の進展に関与していると考えられている⁷。重篤な肝傷害時には肝前駆細胞が活性化して肝細胞に分化するとされるが、交感神経を阻害すると肝前駆細胞の増殖が促され、肝傷害が軽減する⁷。これに対して、迷走神経切断により肝再生が阻害されることが示されている⁸。

このように、肝臓の様々な機能を調節して他臓器との伝達に関わっていると考えられる肝内自律神経と肝疾患との関連を明らかにすることは、肝疾患の治療法の発展に貢献できる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、慢性肝炎における神経線維の分布の変化を解明することを目的とした。そのため、ヒトの肝生検標本における神経線維の分布を、門脈域の全神経線維と交感神経線維で評価した。これを原因疾患ごと、病理学的進展度ごとに検討し、臨床検査値との関連についても検討した。

(2) 慢性肝炎の改善、特に肝線維化の軽快に伴って、肝内神経線維の量も変化するか否かを明らかにすることを第2の目的とした。これについては、C型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療の前後における肝生検標本を用いて、線維化改善とともに神経線維がどのように変化するかを検討した。

3. 研究の方法

(1) (2)-1 対象

当院で2006年から2017年に肝生検を施行した患者のうち、慢性肝疾患としてウイルス性肝炎45例（B型肝炎20例、C型肝炎25例）とNASH35例、および正常肝と診断された5例の肝生検標本を用いた。C型肝炎の症例のうち、初回生検後にインターフェロン単独治療を行われた2例、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法を行われた1例において、治療前後の比較を行った。

患者には入院時に検体保存および研究目的の使用について文書で説明して同意を得ており、更に、本学のホームページで研究概要の告知およびオプトアウトによる研究からの除外の申し出を受け付ける形で、研究参加および撤回の意思を確認した。本研究は、山形大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた（受付番号：2018年度第74号）。

(1) (2)-2 組織化学染色および免疫組織化学染色

肝生検にて得られた標本は、神経の分布を評価するために、免疫組織化学染色を施行した。ホルマリン固定しパラフィン包埋した肝組織を脱パラフィン後に、98°Cで20分間の抗原賦活化処理を行った。全神経マーカーとして抗 protein gene product (PGP) 9.5 ウサギポリクローナル抗体 (1:150, cat# ADI-905-520-1, Enzo Life Science, NY, USA)、交感神経マーカーとして抗チロシン水酸化酵素 (TH) ウサギポリクローナル抗体 (1:250, cat# ab112, Abcam, Cambridge, UK) を一次抗体に用い、室温で50分インキュベートした。その後、二次抗体としてヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (cat# 424151, ニチレイバイオサイエンス、東京、日本) で30分反応させ、DAB法で発色した。線維化および炎症所見については、ヘマトキシリン・エオジン染色、エラスティカ・マッソン染色、銀染色を用い、新犬山分類に沿って評価した。

(1) (2)-3 画像解析と統計解析

免疫組織化学染色を施行した標本をオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE、大阪、日本) にて観察し、画像解析ソフトの BZ-H3C/ハイブリッドセルカウント (KEYENCE、大阪、日本) を用いて管腔を除いた門脈域の面積と門脈域内の神経線維軸索断面積を計測して、神経線維量を推定した。門脈域に占める神経線維の面積比の平均を、標本ごとに算出した。この面積比を疾患ごとに比較し、炎症の程度、線維化の程度、代謝関連の検査値の高低においても比較した。炎症の程度は、新犬山分類による評価と血清 ALT を指標とした。線維化の程度は、新犬山分類を用いた分類、年齢、AST、ALT、血小板数から算出される FIB-4 index と、Mac-2 結合蛋白糖鎖修飾異性体 (M2BPGi) を使用した。代謝関連の検査値としては中性脂肪、総コレステロール、空腹時血糖を用いて、値の高い群と低い群に分けて比較検討した。疾患ごとの比較は 1-way ANOVA および Tukey 多重比較検定、病理学的分類や臨床検査値による比較は t 検定にて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。統計解析には、GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, CA, USA) を用いた。

4. 研究成果

(1)-1 病因ごとの神経面積比の比較

肝内神経線維は、門脈域中の神経線維の面積が占める割合を算出することで定量化した。免疫組織化学染色にて陽性となった神経線維の面積を計測し、門脈域の面積から管腔の面積を引いた値で割ったものを、神経面積比 (Nerve fiber area ratio : NFAR) として表示した (図 1)。

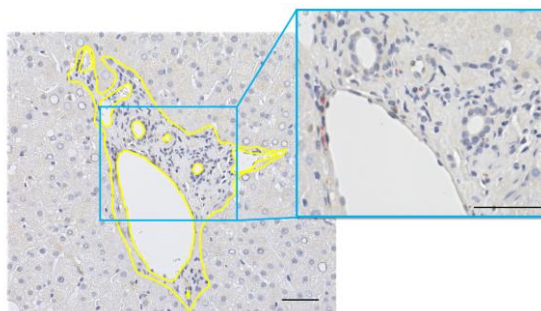


図 1 肝内神経線維の定量

疾患ごとに全神経線維と交感神経線維の面積比を比較したものを図 2 に示す。全神経線維と交感神経線維のいずれにおいても、正常肝はウイルス性肝炎および NASH よりも有意に面積比が高値であった (ウイルス性: $P < 0.0001$ 、NASH: $P < 0.01$)。

このことは、慢性肝炎により神経線維が減少することを示唆している。特にウイルス性肝炎において減少が著しかったことから、病因によって神経線維の傷害程度も異なる可能性がある。

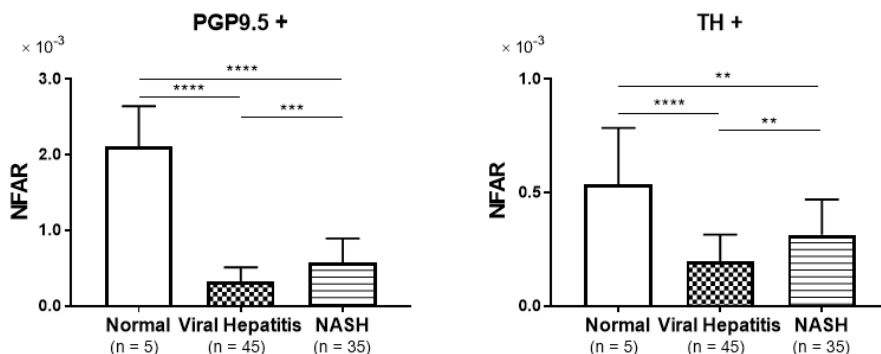


図 2 病因ごとの肝内神経面積比の比較

(1)-2 線維化と神経面積比の関連

線維化と自律神経線維との関連を明らかにするために、新犬山分類において軽度の線維化であるF1と肝硬変であるF4と診断された2群で、神経面積比を比較した(図3A)。全神経線維と交感神経線維のいずれも、F4の方が有意に神経面積比の低下を認めた(いずれも $P < 0.05$)。FIB-4 indexは < 2.67 と > 2.67 の2群に分けて検討した。高度の線維化と考えられるFIB-4 index高値群では、低値群よりも有意に神経線維が減少していた(図3B、PGP9.5+ : $P < 0.05$ 、TH+ : $P < 0.01$)。M2BPGiは疾患によりcut off index (C.O.I.)が異なるが、非ウイルス性肝炎においても高度線維化が疑われる1.5 C.O.I.を超えるものを高値群とし、1.5 C.O.I.未満の低値群と比較した。M2BPGi高値群では、低値群よりも有意に神経線維が減少しており(図3C、PGP9.5+ : $P < 0.01$ 、TH+ : $P < 0.001$)、いずれの指標においても、高度線維化群で神経線維の有意な減少が示された。

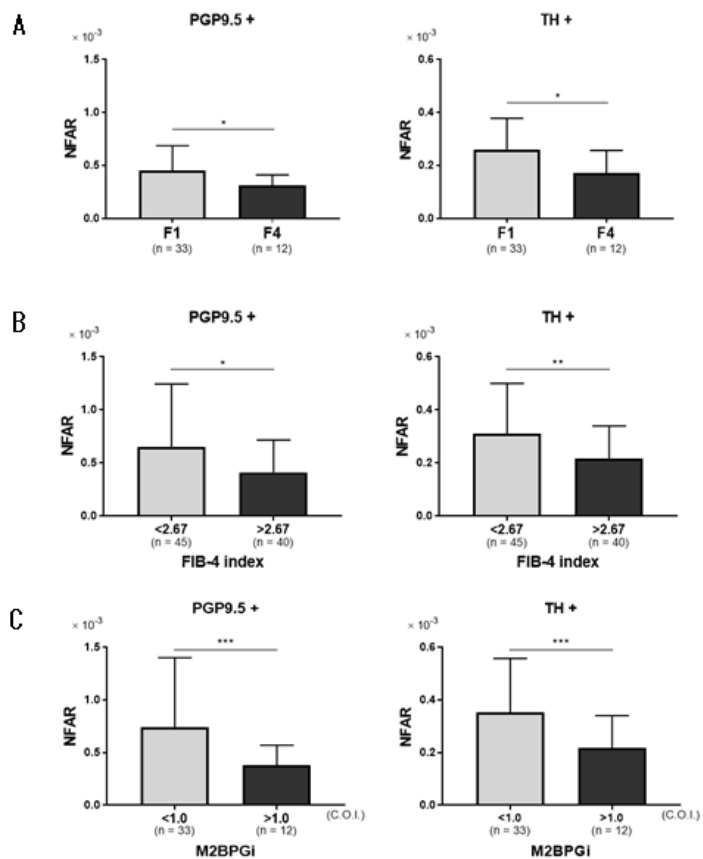


図3 線維化と神経面積比の関連

(1)-3 炎症と神経面積比の関連

慢性肝炎における炎症と神経線維量の関連を評価するため、新犬山分類において軽度の炎症を示すA1と高度炎症のA3で神経面積比を比較したところ、全神経線維も交感神経線維もA3で減少する傾向にあったものの、有意な差を認めなかった(図4A、PGP9.5+ : $P = 0.35$ 、TH+ : $P = 0.08$)。また、ALT値の高い群と低い群でも比較したが、全神経線維と交感神経線維ともに差はなかった(図4B、PGP9.5+ : $P = 0.88$ 、TH+ : $P = 0.90$)。このことから、炎症の程度と神経線維量には有意な関連性が認められなかった。

(1)-4 代謝と神経面積比の関連

代謝と神経の関連については、中性脂肪、総コレステロール、空腹時血糖で評価した。空腹時の中性脂肪が100を超える群と下回る群で神経面積比を比較したところ、全神経線維と交感神経線維とも差はなかった(PGP9.5+ : $P = 0.99$ 、TH+ : $P = 0.67$)。総コレステロール値においても有意な差を認めなかったが、交感神経線維では比較的コレステロール値が高い群で神経線維が多い傾向にあった(PGP9.5+ : $P = 0.72$ 、TH+ : $P = 0.05$)。空腹時血糖の高低による比較では、全神経線維も交感神経線維も有意差を認めなかった(PGP9.5+ : $P = 0.61$ 、TH+ : $P = 0.87$)。代謝異常と神経線維量の

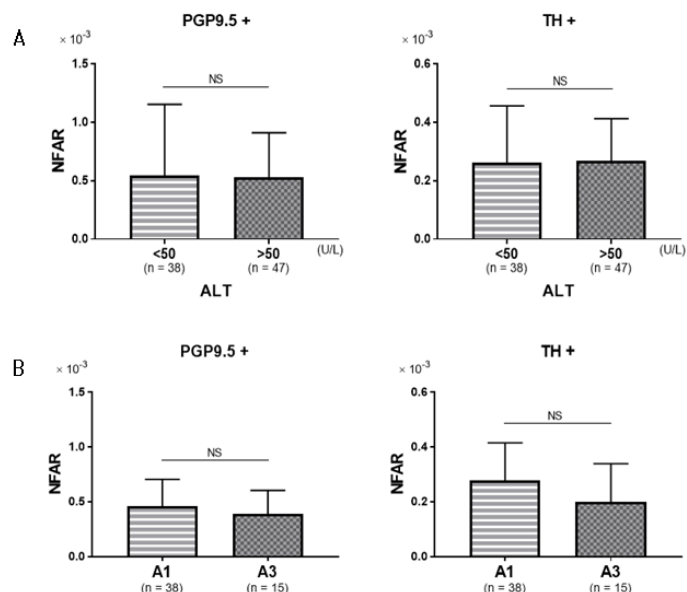


図4 炎症と神経面積比の関連

相関はなさそうであると言える。

以上より、慢性肝炎において自律神経線維は減少傾向となるが、これには炎症や代謝異常よりも線維化との関連が深い可能性が示唆された。

(2) 抗ウイルス治療に伴う神経面積比の変化

C型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療を施行した3例について、治療前後の肝組織の比較を行った。治療の内訳は、インターフェロン単独治療が2例、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法が1例であった。いずれも治療前はF3であったが治療後はF1~F2となっており、組織学的に肝線維化の改善を認めた。

治療の前後における神経面積比を比較したところ、全神経線維は増加傾向にあったが有意な差はなく、交感神経線維は治療前よりも有意に増加していた(図5、PGP9.5+ : $P = 0.09$ 、TH+ : $P < 0.05$)。

このことから、肝線維化の改善により肝内神経線維は回復可能であり、神経による調整能も回復していると考えられた。

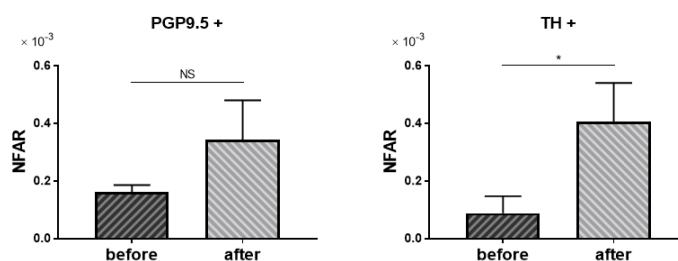


図5 抗ウイルス治療に伴う神経面積比の変化

本研究では、慢性肝炎において肝内自律神経線維が減少し、疾患により減少の程度に差があることを示した。線維化進展例で有意に神経線維が減少しており、線維化の改善に伴って神経線維量も回復することを明らかにした。また、慢性肝炎に伴う炎症よりも線維化の方が神経線維量と関連している可能性が示唆された。

- 1 Uno, K. *et al.* Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science (New York, N.Y.)* **312**, 1656-1659, doi:10.1126/science.1126010 (2006).
- 2 Jensen, K. J., Alpini, G. & Glaser, S. Hepatic nervous system and neurobiology of the liver. *Comprehensive Physiology* **3**, 655-665, doi:10.1002/cphy.c120018 (2013).
- 3 Amenta, F., Cavallotti, C., Ferrante, F. & Tonelli, F. Cholinergic nerves in the human liver. *The Histochemical journal* **13**, 419-424 (1981).
- 4 Fukuda, Y., Imoto, M., Koyama, Y., Miyazawa, Y. & Hayakawa, T. Demonstration of noradrenaline-immunoreactive nerve fibres in the liver. *The Journal of international medical research* **24**, 466-472, doi:10.1177/030006059602400603 (1996).
- 5 Laish, I. *et al.* Metabolic syndrome in liver transplant recipients: prevalence, risk factors, and association with cardiovascular events. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* **17**, 15-22, doi:10.1002/lt.22198 (2011).
- 6 Nishio, T. *et al.* Hepatic vagus nerve regulates Kupffer cell activation via alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology* **52**, 965-976, doi:10.1007/s00535-016-1304-z (2017).
- 7 Oben, J. A. & Diehl, A. M. Sympathetic nervous system regulation of liver repair. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* **280**, 874-883, doi:10.1002/ar.a.20081 (2004).
- 8 Izumi, T. *et al.* Vagus-macrophage-hepatocyte link promotes post-injury liver regeneration and whole-body survival through hepatic FoxM1 activation. *Nature communications* **9**, 5300, doi:10.1038/s41467-018-07747-0 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水野恵、芳賀弘明、仁科武人、富田恭子、奥本和夫、齋藤貴史、上野義之
2. 発表標題 慢性肝炎と肝内神経線維の変化の検討
3. 学会等名 第23回日本肝臓学会大会(JDDW 2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 恵、芳賀弘明、仁科武人、富田恭子、奥本和夫、齋藤貴史、上野義之
2. 発表標題 慢性肝炎における肝内自律神経線維の変化
3. 学会等名 第22回日本肝臓学会大会(JDDW 2018)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuno K, Haga H, Okumoto K, Tomita K, Nishina T, Saito T, Ueno Y
2. 発表標題 Hepatic Fibrosis rather than Inflammation Affects the Intrahepatic Distribution of Nerve Fibers in the Diseased Liver
3. 学会等名 Annual Meeting for American Association for the Study of Liver Diseases(The Liver Meeting 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野 恵、芳賀弘明、仁科武人、勝見智大、奥本和夫、齋藤貴史、上野義之
2. 発表標題 炎症性肝疾患における肝内神経支配の変化
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----