

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08014

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎発症・進展機序における迷走神経肝臓枝の役割についての検討

研究課題名(英文) Study of the role of the vagal liver branch in the onset and progression mechanism of nonalcoholic steatohepatitis.

研究代表者

寺谷 俊昭 (TERATANI, Toshiaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40624408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、肝硬変、肝細胞癌に進行する疾患である。NASH患者が急増する本邦において、NASH病態発症・進展機序の解明しなければならない。そこで、本研究では、NASH病態における迷走神経肝臓枝を役割解明を目的とした。迷走神経肝臓枝を切除するとNASHの肝臓線維化病態を増悪させた。肝星細胞にはムスカリン型アセチルコリン受容体サブタイプ2(mAChR2)が高発現していた。mAChR2欠損マウスでは、野生型マウスと比べて、CCI4およびMCDによる肝臓線維化を増悪させた。肝星細胞のムスカリンシグナルは肝臓線維化に対して抑制的に作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年注目される脳肝相関に着目した。肝臓内の神経線維維持において、肝星細胞が分泌されるグリア細胞由来神経栄養因子が重要な役割を果たすことが本研究により明らかとされた。さらに、肝星細胞内のムスカリンシグナルが活性化および細胞増殖を抑制していることが明らかとなった。これまで、脳からの指令は、肝細胞や免疫細胞に作用することが示されてきたが、本研究により脳から伝播されるシグナルは肝星細胞のような線維芽細胞にも作用することが示された。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a phenotype of lifestyle-related disease in the liver. NASH is a disease that progresses to cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma. In Japan, where the number of NASH patients is increasing rapidly, it is necessary to elucidate the pathogenesis and progression mechanism of NASH. Therefore, in this study, we aimed to elucidate the role of the hepatic vagal branch in NASH pathology. Resection of the hepatic vagal branch exacerbated the liver fibrotic pathology of MCD-NASH. Analysis of neurotransmitter receptor gene expression in hepatic stellate cells revealed high expression of muscarinic acetylcholine receptor subtype 2 (mAChR2). In mAChR2-deficient mice, CCI4 or MCD-induced liver fibrosis was even exacerbated compared to wild-type mice. It was suggested that the muscarinic signal in hepatic stellate cell has an inhibitory effect on liver fibrosis.

研究分野：消化器内科

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 脳肝相関 肝星細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis; NASH)は、肝臓におけるメタボリックシンドロームの表現型と言われており、NASH 患者の一部は、肝硬変さらには肝細胞癌に進行する。すでに、日本人の約 1-2%が NASH に罹患しているとの推察がなされており、飽食の時代を迎え肥満有病率が上昇する我が国において、NASH 患者の更なる増加が見込まれる。そのため、NASH 病態発症・進展機序の解明及び NASH に対する治療法・予防法の確立が期待されている。NASH 病態の背景には肥満・高血圧・インスリン抵抗性・糖尿病・脂質異常症が挙げられている。一方で、肝臓は代謝の中心臓器であるため、肝機能低下は全身の代謝機能を悪化させる。つまり、NASH 病態増悪イベントは肝臓のみならず全身諸臓器で起きており、中枢・神経系を含む諸臓器/諸臓器と肝臓との連携が、NASH 病態発症・進展機序に深く関与する。近年、全身の代謝機能維持における「肝脳相関」の重要性が示され、注目されている。肝臓がエネルギー蓄積状態(脂肪肝)に陥ると、肝エネルギー蓄積信号が自律神経求心路(迷走神経肝臓枝)を通じて脳に伝播される、さらに、脳から交感神経を介して末梢でのエネルギー消費を増加させるというフィードバック機構により、肥満やインスリン抵抗性を予防するという新たなエネルギー代謝ホメオスタシス維持機構の存在が明らかとなった。しかし、これまでの研究において、肝臓から自律神経を通じて発信されたシグナルが、NASH 病態発症・進展においてどのような役割を担っているのかは、明らかとされていない。

2. 研究の目的

我々は、本研究課題に取り組むべく、すでにくつかの予備検討を行ってきた。まず、我々は、肝臓において神経細胞周辺に肝星細胞が密集していることを確認した。次に、NASH モデルマウスを作成し、肝臓における神経細胞活性化を評価したところ、肝臓線維化病態増悪に伴い神経細胞の活性化が減弱していた。さらに、肝臓におけるグリア細胞株由来神経栄養因子(Glial cell line derived neurotrophic factor; GDNF)の発現責任細胞が肝星細胞(Hepatic stellate cell; HSC)であり、肝星細胞の活性化に伴い肝臓 Gdnf 遺伝子発現が消失することを確認した。上記の結果より、肝臓において、肝星細胞を介した神経機能維持機構が存在することが予想される。そこで、NASH 病態における肝星細胞の形質変化(グリア様細胞 筋繊維芽様細胞)が、神経栄養因子の発現低下を介して自律神経依存的な肝脳相関機構を破綻させ、NASH 病態の増悪に寄与する、という仮説を立て、この仮説を立証することを本研究課題の目的とする。

3. 研究の方法

[1] マウス NASH 病態発症・進展における迷走神経肝臓枝の役割についての検討

我々は、マウス迷走神経肝臓枝を外科的に遮断する方法を確立している。C57BL/6 マウス(雄: 6 週齢)に、メチオニン・コリン欠乏食(MCD 食)または通常食のいずれかを 8 週間摂取させた。MCD 食を 8 週間摂取したマウスの迷走神経肝臓枝を外科的に遮断した。コントロール群には開腹のみの偽手術(Sham)を行った。手術 1 週後に、FITC-dextran を用いた腸管透過試験を実施した。迷走神経肝臓枝遮断 2 週後に解剖を行い、各群マウスより、肝臓、大腸、脳及び血清を採取した。上記 NASH 病態モデルマウス肝臓より各種肝臓構成細胞(肝細胞・肝星細胞・クッパー細胞・類洞内皮細胞)を分離した。脂肪肝・肝細胞障害・肝臓線維化病態の差異は、組織学的(HE 染色、Oil Red O 染色、マッソントリクローム染色)、血清学的(ALT、トリグリセライド、コレステロール、エンドトキシン濃度)、遺伝子工学的(Real-time PCR)及び生化学的手法(Western blotting)を用いて網羅的に解析・評価した。

[2] 肝星細胞内ムスカリンシグナルが NASH 肝臓線維化病態に果たす役割についての検討

肝星細胞における神経伝達物質受容体の遺伝子発現は、正常マウス肝臓由来の星細胞を用いて解析した。肝星細胞より RNA を回収した後、リアルタイム PCR を用いて、相対的な遺伝子発現量を評価した。

ムスカリンシグナル欠損マウスに MCD 食を 10 週間摂取させた。摂取開始 9 週間目に FITC-dextran を用いた腸管透過試験を実施した。摂取開始 10 週後に解剖を行い、各群マウスより、肝臓、大腸、脳及び血清を採取した。上記 NASH 病態モデルマウス肝臓より各種肝臓構成細胞(肝細胞・肝星細胞・クッパー細胞・類洞内皮細胞)を分離した。脂肪肝・肝細胞障害・肝臓線維化病態の差異は、組織学的(HE 染色、Oil Red O 染色、マッソントリクローム染色)、血清学的(ALT、トリグリセライド、コレステロール、エンドトキシン濃度)、遺伝子工学的(Real-time PCR)及び生化学的手法(Western blotting)を用いて網羅的に解析・評価した。

ムスカリンシグナル欠損マウス由来の肝星細胞を用いて、in vitro で活性化及び増殖能を評価した。

[3] 神経細胞維持における肝星細胞の役割に関する検討

迷走神経細胞はマウス nodose ganglion より酵素法を用いて回収した。マウスに四塩化炭素を週 3 回のペースで腹腔内に計 12 回投与した。コントロールマウスには、溶媒であるコーンオイルのみを投与した。正常肝もしくは線維化病態肝臓より肝星細胞を分離した。迷走神経細胞を正常肝由来肝星細胞もしくは線維化肝星細胞のいずれかと共培養を行った。播種後の神経細胞の生存率を MTT アッセイで評価した。

4. 研究成果

MCD食をマウスに与えると約10週目でNASH病態を発症するが、迷走神経肝臓枝を切除するとSham群と比して、肝線維化病態の増悪を認めた。肝臓内の線維化マーカー遺伝子であるCollagen 1a1, 1a2および α SMA発現をリアルタイムPCRで確認したところ、いずれの発現量も神経切除群でSham群と比し高値を示した。迷走神経肝臓枝切除により、肝細胞障害のマーカーである血清ALTレベルが有意に増加した。一方で、肝臓内のTNF α およびIL-1bなど炎症性サイトカインレベルは、迷走神経肝臓枝切除群とSham群でほぼ同値を示した。迷走神経切除により、肝臓内のアセチルコリン量が低下した。これらの結果より、迷走神経肝臓枝切除は、肝臓内アセチルコリン量の低下を介して、肝臓線維化病態を増悪させると考えられた。

肝星細胞における神経伝達物質受容体遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法で確認したところ、ムスカリン型アセチルコリン受容体サブタイプ2(mAChR2)が高発現していることを確認した。mAChR2は、肝細胞、クッパー細胞や類洞内皮細胞ではあまり発現しておらず、肝臓内においては肝星細胞がmAChR2の発現責任細胞であった。mAChR2を欠損したマウスを用いて、肝星細胞内のムスカリンシグナルがNASH病態におよぼす影響を確認した。肝星細胞内のムスカリンシグナルの欠損により、MCD食投与による肝臓線維化病態が増悪した。しかし、血清ALTレベルおよび免疫細胞浸潤には野生型とmAChR2欠損で大きな違いを認めなかった。野生型およびmAChR2欠損マウスより肝星細胞を分離して、*in vitro*で肝星細胞の活性化および増殖能を評価した。播種7日後に、肝星細胞は線維芽細胞へと形質変化するが、mAChR2欠損肝星細胞は、野生型と比べ、線維化マーカーであるCollagen 1a1および1a2と活性化マーカーである α SMAの遺伝子発現を有意に強めていた。さらに、細胞増殖能をMTTアッセイで評価したところ、mAChR2欠損肝星細胞は、野生型と比べて、有意に高い増殖能を示した。これらの結果は、肝星細胞のムスカリンシグナルは、NASH肝臓線維化病態に対して保護的に機能していることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Teratani T, Tomita K, Furuhashi H, Sugihara N, Higashiyama M, Nishikawa M, Irie R, Takajo T, Wada A, Horiuchi K, Inaba K, Hanawa Y, Shibuya N, Okada Y, Kurihara C, Nishii S, Mizoguchi A, Hozumi H, Watanabe C, Komoto S, Nagao S, Yamamoto J, Miura S, Hokari R, Kanai T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Lipoprotein Lipase Up-regulation in Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HepatoI Commun.	6. 最初と最後の頁 1098-1112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1383.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koda Y, Nakamoto N, Chu PS, Ugamura A, Mikami Y, Teratani T, Tsujikawa H, Shiba S, Taniki N, Sujino T, Miyamoto K, Suzuki T, Yamaguchi A, Morikawa R, Sato K, Sakamoto M, Yoshimoto T, Kanai T.	4. 巻 129
2. 論文標題 Plasmacytoid dendritic cells protect against immune-mediated acute liver injury via IL-35.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 3201-3213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI125863.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T, Suzuki T, Koda Y, Chu PS, Taniki N, Yamaguchi A, Kanamori M, Kamada N, Hattori M, Ashida H, Sakamoto M, Atarashi K, Narushima S, Yoshimura A, Honda K, Sato T, Kanai T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Microbiol.	6. 最初と最後の頁 492-503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41564-018-0333-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiyohara H, Sujino T, Teratani T, Miyamoto K, Arai MM, Nomura E, Harada Y, Aoki R, Koda Y, Mikami Y, Mizuno S, Naganuma M, Hisamatsu T, Kanai T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Toll-Like Receptor 7 Agonist-Induced Dermatitis Causes Severe Dextran Sulfate Sodium Colitis by Altering the Gut Microbiome and Immune Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol HepatoI.	6. 最初と最後の頁 135-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2018.09.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Y, Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Ojiro K, Chu PS, Taniki N, Saito Y, Teratani T, Koda Y, Suzuki T, Saito K, Fukasawa M, Ikeda M, Kato N, Kanai T, Saito H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Dual effects of the Nrf2 inhibitor for inhibition of hepatitis C virus and hepatic cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-018-4588-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniki N, Nakamoto N, Chu PS, Mikami Y, Amiya T, Teratani T, Suzuki T, Tsukimi T, Fukuda S, Yamaguchi A, Shiba S, Miyake R, Katayama T, Ebinuma H, Kanai T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Intestinal barrier regulates immune responses in the liver via IL-10-producing macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.91980.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Furuhashi H, Irie R, Nishikawa M, Yamamoto J, Hibi T, Miura S, Minamino T, Oike Y, Hokari R, Kanai T.	4. 巻 128
2. 論文標題 Aortic carboxypeptidase-like protein, a WNT ligand, exacerbates nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 1581-1596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI92863.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------