

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17502

研究課題名(和文) 肝硬変の代謝機能再代償化における自然免疫の可塑性制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of the Plasticity of Innate Immunity during Metabolic Re-compensation in Liver Cirrhosis

研究代表者

チヨ ハクショウ (CHU, Po-sung)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80570689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝硬変は依然として「生命予後」のみならず人類の「生命の質」を脅かし続けている。四塩化炭素肝線維化回復マウスモデルを用いて、骨髄由来単球細胞の自然免疫を担うTLR4が蓄積された細胞外基質の消退に寄与するMMP12の発現増強に必須であることを明らかにし、その過程に腸内細菌、特にErysipelotrichaceae属の存在、FXR拮抗能を有する胆汁酸Tauro-MCAの低下、MMP誘導能を有する胆汁酸7-oxo-LCAの増加に関連することを突き止めた。また、肝硬変患者の観察研究を用いてAcute-on-chronic肝不全「再発」と「誘因」に関連する臨床表現型の特徴を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TLR4は肝星細胞におけるTGF-β経路を増強し肝線維化の線維化形成(fibrogenesis)を促進すると知られているが、線維化消退(fibrolysis)に対する影響は不明であった。本研究の結果によって、骨髄由来単球におけるTLR4のfibrolysisの役割が新たに解明されると同時に、生体内の腸内細菌または胆汁酸-FXRを介した制御機構が初めて明らかになり、抗線維化治療の開発に新たな突破点になり得る知見が得られた。また、観察研究より、「急性誘因不明」は肝硬変患者における急性非代償化・ACLFの再発に寄与することが明らかになり、今後橋渡し研究の臨床マーカーになり得る。

研究成果の概要(英文)：Immune cells are key players in both fibrogenesis and fibrolysis. During carbon tetrachloride-induced liver fibrosis resolution. Significant retardation of liver fibrosis resolution was observed as TLR4-signaling was pharmacologically inhibited in vivo. Single-cell transcriptome analysis revealed the emergence of a Tlr4-expressing myeloid cell cluster with a restorative phenotype during resolution. Metagenomic predictive functional profiling demonstrated enrichment of multiple metabolic pathways linking to the significant increase in the proportion of family Erysipelotrichaceae during resolution. Quantitative dynamics of farnesoid X receptor (FXR)-stimulating secondary bile acids (BAs), namely 7-oxo-lithocholic acids, and inhibitory tauro-muricholic acids, were phenotypically correlated with resolution. In addition, we also clarified that vulnerability to recurrent episodes of acute-on-chronic liver failure triggered by indeterminate precipitants in patients with liver cirrhosis.

研究分野：肝線維化

キーワード：自然免疫 fibrolysis 腸内細菌 胆汁酸 acute-on-chronic肝不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「線維化」はあらゆる組織創傷修復の生理的な過程の一部である。慢性持続する組織障害およびそれに随伴する「過剰な線維化」が臓器障害を起こし、臓器機能不全まで進展することがある。慢性肝障害に起因した非代償性肝硬変もその一例である。衛生環境や医療の進歩によって人類の生命予後が確実に進歩する一方、延長された寿命における障害に対する医療資源がより大きな割合を占める問題に直面している。治療の進歩によってウイルス性肝炎の障害生存年数が10年前より著明に低下した一方、「肝硬変」はウイルス性肝炎や肝細胞癌より多くの障害生存年数をもたらす。生命予後の延長は健康生命の延長にならなければならない、特に「慢性肝障害-肝線維化-肝硬変」という病態連鎖において、最初の「原因除去=ウイルス抑制」が肝臓という臓器機能回復に「必須条件」ではあるが「十分条件」ではないことが明白である。肝臓は腸管から消化吸収された栄養や、短鎖脂肪酸、二次胆汁酸など腸内微生物叢の代謝産物およびPAMPs/ DAMPsなどが門脈循環を介して肝臓の代謝・免疫形成に深く影響することから、重要な免疫器官であり代謝の中核臓器でもある。肝臓内のみならず、腸管、脂肪細胞、骨格筋細胞、膵細胞、骨髄、または臓器間関連における自然免疫と代謝経路の相関が注目されるが、肝「代謝機能再代償化」と関連する恒常性維持の研究が未だに欠如している。非代償性肝硬変における「戻らぬ点 (point of no-return)」の存在が伺われるが、その実態は未だに不明である。特に機能障害が著しく損なわれた非代償性肝硬変においては根本的治療法が存在せず、「肝移植」が唯一の根本治療である。ドナー不足の問題や移植後の終身免疫抑制投与、移植後の10年生存率が74%程度と決して高くないことから、最善の治療法とは考えにくい。従っていまだに存在しない「抗線維化・再代償化」の新規治療に挑戦する必要がある。

また、近年、欧米を中心に肝硬変における急性非代償化の自然史に関する臨床研究が進み、Acute-on-chronic liver failure (ACLF)の観点から今後、translational研究に適したend-pointの設定が可能になる可能性が高い。一方、一旦非代償化になった肝予備能が如何に「再代償化」になるかに関する研究がなく、自然免疫との関連を論ずる研究も少ない。このような背景を踏まえて、マウスモデルだけでなく、肝硬変患者の自然史の観察研究を用いて、肝炎・肝線維化の回復期における自然免疫の可塑性が線維化消退・代謝機能回復に対する影響を本研究の標的とする。

2. 研究の目的

「線維化消退・代謝機能回復」という恒常性維持を標的に肝自然免疫の変化を経時的かつ網羅的に調べ、その可塑性による制御機構を同定する。以下の2つの課題に分けられる。

- (1) マウス四塩化炭素肝線維化回復モデルを用いて、線維化消退期における自然免疫の主役の一つであるToll-like受容体4(TLR4)の役割ならびに制御機序を明らかにする。
- (2) 肝硬変患者の急性非代償化およびacute-on-chronic肝不全を観察対象とし、「増悪誘因」と「再度非代償化」との関連を中心に自然史を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス四塩化炭素肝線維化回復モデル研究

今までの申請者による先行研究の結果から、このモデルにおける修復性マクロファージ (Restorative Macrophage)の存在や再現性が確認され、TLR4によるMMP12産生の促進を介し線維化の消退を制御する可能性もある。以下の方法を用いてその制御機序を明らかにする。

TLR4シグナル経路の阻害：肝線維化の回復期において、TLR4の細胞内経路を阻害する TAK-

242 の投与で TLR4 経路が肝線維化消退に与える影響を調べる。

TLR4 ノックアウトマウスを用いて、骨髄移植モデルを作成し、肝線維化消退に重要な TLR4 シグナルの局在（肝臓実質細胞か、骨髄由来細胞か）を同定する。

糞便メタゲノム解析を用いて、肝線維化消退に伴う腸内細菌の質及び機能的変化を同定する。

肝線維化消退期に 4 種の難吸収性抗菌薬の経口投与による腸管内除菌（gut sterilization）で、腸内細菌が肝線維化消退に与える影響を同定する。

肝線維化消退期と正常肝臓において、細胞外基質のリモデリングに必要な MMP 産生の主役である CD11b 陽性単球細胞を単離し、single-cell transcriptome を解析し線維化消退の主役細胞の性質を同定する。

線維化消退期の肝臓内各種胆汁酸受容体の発現を確認し、線維化消退に寄与する胆汁酸経路を同定する。

線維化の自然消退、TAK-242 投与、腸管内除菌における糞便中ならびに門脈血中の胆汁酸を定量し、肝線維化消退との関連を調べる。

肝線維化消退における肝臓内ならびに回腸の胆汁酸-FXR-FGF15 軸の変化を同定する。

無菌マウス（Germ-free）に糞便移植を行い、肝線維化消退の表現型の in vivo 確認を行う。

骨髄由来単球細胞の post-phagocytosis モデルを用いて、TLR4 経路と MMP12 の産生、または FXR を介する胆汁酸の影響を in vitro で検証する。

(2) 肝硬変患者の急性非代償化および acute-on-chronic 肝不全観察研究

2012 年以降、当院当科に入院した 1031 名（2165 回）肝硬変患者を対象に、入院加療の必要とする初回急性非代償化・acute-on-chronic 肝不全における「急性誘因」と「再度非代償化」の関連の臨床特徴を調べた（本研究は当院倫理委員会の承認を得て行われた）。

4 . 研究成果

(1) 骨髄由来細胞の TLR4 シグナルが肝線維化消退を促進する

TLR4 は肝星細胞における TGF- β 経路を増強し肝線維化の線維化形成 (fibrogenesis) を促進すると知られている。本研究は、四塩化炭素の肝線維化消退マウスモデルにおいて、TLR4 の阻害薬である TAK-242 の投与で、肝線維化の残存が増悪し、すなわち、肝線維化の消退 (fibrolysis) が遅延されるという予想外の現象を観察した。肝線維化消退に必要な MMP の主要産生免疫細胞である CD11b 陽性単球を単離し、正常肝の CD11b 陽性単球に比し、single-cell transcriptome の解析では TLR4 の発現が有意に上昇することが判明した。骨髄移植モデルでも、骨髄由来細胞における TLR4 シグナルが肝線維化消退促進させることが明らかになった。一方、腸管内除菌は Wildtype の肝線維化消退を遅延させ、TLR4 ノックアウトマウスには変化をもたらさなかった。糞便メタゲノム解析では、肝線維化消退期に Erysipelotrichaeae 属が有意に増加し、線維化消退自体と腸内細菌の代謝経路の有意な変動と関連した。線維化消退期の肝臓内各種胆汁酸受容体の発現を確認したところ、線維化消退は肝臓内 FXR の発現上昇に有意に寄与した。糞便、門脈血の胆汁酸定量では、肝線維化消退は FXR 拮抗機能を有する胆汁酸 tauro- β -MCA の低下に一致し、7-oxo-LCA の増加に一致した。Germ-free マウスに四塩化炭素を投与し、肝線維化消退期に糞便移植を行った結果、消退期の糞便を移植した個体において肝線維化消退の促進が確認した。最後に、骨髄由来単球細胞に肝細胞 debris を貪食させ、回復性マクロファージに誘導し、TLR4 のシグナルは MMP12 の発現を増強させ、また、7-oxo-LCA は FXR を開始 TLR4 や MMP12 の発現を促進した。

本研究結果は図 1 のようにまとめられる。今まで肝星細胞における TLR4 の fibrogenesis の役割しか解明されていなかった。本研究の結果によって、骨髄由来単球における TLR4 の fibrolysis の役割が新たに解明されると同時に、生体内の腸内細菌または胆汁酸-FXR を介した制御機序が初めて明らかになり、抗線維化治療の開発に新たな突破点になり得る知見が得られた。(Takimoto Y, Chu P-S et al. Submitted)

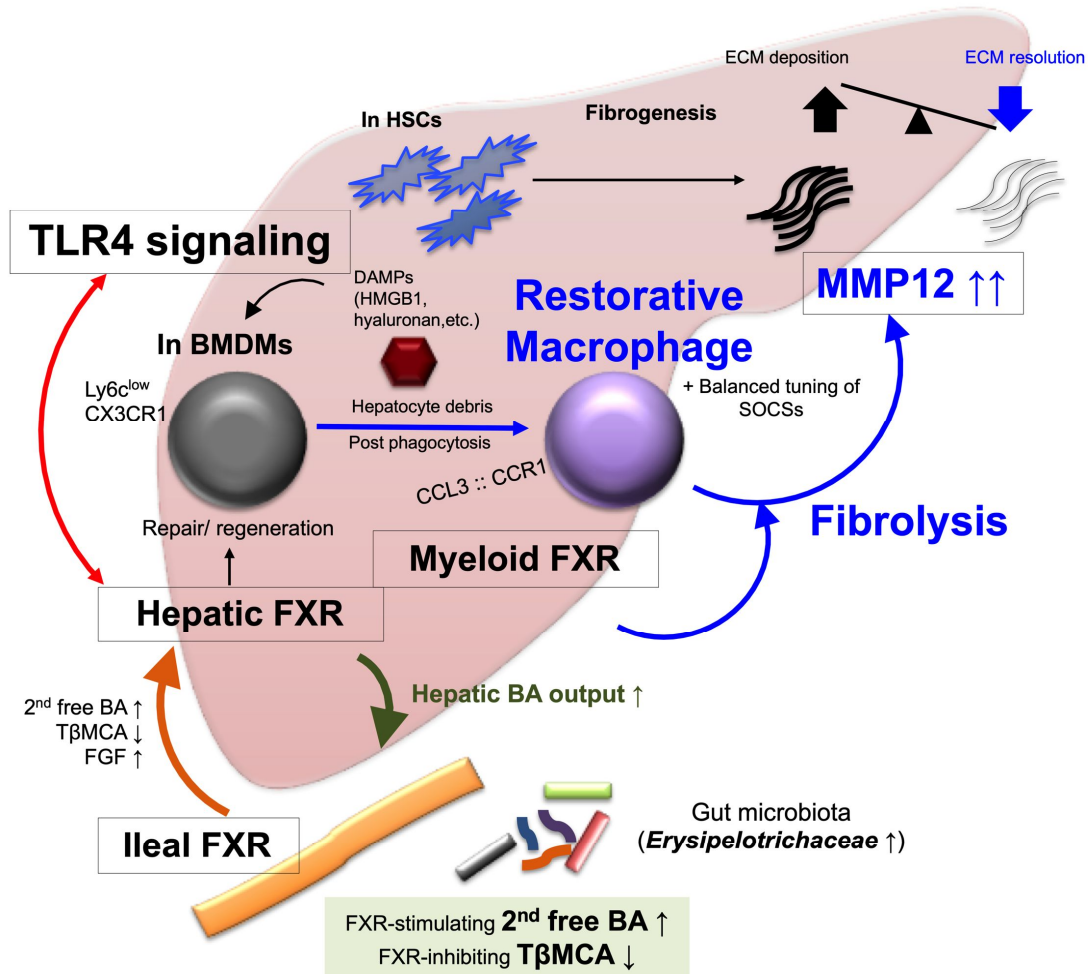


図1

(2) 「急性誘因不明」は肝硬変患者における急性非代償化・ACLFの再発に寄与する
 肝硬変患者を対象とする観察研究では、初回急性非代償化・ACLFの「急性誘因」を網羅的に調べた。細菌感染の180日非移植生存が最も低かったが、competing risk analysisでは、「急性誘因不明」の患者において一度急性非代償化・ACLFが回復しても、約90-110日頃に「再急性非代償化」が有意に多いとの臨床経過が明らかになった(図2)。急性非代償化・ACLFの自然史において不明な点が依然として多く、また、その病態機序も不明である。今回の知見から、肝硬変患者の病態分期がより明確なものとなり、今後のtranslational研究のsurrogate markerになる可能性がある。(Hoshi H, Chu P-S et al. PLOS ONE 2021)

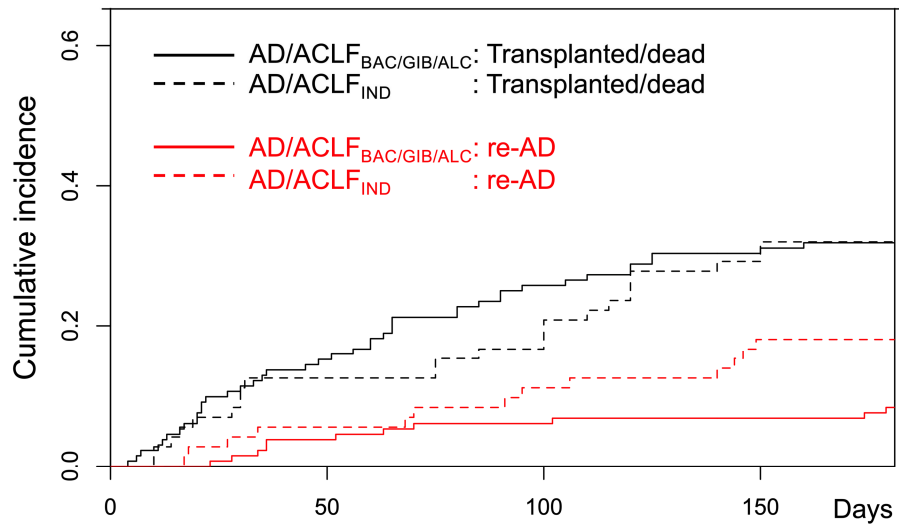


图2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiba Shunsuke, Chu Po-sung, Nakamoto Nobuhiro, Yamataka Karin, Taniki Nobuhito, Ojira Keisuke, Yamaguchi Akihiro, Morikawa Rei, Yoshida Aya, Ikura Akihiko, Ebinuma Hirotooshi, Saito Hidetsugu, Kanai Takanori	4. 巻 20
2. 論文標題 Clinical implications with tolvaptan on monitored bioimpedance-defined fluid status in patients with cirrhotic ascites: an observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	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/s12876-020-01205-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hoshi Hitomi, Chu Po-sung, Yoshida Aya, Taniki Nobuhito, Morikawa Rei, Yamataka Karin, Noguchi Fumie, Kasuga Ryosuke, Tabuchi Takaya, Ebinuma Hirotooshi, Saito Hidetsugu, Kanai Takanori, Nakamoto Nobuhiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Vulnerability to recurrent episodes of acute decompensation/acute-on-chronic liver failure characterizes those triggered by indeterminate precipitants in patients with liver cirrhosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0250062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikura Akihiko, Chu Po sung, Nakamoto Nobuhiro, Ojira Keisuke, Taniki Nobuhito, Yoshida Aya, Shinoda Masahiro, Morikawa Rei, Yamataka Karin, Noguchi Fumie, Hoshi Hitomi, Usui Shingo, Ebinuma Hirotooshi, Kitagawa Yuko, Saito Hidetsugu, Kanai Takanori	4. 巻 4
2. 論文標題 CLIF C Organ Failure Score and Liver Volume Predict Prognosis in Steroid Treated Severe Acute Autoimmune Hepatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takimoto Y., Chu P-s., Nakamoto N., Kanai T.
2. 発表標題 Toll-like receptor 4 signaling in bone marrow-derived macrophages promotes resolution of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis
3. 学会等名 International Liver Congress, EASL (2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hoshi H, Chu P-S, Nakamoto N
2. 発表標題 Clinical features and natural history of acute-on-chronic liver failure precipitated by any indeterminate factor: singlecenter observational study
3. 学会等名 International Liver Congress, EASL (2020) (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------