

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04129

研究課題名（和文）腸肝相関を介したNASH肝線維化溶解メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of NASH resolution via the gut-liver axis for future clinical application

研究代表者

中本 伸宏（NAKAMOTO, NOBUHIRO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：40383749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、高脂肪高コレステロール食の長期摂取に起因する非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の肝線維化病態が、食事の改善によって回復する免疫学的メカニズムを明らかにした。独自に構築したマウスモデルを用いて、NASHの病態回復において「組織常在型メモリーCD8T細胞」が関与していることを発見した。本CD8T細胞が線維化の主要な悪玉とされる肝星細胞をCCR5/CCL5 axisを介して引き寄せ、活性化した星細胞のアポトーシスを誘導し、線維化からの回復を促進していることを明らかとした。本成果により、NASHをはじめとする臓器線維化疾患の新たな治療法や診断薬の開発につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回申請者が見出したTrmは肝線維化修復において特異性、新規性が高く、将来的な治療標的候補として期待される。本研究課題の成果は、これまで明らかにされていない肝臓を中心とする臓器間ネットワークを介したTrmの誘導機序の解明という学術的意義のみならず、NASHの新たなバイオマーカーの確立と、今後の治療応用を見据えたProof of conceptの取得が期待される。さらに、線維化進展は肺線維症や腸管狭窄など肝臓以外の様々な臓器においても有効な治療法が存在せず、一刻も早い病態解明が待たれる領域であり、今後臓器特異性を含めて本研究成果を足がかりとして生体修復に関わる研究の発展と社会貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have identified an immunological mechanism by which the liver fibrosis pathology of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) caused by long-term consumption of a high-fat, high-cholesterol diet is restored by dietary modification. Using an originally constructed mouse model, they found that "tissue-resident memory CD8T cells" are involved in the pathological recovery of NASH. The CD8T cells attract hepatic astrocytes, which are considered to be the main bad cells of fibrosis, via the CCR5/CCL5 axis, and induce apoptosis of activated astrocytes, thereby promoting recovery from fibrosis. These results are expected to lead to the development of new therapeutic and diagnostic strategies for NASH and other organ fibrosis diseases.

研究分野：肝臓免疫

キーワード：脂肪性肝炎 肝臓線維化 線維化修復 組織常在型CD8 T細胞 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【NASH、および NASH 肝癌の増加と対策の必要性】食生活の西洋化と運動不足に伴い、近年日本国内で肥満や生活習慣病を基盤とする肝障害である NAFLD(Nonalcoholic fatty liver disease; 非アルコール性脂肪性肝疾患)や NASH (Nonalcoholic steatohepatitis; 非アルコール性脂肪性肝炎)が増加している。NASH の進行により、他のウイルス性肝疾患と同様に肝硬変への進展や肝臓癌(肝細胞癌 Hepatocellular carcinoma; HCC)の合併が高率に認められることが証明されており、今後ますます増加が予想される生活習慣病の一部としての NASH に対する早期治療介入が急務である。

【NASH に対する薬物治療】従来、NASH に対する治療介入は食事、運動療法が主であり、日本国内で保険適応がある薬物療法はインスリン抵抗性改善薬のピオグリタゾンとビタミン E 製剤のみである。一方、近年 NASH に対する治療薬開発の動きは目覚ましく、脂肪酸代謝、胆汁酸受容体、ミトコンドリア機能異常-アポトーシス、免疫細胞(制御性 T 細胞、炎症性マクロファージ)など数多くの新規治療標的に対する臨床応用が試みられている。

【NASH 進展と腸内細菌】肝臓は門脈や胆管を介して腸管と直接的な交通があり、外来の食物関連抗原や腸内細菌に対する 1st barrier として重要な役割を担っている。食生活の西欧化に伴う腸内細菌叢の変化(dysbiosis)→腸管バリアの破壊→腸内細菌やその代謝産物の腸管外への移行(bacterial translocation)→肝臓における過度の免疫応答→NASH の進展、という仮説のもと、古くから NASH の病因の一つとして腸内細菌の関与が提唱されてきた。近年の腸内細菌の解析技術の進歩により NASH や NASH に関連する HCC に関連する腸内細菌種が複数報告されている(Loomba R, et.al. Cell Metabolism 2017, Yuan J, et.al. Cell Metabolism 2019)。一方、従来のモデルマウス、または患者の便サンプルを用いたメタゲノム解析による検討のみでは、腸内細菌の病態への直接的関与の解明は困難である。

【肝線維化溶解を目指した研究、治療開発の現状、Trm の関与】NASH に対する星細胞を標的とした新規薬剤として、Gelectin3 阻害薬やシンバスタチンを用いた臨床試験が行われている(Harrison SA, et.al. Aliment Pharmacol Ther 2016)。また、四塩化炭素を用いたマウス肝硬変モデルにおいて、Ly6c^{low} マクロファージが肝臓線維化の回復に直接寄与することが報告されている(Ramachandran P, et.al. Proc Natl Acad Sci USA 2012)。申請者のグループはヒト NASH 病態をより正確に再現するために、マウスに高脂肪高コレステロール食(HFHC 食)を 24 週間投与し誘導する新規 NASH モデルを用いた検討をこれまで行ってきた。さらに、肝線維化完成後に HFHC 食を普通食(ND 食)に切り替え 8 週間投与を継続すると肝線維化が組織学的に回復し、その際に肝臓内に CD44⁺CD62L⁻CD69⁺CD8⁺の phenotype を有する Trm 細胞が集積することを見出した。線維化溶解期に抗 CD8 中和抗体を投与し本細胞を除去すると肝線維化溶解がキャンセルされること、逆に肝線維化形成期に本細胞を移入すると線維化進展が抑制されることから、肝線維化を制御する新規細胞標的として Trm に着目した。

2. 研究の目的

NASH に関する学術的背景、および申請者のグループのこれまでの知見をふまえて本申請課題を進展させ、最終的に下記の学術的「問い」を明らかにすることを目的とする。

- (1) 生活習慣病を基盤とする NAFLD 患者において、NASH 進展を規定する真の因子は何か
- (2) 完成した NASH 線維化、肝硬変を回復することは可能か
- (3) NASH 肝線維化溶解の免疫学的視点からみた根幹的機序

特に腸内細菌—Trm—星細胞の三者連関を介した肝臓線維化溶解ニッチの解明

(4) Dysbiosis は NASH の原因か結果か、治療標的、診断バイオマーカーとしての可能性

NASH resolution モデルにおいて CD8 T 細胞の 1 分画である Trm が線維化進展を抑制する機能を有するという予備検討の結果に基づき、モデルマウスにおける肝 Trm の詳細な機能解析と腸肝相関を介した線維化溶解メカニズムの解明を試みる。さらに様々な病期の NASH 患者の臨床検体を用いてマウスの結果を検証し、本細胞を標的とした将来的な治療応用を目指すことを目的とする。

3 . 研究の方法

<研究項目 A> NASH 肝線維化溶解に寄与する肝臓 Trm の機能解析、メカニズムの解明

(1) Resolution 時に増加する肝臓 Trm の機能解析

Resolution マウス肝臓より、CD62L⁺CD44⁺CD8⁺ naïve T 細胞, CD62L⁺CD44⁺CD69⁺CD8⁺ effector memory T (Tem)細胞, CD62L⁺CD44⁺CD69⁺CD8⁺ Trm 細胞を、対照として fibrosis マウス(図 1 HFHC)肝臓より、Trm 細胞をそれぞれフローサイトメトリーで単離し、シングルセル RNA seq 解析などを用いて各 phase の免疫細胞集団の網羅的探索を行う。

(2) Resolution 時に増加する肝臓 Trm の誘導、維持メカニズム、誘導候補因子の探索

(3) Trm の肝線維化溶解メカニズムの解明

<研究項目 B> NASH 肝線維化進展、回復に寄与する腸内細菌の同定

当研究室ではこれまでに原発性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis: PSC)患者の便サンプルを無菌マウスに移植したヒトフローラ化マウスにおいて SPF マウスでは認められない bacterial translocation、肝臓 Th17 誘導が起きることを見出し、同マウスの腸間膜リンパ節から bacterial translocation の原因菌である Klebsiella pneumoniae を分離、さらに本菌が PSC 患者に高率に検出されることを報告した (Nakamoto N, et.al. Nat Microbiol 2019)。本手法を NASH 患者に応用し、下記の方法により NAFLD→NASH 進展に寄与する腸内細菌の同定を試みる。

<研究項目 C> 患者検体を用いた検証、肝線維化 resolution 因子の探索

本項目では、モデルマウスの検討から見出した Trm を含めた NASH resolution 誘導細胞、および誘導因子のヒト肝線維化病態への関与、臨床応用の可能性について、下記の異なる肝疾患患者群の血清(メタボローム解析; 委託) 末梢血単核球(フローサイトメトリー解析)、および肝生検組織サンプル(免疫組織染色)を用いて検証する。

(1) 肝生検で組織学的に診断された F1-F4 期の NAFLD 患者の比較

(2) HCV に対する 抗ウイルス治療によりウイルス排除を達成した C 型慢性肝炎・肝硬変患者のうち、肝線維化改善症例 とウイルス排除後線維化持続症例の比較

4 . 研究成果

肝線維化病態が回復するメカニズムを解明するため、まず NASH 病態の「発症→病態進行→治療による回復」のプロセスをマウスで再現することを試みた。具体的には、マウスに高脂肪高コレステロール食を 24 週間摂食させ NASH 病態および肝線維化を誘導した後、餌を通常食に切り替えて、NASH 病態および肝線維化から回復がみられるか検討した。その結果、通常食に切り替えてからマウスの体重や ALT などの肝臓の炎症マーカーは急激に減少し、また肝臓の線維化からの回復が顕著に認められました。通常食に切り替えてから 8 週間後には体重や ALT、肝臓の線維化は通常マウスと同程度にまで回復した。以上の結果から、食事療法による治療により肝線維化から回復するプロセスを再現したマウスモデルの構築に成功し、マウスにおいて肝線維

化は可逆的であることが示された。

次に肝線維化から回復するメカニズムを明らかにするため、回復する 8 週間で生体においてどのような変化が起きていたのか検討した。既存の報告から線維化の病態形成や回復においてはマクロファージなどの免疫細胞が寄与していることが示唆されていたことから、フローサイトメトリーにより、肝線維化回復期における免疫細胞の動態を網羅的に解析した。その結果、病態誘導によって顕著に増加していた CD8T 細胞が、肝線維化病態は改善しているにもかかわらず、回復期においても残存し続けていることが明らかになった。さらに、この CD8T 細胞が肝線維化からの回復においてどのような役割を果たしているのか検討するため、これらの細胞を除去抗体を用いて特異的に除去し、回復への作用を検討した。興味深いことに、CD8T 細胞を除去したマウスでは、CD8T 細胞を除去していないマウスと比較して、肝線維化からの回復が顕著に遅れていることが明らかとなった。以上の結果から、マウスモデルにおいて、CD8T 細胞が肝線維化からの回復を促進する役割を果たしていることが示された。また、この CD8T 細胞の性質をシングルセルトランスクリプトーム解析などの手法を用いて詳細に解析したところ、血中を循環せずに、組織に留まり続ける「組織常在型メモリー CD8T (CD8+Trm) 細胞」と呼ばれる特殊な CD8T 細胞であることが明らかとなった (図 1)。

また重要なことに、同様の性質を有する CD8T 細胞が、線維化の進展とともに NASH 患者の肝臓組織において増加していることが確認された (図 2)。

次に、肝線維化からの回復で重要であることが明らかとなった CD8+Trm 細胞が回復を促進する詳細なメカニズムの解析を行いました。免疫組織化学染色法を用いた検討の結果、線維化回復期の CD8T 細胞は線維化病態において悪玉の働きを示す肝星細胞と非常に近接して存在することが明らかになった (図 3)。

回復期における CD8+Trm 細胞の遺伝子発現を網羅的に検討したところ、肝星細胞を近くに呼び寄せる作用をもつケモカインを非常に多く産生していることを見出した。肝星細胞の表面にあるこれらのケモカインを感知する受容体 (CCR5) の発現を低下させたところ、CCR5 の発現を低下させたマウスにおいて、線維化からの回復が顕著に遅延した。さらに、CD8+Trm 細胞と肝星細胞の相互作用の詳細を検討したところ

シングルセルRNAseq解析

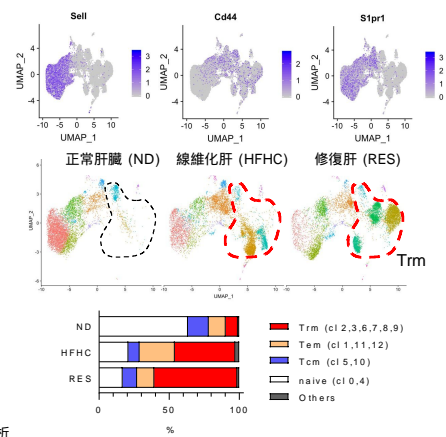
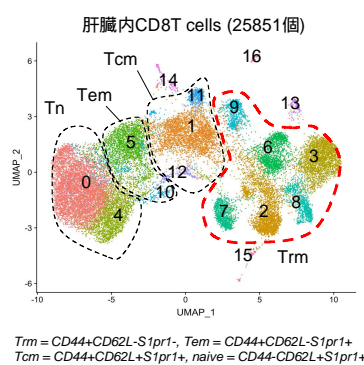


図1: NASH進展、修復期の肝臓 CD8 T細胞のシングルセル解析

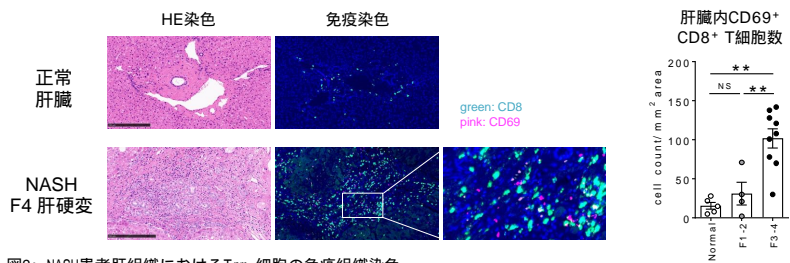


図2: NASH患者肝臓におけるTrm 細胞の免疫組織染色

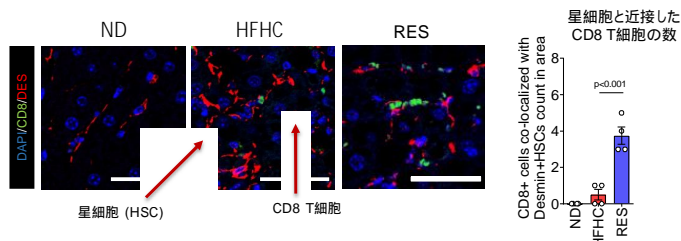
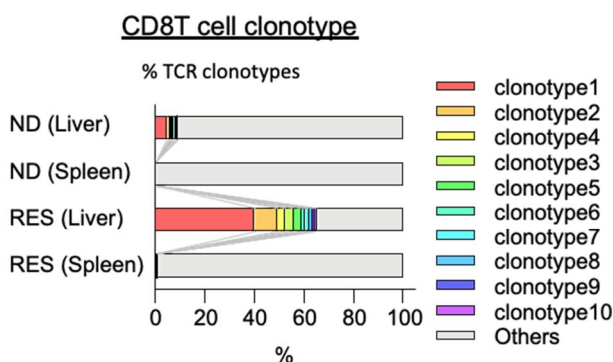


図3: 正常肝、線維肝、修復肝におけるCD8T細胞(緑)と星細胞(赤)の位置関係

る、CD8+Trm 細胞が FasL とよばれるタンパク質を介して肝星細胞の細胞死を誘導していることが判明し、回復期に抗 FasL 抗体を用いてこのシグナルを抑制すると細胞死した星細胞の数が減少し肝線維化の回復がキャンセルされた。以上のことから、CD8+Trm 細胞が肝星細胞と近位に存在し、線維化の悪玉である肝星細胞の細胞死を誘導することで線維化からの回復を促進していることが明らかとなった。

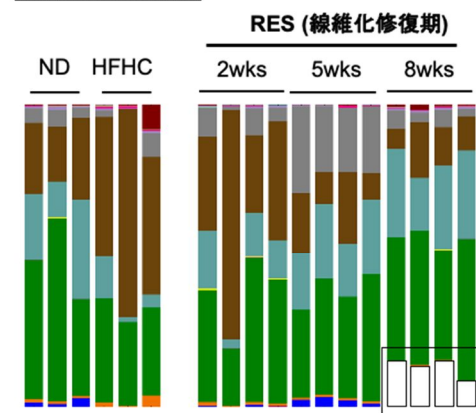
NASH 進展、修復期の CD8 T 細胞のシングルセル TCR-seq 解析の結果、NASH 進展期、修復期に特定の clonotype の TCR が増加することが確認され（図 4 左） 特定の抗原がその分化に寄与する可能性が示唆された。また、NASH 修復モデルマウスにおける腸内細菌の継時的な解析の結果、定常状態(ND)、NASH 完成期(HFHC)、NASH 修復期(RES)で便中の腸内細菌叢の構成は大きく変動した。NASH 線維化が組織学的にほぼ完全に修復した食餌切り替え後 8 週の時点においても腸内細菌叢は定常状態には戻らず、NASH 修復期にビフィズス菌の一種である *Bifidobacterium* 属が増加することを見出した（図 4 右）

TCR seq シングルセル解析



線維化修復期に増加するCD8 T細胞は特定のTCRclonotypeで占められる

腸内細菌叢解析



線維化修復期にビフィズス菌が増加する

図4: NASH resolutionに寄与する自己抗原、腸内細菌の探索

本研究では、ヒト病態プロセスを模したユニークなマウスモデルを用いて、これまでわかっていなかった肝線維化回復の免疫メカニズムを世界に先駆けて明らかにし。現在、NASH や種々の線維化関連疾患において有効な治療薬は開発されていない。今後、本研究で得られた知見を治療に応用するため、CD8+Trm の誘導や維持機構を検証するとともに NASH 患者の臨床サンプルを用いた本細胞の詳細な検討を行う予定である。今回の成果が本疾患に対する細胞療法などの新たな治療法の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koda Y, Teratani T, Chu PS, Hagihara Y, Mikami Y, Harada Y, Tsujikawa H, Miyamoto K, Suzuki T, Taniki N, Sujino T, Sakamoto M, Kanai T, Nakamoto N.	4. 巻 12
2. 論文標題 CD8 + tissue-resident memory T cells promote liver fibrosis resolution by inducing apoptosis of hepatic stellate cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-021-24734-0	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuzo Koda, Nobuhiro Nakamoto, Takanori Kanai
2. 発表標題 Roles of CD8 resident memory T cells in the liver fibrosis resolution
3. 学会等名 第63回日本消化器病学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------