

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08373

研究課題名（和文）臓器透明化技術による肝内神経支配と慢性肝疾患病態形成機序の解明

研究課題名（英文）Intrahepatic innervation and pathogenesis of chronic liver disease

研究代表者

水野 恵（Mizuno, Kei）

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00715394

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）：本研究では、正常肝、ウイルス性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎の肝生検標本を用いて、肝内神経線維の変化と臨床的背景との関連を調査した。全門脈域の面積に対する神経線維の面積比を各標本で算出したところ、慢性肝炎、特にウイルス性肝炎ではこの面積比が著明に低下していた。線維化進展群でも有意に神経面積比の低下が認められた。ただし、炎症の程度では有意な変化は無かった。HCVに対する抗ウイルス治療の前後で得られた肝生検標本を比較すると、肝線維化の改善とともに神経面積比の回復が認められた。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る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、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）とウイルス性肝炎において、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た。また、近年発展してきた臓器透明化技術を用いてマウスの肝内神経線維を観察することも試みた。高度脂肪肝や硬変肝では透明化に至らなかったが、この技術により、これまでより正確に神経線維を定量できると期待される。

研究成果の概要（英文）：The present study investigated changes in hepatic nerve fibers in liver biopsy specimens from patients with normal liver, viral hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis, in relation to clinical background. The areal ratio of nerve fibers to the total portal area was automatically calculated for each sample. The nerve fiber areal ratios (NFAR) was significantly lower in liver affected by chronic hepatitis, particularly viral hepatitis, and this was also the case for advanced liver fibrosis. However, the degree of inflammatory activity did not affect NFAR. Comparison of samples obtained before and after antiviral treatment for HCV demonstrated recovery of NFAR along with improvement of liver fibrosis. It suggests that intrahepatic nerve fibers may be involved in the pathogenesis of chronic hepatitis.

研究分野：肝臓内科

キーワード：肝内神経線維 肝線維化 慢性肝炎

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、特に消化管の運動、体液輸送、内分泌系に関しては自律神経系との関連は古くからよく知られている¹。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が、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。

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³。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⁴。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、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。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、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されている^{5,6}。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。

しかしながら、肝生検標本ではサンプリングエラーの可能性が否定できない。我々は、疾患モデルマウスを作成し、マウス肝の一葉全体での神経線維定量的方法を検討した。近年、臓器透明化技術の進歩が著しいことから、我々はこの技術を生かしてマウス肝を透明化し、神経線維を免疫組織化学染色にて同定して定量することを試みた。

2. 研究の目的

(1) まず、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。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、病理学的な線維化と炎症の進展度、臨床検査値との関連について検討した。

(2) 慢性肝炎の改善に伴って、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。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) マウス肝を透明化し、葉全体での神経線維の定量を行うことを第 3 の目的とした。NASH と肝硬変のモデルマウスを作成し、コントロール群とともに肝臓の透明化を試みた。

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 NASH 35 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℃ 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、METAVIR スコア⁷および Brunt 分類⁸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、病理学的評価と血清 ALT を指標とした。線維化の程度は、病理学的分類の他、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。

(3)-1 疾患モデルマウスの作成

NASH モデルマウスは、FFC 食を 20 週与えて作成した⁹。肝硬変モデルマウスは、四塩化炭素の腹腔内投与を 12 週行って作成した。いずれもコントロール群とともに、灌流固定後に肝臓を摘出した。

(3)-2 臓器透明化および免疫組織化学染色

摘出したマウス肝の一葉を切除し、CUBIC 法および CLARITY 法を用いて、組織透明化を試みた^{10,11}。透明化に成功した組織は、PGP9.5 ウサギポリクローナル抗体 (1:100, cat# P09936, Novus Biologicals, CO, USA) を使用して、室温で 14 日間反応させた。

標本は、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE、大阪、日本) にて観察した。

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)。

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 (ウイルス性いずれも: $P < 0.0001$ 、NASH 全神経: $P < 0.0001$ 、NASH 交感神経 $P < 0.01$)。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。

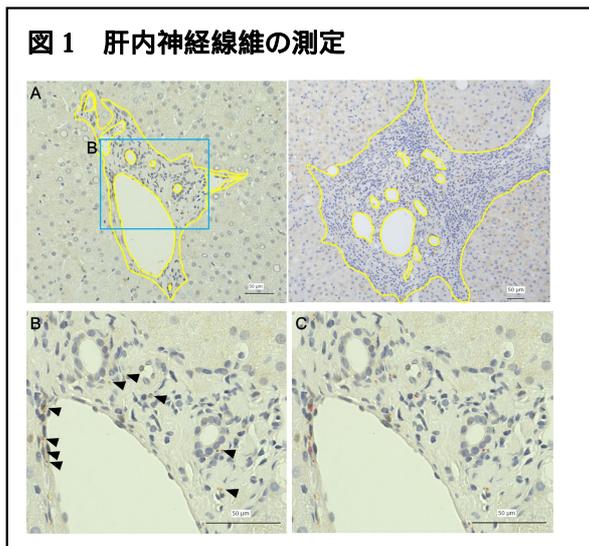


図 1 肝内神経線維の測定

(1)-2 線維化と肝内神経線維の関連

線維化と神経線維との関連を明らかにするために、軽度線維化群と高度線維化群を比較した (図 3)。全神経線維では有意ではないが F4 群が低い傾向にあり、交感神経線維では F4 群の方が有意に NFAR が低下していた ($P < 0.05$)。血小板数が低い群と保たれている群では、低値群で有意に NFAR の低下を認めた (図 3B、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 3C、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

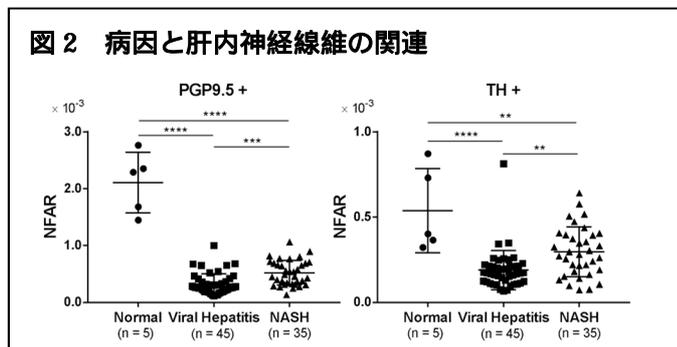
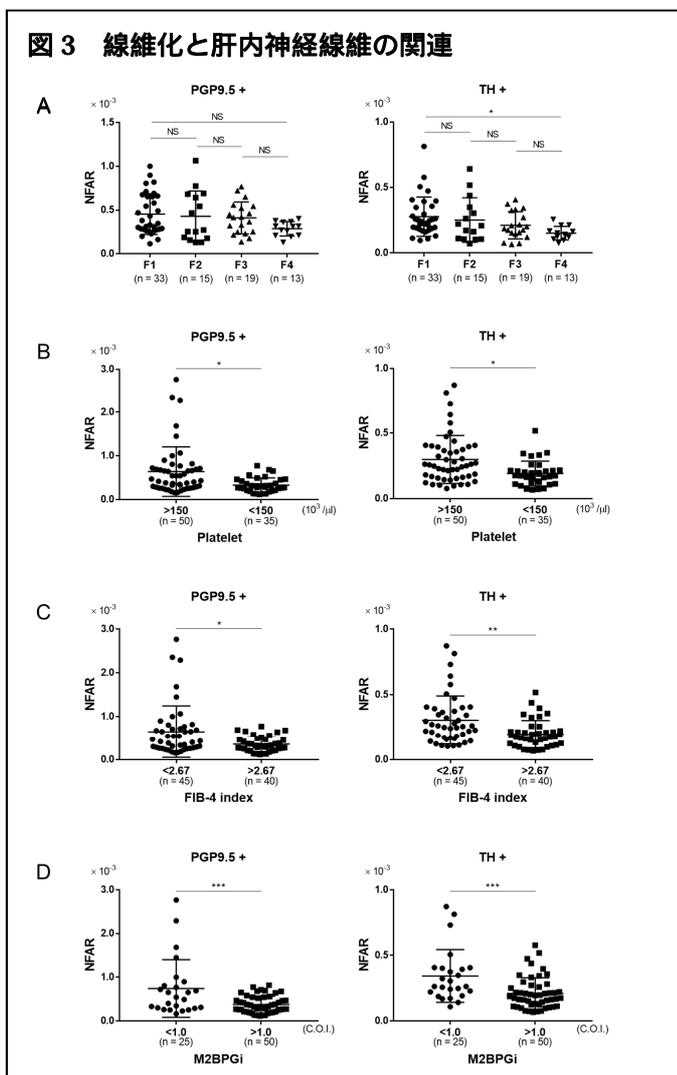


図 2 病因と肝内神経線維の関連

われる 1.0 C.O.I.を超えるものを高値群とし、1.0 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 3D、いずれも $P < 0.001$ ）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。

線維化と神経線維との関連を明らかにするために、軽度線維化群と高度線維化群を比較した（図 3）。全神経線維では有意ではないが F4 群が低い傾向にあり、交感神経線維では F4 群の方が有意に NFAR が低下していた（ $P < 0.05$ ）。血小板数が低い群と保たれている群では、低値群で有意に NFAR の低下を認めた（図 3B、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 3C、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 1.0 C.O.I.を超えるものを高値群とし、1.0 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 3D、いずれも $P < 0.001$ ）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 線維化と肝内神経線維の関連

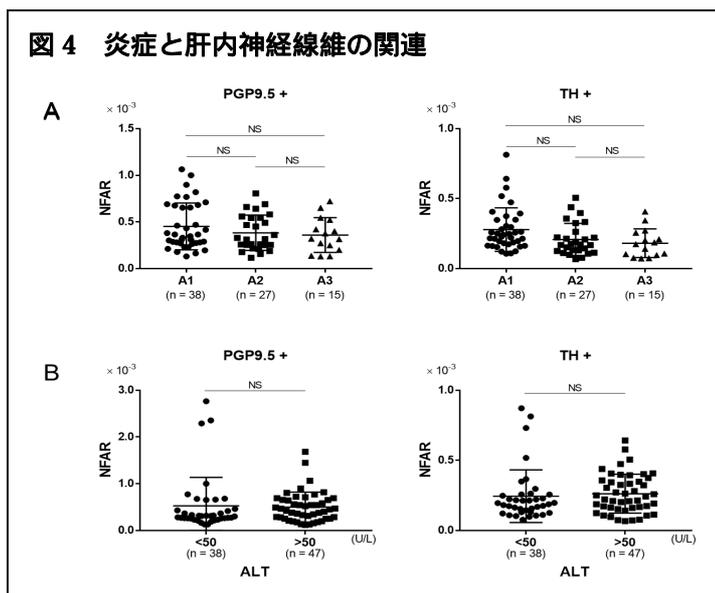


(1)-3 炎症と肝内神経線維の関連

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、病理的に軽度の炎症を示す A1 から高度炎症の 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）。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）。

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。

図 4 炎症と肝内神経線維の関連



(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。総コレステロール値や空腹時血糖の高低による比較でも、有意差を認めなかった。代謝異常と神経線維量の相関はなさそうであると言える。

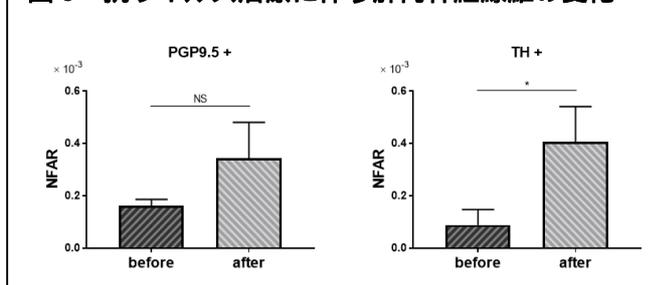
以上より、慢性肝炎において自律神経線維は減少傾向となるが、これには炎症や代謝異常よりも線維化との関連が深い可能性が示唆された。

(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。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。

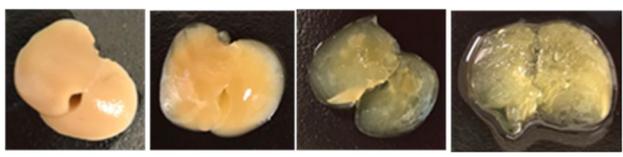
図5 抗ウイルス治療に伴う肝内神経線維の変化



(3) 疾患モデルマウスの作成と肝組織透明化

NASHモデルマウスおよび肝硬変モデルマウスの作成には成功した。正常肝では透明化に成功したが、高度脂肪肝や硬変肝を透明化することは困難で、一見透明化に成功していても組織障害が高度であり、神経線維の同定ができなかった。

図6 マウス正常肝の透明化



肝組織透明化については更なる追求が必要だが、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 Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(5):286-94.
- 2 Jensen KJ, Alpini G, Glaser S. Hepatic nervous system and neurobiology of the liver. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(2):655-65.
- 3 Laish I, Braun M, Mor E, Sulkes J, Harif Y, Ben Ari Z. 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*. 2011;17(1):15-22.
- 4 Nishio T, Taura K, Iwaisako K, Koyama Y, Tanabe K, Yamamoto G, et al. Hepatic vagus nerve regulates Kupffer cell activation via alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology*. 2017;52(8):965-76.
- 5 Oben JA, Diehl AM. Sympathetic nervous system regulation of liver repair. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2004;280(1):874-83.
- 6 Izumi T, Imai J, Yamamoto J, Kawana Y, Endo A, Sugawara H, et al. Vagus-macrophage-hepatocyte link promotes post-injury liver regeneration and whole-body survival through hepatic FoxM1 activation. *Nature communications*. 2018;9(1):5300.
- 7 Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1996;24(2):289-93.
- 8 Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology*. 1999;94(9):2467-74.
- 9 Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: eat, delete, and inflame. *Digestive diseases and sciences*. 2016;62(5):1325-36.
- 10 Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda HR. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*. 2014;157(3):726-39.
- 11 Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*. 2013;497(7449):332-7.

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 Kei Mizuno, Hiroaki Haga, Kazuo Okumoto, Kyoko Hoshikawa, Tomohiro Katsumi, Taketo Nishina, Takafumi Saito, Hideki Katagiri, Yoshiyuki Ueno	4. 巻 16(4)
2. 論文標題 Intrahepatic distribution of nerve fibers and alterations due to fibrosis in diseased liver	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0249556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0249556	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
研究 分 担 者	芳賀 弘明 (Haga Hiroaki) (70466613)	山形大学・医学部・講師 (11501)	

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