

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860559

研究課題名(和文) 肝臓線維化における疾患特異的腸内細菌と腸肝循環マクロファージのクロストーク

研究課題名(英文) The interaction between the intestinal microbiota and hepatic macrophages in the pathogenesis of liver fibrosis

研究代表者

中本 伸宏 (Nakamoto, Nobuhiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40383749

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)：四塩化炭素の腹腔内投与によるマウス肝線維化促進の機序として、CCL25/CCR9を介したマクロファージ、および星細胞の炎症の場への遊走、さらにCCR9陽性マクロファージによるTNF- α およびTGF- β 1依存的な星細胞の活性化が重要であると考えられた。さらにConcanavalin Aの静脈内投与によるマウス急性肝障害モデルにおいて、肝臓への炎症性マクロファージや抑制性樹状細胞の集積に加えて、Bacteroides属、およびLactobacillus属をはじめとする腸内細菌叢の経時的な変化が認められ、肝臓内免疫細胞との相互作用により免疫応答、免疫寛容が巧妙に制御されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We report that TNF- α -producing CCR9+ macrophages infiltrated during the process of CC14-induced liver fibrosis, and CCR9 deficiency protects the liver from overt fibrosis. Liver-infiltrating CD11b+ macrophages from CC14-treated WT mice (CCR9+ macrophages), but not CD8+ T lymphocytes or non-CD11b+ cells, showed a significantly superior ability to activate HSCs over those from CCR9-/- mice in vitro.

Following Concanavalin A administration, a murine model of acute liver injury, in addition to the accumulation of inflammatory macrophages and suppressive dendritic cells in the liver, the composition of intestinal bacterial flora such as Genus Bacteroides and Genus Lactobacillus sequentially changed. Transplantation of fecal microbiota derived from mice post-ConA administration, but not from untreated mice, to gut sterilized mice induced immunosuppressive CD11c+ cDCs in the liver and reduced liver injury by ConA.

研究分野：消化器内科

キーワード：腸内細菌 急性肝障害 肝硬変

1. 研究開始当初の背景

肝線維化・肝硬変は慢性肝炎の終末期の病態で、特に非代償性肝硬変は高率に肝細胞がんの合併、肝不全への進展を認め、生命予後に直結する末期的病態である。肝硬変に対する根本的な治療法は肝移植など特殊な治療法に限られており、免疫学的アプローチからの病態の解明、および内科的新規治療法の開発は我々に与えられた急務といえる。我々はこれまでの研究において、Concanavalin A (Con A)および四塩化炭素(CCl₄)惹起マウス急性肝障害モデルにおいて、ケモカイン受容体の一つである CCR9 陽性 CD11b+F4/80+ マクロファージが TNF- α の産生を介して病態形成に重要な役割を果たすこと (Nakamoto et. al. Gastroenterology 2012) を報告した。CCR9 は腸管ホーミング受容体であり、T 細胞や形質細胞様樹状細胞(pDC)に発現することが知られているが (Hadeiba et.al.Nat Immunol 2008) 炎症性マクロファージ・単球における CCR9 の発現、病態への関与については急性肝障害、慢性関節リウマチ以外に報告がない新規性の高い発見であり、さらなる検討が早急に望まれる。そこで本研究をさらに発展させる目的で、第一に本細胞の肝線維化・肝発癌の病態形成における役割を明らかにする。肝臓における持続的な慢性炎症が線維化、および発癌に寄与することは広く知られており、本細胞による TNF- α 産生を介した Th1 細胞の誘導、ならびに肝線維化の責任細胞の一つである星細胞への直接的関与の両側面から肝線維化への関与を検討する。また第二に、本細胞が肝臓内に遊走される根幹的機序を解明する目的で、特に腸内細菌の病態への関与を追究する。近年炎症性腸疾患や自己免疫疾患の病態に、特定の腸内細菌とその腸内細菌により誘導される免疫担当細胞が関与することが報告されており (Devkota et.al. Nature 2012, Kawamoto et.al. Science 2012) 疾患特異的な腸内細菌に対する免疫応答の概念は国内外で注目されている。我々も Con A 肝炎急性期に特定の腸内細菌が肝臓内に増加し、Toll 様受容体(TLR)-MyD88 依存性に肝障害が惹起されること (Ojiro et.al. BBRC 2010) 無菌マウスにおいて Con A 惹起肝障

害が減弱すること (未発表データ) を見出してきた。これらの知見から、腸管から肝臓内に運ばれた疾患特異的腸内細菌が腸管-肝臓を循環する炎症性マクロファージの遊走を介して急性肝障害や線維化の進展に寄与するという独自仮説に基づいて本研究を遂行する。

2. 研究の目的

CCR9 陽性マクロファージの肝線維化・肝硬変および肝発癌過程における役割

肝炎急性期において CCR9 陽性マクロファージが肝臓内の CCL25 高発現部位に遊走し、TNF- α の産生を介して Th1 細胞を誘導し肝炎を惹起する。一方、肝線維化進展におけるケモカイン/ケモカイン受容体の関与については、CCR1, CCR2, CCR5, CCR8 が促進的に、CX3CR1 が抑制的に寄与することが欠損マウスを用いた検討において報告されているが (Seki et.al. JCI 2009 など)、CCR9 の関与についての報告はなく、またその責任細胞についても明らかにされていない。現在までに予備実験として、マウス CCl₄ 惹起線維化モデルにおいて、肝障害急性期同様に TNF- α 産生能を有する CCR9 陽性マクロファージが肝臓内に増加することを確認している。これらの知見をもとに今回の研究において、CCR9/CCL25 axis の肝線維化への関与を炎症性マクロファージ、星細胞の活性化の側面から追究し、肝線維化進展における既報の他のケモカイン受容体と比較した CCR9 の疾患特異性および優位性、責任細胞の同定、CCR9/CCL25 阻害による肝硬変への治療応用、を検討する。

疾患特異的腸内細菌と肝臓内に遊走する炎症性マクロファージのクロストーク

肝臓は門脈を介して常に食物関連抗原や PAMP など消化管由来の抗原提示を受ける。消化管には 100 兆個以上の腸内細菌が常在し、これらの外来抗原に対する免疫応答、あるいは過剰な免疫反応を抑制する免疫調整機構により生体の恒常性が保たれている。炎症性腸疾患では臨床的に広域抗生剤やプロバイオティクスが有効な症例が存在し、基礎研究においても制御性 T 細胞や Th17 細胞を誘導

する腸内細菌が報告されており (Wu et.al. Immunity 2010)、その病態に腸内細菌が深く関与している。前述のとおり Con A 惹起肝障害は無菌マウスにおいて軽減すること、さらに Con A 投与後に肝臓内に特定の腸内細菌が増加する事実より、肝臓においても腸内細菌の質的・量的異常、あるいは生体側の過剰反応が病態に寄与すると予想される。本研究において、疾患特異的な腸内細菌と炎症性マクロファージのクロストークが肝疾患の病態形成に重要な役割を担っているという独自の仮説に立脚し、免疫応答、免疫寛容、さらに肝線維化の各病態において疾患特異的な腸内細菌の同定を行い、将来的に腸内細菌をターゲットとしたプロバイオティクスの開発を目指す。

腸管-肝臓間を循環する免疫担当細胞が両者の病態に関与しているという本研究の根源的な仮説の基礎的な裏付けとして、腸炎モデルマウスにおいて、腸炎発症と同時に肝臓内への炎症性マクロファージの浸潤を伴う肝障害が認められる現象 (Mikami, Nakamoto et.al. J Immunol under revision) を近年報告した。本研究において GFP マウスを用いた検討により、急性肝障害時に肝臓に遊走する CCR9 陽性炎症性マクロファージの由来、機序を解明する。

3. 研究の方法

CCR9 陽性マクロファージの肝線維化・肝硬変および肝発癌過程における役割

7-8 週齢の雄性 C57BL/6 マウス、および CCR9 欠損マウスを用いて、週 3 回計 6 週間四塩化炭素 (CCl₄) を腹腔内に投与し肝線維化を惹起した。CCl₄ の最終投与の 24 時間後にマウスより肝臓を摘出し以下の検討を行った。

A 単核球の分離、細胞表面染色、細胞内サイトカイン産生能の評価

比重遠心法により肝臓単核球を分離し、CD11b、CD11c、CCR9、CD80、CD86、F4/80、Ly6C 抗体などを用いて細胞表面染色を行い、フローサイトメトリーによる CD11b 陽性マクロファージをはじめとする各細胞分画の Phenotype の解析を行った。さらに LPS 刺激による同細胞の TNF- α 、IL-10 などのサイト

カイン産生能を検討した。

B 組織学的評価

肝臓を摘出後 10%ホルマリンで固定し、HE 染色により肝障害の程度を評価した。肝線維化の程度は Sirius red 染色、および α -SMA 免疫染色により評価した。

C 線維化過程における CCR9、および CCL25 発現細胞の同定、およびその局在

マウス非線維化肝、線維化肝より比重遠心法、および MACS beads を用いて各細胞分画 (マクロファージ、樹状細胞、CD4/8 T 細胞、NK 細胞、肝細胞、類洞内皮細胞、星細胞) を分離した。各細胞より RNA を抽出し、定量的 PCR 法で CCR9、および CCL25 の発現変化を検討した。さらに線維化肝組織の CCR9/F4/80、および CCR9/ α -SMA の免疫蛍光二重染色により CCR9 陽性マクロファージ、CCR9 陽性星細胞の局在を検討した。

D 線維化の評価

肝臓全体、および上述の分離後各細胞分画における TNF- α 、 α -SMA、TGF- β 1、collagen 1 α 1、TIMP-1 などの線維化マーカーの発現を定量的 PCR 法にて評価した。

E CCL25 による遊走能の評価

8 μ m 径の 96 well transwell plate を用いて、上段に野生型、または CCR9 欠損マウスの線維化肝より分離した CD11b 陽性細胞、星細胞を撒き、下段に CCL25 (0-600ng/ml) を添加し、各細胞の遊走能を評価した。

F 共培養による星細胞の活性化

野生型、または CCR9 欠損マウスに CCl₄ を単回投与し、CD11b 陽性マクロファージ、CD8 T 細胞を分離後、野生型マウス肝臓から分離した静止星細胞と共培養を行った。24 時間後免疫細胞を除去し、星細胞の活性化の程度を α -SMA、TGF- β 、collagen 1 α 1、TIMP-1 mRNA の発現により評価した。

疾患特異的な腸内細菌と肝臓内に遊走する炎症性マクロファージのクロストーク

肝障害進展における腸内細菌の包括的な関与を検討するために、急性肝障害モデル、肝線維化、肝硬変を用いて検討を行った。

4. 研究成果

CCR9 陽性マクロファージの肝線維化・肝

硬変および肝発癌過程における役割

線維化肝臓内に急性肝障害時同様に TNF- α 産生能を有する CCR9 陽性 CD11b+F4/80+マクロファージが著明に増加していた。CCR9 陽性 CD11b 陽性マクロファージは CD80、CD86、および Ly6c 陽性で、LPS 刺激による TNF- α 産生能を有していた。CCR9 を発現することが報告されている pDC、NK 細胞、CD8 T 細胞、CD4 T 細胞分画の CCR9 発現を検討したところ、何れの細胞分画においても線維化過程における発現上昇を認めなかった。さらに肝臓内の CCR9 発現細胞を定量的 PCR 法にて詳細に検討したところ、線維化肝のマクロファージおよび星細胞において CCR9 の発現が増加しており、一方 CCL25 発現は類洞内皮細胞においてのみ上昇していた。興味深いことに CCR9 陽性マクロファージ、および CCR9 陽性星細胞は線維化の程度が強い門脈域に共同在していた。CCR9 欠損マウスを用いて同様の検討を行ったところ、野生型と比較して肝臓内の CD11b 陽性マクロファージの数、および CD11b 陽性マクロファージ分画における TGF- β 、 α -SMA、collagen 1a 等の線維化マーカーの発現が減弱していた。その結果、CCR9 欠損マウスにおいて肝線維化が有意に軽減していた。以上の結果より、肝線維化の病態形成における CCR9 陽性マクロファージの関与が示唆された。次に肝線維化病態形成における星細胞の関与を明らかにするために野生型線維化肝より星細胞を分離したところ、非線維化肝由来星細胞と比較し有意に CCR9 発現が上昇しておりこの結果は mRNA の結果と一致していた。さらに CCR9 陽性星細胞は線維化マーカーの発現上昇を認め活性化星細胞の性質を有しており、CCR9 陽性星細胞が線維化に関与していることが示唆された。さらに線維化肝より分離した CD11b 陽性マクロファージ、および星細胞の CCL25 に対する遊走能を検討したところ両細胞共に濃度依存性の遊走能を認めた。重要なことに静止型星細胞は野生型マウス由来の CD11b 陽性マクロファージとの共培養により活性化し線維化マーカーの発現が上昇し、抗 TNF- α 抗体、および抗 TGF- β 抗体の添加により星細胞の活性化は部分的に抑制された。一方野生型マウス由来

CD11b 陰性細胞、または CCR9 欠損マウス由来 CD11b 陽性マクロファージとの共培養では、星細胞の活性化は認められなかった。

疾患特異的腸内細菌と肝臓内に遊走する炎症性マクロファージのクロストーク

A 急性肝障害モデル

肝障害進展における腸内細菌の包括的な関与を検討するために、はじめに Concanavalin A (ConA) 惹起急性肝障害モデルを用いて検討を行った。アンピシリン、バンコマイシン、メトロニダゾール、ネオマイシンの4種類の抗菌薬カクテルを21日間自由飲水する腸管除菌モデル、無菌マウスいずれにおいても対照群と比較して ConA 惹起急性肝障害が抑制され肝障害病態に腸内細菌が関与することが示唆された。ConA 投与後の経時的な腸内細菌の解析の結果、投与1日後の免疫応答期には Bacteroides 属の増加、投与4-7日目の免疫寛容期には Lactobacillus 属の増加が認められた。興味深いことに、21日間の抗菌薬投与による腸管除菌後、免疫寛容期に増加する腸内細菌叢の前投与を行った群において、非投与群と比較して ConA 肝障害が有意に抑制され、腸内細菌により肝臓内免疫応答が制御されている可能性が示唆された。

B 肝線維化、肝硬変、発癌モデル

3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) 経口投与による胆管障害を主病態とする肝線維化・肝硬変モデル、四塩化炭素腹腔内投与による肝障害を主病態とする肝線維化・肝硬変モデルいずれにおいても抗菌薬カクテル投与群において非投与群と比較して肝障害、および線維化の程度は軽度であった。現在 DEN 投与による肝細胞癌発がんモデル(48週間)を含めて検討を行っており、今後肝線維化、発癌に寄与する腸内細菌叢、および肝臓内免疫細胞との相互作用を明らかにする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Nakamoto N and Schnabl N. Does the intestinal microbiota explain differences in the epidemiology of liver diseases between east and the west?

Inflammatory Intestinal diseases 1:
3-8, 2016 査読有

2. Nakamoto N, Kanai T. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. **Front Immunol** 16;5: 221, 2014 (Review) 査読有
3. Chu PS, Nakamoto N,* Ebinuma H, Usui S, Saeki K, Matsumoto A, Mikami Y, Sugiyama K, Tomita K, Kanai T, Saito H, Hibi T. C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in mice. **Hepatology** 58: 337-350, 2013 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. Nakamoto N, Ebinuma H, Chu PS, Taniki N, Amiya T, Yamaguchi Y, Shiba S, Saito H, Kanai T. The gut-liver axis plays a crucial role in murine immune tolerance in the liver. AASLD 2015 (Nov, 2015); サンフランシスコ (米国)
2. Nakamoto N, Ebinuma H, Taniki N, Wakayama Y, Murata H, Chu PS, Yamaguchi Y, Amiya T, Saito H, Kanai T. A distinct role for the TLR9 pathway in immune activation and tolerance during acute liver injury in mice. AASLD 2014 (Nov, 2013); ボストン (米国)
3. Nakamoto N, Ebinuma H, Kanai T, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Mikami Y, Chu PS, Sugiyama K, Saito H, Hibi T. A unique subset of CD11c-positive dendritic cells mediate immunological tolerance via TLR9 in Concanavalin A-induced liver injury in mice. AASLD 2013 (Nov, 2013);

ワシントン DC (米国)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
中本 伸宏 (Nobuhiro Nakamoto)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号: 40383749

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
金井 隆典 (Takanori Kanai)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 40245478