

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02906

研究課題名（和文）肝疾患病態進展による腸-肝臓-脳自律神経反射の破綻が諸臓器に及ぼす影響について

研究課題名（英文）Effects of disruption of gut-liver-brain autonomic reflexes on various organs due to the progression of liver disease pathology

研究代表者

寺谷 俊昭 (Teratani, Toshiaki)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任准教授

研究者番号：40624408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓は代謝および解毒を司る臓器であるため、肝機能低下や肝疾患は消化器、脾臓、心臓、肺、腎臓などの臓器機能や病態形成に深く関与する。特に肝疾患で併発する呼吸器障害は、肝肺症候群と呼ばれ、患者QOLを低下させた上で患者生命そのものを脅かす。慢性的な肝機能の低下により蓄積した血管拡張物質が肝肺症候群の原因とされてきたが、現在までに詳細な病態形成機序は示されていない。そこで、肝臓-脳軸が肺の恒常性に及ぼす影響をマウスモデルで解析した。迷走神経肝臓枝の切除は、肺の2型自然リンパ球を増加させた。この結果は、肝臓病変は求心性迷走神経を通して肺機能等に影響を及ぼすことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓内を走行する神経ネットワークの維持に肝星細胞が重要な役割を果たしていることが明確となった。そのため、肝臓病の発症および進展に伴う肝星細胞の形質変化が、肝臓-脳軸を脆弱にすることで、肺や代謝臓器に対して様々な影響を齎すと想定された。さらに、栄養応答性の求心性迷走神経が代謝疾患制御における重要なターゲットであることが本研究により示唆された。これらのデータは、肝臓病を背景とした肺疾患や代謝疾患に対して有効な治療法提案に繋がると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Since the liver is an organ responsible for metabolism and detoxification, impaired liver function and liver disease are deeply involved in organ function and pathogenesis, including the digestive organs, spleen, heart, lungs, and kidneys. In particular, the respiratory disorder that occurs with liver disease is called hepatopulmonary syndrome, which threatens the patient's life itself in addition to decreasing the patient's quality of life. Although vasodilators accumulated due to chronic hepatic insufficiency have been considered the cause of hepatopulmonary syndrome, a detailed pathogenetic mechanism has not been demonstrated to date. Therefore, we analyzed the effects of the liver-brain axis on lung homeostasis in a mouse model. Resection of the hepatic branch of the vagus nerve increased group 2 innate lymphoid cells in the lung. These results suggest that liver lesions affect lung function and other functions through the afferent vagus nerve.

研究分野：消化器学

キーワード：肝肺相関 迷走神経

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の諸臓器は、各々が独立した器官として機能しているが、個体の恒常性維持には臓器間の相互作用を欠くことができない。この臓器間相互作用を臓器相関と呼ぶ。ある臓器で生じた障害が時間を経て別臓器の障害を惹起させるため、臓器相関を念頭にいった適切な治療がなされない場合、次の臓器へとその影響が伝播し、最終的には多臓器不全へと至る。肝臓は、門脈を介して腸管と直接繋がっており、腸管由来の因子(栄養素や細菌等)に常に暴露される。肝臓は、応答と寛容の適切な免疫バランスを維持しつつ、門脈より流入した外的因子を解毒もしくは代謝することで生体の恒常性を維持する。そのため、肝機能低下や肝疾患が全身諸臓器に影響を及ぼすことは想像に難しくなく、実際に、肝疾患に関連した臓器相関は、肝肺症候群・肝腎症候群・肝脾症候群・門脈亢進症などの病態形成に深く関与する。

肝疾患患者において、息切れなどの呼吸器症状を訴えることが散見される。この肝疾患発病下における呼吸器障害は、主に肝肺症候群(hepatopulmonary syndrome; HPS)と肺高血圧症(pulmonary hypertension; PH)の2つに大別される。HPSは、肝疾患・肺欠陥・低酸素血症の3つの特徴を有している。低酸素血症は肝硬変患者の約15-25%で見られる。一方で、PHは門脈圧の亢進に伴う肺高血圧症であり、門脈圧亢進症患者の2-6%で病態が確認される。HPSおよびPHは、いずれも予後不良の進行性疾患であり、適切な治療を実施しない場合、患者QOLを低下させるだけでなく、患者生命を危険に晒す。上記病態の形成・進展機序として、腸肝循環を介して解毒・代謝されるべき腸内細菌関連因子が肝機能の低下により生体より排除されずに全身循環を経て肺に流入することが原因として想定されるが、その根拠となるデータは乏しく、病態形成機序は漠としている。そのため、これら疾患に対する有効的な治療法は確立されておらず、現状のところ、肝移植が最も有効とされる。

近年、我々のグループは、肝臓が腸管情報を集積・統合し脳へと伝達し、さらに、脳から腸へと情報がフィードバックされる仕組み”腸-肝臓-脳自律神経反射”を世界で初めて発見した(Teratani et al., Nature, 2020)。腸内細菌関連因子による肝臓内神経刺激が迷走神経肝臓枝求心路を介して脳に伝播され、脳からコリン作動性神経(choline acetyltransferase, ChAT陽性神経細胞)を活性化し、腸管免疫に作用した。この迷走神経を外科的に遮断すると、腸管内の制御性T細胞は減少し、大腸炎病態が増悪する。非常に興味深いことに、この自律神経反射の乱れが、腸管のみならず、肺を含むさまざまな臓器の免疫機構を攪乱していることを新たに見出した。また、マウス肝硬変および非アルコール性脂肪肝炎モデルにおいて、肝線維化病態の進展に伴い、肝臓内求心性神経線維の活性化は抑制される。これらの結果は、肝疾患は、肝臓内神経線維を変性もしくは消失させ、腸-肝-脳自律神経反射を破綻させることで諸臓器疾患を形成すると示唆している。つまり、本来、肝臓は循環などを通じて生体環境情報を集積・統合し、生体恒常性維持に必要な情報を脳へと伝達していたが、ひとたび肝臓内に病態が形成されると肝臓内神経構造を維持できなくなり脳への情報伝達経路が遮断される。その結果、腸-肝-脳で構成される自律神経反射が破綻し、肝疾患合併症(肝肺症候群や肝腎症候群など)が発症・進展すると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、”肝疾患合併症における腸-肝-脳自律神経反射の役割の解明”と”肝臓内の神経維持・活性化機構の解明”の2つである。これまで、肝疾患合併症(肝肺症候群や肝腎症候群など)の発症・進展は、腸肝循環を介して代謝されるべき腸内細菌関連因子(液性因子)が肝臓内に蓄積し、それらが血中に漏出することで惹起されると考えられてきた。臓器間のコミュニケーション手段として、液性因子系だけでなく神経系も極めて重要である。そこで、我々は、肝臓を支配する神経と他臓器を支配する神経がどのようにコミュニケーションをとっているのかを世界に先駆けて解析を進めていき、そのネットワーク関連因子を同定していく。同定したネットワーク因子が肝機能、消化管、さらにその他臓器に及ぼす影響を動物モデルで詳細に解析する。加えて、これまで解明されてこなかった肝臓内神経の維持・活性化に関する分子機序を、我々が独自に開発した肝臓内神経のトレーシング技術と神経細胞のシングルセル解析を組み合わせることで解明していく。肝臓を支配する遺伝的・機能的プロファイルを作成し、門脈を通じて肝臓内に流入した腸管環境因子が肝臓内を走行する求心性神経線維を刺激し、脳や末梢にどのようなシグナルを伝えているのか、伝えられた信号がどのような生理的意義をもつのかを理解していく。本研究を通じて、新たに得られた知見・実験手法は、肝臓だけでなく腸管・脾臓・肺・脂肪組織を含む内臓を支配する神経の特性を理解する上でも有効であるため、学術的にも意義深いと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肝臓と脳を繋ぐ神経回路の同定と機能解析

マウス肝臓内に蛍光標識された逆行性トレーサーを投与し、投与1週間後に頸部迷走神経節および後根神経節を回収した。これら神経節を薄切した後、蛍光顕微鏡にて観察を実施した。

迷走神経の神経線維にカプサイシンを塗布することで、求心性迷走神経の除去を行なった。カプサイシンを脊髄注射することにより、後根神経節に含まれる感覚神経の除去を行なった。

## (2) 栄養応答性の求心性迷走神経の除去

TRAP2 マウスの求心性迷走神経節に AAV9-FLEX-DTA\_GFP を感染させた。1 週間の回復期間を設けたのち、これらマウスに 4 ヒドロキシタモキシフェンを腹腔内に投与し、さらに、グルコースもしくは intralipid を用いて求心性迷走神経を刺激した。各種刺激による組換えおよび標的神経の除去効率は、迷走神経節内の GFP 陽性細胞を観察することで評価した。

## (3) 肝星細胞の単離・培養

マウスを開腹後、門脈より細胞分散液(プロテアーゼ・コラゲナーゼ溶液)で注入した。灌流後、マウスより肝臓を摘出した。これらの肝臓より、パーコール密度勾配法を用いて、肝星細胞が含まれるフラクションを回収した。回収後、細胞培養皿に播種し、播種後 1 日までの細胞を非活性型とし、播種 7 日後の細胞を活性型として実験に使用した。

## (4) 肺免疫細胞の解析

マウスより回収した肺を細切したのち、gentleMACS Dissociator を用いて、肺組織を分散した。分散液を用いて、パーコール密度勾配を実施して、免疫細胞のフラクションを回収した。

## 4. 研究成果

脳と肝臓を結びつける求心性神経を同定するため、肝臓内に Alexa488 で標識された逆行性トレーサー(wheat germ agglutinin)を注入した。1 週間後にマウスの迷走神経節および後根神経節を観察すると、左迷走神経節および後根神経節 Th4 で陽性細胞が確認された。このことは、肝臓内の環境情報は、左側迷走神経および脊髄感覚神経を通じて、脳に伝達されることを示唆する。そこで、求心性迷走神経と脊髄感覚神経を各々の薬理的に除去した。カプサイシン塗布により左側求心性迷走神経を除去すると、肺の 2 型自然リンパ球(ILC2)が有意に微増したのに対して、脊髄感覚神経の遮断を肺の ILC2 の割合に影響を及ぼすことはなかった。そのため、求心性迷走神経の脱落は、肺免疫や肺疾患形成に何らかの影響を及ぼすことが想定された。

次に、肝臓病態モデルを作製し、肝臓病態が肝臓内を走行する求心性神経に対して及ぼす影響を確認した。マウスに腹腔内に四塩化炭素を慢性的に投与すると、肝臓内に線維化病態が形成される。肝臓線維化病態の発症・進展に伴って、門脈周辺を走行する神経線維の脱落が観察された。非常に興味深いことに、肝星細胞のマーカー遺伝子である Glial fibrillary acidic protein (GFAP)を発現する細胞が、門脈周辺の神経細胞を取り囲んでいることが観察された。そこで、肝星細胞と神経細胞の相互作用を確認するため、in vitro 共培養を実施した。まず、迷走神経節由来のニューロンを正常肝臓由来の肝星細胞と共培養を行なった。迷走神経節由来のニューロンを単独で培養すると、これら細胞は、時間経過に伴い細胞死を引き起こし、培養開始 4 日目までに死滅した。一方で、肝星細胞との共培養を行うと、ニューロン細胞数の減少が、有意に抑制され、培養開始 4 日目においては、約半数の細胞が生存していた。しかし、線維化肝臓由来の肝星細胞は、正常肝臓とは異なり、ニューロンの細胞死抑制効果を示さなかった。肝星細胞は線維化病態の進展に伴い、脂肪的を蓄積した細胞から膠原線維を産生する線維芽細胞へと変遷する。そこで、星細胞の遺伝子発現を網羅的に解析すると、活性化に伴って、神経栄養因子の 1 種であるグリア細胞株由来神経栄養因子が著名に減弱した。このことから、肝臓線維化病態に進展に伴う肝星細胞の形質変化が肝臓内の神経ネットワークを脆弱にさせることが示唆された。

最後に、栄養因子に応答する求心性迷走神経が非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の発症・進展における役割を解析した。具体的には、TRAP2 マウスを用いてグルコースもしくは intralipid に応答する求心性迷走神経に対して hM3Dq を発現させた。これらマウスに高脂肪・高コレステロール食(HFHC 食)を与えて NASH 病態を発症させた。人為的な神経活性化を行うため、DCZ を含んだ飲料水をマウスに試験期間中与えた。HFHC 食摂餌群のマウスは、通常食摂餌群と比較して、著名な体重増加・耐糖能異常・肝臓線維化を特徴とした NASH 病態を呈した。一方で、脂質に応答する求心性迷走神経を化学遺伝学的に強制的に活性化させると、非刺激群と比較して、摂餌量および体重の顕著な低下を認め、耐糖能障害の改善および肝臓病に対する保護作用を示した。

これらの結果より、肝臓と脳を繋ぐ求心性迷走神経は、肝臓のみならず肺臓や代謝臓器の機能に制御に関わることが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takimoto Y, Chu PS, Nakamoto N, Hagihara Y, Mikami Y, Miyamoto K, Morikawa R, Teratani T, Taniki N, Fujimori S, Suzuki T, Koda Y, Ishihara R, Ichikawa M, Honda A, Kanai T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Myeloid TLR4 signaling promotes post-injury withdrawal resolution of murine liver fibrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106220.	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 Tanemoto S, Sujino T, Miyamoto K, Moody J, Yoshimatsu Y, Ando Y, Koya I, Harada Y, Tojo AO, Ono K, Hayashi Y, Takabayashi K, Okabayashi K, Teratani T, Mikami Y, Nakamoto N, Hosoe N, Ogata H, Hon CC, Shin JW, Kanai T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Single-cell transcriptomics of human gut T cells identifies cytotoxic CD4+CD8A+ T cells related to mouse CD4 cytotoxic T cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 106220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.977117.	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 Irie E, Ishihara R, Mizushima I, Hatai S, Hagihara Y, Takada Y, Tsunoda J, Iwata K, Matsubara Y, Yoshimatsu Y, Kiyohara H, Taniki N, Sujino T, Takabayashi K, Hosoe N, Ogata H, Teratani T, Nakamoto N, Mikami Y, Kanai T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Enrichment of type I interferon signaling in colonic group 2 innate lymphoid cells in experimental colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 982827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.982827.	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 Koda Y, Nakamoto N, Chu PS, Teratani T, Ueno A, Amiya T, Taniki N, Chiba S, Miyamoto K, Sakamoto M, Kanai T.	4. 巻 7
2. 論文標題 CCR9 axis inhibition enhances hepatic migration of plasmacytoid DCs and protects against liver injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e159910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.159910.	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 Teratani T, Mikami Y, Kanai T.	4. 巻 34
2. 論文標題 Neuroimmune crosstalk in the gut and liver.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 475-484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac033.	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, Ichikawa M, Teratani T, Kanai T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Th17 cells in the liver: balancing autoimmunity and pathogen defense.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Semin Immunopathol.	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) 10.1007/s00281-022-00917-9	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 Matsubara Y, Kiyohara H, Teratani T, Mikami Y, Kanai T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Organ and brain crosstalk: The liver-brain axis in gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropharmacology.	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) 10.1016/j.neuropharm.2021.108915	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 Yamaguchi A, Teratani T, Chu PS, Suzuki T, Taniki N, Mikami Y, Shiba S, Morikawa R, Amiya T, Aoki R, Kanai T, Nakamoto N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Hepatic Adenosine Triphosphate Reduction Through the Short-Chain Fatty Acids-Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -Uncoupling Protein 2 Axis Alleviates Immune-Mediated Acute Hepatitis in Inulin-Supplemented Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatol Commun.	6. 最初と最後の頁 1555-1570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1742	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, 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 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 4474
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, Wada A, Sugihara N, Higashiyama M, Inaba K, Horiuchi K, Hanawa Y, Nishii S, Mizoguchi A, Tanemoto R, Ito S, Okada Y, Kurihara C, Akita Y, Narimatsu K, Watanabe C, Komoto S, Oike Y, Miura S, Hokari R, Kanai T.	4. 巻 51
2. 論文標題 Angiopoietin-like protein 4 deficiency augments liver fibrosis in liver diseases such as nonalcoholic steatohepatitis in mice through enhanced free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 580-592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13603	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺谷俊昭
2. 発表標題 腸管を介した糖嗜好性制御機構
3. 学会等名 第58回 糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺谷俊昭、宮本健太郎、金井隆典
2. 発表標題 宿主の糖嗜好形成における 小腸上部菌の役割に関する検討
3. 学会等名 第61回 日本小腸学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺谷俊昭
2. 発表標題 腸管を介した糖嗜好性制御機構
3. 学会等名 第66回 日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺谷俊昭、三上洋平、須永将梧、金井隆典
2. 発表標題 迷走神経で繋がれた「腸-肝臓-脳軸」による腸管恒常性維持機構の解明
3. 学会等名 第60回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2023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