慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	肝線維化を抑制するRestorative Macrophageの誘導機序の解明
Sub Title	Mechanisms for the induction of anti-fibrotic restorative macrophage in the liver
Author	Chu, Po-sung 海老沼, 浩利(Ebinuma, Hirotoshi) 瀧本, 洋一(Takimoto, Yōichi)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	肝線維化消退マウスモデルを用いて、今まで肝線維化を増悪させるとされる自然免疫応答を担う重要な分子TLR4の全肝臓発現量は肝線維化消退期における発現上昇という現象を発見した。TLR4-Trem2を介する修復性マクロファージ (Restorative Macrophage) の誘導機序を突き止め、更に腸管除菌モデルにてTLR4リガンドが腸管由来である可能性や、また、同マウスモデルおよびHCV駆除後のヒト検体でTGFβ/Foxp-3+制御性T細胞の上昇を認めることから肝再生・肝内免疫細胞微小環境の回復との関連も示した。TLR4が肝線維化消退に寄与するという未だに報告されていない機序の存在が示唆された。 Liver cirrhosis, the end-stage of any chronic liver disease, is the leading cause of mortality and disability globally. By using murine liver fibrosis resolution models, we demonstrate that TLR4, which generally considered as pro-inflammatory and pro-fibrogenetic, also play a key role in fibrosis resolution, especially is mandatory for restorative macrophage induction through the TLR4-trem2 pathway. Through the gut-liver axis, TLR4 ligands needed for this process are provided. Subsequent liver regeneration are influenced by TGF-β/Foxp3+ Treg induced during fibrosis resolution. Our findings might provide critical insight to restorative macrophage induction as a novel anti-cirrhotic therapy in the future.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K09373 研究分野：肝臓病学、肝線維化、肝不全
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K09373seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０９３７３

研究課題名（和文）肝線維化を抑制するRestorative Macrophageの誘導機序の解明

研究課題名（英文）Mechanisms for the induction of anti-fibrotic restorative macrophage in the liver

研究代表者
チョ　ハクショウ（Chu, Po-sung）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：８０５７０６８９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：肝線維化消退マウスモデルを用いて、今まで肝線維化を増悪させるとされる自然免疫応答を担う重要な分子TLR4の全肝臓発現量は肝線維化消退期における発現上昇という現象を発見した。TLR4-Trem2を介する修復性マクロファージ(Restorative Macrophage)の誘導機序を突き止め、更に腸管除菌モデルにてTLR4リガンドが腸管由来である可能性や、また、同マウスモデルおよびHCV駆除後のヒト検体でTGFβ/Foxp-3+制御性T細胞の上昇を認めることから肝再生・肝内免疫細胞微小環境の回復との関連も示した。TLR4が肝線維化消退に寄与するという未だに報告されていない機序の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
全世界で肝硬変に関連する死亡者数は年間約200万人と推計される。肝疾患原因の排除だけでなく如何に肝線維化を消退させるのが重要な課題である。本研究は自然免疫応答を担うTLR4が肝線維化の消退期にも発現増加することから、TLR4における肝線維化の消退を制御するという未だに報告されていない新しい機序の存在を明らかにし、肝線維化を抑制する修復性マクロファージ(Restorative Macrophage)の誘導に自然免疫や腸肝関連の重要性を示唆した。「肝星細胞が肝線維化の中枢である」という昨今の規定概念を超え、修復性マクロファージ誘導を治療標的とする肝硬変の根本的な治療方法の開発に繋がると考えた。

研究成果の概要（英文）：Liver cirrhosis, the end-stage of any chronic liver disease, is the leading cause of mortality and disability globally. By using murine liver fibrosis resolution models, we demonstrate that TLR4, which generally considered as pro-inflammatory and pro-fibrogenetic, also play a key role in fibrosis resolution, especially is mandatory for restorative macrophage induction through the TLR4-trem2 pathway. Through the gut-liver axis, TLR4 ligands needed for this process are provided. Subsequent liver regeneration are influenced by TGF-β/Foxp3+ Treg induced during fibrosis resolution. Our findings might provide critical insight to restorative macrophage induction as a novel anti-cirrhotic therapy in the future.

研究分野：肝臓病学、肝線維化、肝不全

キーワード：肝線維化　マクロファージ　自然免疫

１．研究開始当初の背景

肝硬変は、肝臓におけるあらゆる慢性持続性炎症に対する創傷治癒に伴う線維化が進行した終末型である。全世界で肝硬変に伴う死亡者数は年間約 100 万人にのぼり、肝硬変に関連する肝発癌などにより更に 100 万人の死亡が推計される(*BMC Medicine 2014*)。また、世界疾病負荷研究2013年の最新統計によると、肝硬変は544,600年の損失生存年数(years of life lost, YLL)をもたらし、肝炎(444,100 年)や肝癌(190,600)を大きく上回っている(*Lancet 2015*)。現在、日本の肝硬変患者は推定 40-50 万人であり、年間 3 万人の肝癌関連死亡のうち 8 割程度は肝硬変を合併し、一方肝癌を合併しない肝硬変関連死亡は年間 1 万 7 千人である(日本肝臓学会　肝がん白書平成 27 年度)。肝線維化から肝硬変の移行率を年率 5%とし 30 年かけて肝硬変になるとすると、肝硬変の危険にさらされる進行した肝線維化患者はその 5 倍にあたる 200 万人程度と概算される。近年抗ウイルス治療の進歩が著しい C 型慢性肝炎においても、ウイルスの排除後に肝線維化が進行する症例が 2 割程度程存在する(*Hepatology 2012*)。今後本邦においても非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)やアルコール関連肝障害の患者数はますます増加することが予想され、また原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎等未だに病因、病態が解明されず根本的な治療が存在しない原因不明の肝疾患もある。上記の背景のもと各肝疾患の原因の排除に加えて如何に肝炎、および肝線維化を消退させ、将来的な肝硬変、発癌進展を抑制するかという問題が、我々肝臓専門医が対峙すべき重要な課題である。

我々は現在までに免疫細胞の腸管への遊走に関与するケモカイン受容体 CCR9 に着目してきた。まず、CCR9 陽性マクロファージが Th1 細胞誘導を介して急性肝炎の病態形成に根幹的な役割を果たすことを見出し、(*Gastroenterology 2012*)、その後、本研究代表者が中心となり活性化肝星細胞にも CCR9 が発現することを明らかにし、CCR9 陽性マクロファージとのクロストークにより肝線維化進展に深く関与することを発表した(*Hepatology 2013*)。さらに CCR9 マクロファージの由来(*Sci Rep 2016*)を報告し、現在は NASH、発癌(*Submitted*)における CCR9 陽性マクロファージの各病態への関与を追究している。

一方で抑制性マクロファージの遊走を介し肝病態進展を抑制する生体内ホメオスタシスが存在することもわかりつつある。完成された硬変肝に至った肝臓から機能回復を図る際に、「肝臓内線維化の消退」と「正常肝細胞の再生」が不可欠である。「肝臓内線維化の消退を促進する」過程に修復性マクロファージ(Restorative Macrophage)の役割が近年注目される。我々は、「修復性マクロファージの腸肝相関を介した肝臓内への集積が肝線維化制御の中心を担う」と仮説を立て、先行実験を行った。8 週齢のマウスに四塩化炭素を 4 週間腹腔内に反復投与し肝線維化を惹起した。食物繊維は腸内細菌に代謝され、短鎖脂肪酸 butyrate や proprionate の産生を介し腸管の炎症(*Nature 2013*)や気道過敏(*Nat Med 2014*)を抑制することが報告されていることから、腸肝相関を介して線維化改善に寄与しうる因子として食物線維に着目した。食物線維が腸肝相関を介して肝線維化に与える直接的影響を検討するためマウスに 11%水溶性食物繊維を含む食餌(High dietary fiber, HF)を自由摂取させ、対照群には水溶性食物線維を含まない一般食餌(normal diet, ND)を投与した。その結果、高水溶性食物繊維投与群では CD11b 陽性ミエロイド系免疫細胞が有意に多く肝臓内に集積し、その結果肝線維化の所見は有意に軽減された(*unpublished data*)。水溶性食物繊維の投与により認められたミエロイド系細胞の集積は肝線維化抑制に寄与する修復性マクロファージ(Restorative Macrophage)の誘導に関わることが予想される。肝線維化を抑制する修復性マクロファージ(Restorative Macrophage)の誘導に腸内細菌が関与することが推測し、研究を進める。

２．研究の目的

腸肝相関に着目し、肝線維化を抑制する修復性マクロファージ(Restorative Macrophage)の表現型を明らかにし、肝臓内への誘導に必要な因子を突き止める。「肝星細胞が肝線維化の中枢因子である」という昨今の規定概念を超え、肝臓に特異的に遊走する修復性マクロファージ(Restorative Macrophage)とその誘導因子を治療標的として、根本的な治療方法が存在しない肝硬変の病態解明及び根本的治療の開発につなげることを目的とした。

３．研究の方法

- 肝線維化・線維化消退モデル
  - マウス(B6)に四塩化炭素(10%~25%, in olive oil)の 2-3 回/週で計 4-6 週反復腹腔内注射し肝硬変の状態にさせ、そこから慢性肝障害の原因である四塩化炭素の投与を中断し、中断後 24hr、48hr、72hr、96hr に肝内線維化マーカーを含む、肝星細胞や修復性マクロファージの性状を検討した。
- 主な遺伝子改変マウス
  - Myd88 欠損マウス；TLR4 欠損マウス
- 主な阻害薬モデル
  - TAK-242 による TLR4 受容体の下流にある細胞内経路の阻害、Lymphocyte tyrosine posphatase (Lyp) 阻害薬
- 無菌や腸管内殺菌マウスモデル
  - 複数広域抗菌薬(Ampicillin、Vancomycin、Neomycin、Metronidazole) の 2-4 週間経口投与を行い腸管内除菌。
- ヒト末梢血での検討：C 型慢性肝炎・肝硬変患者に対する抗 HCV 治療(Direct anti-viral agent; DAA)前後の末梢血リンパ球の変化（ヒト肝線維化消退モデルの検討)；急性肝障害・肝不全における細胞外基質 remodeling の血清マーカーと予後予測関連の検討

４．研究成果

肝線維化消退モデルとして、マウス(B6)に四塩化炭素(10%～25%, in olive oil)の反復腹腔内注射し肝硬変の状態にさせ、そこから投与を中断し実験を行った。既報のように肝線維化程度は 24hr の時点で頂点になり、その後線維化の消退が次第に進んでいった。驚くことに、肝臓の線維化を増悪させると言われる自然免疫 TLR4 の mRNA 全肝臓発現量は肝線維化の消退のピークに当たる 48hr に発現の最大値を認め、その後の 72hr, 96hr にも 24hr より 2 倍ほど有意に発現の増加を認めた(Figure 1)。今まで TLR4 を介し肝星細胞が活性化になり、肝線維化の促進に働くように報告されてきた(Nat

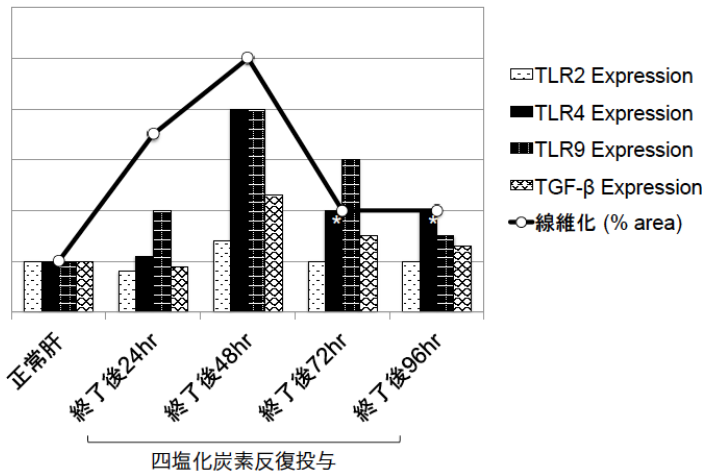

Figure 1　四塩化炭素反復投与終了後の肝線維化消退とToll-like受容体発現の関連

Med 2007)が、TLR4 は肝線維化の消退期にも発現増加することから、TLR4 が肝線維化の消退にも寄与するという未だに報告されていない新しい機序の存在が示唆された。

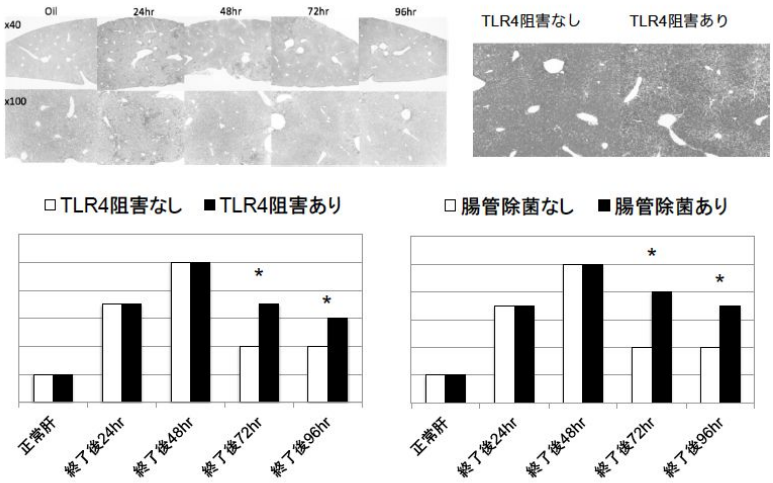

Figure 2　TLR4阻害および腸管除菌は肝線維化の消退を遅延させる

続いて、消退過程 TLR4 の細胞内下流経路を阻害する TAK-242 投与モデルおよび MyD88 欠損マウスを用いた実験では、TLR4 の細胞内径路である TRAM-Trif がマクロファージにおける修復性 phenotype への誘導に関与すると予想した(Figure 2, left)。肝線維化消退マウスモデルでは TLR4 の全肝 mRNA 発現の変化と phenotype の関連を確認した。今後、MyD88 欠損マウスとの比較や TRL4 欠損骨髄移殖のモデルを用いて TLR4 の細胞内経路に Trif を介する肝線維化消退への影響を確認する。また、細胞単離 ex vivo の培養で TAK-242 による TLR4 下流シグナルの阻害の有無にて post-phagocytosis の表現型変化や移入モデルにて同定した責任細胞の in vivo の作用機序を確認する。

TLR4 の Ligand、受容体、細胞内径路を含めて、其々のレベルで肝線維化消退に関与する細胞の同定に注目した。TAK242 による肝線維化の消退抑制と同時に、修復性マクロファージの Trem2 が高発現のままであることが判明した。Trem2 の抑制を介し TLR4 に関連する修復性マクロファージの表現型の誘導が示唆された。Trem2 は TLR 下流シグナル促進分子である MAPK を抑制し、TLR4 の負の制御の機能を有する。また、Trem2 下流を阻害する lymphocyte tyrosine kinase (Lyp)が単球系細胞にも発現すると言われており、今後、修復性の表現型に Trem2 の抑制が必要と予想し、Lyp 阻害剤による肝線維化消退の変化を確認する。

TLR4 のリガンドの由来として、腸管内微生物叢の影響を受けるという仮説のもと、肝線維化の消退期に 4 種合剤抗菌薬による腸管除菌を行なった群は非除菌群より肝線維化消退が有意に遷延した（Figure 2, right)。今後、肝線維化消退モデルでの TLR4 ligand の由来を確認に際し、肝線維化消退の際の腸管除菌の結果を踏まえて、門脈や腸間膜リンパ節、腸管粘膜透過性を含めた腸管内 PAMPs/DAMPs など TLR4 ligand の肝線維化消退における役割を解明していく。一方、肝内細胞外基質の一部である hyaluronan、肝細胞由来 HMGB1 など内因性 TLR4 ligand の役割も焦点に当て、また、胆汁酸や胆汁内の肝臓に由来する内因性 TLR4 が腸管上皮透過性を改変する可能性も念頭に置き精査を進める。

肝線維化消退過程における肝障害・肝再生に対する影響を検討した。TAK-242 投与による TRL4 の細胞内経路の抑制に伴う ALT の上昇や TLR4 の肝線維化消退期における肝障害や肝再生への正の影響が予想される。この仮説のもとに肝の炎症性再生モデルでの検討も必要である。一方、我々は重症急性肝障害、急性肝不全を認める際にヒト末梢血中に細胞外基質の remodeling を反映する線維化マーカーの上昇が急性肝不全の予後不良を予測することを突き止めた（*Heptaol Commun 2018*)。この研究の結果から肝線維化と肝再生不良との関連を示唆した。さらに、肝再生において制御性 T 細胞や TGF-β を介するシグナルの役割が不明であり、同マウスモデルでは肝臓内 Foxp-3+制御性 T 細胞の上昇を認めることに併せ、治療前後の血清肝線維化指標の低下

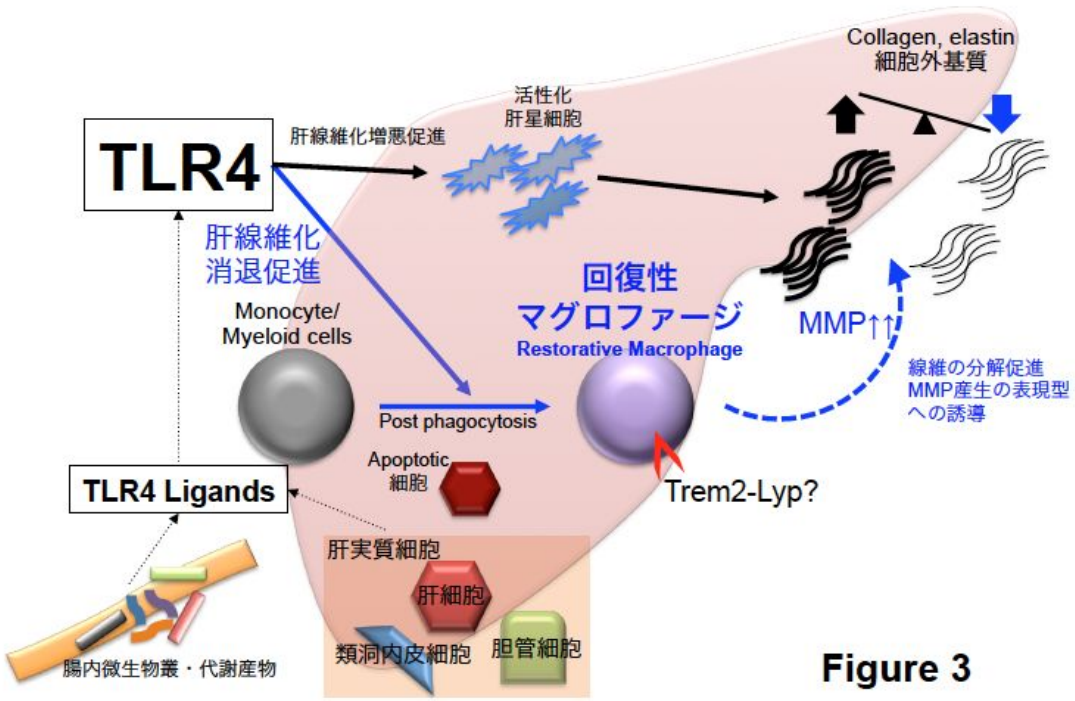

Figure 3

を示すC型慢性肝炎に対するinterferon-free DAA治療前後の比較においても、末梢血中の制御性T細胞頻度の有意な増加を認めたことを報告し(*PLOS One 2017*)、ヒトへtranslationalの意義を示唆した。TLR4を介した回復性マクロファージの制御とTGF-βと肝線維化消退・肝再生・肝内免疫細胞微小環境の回復の関連につき、今後の応用課題としてさらなる研究開拓に繋げていきたい。本研究で得られた知見および今後の展望をFigure 3にまとめた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計７件）

① Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T, Suzuki T, Koda Y, Chu PS, Taniki N, Yamaguchi A, Kanamori M, Kamada N, Hattori M, Ashida H, Sakamoto M, Atarashi K, Narushima S, Yoshimura A, Honda K, Sato T, Kanai T. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. **（査読あり）Nature microbiology 2019.** 4(3) 492-503 (DOI: 10.1038/s41564-018-0333-1)

② Ugamura A, Chu PS, Nakamoto N, Taniki N, Ojiro K, Hibi T, Shinoda M, Obara H, Masugi Y, Yamaguchi A, Shiba S, Morikawa R, Usui S, Ebinuma H, Kitagawa Y, Saito H, and Kanai T. Liver fibrosis markers improve prediction of outcome in non-acetaminophen-associated acute liver failure. **（査読あり）Hepatology Communications. 2018** Sep 21;2(11):1331-1343.(DOI: 10.1002/hep4.1233.)

③ Taniki N, Nakamoto N, Chu PS, Mikami Y, Amiya T, Teratani T, Suzuki T, Tsukimi T, Fukuda S, Yamaguchi A, Shiba S, Miyake R, Katayama T, Ebinuma H, Kanai T. Intestinal barrier regulates immune responses in the liver via IL-10-producing macrophages. **(査読あり) JCI Insight 2018.** 3(12). pii: 91980. (DOI: 10.1172/jci.insight.91980.)

④ Murakami Y, Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Ojiro K, Chu PS, Taniki N, Saito Y, Teratani T Koda Y, Suzuki T, Saito K, Fukasawa M, Ikeda M, Kato N, Kanai T, Saito H. Dual effects of Nrf2 inhibitor for inhibition of hepatitis C virus and hepatic

cancer cells. **（査読あり）BMC Cancer 2018.** 18(1): 680. (DOI: 10.1186/s12885-018-4588-y.)

⑤ Chu PS, Nakamoto N, Taniki N, Ojiro K, Amiya T, Makita Y, Murata H, Yamaguchi A, Shiba S, Miyake R, Katayama T, Ugamura A, Ikura A, Takeda K, Ebinuma H, Saito H, Kanai T. On-treatment decrease of NKG2D correlates to early emergence of clinically evident hepatocellular carcinoma after interferon-free therapy for chronic hepatitis C. **(査読あり) PLoS ONE 2017**; 12(6): e0179096 (DOI: 10.1371/journal.pone.0179096.)

⑥ Nakamoto N, Amiya T, Aoki R, Taniki N, Koda Y, Miyamoto K, Teratani T, Suzuki T, Chiba S, Chu PS, Hayashi A, Yamaguchi A, Shiba S, Miyake R, Katayama T, Suda W, Mikami Y, Kamada N, Ebinuma H, Saito H, Hattori M, Kanai T. Commensal Lactobacillus Controls Immune Tolerance during Acute Liver Injury in Mice. **(査読あり)Cell Reports 2017**; 21(5): 1215-1226. (DOI: 10.1016/j.celrep.2017.)

⑦ Usui S, Ebinuma H, Chu PS, Nakamoto N, Yamagishi Y , Saito H, Kanai T. Detection of bacterial DNA by in situ hybridization in patients with decompensated liver cirrhosis. **(査読あり) BMC Gastroenterology 2017**; 17(1):106. (DOI: 10.1186/s12876-017-0664-z.)

〔学会発表〕（計０件）

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：海老沼　浩利

ローマ字氏名：EBINUMA, Hirotoshi

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：医学部

職名：主任教授

研究者番号（８桁）：20296560

(2)研究協力者

研究協力者氏名：瀧本　洋一

ローマ字氏名：TAKIMOTO, Youichi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。