

2021年7月29日

報道関係者各位

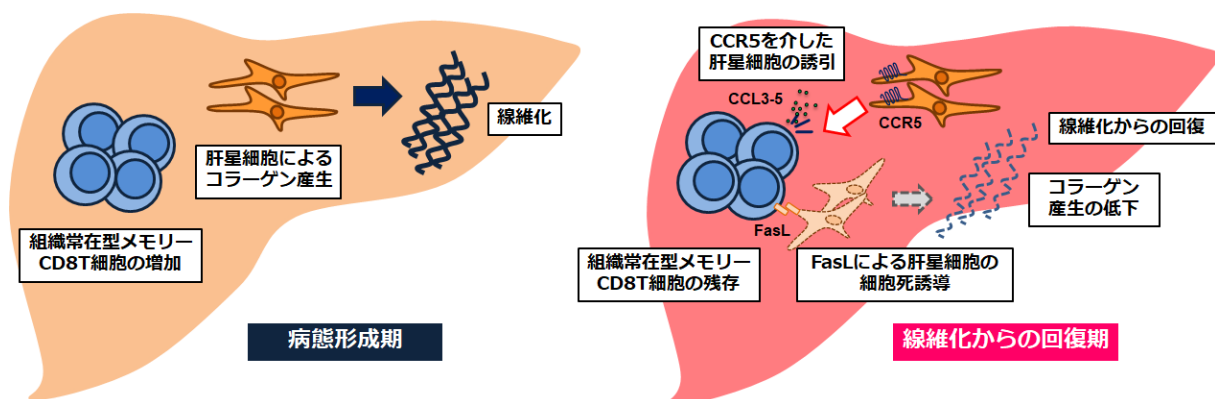
慶應義塾大学医学部

## 非アルコール性脂肪性肝炎の肝線維化病態から回復するメカニズムを解明 —肝線維化の新たな治療法開発に期待—

慶應義塾大学医学部内科学教室（消化器）の中本伸宏准教授、金井隆典教授、田辺三菱製薬株式会社の幸田裕造共同研究員を中心とした研究グループは、慶應義塾大学医学部病理学教室との共同研究により、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世界で初めて明らかにしました。研究グループは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（注1）」という特殊な免疫細胞が関与していることを発見しました（図1）。さらに、このCD8T細胞が線維化の主要な悪玉とされる肝星細胞の細胞死を誘導することで線維化（注2）からの回復を促進していることを明らかとしました。

本成果は、これまで明らかにされていなかった肝線維化病態の回復メカニズムを世界に先駆けて示したもので、従来肝線維化進展に寄与すると考えられてきた肝臓内CD8T細胞の新たな働きを提唱するとともに、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ます。

本研究成果は、2021年7月22日に『Nature Communications』のオンライン版に掲載されました。



【図1】非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）における肝線維化からの回復機序

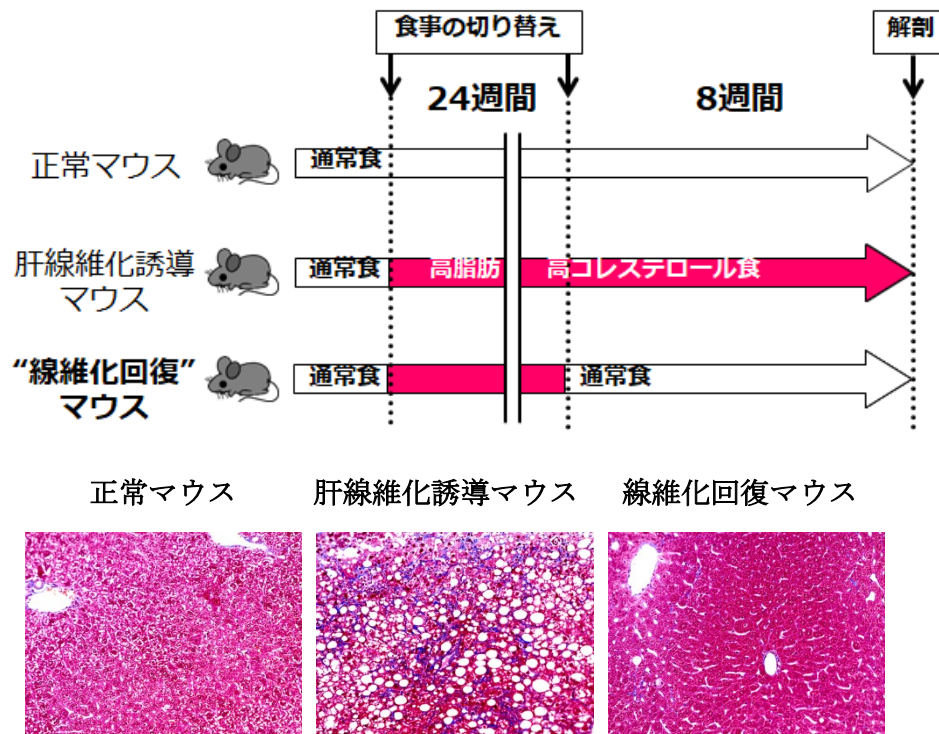
### 1. 研究の背景・目的

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、種々の原因で肝臓内に脂肪が蓄積する疾患で、肝臓内に脂肪沈着するのみの単純性脂肪肝と単純性脂肪肝から進展する非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に大別されます。NASHは肝臓の炎症および肝細胞のバリーニング

(風船状の腫大)を呈し、線維化が進行することを特徴としており、病態が重症化すると肝硬変・肝がんとなる危険性がある疾患ですが、いまだ有効な治療薬は存在しません。現時点では食事療法・運動療法が最も有効な治療方法ですが、肝臓の線維化病態は、一度進行すると不可逆的であり、治療による回復は困難と考えられておりました。しかし、近年、食事療法・運動療法を実施した NASH 患者や抗 HCV (C 型肝炎ウイルス) 治療薬を処方された C 型肝炎患者において、肝臓の線維化病態が回復するケースが報告され、「一度進行した線維化病態は回復しない」という定説は覆されつつあります。線維化から回復するメカニズムを明らかにすることができれば、新しい NASH および臓器線維化治療薬の創成につながることから、本研究ではその解明に取り組みました。

## 2. 研究の成果

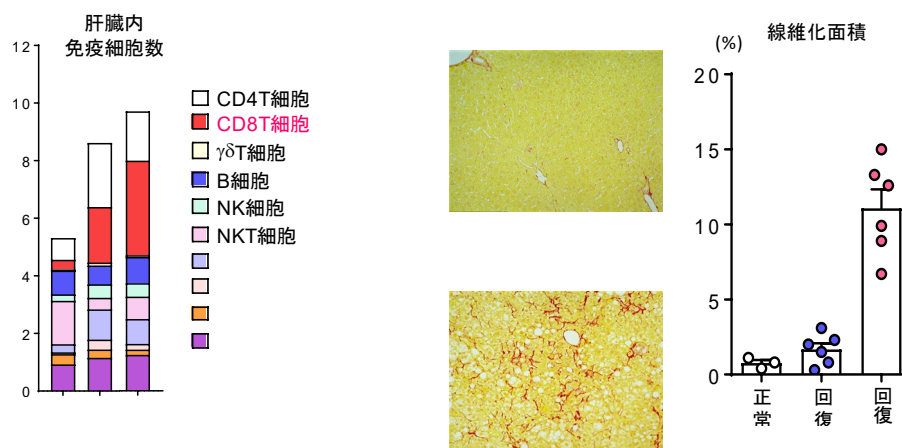
肝線維化病態が回復するメカニズムを解明するため、まず NASH 病態の「発症→病態進行→治療による回復」のプロセスをマウスで再現することを試みました。具体的には、マウスに高脂肪高コレステロール食を 24 週間摂食させ NASH 病態および肝線維化を誘導した後、餌を通常食に切り替えて、NASH 病態および肝線維化から回復がみられるか検討しました。その結果、通常食に切り替えてからマウスの体重や ALT などの肝臓の炎症マーカーは急激に減少し、また肝臓の線維化からの回復が顕著に認められました。通常食に切り替えてから 8 週間後には体重や ALT、肝臓の線維化は通常マウスと同程度にまで回復しました (図 2)。以上のことから、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ました。



【図 2】肝線維化回復プロセスを模したマウスモデルの構築と各マウスの肝臓組織

マッソントリクローム染色を行い、コラーゲン沈着領域を染色した(青色)。正常マウスと比べて肝線維化誘導マウスにおいて脂肪滴の沈着および線維化の進行が認められる。一方で線維化回復マウスにおいては脂肪滴の沈着および線維化がみられない。

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ました。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（注3）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ました。その結果、病態誘導によって顕著に増加していたCD8T細胞（注4）が、肝線維化病態は改善しているにも関わらず、回復期においても残存し続けていることがわかりました（図3左）。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ました。非常に興味深いことに、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りました（図3右）。このことから、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ました。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（注5）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りました。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ました。



【図3】線維化回復期の肝臓においてCD8T細胞が増加する

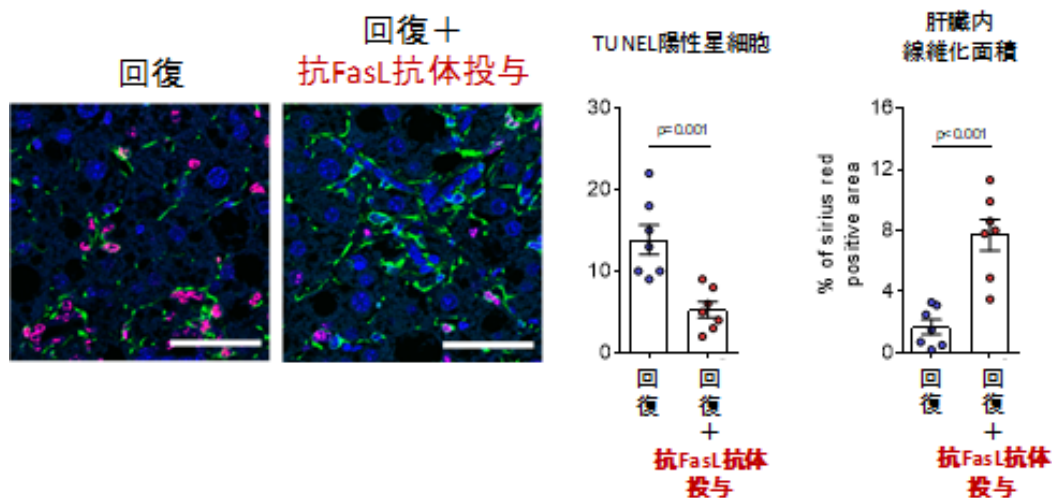
フローサイトメトリーを用いて各マウスにおける肝臓免疫細胞の詳細を検討した。肝線維化誘導マウスおよび線維化回復マウスにおいて正常マウスと比較し、CD8T細胞の数が顕著に増加していた（左）。除去抗体を用いて回復期のCD8T細胞を除去したところ、肝線維化からの回復は遅延した（右：シリウスレッド染色によるコラーゲン線維の染色）

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（注6）と非常に近接して存在することがわかりました（図4）。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（注7）を非常に多く産生していることを見出しました。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れました。

【図 4】線維化回復期の肝臓において CD8T 細胞と星細胞は近位に存在する

免疫蛍光染色法を用いて各マウスにおける CD8T 細胞マーカーの CD8（緑）と星細胞マーカーの Desmin（赤）および細胞核（青）を染色した（左）。回復期において肝星細胞と近位に存在する（共局在する）CD8T 細胞数は増加している（右）。

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、CD8+Trm 細胞が FasL(注 8) 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ました（図 5）。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りました。



【図 5】線維化回復期の肝臓において CD8T 細胞は FasL を介して星細胞の細胞死を誘導する

免疫蛍光染色法を用いて各マウスにおける Desmin 陽性星細胞（緑）の細胞死を TUNEL 染色（ピンク）で評価した。抗 FasL 抗体の投与により、細胞死した肝星細胞は減少し（左）、線維化からの回復が部分的にキャンセルされた。

### 3. 今後の展開

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ました。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おられません。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す。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ます。

#### 4. 論文

英文タイトル : CD8+ tissue-resident memory T cells promote liver fibrosis resolution by inducing apoptosis of hepatic stellate cells

タイトル和訳 : 組織常在型メモリーCD8T 細胞は肝星細胞のアポトーシスを誘導し、肝線維化の回復を促進する

著者名 : 幸田裕造、寺谷俊昭、楮柏松、萩原裕也、三上洋平、原田洋輔、辻川華子、宮本健太郎、鈴木貴博、谷木信仁、筋野智久、坂元亨宇、金井隆典、中本伸宏

掲載誌 : Nature communications (オンライン版)

DOI : 10.1038/s41467-021-24734-0

#### 5. 特記事項

本研究は、JSPS 科研費 JP 20H04129、公益財団法人三島海雲記念財団、公益財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団などの支援を受けて実施しました。

##### 【用語解説】

- (注 1) 組織常在型メモリーCD8T 細胞 : 近年発見された CD8T 細胞陽性の亜群。通常のリンパ球とは異なり、血中を循環せずに組織に滞留することが特徴。ウイルスなどの再感染防御に重要であることが明らかになりつつあるが、NASH などの線維化疾患などにおける役割は不明であった。
- (注 2) 線維化 : 活性化した線維芽細胞などからコラーゲンなどの細胞外マトリックスが過剰に産生され、組織に過剰に沈着することで組織の硬化・肥厚をもたらす現象。結果として、組織の正常な機能が妨害され、対象臓器が重篤な機能不全に陥る。肝臓以外にも肺、皮膚、腸、腎など線維化がおきる臓器は多岐にわたる。
- (注 3) フローサイトメトリー : 一つの細胞の複数の分子 (主にタンパク質) を同時かつ高速に測定し、複数種類の細胞の分布を解析する装置。細胞表面または内部の分子を蛍光物質で標識した後、細胞一つずつに一定波長のレーザー光を当てた時に生じる蛍光波長を検出することにより、その細胞が何の分子を持っているかを分析する。ある部位に存在する細胞集団の増減や機能分子の発現量の増減を解析するために利用されている。
- (注 4) CD8T 細胞 : 細胞障害性 T 細胞としても知られるリンパ球の亜群。本来ウイルスや腫瘍細胞の排除に重要な役割を果たす。また自己反応性の CD8T 細胞は組織を傷害することで自己免疫疾患の病態に関与することも知られている。
- (注 5) シングルセルトランスクリプトーム解析 : 近年開発された遺伝子発現解析の手法。1 細胞レベルでの遺伝子発現を網羅的に検討することが可能で、これまで判別できなかった新しい細胞集団を定義することができる。

(注 6) 肝星細胞：肝臓内のディッセ腔と呼ばれる肝細胞と類洞内皮細胞の間隙に存在する線維芽細胞の一種。活性化した星細胞は肝細胞の再生に必要なコラーゲンやサイトカインを過剰に産生し、肝臓の線維化を誘導することが知られている。

(注 7) ケモカイン：種々の細胞から放出される、細胞間の相互作用を媒介するタンパク質。そのタンパク質の濃度勾配の方向に細胞を遊走させる活性を示す。

(注 8) FasL：CD8T 細胞などの表面に発現している膜たんぱく質。標的細胞の Fas と相互作用し、アポトーシスと呼ばれる細胞死を誘導する。アポトーシスはプログラムされた細胞死と呼ばれ、個体をより良い状態に保つために引き起こされる細胞死と言われている。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

**【本発表資料のお問い合わせ先】**

慶應義塾大学医学部 内科学教室（消化器）

准教授 中本 伸宏（なかもと のぶひろ）

TEL：03-5363-3790 FAX：03-3353-6247 E-mail: nobuhiro@z2.keio.jp

**【本リリースの配信元】**

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課：山崎・飯塚

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL：03-5363-3611 FAX：03-5363-3612 E-mail：med-koho@adst.keio.ac.jp

<http://www.med.keio.ac.jp>