

学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕実績報告書

令和 7 年 4 月 30 日 提出

関連する持続可能な開発目標（SDGs）

1 貧困	2 飢餓	●	3 保健	4 教育
5 ジェンダー	6 水・衛生		7 エネルギー	8 経済成長と雇用
9 インフラ，産業化，イノベーション	10 不平等		11 持続可能な都市	
12 持続可能な消費と生産	13 気候変動		14 海洋資源	
15 陸上資源	16 平和		17 実施手段	

1 課題番号： 23 独先 11

2 研究者（研究代表者）

①所属部科校： 医学部・（総合医学研究所）

②資格・氏名： 助教 ・ 梅田 香織

3 研究課題

①和文表記：シングルセル解析から読み解く非アルコール性脂肪肝炎の病態制御

②英文表記：Single-cell analysis in nonalcoholic steatohepatitis

4 研究期間：令和 5 年度～令和 6 年度

5 現在までの達成度

※当初の研究目的に対する達成度について，自己評価を行ってください

①区 分 A：当初の計画以上に進展している，B：概ね順調に進展している，C：やや遅れている

②達成度 研究期間全体（2年間）を100%とした場合に，現在の進捗状況を〇〇%で評価してください

①区 分： B

②達成度： 80 %

6 研究組織

①研究代表者

資 格・氏 名 (研究者番号)	所属部科校 実施研究所	役 割 分 担
助教・梅田 香織 (10445744)	医学部 総合医学研究所	研究全体の総括及び実施

②研究分担者

[illegible]

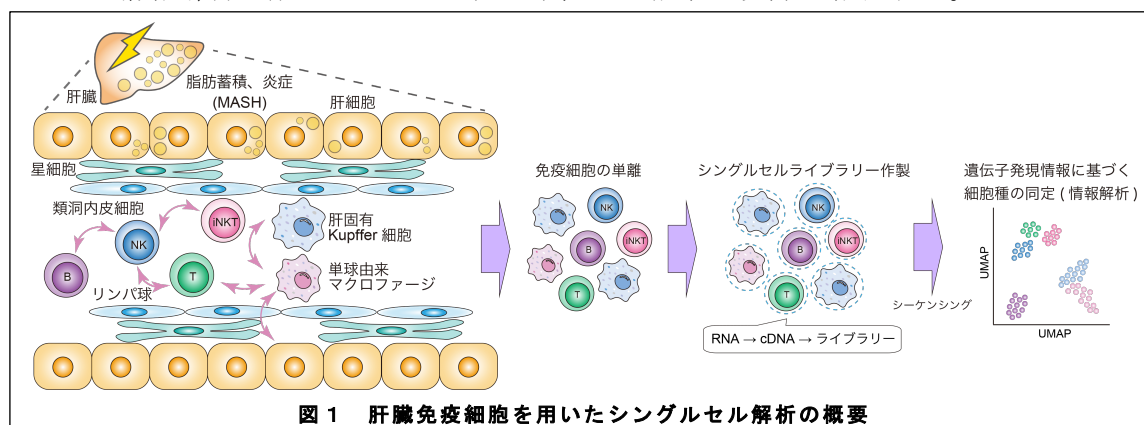
7 研究目的

食事の欧米化や運動不足などの生活習慣の変化により我が国でも一般的に脂肪肝と呼ばれる代謝機能障害関連脂肪性肝疾患（metabolic dysfunction associated steatotic liver disease, MASLD）、さらに炎症を伴う代謝機能障害関連脂肪肝炎（metabolic dysfunction associated steatohepatitis, MASH）の罹患者が増加している。MASLD の約 10%が MASH へと進展するが、その進展メカニズムには不明な点が多い。肝臓は約 70%を肝細胞により構成され栄養成分や生体異物の代謝を担うが、残りの 30%の非実質細胞には類洞内皮細胞や間葉系星細胞の他、Kupffer 細胞などの免疫細胞が豊富に存在し、互いに、または肝細胞と協調しながら代謝、炎症、生体防御、抗腫瘍活性など多岐にわたる機能を発揮する（参考文献[1]）。したがって、MASLD 及び MASH の病態を理解する上で、複雑な免疫細胞の機能全体を解析する必要がある。そこで、本研究では近年急速に開発されたシングルセル解析を本学内に確立し、MASH における肝臓免疫細胞の解析に応用させることにより免疫細胞の新たな機能制御メカニズムを明らかにすること、そして MASH の新たな予防または治療標的を見出すこととした。

8 研究概要

本研究では西洋食負荷による MASH 誘導モデルマウスを用いて肝臓免疫細胞の分布及び機能をシングルセル解析を用いて詳細に解析することにより MASH の病態制御を明らかにする。我々は先行研究において、脂質応答性核内受容体である肝臓 X 受容体（liver X receptor, LXR）及びビタミン D 受容体が肝固有のマクロファージである Kupffer 細胞や単球由来の誘導マクロファージ、ナチュラルキラー（natural killer, NK）T 細胞の分化・成熟化及び機能維持に関与することを報告した[2-5]。特に LXR はコレステロール代謝調節因子として働く転写因子であり、高コレステロール血症や動脈硬化の標的として注目されているが[6]、マクロファージにおいて抗炎症作用を有することから、免疫細胞を介した MASH の病態への関与が強く示唆される。しかし、肝臓免疫細胞における LXR の細胞選択的機能や標的遺伝子は未だ不明である。そこで、本研究では MASH マウスにおける LXR 欠損の影響を詳細に解析した。

シングルセル解析は単一細胞における網羅的遺伝子発現解析を可能にした最先端のゲノミクス解析手法である。この方法を MASH マウスの検体に適用することにより肝臓における免疫細胞の全体像をとらえることが可能となり、MASH への進展メカニズムの解明が期待できる。昨年度はシングルセルライブラリー作製装置である 10x Genomics 社の Chromium Xi を導入した他、既存データを用いてシーケンスデータの解析手法を確立した。そこで、本年度は実際に本実験を行い、肝臓免疫細胞の単離、シングルセルライブラリーの作製及びシーケンスデータの情報解析に成功したため（図 1）、その結果を以降で報告する。



9 研究結果

昨年度は全身性 LXR 欠損マウスを用いて 0.2% コレステロール含有西洋食負荷による MASH モデルマウスを解析し肝障害が増悪することを確認した。また、LXR α ($f1/f1$) LXR β ($f1/f1$) (LXR α ($f1/f1$) LXR β ($f1/f1$)) マウスと数種 Cre レポータートランスジェニックマウスを交配させ細胞選択的 LXR 欠損マウスを作製した。マルチカラーフローサイトメトリーを用いて各マウスの肝臓免疫細胞分布を評価したところ、肝細胞選択的 LXR 欠損マウス (LXR α ($f1/f1$) LXR β ($f1/f1$) - *Alb*-Cre ($tg/+$)) において CD45 陽性免疫細胞の細胞数が全身性 LXR 欠損マウス (LXR α ($-/-$) LXR β ($-/-$) マウス) と同様に増加することが明らかとなった。そこで、このマウスにおける免疫細胞組成及び機能変化を詳細に解析するため、シングルセル解析及び MASH モデルマウスの解析を行った。

(1) LXR α / β 欠損マウス由来肝臓免疫細胞のシングルセル解析 (梅田、山岸)

シングルセル解析には野生型 (C57BL/6J)、全身性 LXR 欠損 (LXR α ($-/-$) LXR β ($-/-$))、Floxed コントロール (LXR α ($f1/f1$) LXR β ($f1/f1$))、肝細胞選択的 LXR 欠損 (LXR α ($f1/f1$) LXR β ($f1/f1$) - *Alb*-Cre ($tg/+$)) の各マウスを用いた。野生型は全身性 LXR 欠損の、Floxed コントロールは肝細胞選択的 LXR 欠損に対するコントロールとして用いた。各マウスより肝臓を摘出し、コラゲナーゼによる肝組織分散及びパーコール密度勾配法により肝非実質細胞を単離した。得られた細胞はセルソーターを用いて CD45 陽性免疫細胞を単離し、90%以上の精製度であることを確認した。単離した免疫細胞は固定後、10xGenomics 社の Chromium Fixed RNA Profiling Protocol に基づきシングルセルライブラリーを作製した。各ライブラリーは混合後、外部委託により Nova-seq 6000 を用いたシーケンシング及び Cell Ranger ARC を用いた一次解析 (マウスゲノム配列へのシークエンスデータのマッピング) を行った。その結果、野生型では 8,754 個、全身性 LXR 欠損では 9,140 個、Floxed コントロールでは 10,364 個、肝細胞選択的 LXR 欠損では 11,327 個の細胞の情報を得ることができた。次に、R のプログラムパッケージである Seurat v5 を用いてシークエンスデータの二次解析を行った。まず、検出された遺伝子数やミトコンドリアの割合等から死細胞などを除去するフィルタリングを行い、野生型から 6,343 個、全身性 LXR 欠損から 7,849 個、Floxed コントロールから 8,048 個、肝細胞選択的 LXR 欠損から 9,509 個の細胞を選別した。次に 4 検体を個別に解析し、次元削減やクラスタリングを行い、クラスター数を決定後、結果を uniform manifold approximation and projection (UMAP) を用いて示した (図 2)。さらに、各クラスターごとに高発現する遺伝子を検出することにより細胞種を同定した。その結果、まず、野生型においては 16 個のクラスターが分類された。変動遺伝子の情報から、各クラスターには、2 種の Kupffer 細胞、2 種の T 細胞、B 細胞、4 種の単球及びマクロファージを含むミエロイド系細胞、NK 細胞、類洞内皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cell, 図中には LSEC と記載)、樹状細胞 (dendritic cell, 図中には DC と記載)、好中球、プラズマ細胞、細胞増殖マーカー発現の高い細胞群、そして単離時に残存した肝細胞が含まれていた。

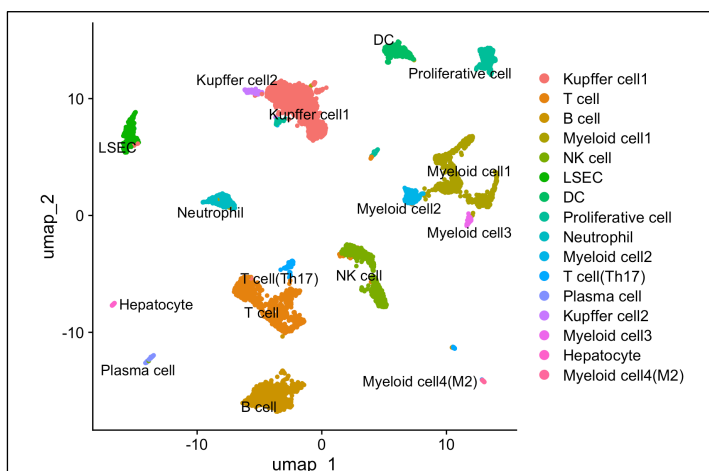


図2 野生型由来肝臓免疫細胞を用いたシングルセル解析クラスタリングされた細胞群を UMAP にて示した。各ドットは単一細胞を示す。

〔9 研究結果（つづき）〕

全身性 LXR 欠損、Floxed コントロール、肝細胞選択的 LXR 欠損群についても同様の解析を行い、それぞれクラスター数は 12 個、14 個、11 個と検体により変化することが示された。

次に、野生型、全身性 LXR 欠損、Floxed コントロール、肝細胞選択的 LXR 欠損の 4 群検体の統合（インテグレーション）を行った。バッチ補正及びクラスタリングを行った結果、合計 15 個のクラスターが検出された（図 3、未発表データのため、各クラスターの細胞名は未記載）。

各クラスターにおける変動遺伝子を抽出したところ、Kupffer 細胞、3 種の T 細胞、B 細胞、3 種の単球及びマクロファージを含むミエロイド系細胞、NK 細胞、類洞内皮細胞、樹状細胞、好中球、細胞増殖マーカー発現の高い細胞群、残存した肝細胞が同定された。変動遺伝子の情報から、インテグレーション後のクラスターには野生型と一致する細胞群も存在したが、野生型において検出されない新規細胞群が存在することが明らかとなった。そこで、インテグレーションしたデータを検体ごとに分割し、野生型、全身性 LXR 欠損、Floxed コントロール、肝細胞選択的 LXR 欠損の 4 群間における細胞分布の比較を行った（図 4）。その結果、まず野生型と Floxed コントロールについては細胞分布パターンが類似することが確認できた。次に、野生型と全身性 LXR 欠損及び Floxed コントロールと肝細胞選択的 LXR 欠損をそれぞれ比較したところ、数種のクラスターにおいて細胞分布パターンは大きく異なることが明らかとなった。興味深いことに、全身性 LXR 欠損と肝細胞選択的 LXR 欠損のパターンは類似していた。

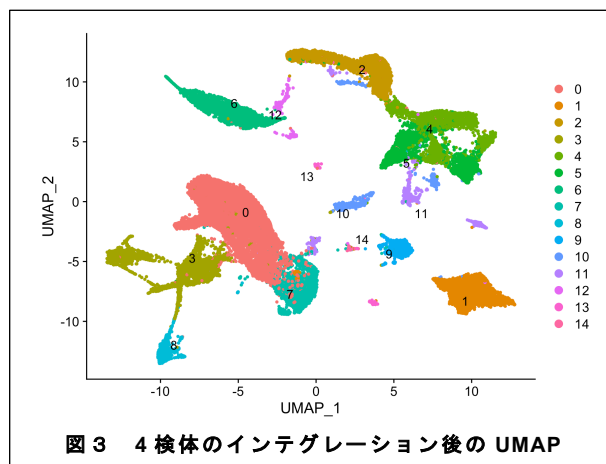


図 3 4 検体のインテグレーション後の UMAP

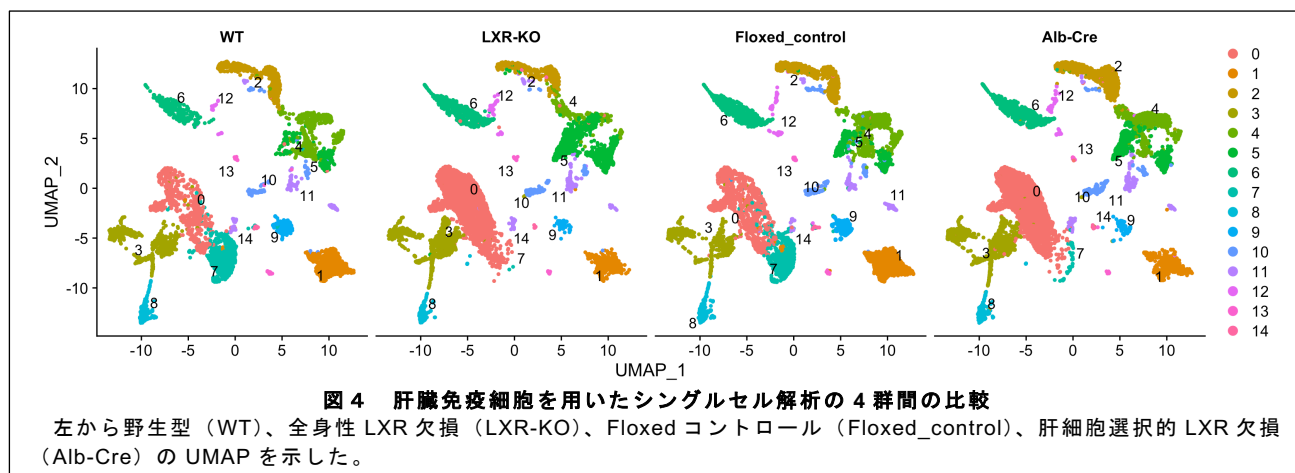


図 4 肝臓免疫細胞を用いたシングルセル解析の 4 群間の比較

左から野生型（WT）、全身性 LXR 欠損（LXR-KO）、Floxed コントロール（Floxed_control）、肝細胞選択的 LXR 欠損（Alb-Cre）の UMAP を示した。

（2）細胞選択的 LXR α/β 欠損マウスを用いた MASH モデルの解析（梅田、槇島、和田）

上記シングルセル解析の結果をふまえ、Floxed コントロール及び肝細胞選択的 LXR 欠損マウスを用いた西洋食負荷による MASH モデルマウスの解析を進めた。肝細胞選択的 LXR 欠損群のシングルセル解析において変化を認めた細胞群について、フローサイトメトリーを用いて解析したところ、同様の細胞分布変化が観察された。また、その変化は西洋食により、より顕著な差を認めた他、全身性欠損と同様にコントロール群と比較して肝重量及び脾臓重量の有意な増加を認め、早期に MASH を誘導した。現在、引き続き病理切片を用いた肝組織の解析等を進めている。

〔9 研究結果（つづき）〕

本年度の検討の結果、全身性 LXR 欠損マウスで観察された肝臓免疫細胞の分布及び機能変化は肝細胞選択的 LXR 欠損マウスにおいても観察されたことから、LXR は肝細胞における脂質代謝制御を介して肝臓免疫細胞の機能に影響することが示された。近年、UK Biobank におけるヒトデータベースを用いた解析から、少なくとも 450 人に 1 人が LXR α の機能不全型変異体を保有していること、血中成分分析の情報から肝障害マーカーが有意に増加することが報告された[7]。さらに機能不全型変異体の 1 つを発現させたマウスは MASH を早期に誘導することから[7, 8]、我々が欠損マウスを用いて見出した知見と一致し、LXR が肝恒常性維持に必須な因子であることが示された。一方、上記の報告は肝組織または肝細胞に限定した解析であった。したがって、今回我々が報告した免疫細胞に関する知見は、MASH の病態制御における LXR のさらなる重要性を示す上で非常に重要な情報である。今後は、シングルセル解析や肝組織切片を用いてさらに詳細な解析を進め、今年度中の論文投稿を目指す予定である。

また、本研究の課題であった本学内でのシングルセル解析の実施及び解析について、本検体を用いて達成することができた。本解析手法は肝臓免疫細胞のみならずヒト及びマウスのほとんどの組織の細胞を用いて解析可能である。また、これまでは生細胞を用いて直ちにライブラリーを作製する必要があったが、最近は今回実施したように固定した細胞やパラフィン切片等を用いた解析も可能となり、容易に検体が準備できるようになった。今後は、医学部以外にも生命科学系学部の研究にも技術提供することにより、本学全体の研究推進力の発展に貢献していきたい。

なお、本研究において用いた実験材料や得られた実験データについては本助成金の他、科研費[21K06862, 22H04925 (PAGS), 22K06919, 25K10237]、日本大学若手研究者環境整備支援助成金（令和 3 年度）、武田科学振興財団（令和 3 年度）、アステラス病態代謝研究会（令和 4 年度）からの助成によるものも一部含まれる。

参考文献（引用順）

1. Endo-Umeda K, Makishima M. Liver X Receptors Regulate Cholesterol Metabolism and Immunity in Hepatic Nonparenchymal Cells. *Int J Mol Sci.* 20(20): E5045, 2019 (Review)
2. Endo-Umeda K, Nakashima H, Umeda N, Seki S, Makishima M. Dysregulation of Kupffer Cells/ Macrophages and Natural Killer T Cells in Steatohepatitis in LXR α Knockout Male Mice. *Endocrinology*, 159(3): 1419-1432, 2018
3. Endo-Umeda K, Nakashima H, Komine-Aizawa S, Umeda N, Seki S, Makishima M. Liver X receptors regulate hepatic F4/80⁺CD11b⁺ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice. *Sci Rep*, 8: 9281, 2018
4. Endo-Umeda K, Nakashima H, Uno S, Toyoshima S, Umeda N, Komine-Aizawa S et al., Liver X receptors regulate natural killer T cell population and antitumor activity in the liver of mice. *Sci Rep*, 11:22595, 2021
5. Umeda N, Endo-Umeda K, Nakashima H, Kato S, Seki S, Makishima M. Concanavalin A-induced acute hepatitis is attenuated in vitamin D receptor knockout mice with decreased immune cell function. *J Leukoc Biol*, 106(4): 791-801, 2019
6. Endo-Umeda K, Makishima M. Exploring the roles of liver X receptors in lipid metabolism and immunity in atherosclerosis. *Biomolecules*, 15(4), 579, 2025 (Review)
7. Lockhart SM, Muso M, Zvetkova I, Lam BYH, Ferrari A, Schoenmakers E et al., Damaging mutations in liver X receptor- α are hepatotoxic and implicate cholesterol sensing in liver health. *Nat Metab*, 6(10):1922-1938, 2024
8. Clark AT, Russo-Savage L, Ashton LA, Haghshenas N, Amselle NA, Schulman IG. A mutation in LXR α uncovers a role for cholesterol sensing in limiting metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. *Nat Commun*, 16(1):1102, 2025