

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08972

研究課題名(和文)肝糖新生におけるType2 Innate Lymphoid Cellの役割の解明

研究課題名(英文)Role of Type 2 Innate Lymphoid Cells in Hepatic Glycogenesis

研究代表者

藤本 真徳 (Fujimoto, Masanori)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：60835081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病をはじめとする生活習慣病において、免疫細胞による炎症が病気を悪くしたりよくしたりする作用が報告されてきた。近年、ILC2という免疫細胞の脂肪での代謝改善作用が報告されており、申請者は肝臓におけるこの細胞の役割に着目した。肝臓からは蓄えた糖が放出され、血糖上昇に寄与するが、ILC2が糖の放出、血糖上昇を抑えることを申請者は明らかにした。個々の細胞の全遺伝子発現を網羅的に解析する手法(single cell RNA-Seq)などの技術を組み合わせて、肝細胞やILC2の新しい性質を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去に開発された糖尿病治療薬は血糖が十分下がらないという重大な問題があり、新規治療薬の開発は緊急の課題である。申請者は、免疫細胞ILC2に注目し、様々な手法を組み合わせることでILC2から放出された物質(サイトカイン)が肝臓の細胞の酵素発現を抑えることで、糖新生を抑えるという現象を見出した。この現象はこれまで報告されておらず、新しい治療標的の候補として大いに期待できる。また、ILC2は様々な臓器や病態で役割を果たす細胞であり、その他の臓器及び病態でILC2の役割を検討するうえで本研究は大いに参考となりうる。本研究の成果は、今後様々な病態の新規治療薬の開発に貢献できる大きな可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In diabetes and other lifestyle-related diseases, inflammation by immune cells has been reported to make the disease worse or better. Recently, ILC2, an immune cell, has been reported to improve metabolism in fat, and the applicant focused on the role of this cell in the liver. The liver releases stored glucose, which contributes to elevated blood glucose, and the applicant has shown that ILC2 suppresses the release of glucose and the elevation of blood glucose. Combining techniques such as a comprehensive analysis of total gene expression in individual cells (single cell RNA-Seq), he reported new properties of hepatocytes and ILC2.

研究分野：代謝および内分泌学関連

キーワード：ILC2 IL33 GATA3 血糖 肝糖新生

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 本研究の着想に至った経緯と準備状況

申請者は、これまで一貫して免疫細胞、特に肥満細胞と慢性疾患との関わりを研究し、肥満細胞が心房細動の病態進展に寄与することを報告してきた。肥満細胞は、心臓だけでなく、脂肪組織の炎症や肝臓においては肝硬変への進展に寄与する可能性が示されている。また、肥満細胞を強力に活性化させるサイトカインとしてIL-33が知られるが、IL-33を投与したマウスの肝臓組織においては、ILC2が著明に増加・活性化していること、すなわちIL-13を分泌していることを偶然に見出した。さらに、肝臓ILC2由来のIL-13が血糖低下作用に重要であることを、ILC2欠損(NSG)マウスに肝臓ILC2を移植する実験から明らかにした。また、ILC2はtype2 cytokineであるIL-13を持つという点で、Th2細胞に類似した特徴を有する可能性があり、その転写調節因子であるGATA3がILC2の機能に何らかの重要な役割を有している可能性を考えた。

一方で、研究協力者細川らは、GATA3転写複合体解析において、GATA3のC末端zinc finger domainに存在するアミノ酸残基(S308, T315, S316)が、Aktによるリン酸化を受けることでGATA3複合体が組み変わり、Th1機能を抑制することを明らかにした(Hosokawa. Nat Commun. 2016)。このことは、糖代謝調節に必須のインスリンシグナルの中心的キナーゼであるAktとT細胞制御因子GATA3が、機能的制御に結びついているという興味深い発見であった。以上から、肝臓ILC2が糖代謝調節に影響を与える根底には、GATA3複合体機能が重要ではないかという着想に至った。

### (2) 関連する国内外の研究動向・本研究の位置づけ

茂呂(理化学研究所 生命医科学研究センター(IMS)/大阪大学)らは、脂肪組織中にFat-associated lymphoid cluster (FALC)というリンパ球の集塊が存在し、その中にTh1/Th2細胞などの既存の免疫細胞のいずれにも分類されない新規免疫細胞である「自然リンパ球 : ILC」が存在することを報告した(Moro. Nature. 2010)。ILCには3つのサブタイプが存在し、特にILC2は喘息や寄生虫排除に重要な働きをすることが知られるが、近年、脂肪組織のBeiging (Moriyama. Nature. 2015; Brestoff. Cell. 2015)、動脈硬化 (Newland. Nat Commun. 2017) などの代謝疾患における重要性が報告され注目を集めている。一方、糖新生という糖代謝に重要な働きを持つ肝臓には、T細胞をはじめとして、NK細胞、Kupffer細胞など多種多様な免疫細胞が存在するものの、肝臓におけるILC2の役割は十分に明らかになっていない。本研究では、細川らが推進してきた転写複合体解析の強みを活かし、ILC2細胞におけるGATA3制御メカニズムと糖代謝調節に与える影響を検討した。

### (3) 研究者の研究遂行能力及び研究環境

申請者は肥満細胞を主な対象として細胞内Caシグナルを検討してきた。また、心房組織における肥満細胞の作用を検討してきた。その過程で各種免疫細胞の性質を学んできた。ILC2と肥満細胞は全く異なる由来の細胞であるが、一部共通する特性を有しており、ILC2に興味を持つ一つのきっかけともなった。

本研究を遂行するにあたり、次世代シーケンサの解析・解釈は必須であったが、Bioinformatics学習のための講習会には積極的に参加し、その過程で得たRなどプログラミング言語、Linux環境の操作の知識も身に付けていたことが非常に役立った。

## 2. 研究の目的

新規免疫細胞である2型自然リンパ球(ILC2)は、脂肪組織において白色脂肪を褐色化させること

が報告され、その糖代謝改善作用が注目されている。しかし、肝臓などインスリン標的臓器におけるILC2の役割は明らかでない。申請者は、これまでにマウスより肝臓特異的なILC2の同定/単離に成功し、肝臓ILC2がIL-13を介して強力な糖新生抑制作用を発揮することや、肝臓ILC2から分泌されるIL-13がヒト肝細胞においても直接糖新生を抑制することを見出した。本研究では、肝臓ILC2/IL-13による糖代謝制御機構を解明するために、シグナル依存的GATA3転写複合体機能のメカニズムを明らかにすることを目的とする。肥満や糖尿病などの生活習慣病との関わりの中で、肝臓ILC2を標的とした細胞種特異的GATA3制御シグナルの解明することで、新規糖尿病治療シーズの探索へと発展させることを目指す。

### 3. 研究の方法

以下の通り、生理学的、免疫学的手法に加え、single cell-RNA-seq (scRNA-seq)解析を含むNGS解析を用い、複合的に細胞の性質や機能を検討した。

#### (1) in vivo/ in vitroの肝臓糖代謝を下記の手法で評価した。

- ・ 肝臓組織RT-qPCRによるG6pcなど糖新生酵素の評価。
- ・ 高脂肪食(High Fat Diet; HFD) 3か月負荷；肥満、高血糖、糖新生亢進モデル。
- ・ 肝臓組織Glycogen content (貯蔵糖の定量)
- ・ 肝臓からのprimary hepatocyte単離、培養

#### (2) ILC2の性質をGATA3転写因子を軸に、下記手法で評価した。

- ・ Flowcytometryを用いた肝臓、肺ILC2の単離。
- ・ Flowcytometryを用いたILC2細胞内IL-13の定量。
- ・ 肝臓・肺ILC2のGATA3-IP/MS-MS複合体解析
- ・ 肝臓・肺ILC2のATAC-seq/GATA3-ChIP-seq
- ・ ELISAによる血清IL-13

#### (3) 一細胞レベルのILC2、肝細胞の性質と相互作用を、下記手法で評価した。

- ・ 肝臓・肺ILC2、hepatocyteを主な対象としたSingle cell-RNA-seq (scRNA-seq)
- ・ scRNA-seq解析としては、Seurat version4を用いた解析。
- ・ 細胞集団のclustering、発現変動遺伝子の評価、TRRUSTによる上流因子解析、
- ・ Gene Ontology analysis, 細胞間相互作用解析、pseudotime-analysis等

### 4. 研究成果

初年度(2019年度)は、肝臓ILC2、肺ILC2のflowcytometryのsortingによる単離、培養系の確立を重点的に行なった。また、ATAC-seq、bulk-RNA-seq、GATA3-ChIP-seqを行った。GATA3がILC2の鍵転写因子であることはすでに報告があるが、GATA3複合体という観点から新たなILC2の役割を検討した。ILC2の細胞数が限定的であり、解析の信頼性を保つために必要な細胞数、必要マウスの匹数などを考慮し十分に計画のうえで実験を行った。解析に際しても共同研究者とともに、全体の論文の流れを踏まえたうえで、解析の方向性、解釈についてdiscussionとdata解釈を重ねた。

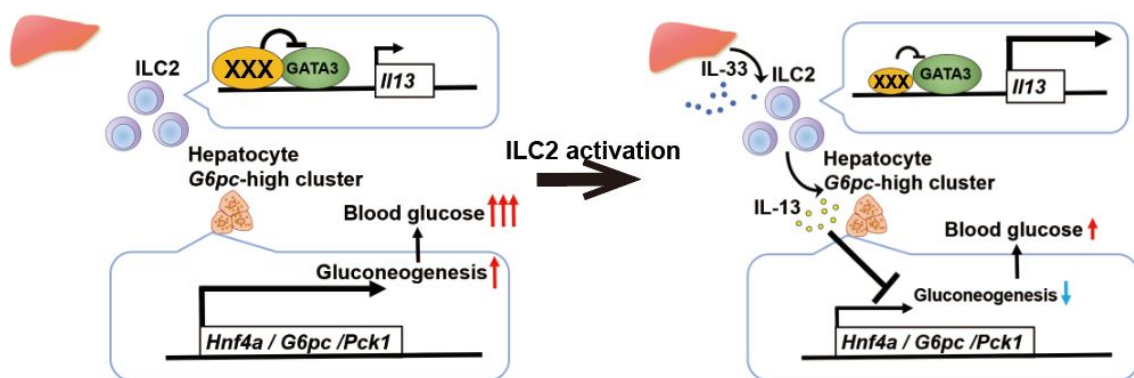
二年目(2020年度)はsingle cell-RNAseqの実験系の確立、が大きな課題であった。初めて行う実験

系であり計画、条件検討にかなりの時間を要した。解析系の確立についてもLinux PCの導入、解析系の環境構築など実際の解析に至るまでに非常に多くの時間を要した。その一方で、hepatocyte、肝臓ILC2の両者のscRNA-seqから、Bulk-RNA-seqの解析からは見えなかった細胞の多様性や、細胞間の相互作用を観察することができ、これまでにない情報を得ることができた。

最終年(2021年度)は、これまでに得た情報を統合解析し肝臓ILC2の役割を解釈すること、論文執筆作業に多くの時間を費やした。最終的に肝臓ILC2が直接肝細胞の糖新生を抑制することを分子レベルで明らかにすることができ、また、特定の肝細胞集団でどのような転写因子が活性化しているか、などさまざまな情報を得ることができた。また得られた結果を踏まえたChIP-PCR、IP-WBなどによるvalidationを行った。これにより、網羅的解析からみえた候補が実際に機能的に重要であることを明らかになった。ILC2もhepatocyteも一樣な集団ではなく、細胞ごとに性質が異なる多様な集団であり、single cell RNA-seqにより得られる知見の有用性を実感した。また、相互作用解析から肝臓ILC2の糖新生抑制作用について特定の肝細胞集団とILC2集団との相互作用を見出し、それがXXX signalを介することを発見し、それをin vitroの機能解析により実証できた。現在、本研究の集大成を投稿論文としてまとめており、これまで見出したコンセプトの妥当性を裏付けるデータがさらに蓄積され、より信頼性の高い成果を報告できると考えている。本研究のまとめを以下の図に示す。肝臓ILC2において、GATA3結合分子であるfactor XXXはIL13産生を抑制している(下図 左)。IL-33により肝臓ILC2を活性化すると、factor XXXによるIL-13産生の抑制が解除され、IL-13を介して糖新生酵素を高発現する肝細胞clusterにおける、糖新生酵素の発現を抑制し、血糖上昇が抑制される(下図 右)。これは一細胞レベルの解析で明らかになった、肝臓ILC2の糖代謝における新たな役割である。

2022年度も基盤Cに採択されており、本研究を継続する予定である。

Visium(空間的遺伝子発現解析)を用いて位置情報も紐づけたまま肝臓組織の一細胞解析を行い、肝臓糖代謝において新たな知見を発見し、新規糖尿病治療シーズの探索への貢献を目指す。



図：肝臓ILC2由来のIL-13を介した糖新生抑制機序の解明

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡野公亮, 瀧由樹, 五十嵐活志, 類家裕太郎, 内藤久美子, 石渡一樹, 河野聡美, 石田晶子, 藤本真徳, 鈴木佐和子, 小出尚史, 田中知明, 横手幸太郎
2. 発表標題 集学的治療により長期間Stable Diseaseを維持するstage IV副腎皮質癌の一例
3. 学会等名 第22回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田裕太, 瀧由樹, 五十嵐活志, 類家裕太郎, 内藤久美子, 石渡一樹, 河野聡美, 石田晶子, 熊谷仁, 藤本真徳, 鈴木佐和子, 小出尚史, 小野啓, 田中知明, 横手幸太郎
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤(ICI)による副腎不全(irAE)とステロイドの影響の鑑別に対する考察
3. 学会等名 第22回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤啓太, 五十嵐活志, 瀧由樹, 類家裕太郎, 石渡一樹, 内藤久美子, 河野聡美, 石田晶子, 藤本真徳, 鈴木佐和子, 小出尚史, 田中知明, 横手幸太郎
2. 発表標題 グルココルチコイドによるポジティブフィードバックが示唆された周期性異所性ACTH症候群疑いの一例
3. 学会等名 第22回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山形一行, 田村 愛, 長濱博章, 藤本真徳, 中山哲俊, 横山真隆, 橋本直子, 村田和貴, 西村 基, 田中知明
2. 発表標題 ES細胞におけるDNA損傷応答シグナルとlncRNA-p53誘導型lncRNA群の同定とその機能
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野聡美, 村田和貴, 藤本真徳, 中山哲俊, 樋口誠一郎, 橋本直子, 佐久間一基, 永野秀和, 田中知明
2. 発表標題 シングルセル解析から捉えた副腎性クッシング症候群の分子病態
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田裕太, 瀧 由樹, 五十嵐活志, 類家裕太郎, 内藤久美子, 石渡一樹, 河野聡美, 石田晶子, 藤本真徳, 永野秀和, 鈴木佐和子, 小出尚史, 小野 啓, 田中知明, 横手幸太郎
2. 発表標題 PA患者の診断における生理食塩水負荷2時間値の有用性の検討
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本真徳, 村田和貴, 中山哲俊, 田中知明
2. 発表標題 褐色細胞腫5例の腫瘍と正常副腎髄質のsingle cell RNA-seq解析
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田和貴, 藤本真徳, 高 躍, 宮 英博, 松田達磨, Zahara Siti, 河野聡美, 宮本康基, 中山 哲俊, 横山真隆, 田中知
2. 発表標題 Damaged intestinal stem cells are restored exclusively by daughter crypt cells that require ASCL2 and respond to Interleukin-11
3. 学会等名 第39回内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山形一行, 田村 愛, 長濱博章, 藤本真徳, 中山哲俊, 横山真隆, 橋本直子, 村田和貴, 西村 基, 田中知明
2. 発表標題 ヒトES細胞におけるp53誘導型長鎖非コードRNA(lncRNA)群の同定及び機能解析
3. 学会等名 第39回内分泌代謝学サマ-セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本真徳, 山形一行, 村田和貴, 横山真隆, 横手幸太郎, 田中知明
2. 発表標題 Single Cell RNA-seq(scRNA-seq)・Omics解析を用いた肝臓ILC2による糖新生抑制作用の検討
3. 学会等名 第39回内分泌代謝学サマ-セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本真徳, 横山真隆, 姚 躍, 横手幸太郎, 田中知明
2. 発表標題 肝臓2型自然免疫細胞の血糖低下作用機序の検討 RNA-seq/ATAC-seq/GATA3-ChIP-seq/MASSを用いた統合解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本真徳, 横山真隆, 村田和貴, 姚 躍, 横手幸太郎, 田中知明
2. 発表標題 肝臓ILC2のGATA3を軸としたOMICs解析(single cell RNA-seq/Gata3-ChIP-seq/Gata3-MASS)と、肝臓ILC2の糖新生抑制作用の検討
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本真徳, 五十嵐活志, 類家裕太郎, 内藤久美子, 石渡一樹, 河野聡美, 石田晶子, 出口ハンナ, 鈴木佐和子, 小出尚史, 小野 啓, 田中 知明, 横手
2. 発表標題 当科でのエサキセレン使用例87例の導入前後の臨床的特徴の後ろ向き検討 血圧Responder 13例、Non-Responder 19例の比較と併せて
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内藤久美子, 鈴木佐和子, 五十嵐活志, 類家裕太郎, 石渡一樹, 石田晶子, 出口ハンナ, 藤本真徳, 小出尚史, 堀口健太郎, 池田純一郎, 田中知明, 横手 幸太郎
2. 発表標題 下垂体病変を伴う血管内大細胞型B細胞性リンパ腫の特徴とその病態
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本直子, 藤本真徳, 樋口誠一郎, 永野秀和, 小出尚史, 横手幸太郎, 田中知明
2. 発表標題 褐色細胞腫に合併した糖代謝異常の病態解析.
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本真徳, 横手幸太郎, 田中知明
2. 発表標題 糖代謝調節における肝臓2型自然リンパ球の新たな機能的役割
3. 学会等名 第92回内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 藤本真徳, 横手幸太郎, 田中知明
2. 発表標題 糖代謝調節における肝臓2型自然リンパ球の新たな機能的役割
3. 学会等名 第56回臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本真徳, 横山正隆, 横手幸太郎, 田中知明
2. 発表標題 肝臓2型自然リンパ球の肝糖新生制御作用とその機序の検討
3. 学会等名 第40回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanori Fujimoto, Koutarou Yokote, Tomoaki Tanaka
2. 発表標題 Hepatic Type 2 Innate Lymphoid Cells Suppress Gluconeogenesis via the IL-33/GATA3/IL-13 Axis
3. 学会等名 American Diabetes Association 's 79th Scientific Sessions
4. 発表年 2019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
研究 分担者	田中 知明  (Tanaka Tomoaki)  (50447299)	千葉大学・大学院医学研究院・教授    (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	永野 秀和  (Nagano Hidekazu)  (60788876)	千葉大学・大学院医学研究院・特任講師    (12501)	
研究分担者	横山 真隆  (Yokoyama Masataka)  (20514871)	千葉大学・大学院医学研究院・助教    (12501)	
研究分担者	橋本 直子  (Hashimoto Naoko)  (10724875)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教    (12501)	

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