

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03382

研究課題名（和文）肝臓の糖脂質代謝とNAFLDにおけるマクロファージ由来因子による転写制御の意義

研究課題名（英文）Deciphering hepatic feeding-state-dependent metabolic gene regulation coordinated by intercellular crosstalk

研究代表者

酒井 真志人（Sakai, Mashito）

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：40643490

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝臓の組織マクロファージであるクッパー細胞と肝細胞の相互作用に着目し、肝臓マクロファージ由来因子による肝細胞の摂食依存性の遺伝子発現調節と肝糖・脂質代謝に与える影響を検討した。クッパー細胞の遺伝子発現の一部は、摂食時にインスリン受容体に依存的に制御されていた。また、クッパー細胞由来因子は肝細胞のグルココルチコイド受容体標的遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓における摂食依存性の遺伝子発現制御メカニズムの解明は、糖尿病・代謝疾患研究における重要な課題である。本研究では、肝臓の組織マクロファージであるクッパー細胞が肝細胞の糖・脂質代謝を調節する可能性を考へて検討した。その結果、クッパー細胞は肝細胞において摂食依存性に制御されるグルココルチコイド受容体標的遺伝子の発現を調節する機能を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The expression of hepatic metabolic enzymes is regulated at the gene transcription level, mainly by hormones and nutrients, thereby maintaining the systemic homeostasis of glucose and lipid metabolism. Kupffer cells are resident macrophages in the liver and are assumed to affect hepatic gene expression through secreted factors. We investigated the role of Kupffer cells in hepatic metabolic gene regulation using inducible Kupffer cell ablation and found that Kupffer cell-derived factors regulated hepatic metabolic genes including glucocorticoid receptor target genes in hepatocytes during feeding.

研究分野：病態生化学

キーワード：クッパー細胞 インスリンシグナル 肝代謝

1. 研究開始当初の背景

肝臓の糖脂質代謝遺伝子の発現は、摂食状態に応じて、ホルモンと栄養素により遺伝子転写レベルで制御され、糖脂質代謝の恒常性を維持している。糖尿病では、摂食サイクル依存的な遺伝子発現調節機構が破綻し、肝臓の脂質合成系および糖新生系酵素遺伝子の発現の病的亢進が脂肪肝と高血糖の原因となる。そのため、肝臓における摂食依存性の遺伝子発現制御メカニズムの解明は、糖尿病・代謝疾患研究における重要な課題である。

肝細胞の代謝機能は、肝臓を構成する細胞の相互作用の影響を受けている。しかし、これまでの肝糖脂質代謝の研究は、主に肝組織と肝細胞を用いて行われてきた。そのため、肝細胞の絶食・摂食応答遺伝子発現における肝臓の非実質細胞の役割は、十分に明らかとなっていない。肝臓の非実質細胞はクッパー細胞、血管内皮細胞、肝星細胞、その他の免疫細胞から構成されるが、中枢神経におけるインスリン作用は、クッパー細胞の IL6 の発現を誘導して肝細胞の STAT3 を活性化し、糖新生系酵素遺伝子の発現を抑制する。このように、肝非実質細胞は肝細胞の代謝遺伝子発現を制御しているが、これまで、肝臓を構成する各細胞における、摂食状態に対する転写応答の解析は行われてこなかった。

食生活の欧米化や慢性的な運動不足に伴って、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) の患者が増加しており、わが国の有病率は約 30% と報告されている。10-20% の NAFLD は、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) に進展し、肝硬変、肝細胞癌発症の原因となるが、脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver, NAFL) と NASH を分ける決定的因子は、明らかとなっていない。NASH には複数のマクロファージ集団が関与し、単球由来マクロファージが炎症と線維化の進展に関与すると考えられている。また、NASH では、胎生由来のクッパー細胞が徐々にアポトーシスを起こし、単球由来マクロファージで置換される。NASH におけるクッパー細胞の単球由来マクロファージによる置換は肝障害を増悪させるが、その分子機構は不明である。

2. 研究の目的

肝臓を構成する細胞の細胞間相互作用が、摂食状態に応じた肝細胞の転写応答を調節するメカニズムを明らかにする必要がある。本研究の目的は、肝臓マクロファージ由来因子による肝細胞の遺伝子発現調節が代謝表現型に与える影響を解明することである。

3. 研究の方法

肝臓マクロファージ由来因子が、肝臓における摂食サイクル依存的な代謝関連遺伝子の発現調節に果たす役割とそのメカニズムを明らかにするために、以下の方法で研究をおこなった。

(1) クッパー細胞除去が肝臓の摂食依存性の遺伝子発現に与える影響の解析

クッパー細胞特異的 cre マウスである Clec4f-cre-tdTomato マウスを、cre 依存性にジフテリア毒素受容体 (diphtheria toxin receptor, DTR) を発現する Rosa26iDTR マウスと交配することで、クッパー細胞特異的に DTR を発現するマウスを作製した。同マウスにジフテリア毒素 (diphtheria toxin, DT) を投与することにより、クッパー細胞を除去して、肝細胞の摂食依存性の遺伝子発現に与える影響を検討した。

クッパー細胞を除去すると、単球が肝臓にリクルートされて、肝臓マクロファージに分化する。そのため、上記のモデルにおいて、クッパー細胞除去の効果は、単球由来マクロファージによって代償されて減弱する可能性がある。この単球の動員は CCR2^{-/-} マウスにおいて著減するため、クッパー細胞特異的 DTR 発現マウスに、CCR2^{-/-} マウスのバックグラウンドを導入したマウスにおいても同様の検討を実施した。

(2) クッパー細胞特異的インスリン受容体欠損マウスの解析

クッパー細胞における摂食依存性の遺伝子発現制御におけるインスリンシグナルの関与と、NAFLD におけるクッパー細胞のインスリン抵抗性の病態生理学的意義を明らかにするために、クッパー細胞特異的インスリン受容体欠損マウスを用いた検討を実施した。まず、クッパー細胞特異的 cre マウスである Clec4f-cre-tdTomato マウスと Insr flox マウスを交配してクッパー細胞特異的インスリン受容体欠損マウスである Insr flox/flox; Clec4f-Cre-tdTomato^{+/+} マウス (KC-Insr KO) を作製した。次に KC-Insr KO マウスとそのコントロールマウス (Insr flox/flox; Clec4f-Cre-tdTomato^{-/-}) から、摂食時、もしくは絶食後にクッパー細胞と肝組織を採取して、RNA-seq による遺伝子発現解析を実施した。

(3) 肝臓由来シグナルによるクッパー細胞分化法の開発

クッパー細胞は、肝臓の代謝機能に影響を与える他、NASH における炎症と線維化の進展に関与している。しかし、ヒトの肝生検で採取できる肝組織には限りがあることから、ヒトの肝病態におけるクッパー細胞の表現型は、ほとんど明らかとなっていない。一方、ヒトの末梢血単核細胞

胞から単球を単離することは容易である。そこで、ヒト単球由来マクロファージを用いて、クッパー細胞の分化・機能維持に必要な環境シグナルを用いて、クッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導を試みた。

4. 研究成果

(1) クッパー細胞による肝細胞の摂食依存性の遺伝子発現制御

Clec4f-cre^{+/-}; Rosa26iDTR^{+/-} マウスに DT 200ng を腹腔内投与することでクッパー細胞を除去して 48 時間後に、絶食・再摂食時の遺伝子発現を RNA-seq で検討したところ、クッパー細胞が、肝臓の摂食依存性の遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。上記のモデルにおいては、クッパー細胞を除去した後、速やかに単球が肝類洞に遊走して肝臓マクロファージに分化する。そこで、単球の動員が減少する Clec4f-cre^{+/-}; Rosa26iDTR^{+/-}; CCR2^{-/-} マウスにおいても同様の検討を実施した。クッパー細胞の特異的な除去が肝細胞の転写に与える影響の解析から、クッパー細胞由来因子は肝細胞のグルコシルコリチン受容体標的遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

(2) 肝臓の脂質代謝におけるクッパー細胞のインスリンシグナルの意義

KC-Insr KO マウスとそのコントロールマウスから、摂食時、もしくは絶食後に肝組織とクッパー細胞を採取して、RNA-seq による遺伝子発現解析を実施した。その結果、*Cxcl2* 等クッパー細胞において摂食依存性に調節されている分泌因子の一部は、クッパー細胞におけるインスリン受容体に依存性に制御されていることが明らかとなった。また、KC-Insr KO の肝細胞では脂肪酸の不飽和化酵素である *Scd1* を含む複数の脂質代謝遺伝子の発現変動がみられた。これらの検討から、インスリンによるクッパー細胞由来因子の調節が肝細胞の脂質代謝制御に果たす新たな役割が明らかとなった。

(3) 肝臓由来シグナルによるクッパー細胞分化法の開発

クッパー細胞特異的遺伝子の発現には、肝類洞内皮細胞上の Notch リガンド DLL4 による Notch-RBPJ シグナルの活性化と、肝星細胞、類洞内皮細胞由来の TGF- β /BMP ファミリー分子による SMAD シグナルの活性化が必要である。そこで、ヒト CD14 陽性単球を、3 日間ヒト M-CSF (10ng/ml) で刺激した後、DLL4 でコートしたディッシュ上に移動して 24 時間刺激し、RNA を抽出して RNA-seq による遺伝子発現解析を実施した。その結果、ヒト CD14 陽性単球由来マクロファージにおいて、DLL4 によるクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導が確認された。ヒトの肝臓マクロファージにおける疾患依存性の変化を *in vitro* で解析するツールとして有用と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakai Mashito	4. 巻 14
2. 論文標題 Exploring the signal-dependent transcriptional regulation involved in the liver pathology of type 2 diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 15~20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-022-00610-0	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 Bennett Hunter, Troutman Ty D., Zhou Enchen, Spann Nathanael J., Link Verena M., Seidman Jason S., Nickl Christian K., Abe Yohei, Sakai Mashito, Pasillas Martina P., Marlman Justin M., Guzman Carlos, Hosseini Mojgan, Schnabl Bernd, Glass Christopher K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Systematic analysis of transcriptional and epigenetic effects of genetic variation in Kupffer cells enables discrimination of cell intrinsic and environment-dependent mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2022.09.22.509046	査読の有無 無
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 酒井 真志人	4. 巻 28巻1号
2. 論文標題 非アルコール性脂肪肝炎における肝臓マクロファージ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本門脈圧亢進症学会雑誌	6. 最初と最後の頁 7-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 酒井 真志人	4. 巻 40巻5号
2. 論文標題 NASHにおけるマクロファージの多様性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 721-726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井真志人
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎におけるマクロファージの多様性
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井真志人
2. 発表標題 シグナル依存性の転写調節による糖尿病の肝病態の制御機構に関する研究
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井真志人
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎におけるマクロファージの多様性
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井真志人
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎におけるマクロファージの多様性の制御機構
3. 学会等名 第8回肝臓と糖尿病・代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井真志人
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎におけるマクロファージの多様性とその制御機構
3. 学会等名 第40回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井真志人
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎におけるマクロファージの多様性の制御機構
3. 学会等名 日本動脈硬化学会 研究者育成セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井 真志人
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎における単球・マクロファージのニッチェ特異的なリプログラミング
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井 真志人
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎とマクロファージ
3. 学会等名 第28回日本門脈圧亢進症学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井 真志人
2. 発表標題 Decoding Environmentally Driven Gene Regulatory Networks in Hepatic Macrophages
3. 学会等名 第94回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2021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	厚川 正則 (Atsukawa Masanori) (00386161)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	菱川 大介 (Hishikawa Daisuke) (10569966)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	
研究分担者	山崎 吉之 (Yamazaki Yoshiyuki) (90407685)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	

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
---------	---------