

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06862

研究課題名(和文) 核内受容体LXRが制御する肝臓免疫細胞間相互作用の解析

研究課題名(英文) Role of liver X receptor on the regulation of hepatic immune cell population and function in nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

梅田 香織 (ENDO-UMEDA, Kaori)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10445744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体liver X receptor (LXR)はコレステロール代謝調節センサーとして働く他、マクロファージにおいて抗炎症作用を有する。我々はLXRが肝臓に高発現することから、肝臓免疫細胞の分布及び機能における影響に着目し、欠損マウスを用いて非アルコール性脂肪肝炎マウスの解析を行った。その結果、LXR欠損群は肝臓への顕著な免疫細胞浸潤とともに炎症を誘導した。シングルセル解析等で詳細に解析したところ、骨髄由来マクロファージの増加に加え、予想外にある種のリンパ球系細胞の機能変化を見出した。本研究により、LXRは複数の免疫細胞に作用し肝炎の病態進展を制御する重要な因子であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝炎の進展には様々な免疫細胞の相互作用が重要であるが、細胞の種類が多い上に病態の進展過程や周辺環境により変化するためその制御は複雑であり、不明な点が多い。本研究において、シングルセル解析等の最先端の網羅的解析技術を用いて肝臓免疫細胞の分布や機能を詳細に解析した結果、LXRは、我々が先行研究で報告したKupffer細胞及びマクロファージ以外の細胞群の機能にも影響し、結果として肝炎進展時の肝臓免疫系全体を制御することを明らかにした。また現在、非アルコール性脂肪肝炎の有効な治療薬は存在しないことから、LXRリガンドが免疫細胞を標的としたNASHの治療薬となりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The nuclear receptor liver X receptor (LXR) regulates cholesterol homeostasis and inflammatory response in macrophages. Due to the higher expression in liver, we focused on the effect of LXR deficiency on hepatic immune cell population and function using its knockout mice, and analyzed a model of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. We found that LXR-deficient mice with western-type diet feeding strongly induced hepatic immune cell infiltration and inflammation compared to wild-type mice. Single cell analysis unexpectedly showed that LXR deficiency affects an activity of a type of lymphocytes in addition to increased number of monocytes and macrophages. These results demonstrated that LXR plays an important role in regulating the progression of nonalcoholic steatohepatitis by dynamically altering population and function of various types of hepatic immune cells.

研究分野：生化学

キーワード：LXR 核内受容体 肝臓 Kupffer細胞 マクロファージ 肝炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝臓を構成する細胞の70%は肝細胞(実質細胞)であるが残りの30%は非実質細胞であり、免疫細胞や類洞内皮細胞、間葉系星細胞などが含まれる。このうち、免疫細胞には、肝固有のマクロファージである Kupffer 細胞や骨髄由来の誘導マクロファージ、ナチュラルキラー(natural killer, NK) 細胞やNKT細胞、T細胞、B細胞などの様々な種類の細胞が互いに、または肝細胞と協調しながら代謝、炎症、生体防御、抗腫瘍活性などの肝機能を維持している(引用文献1)。近年、我が国でも脂肪肝や非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)の罹患者が増加しているが、脂肪肝からNASHの進展には、上記免疫細胞の恒常性が破綻し活性化を経た炎症反応が必要であるが、肝臓に豊富に存在する免疫細胞の制御は複雑であり、その全容は明らかではない。

(2) 核内受容体である肝臓X受容体(liver X receptor, LXR)は、コレステロールの代謝産物であるオキシステロールをリガンドとして認識して活性化するリガンド依存性転写因子であり、LXR α とLXR β の2種類のアイソフォームを有する。欠損マウスを用いた解析から、LXRは体内でコレステロール代謝調節センサーとして機能することが示された。また、マクロファージなどの免疫細胞において抗炎症作用を有することから、高コレステロール血症やアテローム性動脈硬化症などの脂質異常症のみならず、慢性炎症を伴う生活習慣病やがん、自己免疫疾患など多岐にわたる疾患の治療標的として注目されている。

(3) 研究代表者は先行研究(若手研究B、平成25-27年度、課題番号:25860248、若手研究B、平成28年度-令和2年度、課題番号:16K19061)において、LXR α/β 欠損マウスの肝臓では、通常飼育下においても骨髄由来の誘導性マクロファージが増加し、炎症応答に過敏となること(引用文献2)、LXR α 欠損マウスは肝臓への顕著なコレステロール蓄積に伴いNASHを早期に誘導し、通常は存在しない活性化マクロファージが増加し、炎症を誘導すること(引用文献3)、LXR α/β 欠損マウスの肝臓ではNKT細胞が完全に消失しており、抗腫瘍活性が減弱し、NKT細胞感受性がん細胞の肝転移を増加させること、肝臓でのNKT細胞消失の原因は胸腺における分化及び成熟化の異常によるものであること(発表論文1)など、LXR欠損マウスを用いてある種の肝臓免疫細胞の機能におけるLXRの影響に関して、複数の知見を報告した。また、近年、LXR α はKupffer細胞の機能維持に必要であることも報告されたことから(引用文献4,5)、LXRが肝臓免疫系の恒常性維持に必要であることは明らかである。しかし、これまでの研究代表者や他の研究者によって行われたLXRに関する解析は、バルクの細胞を用いた遺伝子発現解析やフローサイトメトリーを用いて各細胞に選択的に発現する表面抗原の情報を元に細胞数を計測するものが多く、NASHの病態進展時の細胞の性質変化や周辺細胞への影響などの詳細な解析は行われておらず、LXRの細胞選択的機能は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究課題では、研究代表者のこれまでの先行研究をさらに発展させるものであり、肝臓免疫細胞間相互作用におけるLXRの新規機能を見出すこととした。先行研究では、LXR欠損マウスにおけるKupffer細胞/マクロファージの集積や炎症への影響、NKT細胞の減少及び抗腫瘍活性への影響など、個々の細胞群における細胞分布及び機能解析を行い、LXRの機能を探索した(上記「1. 研究開始当初の背景」の(3))。しかし、肝臓には多様な免疫細胞が混在しており、NASHの進展には、複数の細胞間の相互作用による細胞分布及び機能の変化が示唆されることから、免疫細胞全体の挙動に対するLXRの影響を検討する必要があると考えた。そこで本研究ではLXRの肝臓免疫系制御における新規機能を発見することによりNASHの進展メカニズムの一端を明らかにすること、そしてLXRリガンドがNASHの治療薬となりうる可能性を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NASHモデルマウスの作製及び解析。野生型及び全身性LXR α/β 欠損マウス(オス、7-8週齢)に通常食(CE-2)または0.2%コレステロール及び20%脂肪(ココアバター)を含有する西洋食を摂餌させ、ヒトNASHの病態を考慮しコレステロールの毒性が軽度であるNASHを誘導するモデルを構築した。8または12週間後の血中成分分析、肝組織の観察、肝非実質細胞を用いた遺伝子発現解析、フローサイトメトリーを用いた肝臓免疫細胞の分布評価などを解析することにより、食餌及びLXR α/β 欠損の影響を検討した。なお、本研究課題において実施した全ての動物実験は、カルタヘナ法及び日本大学遺伝子組換え実験実施規程、文部科学省が定めた「研究機関等における実験動物等の実施に関する基本指針」に従い、日本大学医学部に実験計画を申請し、承認を得た上で実施した。

(2) 肝臓免疫細胞を用いたシングルセルマルチオーム解析。上記(1)の野生型、全身性 LXR α/β 欠損における通常食及び西洋食負荷の4群のマウスを用いて、肝臓より非実質細胞を単離後、セルソーターを用いて Ly6G 陽性好中球を除く CD45 陽性の免疫細胞を単離した。生細胞数を計測後、単離した細胞を用いて 10xGenomics 社の Chromium シングルセルマルチオーム Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) + 遺伝子発現システムを用いてライブラリーを作製し、シーケンシングを行った。なお、ライブラリー作製、シーケンシング及び R のプログラミングパッケージである Cell Ranger を用いた一次解析までは、令和4年度第2期先進ゲノム支援による支援(課題番号: 22H04925 (PAGS))を受け、東京大学において実施された。一次解析後のマッピングデータを用いた二次解析については同じく R のプログラミングパッケージである Seurat 及び Signac を主に用いて検討した。

(3) 細胞選択的 LXR α/β 欠損マウスを用いた NASH モデルマウスの解析。LXR が作用する肝臓免疫細胞を特定するため、テキサス大学の David Mangelsdorf 教授及び仏 GIE-CERBM (IGBMC) の Pierre Chambon 教授より LXR $\alpha^{flxed/flxed}$ LXR $\beta^{flxed/flxed}$ (LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$) マウスを供与を受け、The Jackson Laboratory より購入したある種の細胞を標的とした選択的 Cre レポータートランスジェニックマウスと交配させることにより、Cre-LoxP 系を用いた細胞選択的 LXR α/β 欠損マウスを樹立した。これらのマウスと littermate コントロールとして LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$ マウスを用いて上記(1)と同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) NASH モデルマウスの作製及び解析。野生型及び全身性 LXR α/β 欠損マウスに通常食または西洋食を摂餌させたところ、野生型において血中総コレステロール値の増加を認めた。一方、LXR α/β 欠損群においてはコレステロール逆転送系が障害されるため、血中コレステロール値は野生型と比較し低値であり、西洋食の影響は受けなかった。次に、肝障害マーカーであるトランスアミナーゼ値を評価した。その結果、野生型では西洋食による影響は認めなかったが、LXR α/β 欠損により増加傾向を示し、西洋食負荷によりさらに傾向は増加した。肝組織をヘマトキシリン-エオシン染色により比較したところ、野生型において西洋食負荷により中性脂肪等の脂肪滴の沈着を認めた。一方、LXR α/β 欠損においては脂質の沈着は軽度であったが、顕著な免疫細胞浸潤を認めた。フローサイトメトリーにより細胞分布を評価したところ、LXR α/β 欠損においては先行研究の結果と一致し、Kupffer 細胞の減少及び代償的な骨髄由来の誘導マクロファージの増加が観察できた。また、肝臓非実質細胞を用いたバルクの遺伝子発現解析により、これらの細胞マーカーの遺伝子群について細胞分布と関連した発現変化が観察された。以上、NASH モデルマウスの解析により、全身性 LXR α/β 欠損により早期に肝臓の炎症を誘導し NASH を発症することが明らかとなった。

(2) 肝臓免疫細胞を用いたシングルセルマルチオーム解析。

本研究課題の目的である「肝臓免疫細胞間相互作用における LXR の新規機能を見出す」ため、シングルセル解析を実施し、肝臓免疫細胞全体に対する LXR 欠損の影響を検討した。また、LXR は転写因子であるため、通常の遺伝子発現解析に加え、オープンクロマチン領域を ATAC-seq により同時に検出することにより、LXR が直接作用する細胞及び細胞選択的標的遺伝子を同定できると考え、シングルセルマルチオーム解析を行った。4 検体のシングルセル遺伝子発現及び ATAC シーケンスデータを統合させ、クラスタリングを行った結果、各細胞は Kupffer 細胞、骨髄由来マクロファージ、NK 細胞、T 細胞、B 細胞などの合計 14 個の細胞集団に分類された(図1)。次に、4 群間で細胞分布を比較したところ、(1)の検討と一致し、Kupffer 細胞及び誘導マクロファージの変化を確認できたが、予想外に、これまで着目していなかったある細胞集団における遺伝子発現パターンが4群間で大きく変化することを見出した。この知見を元に再度フローサイトメトリーを用いて免疫細胞を解析した結果、同様の変化を確認した。

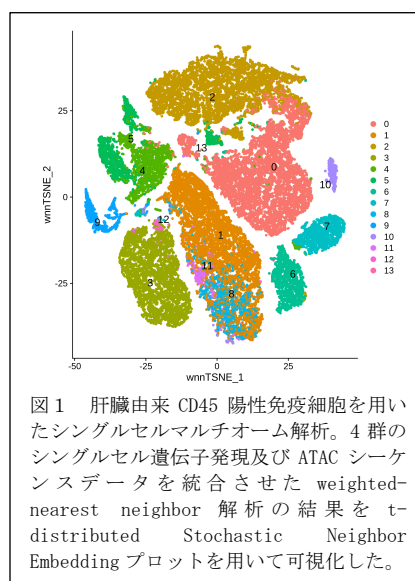


図1 肝臓由来 CD45 陽性免疫細胞を用いたシングルセルマルチオーム解析。4 群のシングルセル遺伝子発現及び ATAC シーケンスデータを統合させた weighted-nearest neighbor 解析の結果を t-distributed Stochastic Neighbor Embedding プロットを用いて可視化した。

(3) 細胞選択的 LXR α/β 欠損マウスを用いた NASH モデルマウスの解析。LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$ マウスと Cre レポータートランスジェニックマウスを交配させ、3 系統の細胞選択的欠損マウスを樹立した。まず、これらのマウスとコントロールである LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$ マウスを用いて通常飼育下における肝臓免疫細胞組成をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、コントロールマウスと比較して明らかに免疫細胞分布の異なるマウスを見出した。また、その表現型は全身性欠損マウスのものとも一部異なるものであった。次に、(1)と同様の条件において NASH モデルマウスを作製し、解析を行ったところ、その細胞分布変化はさらなる変化を認めた。

以上、本研究課題において、「4. 研究成果」に示した(1)から(3)までの解析結果により、LXR α 及び β はNASHの進展を免疫細胞の機能を介して抑制すること、肝臓免疫系全体をダイナミックに制御することを明らかにした。NASHの進展には肝臓細胞における脂質蓄積の結果、産生されたストレス等で様々な免疫細胞が活性化し、相互作用することが重要である。しかし、細胞の種類が多い上に病態の進展過程や周辺環境により変化するため、その免疫制御は複雑であり、これまで様々なモデルマウスやヒト臨床検体を用いた検討が行われているが、未だ不明な点が多い。本研究課題において、特に先進ゲノム支援に採択されたことによって、シングルセルマルチオーム解析という最先端の網羅的解析技術を用いて肝臓免疫細胞の分布や機能を詳細に解析することができ、当初の想定以上の結果を得ることができた。LXRは本来、研究代表者が先行研究で報告したKupffer細胞及びマクロファージが主な標的細胞であり、炎症や食能に影響すると考えられていた。しかし、本研究課題で実施したマルチオーム解析の結果、LXRはKupffer細胞/マクロファージ以外のある種の細胞群の機能にも強く影響し、結果としてNASH進展時の肝臓免疫系全体を制御することを明らかにした。これらの知見はLXRが肝臓免疫系の恒常性維持に極めて重要な因子であることを示している。今後は、マルチオーム解析の情報解析をさらに進めることにより、LXRの細胞選択的標的遺伝子の絞り込みを進め、より詳細な制御メカニズムを明らかにすることが必要である。現在、NASHの有効な治療薬は存在しない。LXRはリガンド依存性転写因子であることから、本研究課題で得られた知見によって、免疫細胞を標的とした作用選択的LXRリガンドがNASHの治療薬となりうる可能性が示された。

<引用文献>

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 5.924
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 4.736
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 4.996
4. Scott CL, T'Jonck W, Martens L et al., The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages. *Immunity*, 49(2):312-325, 2018
5. Sakai M, Troutman TD, Seidman JS et al., Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity. *Immunity*, 51(4):655-670, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Endo-Umeda Kaori, Nakashima Hiroyuki, Uno Shigeyuki, Toyoshima Shota, Umeda Naoki, Komine-Aizawa Shihoko, Seki Shuhji, Makishima Makoto | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Liver X receptors regulate natural killer T cell population and antitumor activity in the liver of mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 22595 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02062-z | 査読の有無 有 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 梅田香織 |
| 2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎における核内受容体LXRによる肝臓免疫細胞制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 2023年度「先進ゲノム支援」拡大班会議 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 梅田（遠藤）香織，中島弘幸，宇野茂之，豊島翔太，梅田直，相澤（小峯）志保子，関修司，横島誠 |
| 2. 発表標題 核内受容体Liver X receptorによるナチュラルキラーT細胞分布及び肝臓抗腫瘍活性制御 |
| 3. 学会等名 日本レチノイド研究会 第33回学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 梅田（遠藤）香織，中島弘幸，宇野茂之，豊島翔太，梅田直，相澤（小峯）志保子，関修司，横島誠 |
| 2. 発表標題 核内受容体Liver X receptorによるナチュラルキラーT細胞分布及び肝臓抗腫瘍活性制御 |
| 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 Kaori Endo-Umeda, Hiroyuki Nakashima, Shota Toyoshima, Shihoko Komine-Aizawa, Shuhji Seki, Makoto Makishima |
| 2. 発表標題 Liver X receptors regulate natural killer T cell population and hepatic antitumor activity in mice |
| 3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|