

令和 6 年 6 月 30 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18260

研究課題名（和文）肝臓における新規マクロファージサブタイプの同定とその機能の包括的理解

研究課題名（英文）Identification of novel macrophage subtypes in the liver and comprehensive understanding of their function

研究代表者

佐藤 荘 (sato, takashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60619716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：これまで1種類しか存在しないと考えられてきたマクロファージであるが、様々な最近の研究や研究担当者のこれまでの研究からマクロファージは複数のサブタイプがある（多様性を持っている）ことが明らかになっている。本申請で標的臓器を肝臓、標的疾患を肝臓がんとしており、これまで主に研究・解析されているクッパー細胞以外の細胞でさらに肝臓がんの発症・進行に影響を与えるマクロファージサブタイプの探索と機能解析を行うことで、肝臓がんの発症や進行メカニズムの包括的に理解することを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで1種類しかないと考えられてきたマクロファージであるが、最近の研究や研究担当者の研究からマクロファージには複数のサブタイプがあることがわかってきている。肝臓のマクロファージ研究はこれまでクッパー細胞が主に研究・解析されており、それ以外のサブタイプの探索や研究はこれまで報告されていなかった。本研究によって肝臓がんの病態進行に関与する新しいマクロファージサブタイプの同定と機能解析によって、またそれらの各細胞に影響を及ぼす非免疫系とのクロストークの網羅的解析によって、マクロファージを1つの指標として包括的に肝臓がんを理解することができた点で意義があったといえる。

研究成果の概要（英文）：Macrophages have been considered to exist as a single type for long time. but various recent studies and the research revealed that macrophages exhibit multiple subtypes. In this research, we focused on liver and liver cancer as the targets. The objective is to comprehensively understand the mechanisms of liver cancer development and progression by exploring and functionally analyzing macrophage subtypes other than the Kupffer cells, which have been mainly studied and analyzed so far, that influence the onset and progression of liver cancer.

研究分野：免疫学

キーワード：肝臓がん マクロファージサブタイプ

1. 研究開始当初の背景

臓器の中でも肝臓は栄養の貯蔵、有害物質の解毒・分解、消化に必要な胆汁の分泌を担う非常に重要な器官であるが、慢性ウイルス性肝炎により発生する原発性肝がんや他の臓器で発生したがんが転移する転移性肝がん等が起こる臓器でもある。また、この肝臓のマクロファージはこれまでクッパー細胞が主に研究されてきた。

研究担当者がこれまでに着目してきたアレルギー、メタボリックシンドローム、肺線維症に関わる3つの疾患特異的マクロファージの観点から、肝臓にも複数種の細胞が存在していることが推測された。実際に研究担当者の予備実験から肝臓がんの病態の進行に伴って既知の細胞とは異なる分子マーカーや遺伝子発現のパターンが異なるマクロファージサブタイプが確認されたことから、本研究計画では研究対象を肝臓に定め、肝がんの進行に影響を及ぼす新規マクロファージサブタイプの探索と同定及び機能解明を行うことで、肝臓がんの発症・進行メカニズムの全貌を明らかにしたいという思いから本研究構想に至った。

2. 研究の目的

これまで1種類しか存在しないと考えられてきたマクロファージであるが、様々な最近の研究や研究担当者のこれまでの研究からマクロファージは複数のサブタイプがある(多様性を持っている)ことが明らかになっている。本申請で標的臓器を肝臓、標的疾患を肝臓がんとしており、これまで主に研究・解析されているクッパー細胞以外の細胞でさらに肝臓がんの発症・進行に影響を与えるマクロファージサブタイプの探索と機能解析を行うことで、肝臓がんの発症や進行メカニズムの包括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

①肝臓がんの病態進行に伴って変化するマクロファージサブタイプの分類と機能解析
肝臓がんモデルマウスとしてHydrodynamic injection (HDI)法を用いて肝臓に発がん遺伝子であるRas及びがん抑制遺伝子p53の発現抑制をかけて発がんさせる肝臓がんモデルを立ち上げた。またHDI法に加え、コリン欠乏高脂肪メチオニン原料飼料(CDA-HFD)給餌による肝臓がんモデルマウス等の複数の発がんモデルも用いる。上記の方法で発がんした病態進行度の比較検討を行い、複数の発がんモデルにおいて共通に表れるマクロファージや単球のサブタイプの検討を行う。HDI法ではRas発現プラスミドとp53抑制プラスミドの混合液を尾静脈から定圧及び一定時間で注入し、病態進行期である28日と悪化期である56日に組織学的解析と各タイムポイントでのマクロファージ・単球の各サブタイプの経時的変化を取り入れ、フローサイトメーターを用いてデータの入手を行った。

これらの解析に加え、担癌マウス内で変化するマクロファージや単球の詳細な分類についてはシングルセル解析をし、その中からがんの病態の発症・増悪に関わると考えられる新規マクロファージの探索を行った。得られた複数のマクロファージサブタイプ候補細胞を担がんの野生型マウスに移植することにより、肝臓がんの進行に影響を及ぼす細胞かを決定した。病態に影響を及ぼす細胞の同定ができたので、その細胞を肝臓に過剰に移植し、細胞が多量にある状況下でシングルセル解析を行い、さらにリガンドレセプター解析を行って、細胞同士の関係性を検討した。

②肝臓がんの病態進行に伴う疾患特異的マクロファージの解析と遺伝子発現の網羅的解析

新規マクロファージサブタイプにおける遺伝子発現をRNA-Sequence (RNA-seq)を用いて検討し、これまで蓄積してきたその他の疾患特異的マクロファージサブタイプの網羅的遺伝子発現データ群との比較検討することで、肝臓がんの病態に関与するマクロファージサブタイプ内で特異的に変化する疾患関連遺伝子の候補を抽出した。得られた候補遺伝子をノックダウン(KD)システムで安価で簡易的に疾患への関与を検討し、ポジティブなデータが得られた遺伝子に関してノックアウト(KO)マウスを作製した。このマウスを使用して新規マクロファージサブタイプに及ぼす影響及び、病態に及ぼす影響を解析してサブタイプの制御因子を同定した。

4. 研究成果

- ① 肝臓がんの病態進行に伴って変化するマクロファージサブタイプのカテゴリと機能解析により、肝臓がんの進行に影響を与える新規マクロファージサブタイプを同定した。

野生型のマウスで複数の肝がんモデルを作製し、骨髄、リンパ節、脾臓、血中やがん移植部位で変化するミエロイド細胞を経時的にサンプルを回収してフローサイトメトリーにより解析した。

肝臓がんの発生に伴って変化する様々なミエロイド細胞を分類し、解析・検討した。異なる発がんモデルマウスにおいても共通してその数が大きく変化する細胞をいくつか同定することができた (図1)。

同定された細胞を別々に肝臓がんモデルマウスに移植し、腫瘍体積と腫瘍重量を測定することにより、どのマクロファージサブタイプが肝臓がんの増悪・抑制の機能を有しているかを検討したところ、一つのマクロファージサブタイプによって肝臓がんの増悪が顕著に抑えられることが明らかになった。

これらの解析に加え、担がん

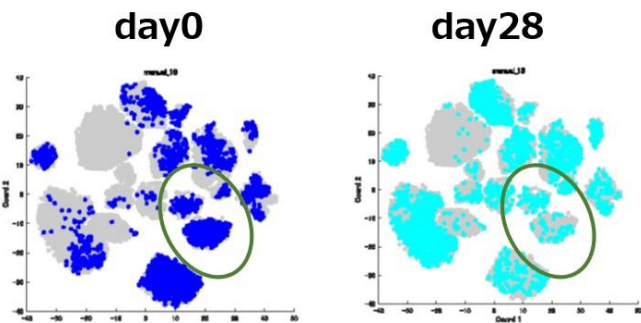
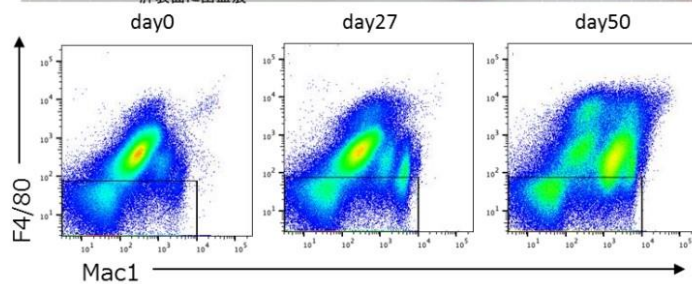
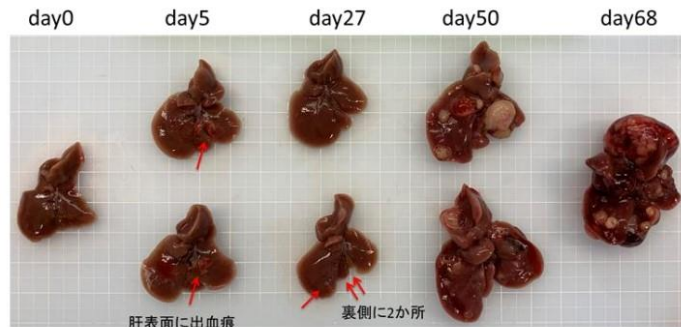
マウス内で変化するマクロファージや単球の詳細な分類を行うために、同定された新規マクロファージサブタイプを肝臓に過剰に移植し、細胞が多量にある状況下でサンプルを回収し、10x シングルセル解析システムを用いて一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を実施する。シングルセルダブレット除去、死細胞除去、細胞周期補正を行い、主成分解析 (PCA) の後に tSNE および UMAP 圧縮にて2次元で細胞分布を可視化する。

さらに階層的クラスタ解析による樹形図を作製し該当組織及び該当部位に存在している細胞を分類する。既知の各細胞マーカーを Feature プロットで可視化する事で比較対象とする。細分化されたクラスターに特異的に発現する遺伝子を30以上抽出した。さらにリガンドレセプター解析を行って、細胞同士の関係性を検討した。マクロファージサブタイプの RNA-Seq を行い、実験担当者がこれまで蓄積してきた様々なマクロファージの遺伝子発現データとの比較を行い、細胞の特徴を捉えることができた。これまでに確立した遺伝子抽出方法のノウハウを用いて、これらの遺伝子発現情報を解析し複数の疾患関連遺伝子の選出をし、候補遺伝子の断続的なノックダウン (KD) をした骨髄細胞の樹立を行った。この骨髄細胞を班致死量の γ 線を照射した野生型のマウスに移植してキメラマウスを作製し、HDI法を用いて担癌モデルマウスを作製し肝臓がんに関与する影響とマクロファージサブタイプを中心とした免疫応答を検討するために病態進行期の肝臓を回収し組織学的解析とフローサイトメトリーによる解析を行った。

これらの一連の解析により、これまで肝臓がんとの関連が報告されていない新規の疾患関連遺伝子の同定をすることができた。

- ② 肝臓がんの病態進行に伴う疾患特異的マクロファージの解析と遺伝子発現の網羅的解析

上記で同定した新規疾患関連遺伝子のノックアウト (KO) マウスを作製した。樹立した遺伝子 KO マウスを用いて肝臓がんの病態に関わる疾患特異的マクロファージで機能する重要な分子の検討を行った。KO マウス由来の細胞の遺伝子発現を RNA-Seq により検討し、発現パターンのクラスタリングを行う。これまでに作製された遺伝子発現データベースよりクラスターごとの遺伝子のプロモーター配列を抽出し、そこに結合する転写



因子を予想検討するプログラムを用いて、遺伝子発現制御に関わる転写因子を解析した。遺伝子発現を制御する重要な転写因子に関しては今後さらなる解析・検討が必要になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yan M, Komatsu N, Muro R, Huynh N C, Tomofuji Y, Okada Y, Suzuki H, Takaba H, Kitazawa R, Kitazawa S, Pluemsakunthai W, Mitsui Y, Satoh T, Okamura T, Nitta T, Im S-H, Kim C J, Kollias G, T S, Okamoto K, Tsukasaki M, Takayanagi H	4. 巻 23
2. 論文標題 ETS1 governs pathological tissue-remodeling programs in disease-associated fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1303-1317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-022-01285-0	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 Oura Seiya, Hino Toshiaki, Satoh Takashi, Noda Taichi, Koyano Takayuki, Isotani Ayako, Matsuyama Makoto, Akira Shizuo, Ishiguro Kei-ichiro, Ikawa Masahito	4. 巻 18(6)
2. 論文標題 Trim41 is required to regulate chromosome axis protein dynamics and meiosis in male mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010241	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 Hiramatsu Yukihiro, Suzuki Koichiro, Nishida Takashi, Onoda Naoki, Satoh Takashi, Akira Shizuo, Ikawa Masahito, Ikeda Hiroko, Kamei Junzo, Derouiche Sandra, Tominaga Makoto, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 The Mechanism of Pertussis Cough Revealed by the Mouse-Coughing Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03197 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.03197-21	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 Okabe J, Kodama T, Sato Y, Shigeno S, Matsumae T, Daiku K, Sato K, Yoshioka T, Shigekawa M, Higashiguchi M, Kobayashi S, Hikita H, Tatsumi T, Okamoto T, Satoh T, Eguchi H, Akira S, Takehara T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Deregulation promotes pancreatic cancer through myeloid-derived suppressor cell-mediated evasion of anticancer immunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Exp Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 95-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-023-02831-w.	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 Hosoya T, Oba S, Komiya T, Kawata D, Kamiya M, Iwai H, Miyamoto S, Kataoka M, Tobiume M, Kanno T, Aina A, Sato H, Hirakawa A, Mitsui Y, Satoh T, Wakabayashi K, Yamada T, Otomo Y, Miyazaki Y, Hasegawa H, Suzuki T, Yasuda S	4. 巻 120
2. 論文標題 Apple-shaped obesity: A risky soil for cytokine-accelerated severity in COVID-19	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Sci USA	6. 最初と最後の頁 e2300155120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2300155120.	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 Park ES, Jeon H, Lee N, Yu J, Park HW, Satoh T, Akira S, Furuyama T, Lee CH, Choi JS, Rho J	4. 巻 42
2. 論文標題 TDAG51 promotes transcription factor FoxO1 activity during LPS-induced inflammatory responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022111867.	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 Yuichi M, Tatsuya S, Kanako K, Jun I, Kensuke Y, Mariko K, Junya W, Mio E, Songling L, Tsukasa K, Seiya O, Tadashi H, Kentaro M, Yujiro N, Shohei K, Nobuo S, Daron M S, Jay W S, Shizuo A, Shinsuke Y, Yasunari M, Yuta K, Atsushi K, Toru O, Takashi S.	4. 巻 56
2. 論文標題 Expression of the readthrough transcript CiDRE in alveolar macrophages boosts SARS-CoV-2 susceptibility and promotes COVID-19 severity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 immunity	6. 最初と最後の頁 1939-1954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2023.06.013.	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 佐藤 荘
2. 発表標題 疾患特異的マクロファージの機能的多様性
3. 学会等名 第121回日本消化器病学会九州支部例会・第115回日本消化器内視鏡学会九州支部例会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 荘
2. 発表標題 マクロファージと構造細胞による炎症ダイナミクス
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 荘
2. 発表標題 疾患特異的マクロファージの機能的多様性
3. 学会等名 第96回生化学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 荘
2. 発表標題 疾患特異的マクロファージの機能的多様性
3. 学会等名 第62回 日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 takashi sato
2. 発表標題 Toward understanding for developmen of fibrosis onset
3. 学会等名 WC12022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 takashi sato
2. 発表標題 Disorder-specific macrophage subtype
3. 学会等名 Heart Failure Front Line (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 荘
2. 発表標題 疾患特異的マクロファージの機能的多様性
3. 学会等名 第51回 日本心臓血管動物質学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 荘
2. 発表標題 疾患特異的マクロファージの機能的多様性
3. 学会等名 第58回日本肺サーファクタント・界面医学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 荘
2. 発表標題 疾患特異的マクロファージの機能的多様性
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 荘
2. 発表標題 疾患特異的マクロファージの機能的多様性
3. 学会等名 第2回日本びまん性肺疾患研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 荘
2. 発表標題 疾患特異的マクロファージの機能的多様性
3. 学会等名 第50回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 takashi sato
2. 発表標題 study of disorder-specific macrophage subtypes
3. 学会等名 31th hot spring harbor international symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022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	國吉 佳奈子 (kuniyoshi kanako) (70747881)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト 助教 (12602)	

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