

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20760

研究課題名（和文）肝臓門脈域に局在する免疫制御性マクロファージの生理・病態生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Periportal macrophages protect against gut commensal-driven inflammation in the liver

研究代表者

宮本 佑（Miyamoto, Yu）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員（常勤）

研究者番号：90965336

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓には、腸管で吸収された栄養素の他に、腸内細菌やその関連物質がしばしば入ってくる。通常の肝臓ではこのような炎症誘導性の刺激に対して免疫系が過度に反応しないように制御されているが、そのメカニズムは不明な点が多く残されていた。本研究では、肝内門脈近傍に局在し、脂質、細菌、死細胞などを貪食消化する能力を持ち、抗炎症性分子を産生する免疫制御性マクロファージを同定した。このマクロファージは臓器の入り口付近で腸管から入ってくる腸内細菌やその関連物質を貪食消化し、抗炎症性サイトカインを産生することで炎症から肝臓を保護していることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会では、生活習慣の乱れや偏った食生活などによりリーキーガットになる人の数が増加している。リーキーガットでは腸内細菌などが門脈を経由して侵入してくるため、肝臓をはじめ様々な臓器で炎症が惹起され身体の不調につながる。本研究により、肝臓門脈域の免疫制御性マクロファージが腸内細菌感染に対する生体防御および肝内炎症応答の制御を担っていることを明らかにした。今後このマクロファージの機能を高めることで、リーキーガットに伴う感染症の予防・治療につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The liver frequently receives nutrients absorbed from the intestine, as well as intestinal bacteria and related substances. In a normal liver, the immune system is regulated to avoid excessive responses to such inflammatory stimuli, although many aspects of this mechanism remain unclear. This study elucidated that immunoregulatory macrophages, located near the portal vein, engulf and digest lipids, bacteria, and dead cells, and also produce anti-inflammatory molecules. These macrophages ingest intestinal bacteria and their related substances entering from the intestine at the liver entrance and produce anti-inflammatory cytokines, thereby protecting the liver from inflammation.

研究分野：免疫学、微生物学

キーワード：肝臓 門脈 マクロファージ スカベンジャー受容体 貪食 抗炎症 二次胆汁酸 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝組織は、組織学的に門脈周辺の門脈域と静脈周辺の中心静脈域に区域分けできる。多くの肝疾患には領域選択性が認められており、門脈域で優先的に発症する疾患もあれば中心静脈域で優先的に発症するものもある。近年の研究により、肝臓の構成細胞である肝細胞、血管内皮細胞、肝星細胞の性質・機能が領域によって異なることが続々と明らかにされてきた。しかし、病態形成に大きく関与する免疫細胞では領域による差異があるのか否かはほとんど知られていなかった。そこで本研究者は、肝臓の生体イメージング技術を独自に確立し門脈域と中心静脈域の免疫応答を比較解析してきた。さらに、各領域から細胞を回収する技術を開発し、各領域に存在する免疫細胞を1細胞ごとにRNA-sequence解析することで、免疫細胞の領域間の差異を解明することに成功した。以上の結果から、門脈域にはスカベンジャー受容体 Marco と抗炎症性サイトカイン interleukin-10 を共発現する免疫制御性マクロファージが局在しており、局所的に免疫システムを抑制していることがわかった。しかしながら、門脈域に免疫制御性マクロファージが局在する生理・病態生理学的な意義については不明であった。そこで本研究では、門脈域に局在する免疫制御性マクロファージが機能しないと、どのようなシチュエーションでどのような不都合が肝内に生じるのかを解明することを目標とする。

2. 研究の目的

本研究では、まず門脈域に局在する免疫制御性マクロファージがその機能を発揮できない場合に肝組織内の恒常性や病態感受性が変化するのかを明らかにする。さらに、この免疫制御性マクロファージの誘導メカニズムを解明することで、本マクロファージを標的とした新規の肝疾患予防・治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 肝臓門脈近傍の免疫制御性マクロファージの機能を欠失させたマウスの作製

本研究で標的とする免疫制御性マクロファージは Marco を特異的なマーカー分子として発現する。そこで、Marco の遺伝子座にサルジフテリア毒素受容体 (DTR) をコードする遺伝子をノックインし、Marco のプロモーター活性で DTR を発現する遺伝子改変マウスを作製する。このマウスにジフテリア毒素を腹腔内投与して標的マクロファージを除去できるか検討する。

Marco 遺伝子を欠損した既存のノックアウト (KO) マウスを解析したところ、標的マクロファージの免疫制御能 (食食消化能および抗炎症性サイトカイン産生) が有意に低下していることを確認した。すなわち、このノックアウトマウスは標的マクロファージの機能障害モデルマウスとして使用できることを意味する。

したがって、Marco-DTR マウスに加えて、この Marco KO マウスも用いて以下に示すマクロファージの生理機能の解析を進める。なお、Marco-DTR マウスはホモ接合体にするとノックアウトされてしまうため、ヘテロ接合体で使用する。

(2) 免疫制御性マクロファージの病態生理学的機能の解明

本研究対象の免疫制御性マクロファージは肝臓の入り口である門脈血管周囲に局在する。腸管で吸収された物質は門脈を経由して肝臓に直接送り込まれることと、標的マクロファージは高い食食能と抗炎症性サイトカイン産生能を有することを考慮すると、本マクロファージは腸から侵入してきた細菌などを食食消化し、さらに抗炎症性サイトカインを産生して炎症応答を制御している可能性が考えられた。そこで、Marco-DTR マウスおよび Marco KO マウスを用いて標的マクロファージが機能しない個体を作り出し、1%デキストラン硫酸ナトリウム水を自由飲水させて腸内細菌の肝内移行を誘導して、肝臓における炎症反応を解析する。なお、比較対象にはそれぞれジフテリア毒素を投与しない Marco-DTR マウスと野生型 (WT) マウスを使用する。

さらに、腸内細菌の肝内移行がみられる肝疾患の中でも特に近年罹患者数が増大している食事性の脂肪肝炎においても、標的マクロファージが疾患の発症・進行に関与しているかどうかを検討する。具体的には、標的マクロファージが機能欠失しているマウスとその比較対象マウスにメチオニン・コリン減量高脂肪ダイエットを8週間与え、食餌変更から1週ごとに炎症性細胞の肝内への浸潤、血清中肝障害マーカー、肝線維化など病態指標を計測し比較する。

(3) 免疫制御性マクロファージの分化発生メカニズムの解明

標的マクロファージの数は腸内細菌叢に依存して変化することを事前に明らかにしていた。そ

ここで、異なる飼育環境（異なる腸内細菌叢を有する）の、標的マクロファージ数が有意に異なるマウスの大腸内容を回収し、メタゲノム解析および糞便のメタボローム解析を行う。これにより、標的マクロファージの誘導と相関性を示す細菌および物質を同定する。同定された細菌あるいは物質をマウスに移植し、標的マクロファージの分化発生が増大することを確認する。

4. 研究成果

(1) 免疫制御性マクロファージの機能を欠失させたマウスの作製

まず Marco のプロモーター直下に DTR 遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスを作出した。ゲノムシーケンズを読んだ結果、目的の位置に DTR 遺伝子が挿入されていることを確認した。この Marco-DTR マウスにジフテリア毒素を腹腔内投与して標的マクロファージの除去を試みたが、わずかな減少のみみられたものの意図した程の除去効率ではなかった。したがって、本研究では Marco KO マウスを用いて標的マクロファージの機能を解析する方針に切り替えた。

(2) 免疫制御性マクロファージの病態生理学的機能の解明

まず 1%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 水を自由飲水させ腸管上皮バリアを破壊し、肝臓での腸内細菌感染を引き起こして、標的マクロファージの生理的重要性を評価した。DSS 水を 7 日間与え、その後 4 日間通常水に戻し、肝臓内の炎症について解析した。その結果、WT マウスでは DSS を与えて 7 日目には肝内に好中球・マクロファージの浸潤がみられ炎症が起こっていたが、その後 4 日間通常水に戻すと、肝内炎症は緩解していた。一方で Marco KO マウスでは、DSS 水 7 日間、通常水 4 日間与えた後、肝内炎症をみると、さらに多くの好中球・マクロファージの浸潤がみられ、炎症が慢性化することがわかった。さらに、DSS 水 7 日間、通常水 7 日間のサイクルを 3 回繰り返して肝内の状態を調べたところ、Marco KO マウスでは炎症性細胞であるヘルパー T 細胞と好中球の浸潤が WT マウスよりも有意に増大していた。また、肝障害を示す血清 ALT および AST はともに Marco KO マウスで有意に増大していた。さらに、Marco KO マウスの肝臓では門脈周囲に 1 型コラーゲンの蓄積がみられ、線維症の様相を呈していた。以上の結果から、標的マクロファージが腸から侵入してくる腸内細菌のクリアランスおよび免疫制御において重要な働きをしていることが明らかになった。

次に、Marco KO マウスと WT マウスにメチオニン・コリン減量高脂肪ダイエットを与えて脂肪肝を誘導し、肝内の病態進行について評価した。その結果、Marco KO マウスでは解析期間 8 週間の各タイムポイントで肝障害マーカー ALT の数値が WT マウスよりも高い値を示していた。さらに病理組織解析を行ったところ、脂肪肝誘導 6 週目に WT マウスでは門脈域に脂肪滴を認めなかったが、Marco KO マウスでは門脈域を含む肝組織全体で脂肪滴が発生していることが明らかになった。この結果から、標的マクロファージは脂肪肝において病態抑制的に作用していることが明らかになった。

(3) 免疫制御性マクロファージの分化発生メカニズムの解明

標的マクロファージの数が有意に異なる別施設のマウスの大腸内容を回収し、メタゲノム解析を実施した。その結果、標的マクロファージが多い方の施設で有意に増大している細菌を 5 種同定することに成功した。その中でも Odoribacteraceae は、標的マクロファージが多い個体ほど多く検出され、菌体量と標的マクロファージ数の間に強い正の相関が認められた。そこで、Odoribacteraceae の単離株を、この細菌を保有しないマウスに経口投与して移植したところ、標的マクロファージの分化発生が有意に増大した。Odoribacteraceae は二次胆汁酸のイソアロリトコール酸 (Isoallo-LCA) を産生することが報告されていた。そこで、各施設のマウス大腸内容物に含まれる Isoallo-LCA 濃度を計測したところ、標的マクロファージが多い方で約 10 倍多く産生されていることを確認した。なお、標的マクロファージが少ない方ではわずかな産生しか認められなかった。続いて、Isoallo-LCA をマウスに 2 週間毎日経口投与して標的マクロファージの誘導を調べた。その結果、Isoallo-LCA を投与した群では vehicle を投与した群に比べて約 2 倍多く標的マクロファージが誘導された。以上の結果から、Odoribacteraceae が産生する Isoallo-LCA が肝内免疫制御性マクロファージを誘導する効果があることが明らかになった。

以上の成果から、肝組織の門脈近傍には免疫制御性マクロファージが局在しているが、このマクロファージは肝臓の入り口で腸管から入ってくる病原体などを貪食消化して肝臓を炎症から守っていることが示唆された。また、脂肪肝のように組織内に脂質や死細胞が発生した場合には、これらによって引き起こされる炎症を本マクロファージが抑える働きもあることが示唆された。さらに本マクロファージは Isoallo-LCA によって分化誘導が促進されることが明らかになったため、今後 Isoallo-LCA によって本マクロファージを増やすことで肝内の炎症を制御する治療薬の開発につながる可能性が見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyamoto Yu, Ishii Masaru, et al.	4. 巻 Online
2. 論文標題 Periportal macrophages protect against commensal-driven liver inflammation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-024-07372-6	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 該当する
1. 著者名 Shimizu Kotaro, Kikuta Junichi, Ohta Yumi, Uchida Yutaka, Miyamoto Yu, Morimoto Akito, Yari Shinya, Sato Takashi, Kamakura Takefumi, Oshima Kazuo, Imai Ryusuke, Liu Yu-Chen, Okuzaki Daisuke, Hara Tetsuya, Motooka Daisuke, Emoto Noriaki, Inohara Hidenori, Ishii Masaru	4. 巻 14
2. 論文標題 Single-cell transcriptomics of human cholesteatoma identifies an activin A-producing osteoclastogenic fibroblast subset inducing bone destruction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-40094-3	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 -
1. 著者名 Yari Shinya, Kikuta Junichi, Shigyo Hotaka, Miyamoto Yu, Okuzaki Daisuke, Furusawa Yuki, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya, Ishii Masaru	4. 巻 43
2. 論文標題 JAK inhibition ameliorates bone destruction by simultaneously targeting mature osteoclasts and their precursors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-023-00268-4	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 -
1. 著者名 Taniguchi Seiji, Matsui Takahiro, Kimura Kenji, Funaki Soichiro, Miyamoto Yu, Uchida Yutaka, Sudo Takao, Kikuta Junichi, Hara Tetsuya, Motooka Daisuke, Liu Yu-Chen, Okuzaki Daisuke, Morii Eiichi, Emoto Noriaki, Shintani Yasushi, Ishii Masaru	4. 巻 14
2. 論文標題 In vivo induction of activin A-producing alveolar macrophages supports the progression of lung cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-35701-8	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮本 佑
2. 発表標題 肝臓内のマクロファージによる空間的に不均一な免疫制御
3. 学会等名 第7回日本骨免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本 佑
2. 発表標題 生体イメージングを活用した肝臓内微小環境における炎症応答の解析
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本 佑
2. 発表標題 肝臓免疫系の空間的な遺伝子発現解析
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyamoto Yu
2. 発表標題 Spatially heterogeneous immune regulations by resident macrophages in the liver
3. 学会等名 第51回日本免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyamoto Yu
2. 発表標題 Spatially heterogeneous immune regulations by Kupffer cells in the liver.
3. 学会等名 第29回マクロファージ国際シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本 佑
2. 発表標題 肝臓における空間的に不均一な免疫制御とその生理的意義の解明
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miyamoto Yu
2. 発表標題 Identification of a novel neuron-associated macrophage subset in the liver.
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会/第66回日本神経化学会大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本 佑
2. 発表標題 肝臓門脈域に局在するマクロファージは腸内細菌の侵入に対する過剰な臓器 炎症を抑制する
3. 学会等名 第10回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miyamoto Yu
2. 発表標題 Identification of a novel neuron-associated macrophage subset in the liver.
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会/第44回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miyamoto Yu
2. 発表標題 A periportal Kupffer cell subset prevents against commensal bacteria-driven liver inflammation.
3. 学会等名 第52回日本免疫学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 宮本 佑、藤尾 圭志ほか	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 207
3. 書名 実験医学 自己免疫疾患 層別化する新時代へ	

1. 著者名 宮本 佑、石井 優ほか	4. 発行年 2022年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 77
3. 書名 炎症と免疫 シングルセル解析による免疫細胞研究の新展開	

1. 著者名 宮本 佑、石井優ほか	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 192
3. 書名 医学のあゆみ 生体イメージングの最前線--絶え間ない技術革新と生命医科学の新展開	

〔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
---------	---------