

令和 7 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：学術変革領域研究(A)

研究期間：2020～2024

課題番号：20H05901

研究課題名（和文）末梢神経による免疫・炎症システムの時空間的制御機構の解明

研究課題名（英文）Dynamic control of immune and inflammatory cell behaviors by peripheral nervous system

研究代表者

石井 優 (ISHII, MASARU)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：10324758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 80,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、肝臓における炎症制御メカニズムを分子・細胞レベルで解明することを目的とし、生体多光子励起イメージングやレーザー焼却、時空間シングルセル解析などの先端技術を用いて実施された。門脈周囲に局在する新規の抗炎症性マクロファージ（MP2）を同定し、その分子特性と腸内細菌との関与を明らかにした。また、交感神経と密接に連携する神経関連マクロファージ（pNAM）が、門脈交感神経ネットワークの構築と肝内血管透過性制御、免疫寛容維持に重要な役割を果たすことを発見した。これらの成果は肝臓における臓器特異的な免疫制御の本質を解き明かし、肝疾患の新たな治療標的の提案につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肝臓に特有の炎症制御システムの実態を初めて細胞実体レベルで明らかにし、従来の臓器横断的理解を超える革新をもたらした点で学術的意義が大きい。特に、腸内細菌との相互作用による抗炎症マクロファージの誘導、神経と免疫系の密接な連関は、免疫学・神経科学・微生物学の学際的研究を加速させる。社会的には、慢性肝炎、脂肪肝炎、自己免疫性胆管炎といった難治性肝疾患の新規治療法開発に向けた重要な基盤知識を提供し、肝疾患患者のQOL向上や医療負担軽減への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the molecular and cellular mechanisms of inflammation control in the liver using advanced techniques such as intravital multiphoton imaging, laser ablation, and spatiotemporal single-cell analysis. The researchers identified a novel anti-inflammatory macrophage (MP2) localized around the portal vein and clarified its molecular characteristics and dependence on gut microbiota. Furthermore, they discovered neuron-associated macrophages (pNAMs) closely linked to sympathetic nerves, which contribute to the construction of the periportal sympathetic nerve network and regulate vascular permeability and immune tolerance within the liver. These findings reveal the essence of liver-specific immune regulation and propose new therapeutic targets for liver diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：組織マクロファージ 自律神経 イメージング シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

自律神経と免疫・炎症システムの間には密接な関連が存在することが知られている。しかし、炎症の進行に伴い、神経系の機能やそれを取り巻く組織構造がどのように変化し、それが炎症細胞の局所動員や機能にどのような影響を及ぼすのかについては、これまで十分に解明されてこなかった。特に肝臓は、他の臓器と異なり、門脈を介して腸管から直接血流を受けるという特異的な性質を持ち、腸管由来の多様な催炎症物質にさらされる臓器であるが、こうした臓器特異性に基づく炎症制御メカニズムは重要であるにもかかわらず、その実態は不明な部分が多く残されていた。肝臓は交感神経系の支配を受けており、この神経系による制御が肝臓の組織免疫応答にどのような微調整を与えているかについては明らかにされていなかった。本研究では、生体内イメージング技術を駆使することで、これらの時空間的な制御の実体を明らかにし、特に門脈周囲のマクロファージ、神経関連マクロファージといった要素が果たす役割に着目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症に関連する神経-免疫連関を明らかにすることにあった。特に、肝臓における門脈周囲の抗炎症性マクロファージや神経関連マクロファージの特性と機能を解析することで、臓器特異的な炎症制御機構と、それがもたらす臓器のレジリエンス機能についての理解を深めることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、生体多光子励起イメージングやレーザー焼却による局所炎症誘導、イメージングに基づいた部位特異的な細胞回収法と時空間的シングルセル解析といった新規の技術を駆使した。具体的には、肝臓の解析では、生体イメージングとシングルセル解析を組み合わせ、門脈周囲に局在するマクロファージの分類と特異的な表面マーカーの抽出を行い、リポーターシステムや光遺伝学的手法を導入することで、肝門脈周囲の交感神経と神経関連マクロファージ (hepatic periportal neural associated macrophage: hpNAM) の相互作用を分子レベルで解析した。

4. 研究成果

(1) 肝臓内での免疫応答の不均一性：肝門脈周囲抗炎症性マクロファージの発見

生体イメージング観察中に局所に強いレーザーを照射 (レーザーアブレーション) するとその部分の細胞が壊死して催炎症物質 (DAMPs) が放出され、好中球などの炎症細胞が集簇する。これは組織局所の炎症応答を定量的に評価する方法論として、皮膚組織などで報告されていたものであった。本研究では、

肝臓における炎症応答を制御する分子機構を解明するために、肝臓の生体イメージング系を確立し、レーザーアブレーションを行い、炎症応答を観察した。その結果、レーザーアブレーションでの好中球の集

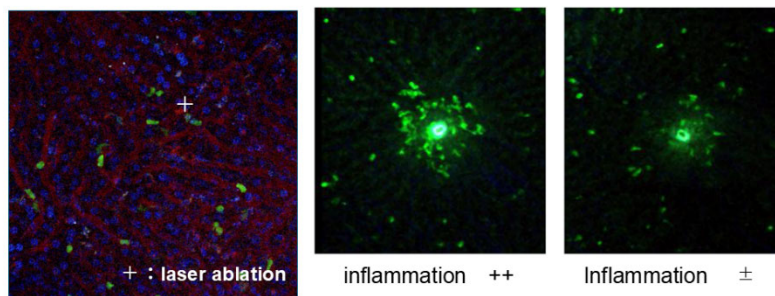


図1. 肝臓内でのレーザーアブレーションへの炎症応答のばらつき。
(左) レーザーアブレーションによる炎症誘導。(右) 同一刺激に対して顕著な炎症誘導 (左) と微弱な炎症誘導 (右)。

積を観察できたが、実験毎に結果がバラつき、顕著な集積が見られるときもあれば、同じレーザーを照射してもほとんど炎症細胞が集積しないケースが見られた【図1】。当初、この結果のバラつきの原因は不明であった。その頃、肝臓内で門脈域(PV域)と中心静脈域(CV域)では肝細胞が異なる機能を有しているとの報告があったため、肝臓の局所炎症もPV域とCV域で異なる可能性を検討し、PV域とCV域を区別してレーザーアブレーションを行う実験系を構築して実施した結果、同一のレーザー照射に対して、CV域では炎症が誘導されるが、PV域では炎症が起きないことを発見した【図2】。即ち、当初の結果のバラつきは、照射したエリアの違いによるものであったことがわかった。さらに、クロドロン酸内包リポソームを投与し肝臓内のマクロファージ(クッパー細胞)を除去すると、PV域でもCV域と同様にレーザー照射による炎症が誘導されることも発見した【図2】。これは、PV域にのみ炎症を抑制するマクロファージが存在することを意味する結果であった。

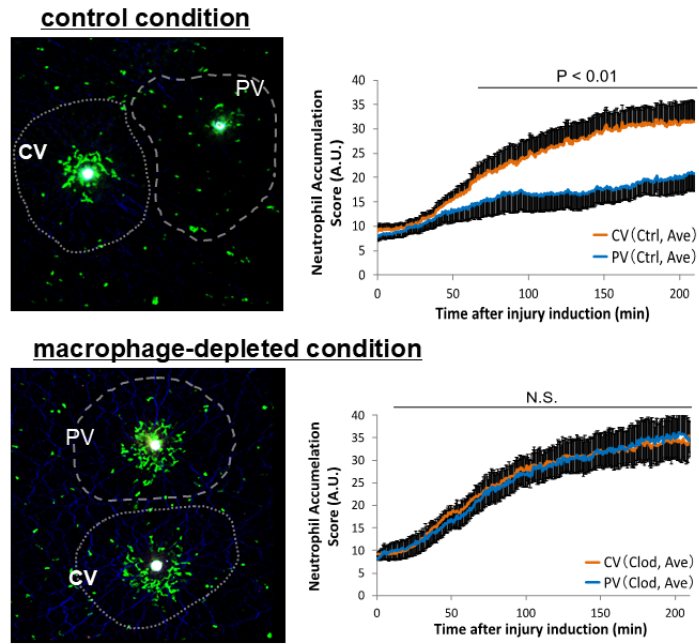


図2. 肝臓内炎症応答の空間多様性. (上) 同一刺激に対するCV域とPV域での炎症誘導. (下) マクロファージを除去した状態での炎症誘導. 定常状態ではPV域にのみ、炎症を抑制するマクロファージが存在することを示唆される。

次に、この「PV域のみ存在する免疫抑制性マクロファージ」を同定したいと考えたが、肝組織の中でPV域とCV域は混在しており、PV域のみから細胞を回収することは物理的に極めて困難であった。そこで、生体イメージングとPhotoactivatable(PA)-GFP(定常状態で蛍光がoffですが、紫色域の光を当てるとonになるGFP)を組み合わせることで、独自の細胞回収法を確立した。PA-GFPを全身に発現させたマウスの肝臓のPV域・CV域に選択的に光活性化して各領域の細胞をGFPマーキングして、この肝臓から細胞を回収してGFP陽性でsortingすることでPV域・CV域から個別に細胞を回収することに成功した【図3】。その結果、PV域のマクロファージはCV域のマクロファージとは異なり、DAMPsのスカベンジャー受容体(取り込んで無効化する)であるMarcoを高発現し、免疫抑制性サイトカインIL-10を分泌することが明らかになった(本論文の中ではこのPV

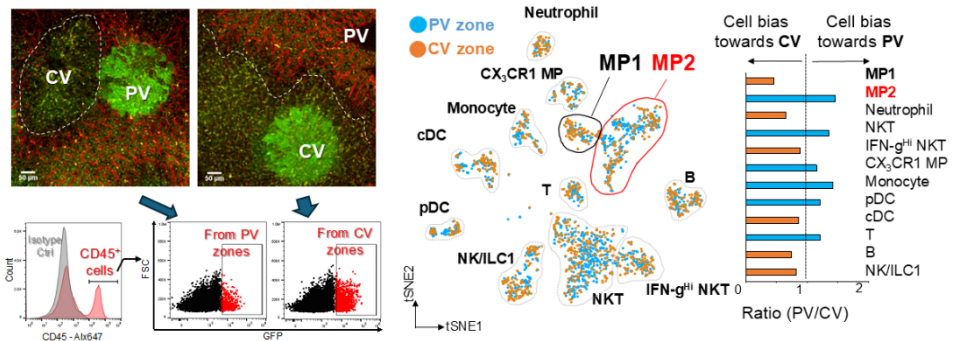


図3. 肝臓の部位特異的細胞回収・シングルセル解析. (左) PV域、CV域をそれぞれ区別してPhoto-activationを行う. (右) PV域(青)、CV域(赤)から回収した細胞のシングルセル解析結果. 2つのマクロファージ集団のうち、MP2がPV域に偏在している。

域の免疫抑制性マクロファージをMP2(Macrophage type 2)と命名した)。本研究ではさらにMP2が腸から肝PV域に定常的に流入

する腸内細菌に依存することを明らかにし、腸内細菌の中でも特にMP2誘導を行いやすい菌種としてバクテロイデスの一種の *Odoribacteraceae* を同定した。また、Marco を欠損させて MP2 の機能を阻害することで、肝臓で炎症が誘導されやすくなることも明らかにし、代謝異常関連脂肪肝炎 (MASH) や原発性硬化

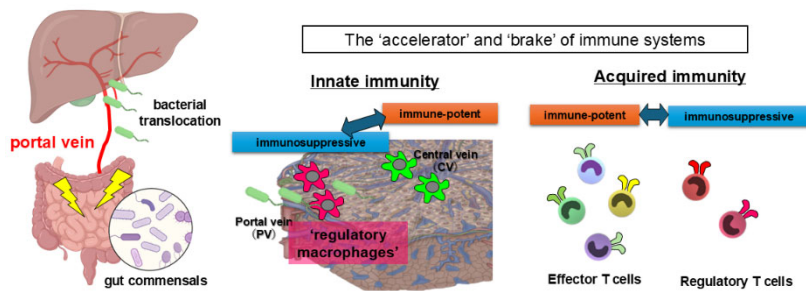


図4. 今回の研究で明らかになった肝臓の免疫寛容の実体と“制御性”自然免疫機構の意義. (左) 肝臓には門脈を経て腸から腸内細菌や栄養素など夾雑物を多く含んだ血液が流入するため免疫寛容機構が必要. (右) 免疫系のアクセルとブレーキ. 獲得免疫では活性型と抑制型では TCR のレパトアが異なることで、自然免疫では作用する場所が異なることで使いわけていることが示唆される.

性胆管炎 (PSC) といった肝臓炎症疾患では MP2 が減少していることをマウスモデルとヒト臨床検体を用いて証明した。

肝臓には門脈を介して腸管から、腸内細菌やその成分、吸収した栄養素などの“夾雑物”が豊富な血液を直接流れ込むため、潜在的に炎症が誘導されやすい状態にあるが、実際には炎症が起きにくいいため、肝臓には独自の「免疫寛容」システムが存在すると想定されていたが、今回の発見はこの肝臓免疫寛容の細胞実体を明らかにしたことになった。このシステムが破綻すると肝臓における慢性炎症疾患の発症につながるということが示唆されることから、その医学的な重要性についても十分示されたと考えられた【図4】。本研究成果は 2024 年の Nature 誌に掲載された (Miyamoto et al., *Nature* 2024)。

(2) 肝門脈周囲神経関連マクロファージの発見とその機能

近年、腸管、皮膚、脂肪組織、肺など末梢臓器で神経上に局在する特殊なマクロファージ (neuron-associated macrophages: NAM) が相次いで報告されている。このマクロファージはそれぞれの所属臓器で臓器機能を支持する重要な役割を果たすことも明らかにされてきた。本研究では、腸管と肝臓をつなぐ門脈血管において交感神経上に分布する新規の神経関連マクロファージ (periportal neuron-associated macrophages: pNAM) を発見した。このマクロファージの機能・性質を明らかにするため、まずはシングルセル RNA-sequencing 解析を実施し、この pNAM 特有の遺伝子発現プロファイルを取得した。そして、前駆マクロファージと比較して pNAM で発現上昇した遺伝子 (分化して獲得した遺伝子) を抽出し、この遺伝子群を用いて遺伝子オンロジー解析を行ったところ、「神経ネットワーク構築に関係する機能」や「血管中の物質を感知する機能」などが示唆された。

そこでまず、「神経ネットワークの構築に関わる機能」について検討を進めた。このために、pNAM と門脈交感神経の発生ダイナミクスを解析することから始めた。その結果、pNAM は神経よりも早期に (約 1 週弱の差で) 門脈血管を取り巻くことが明らかになった

【図5】。この発生動態の時間差からも、pNAM が先んじて門脈血管上に分布し神経の発生・発達をサポートしている可能性が示唆された。次に、神経の発生・発達過程で pNAM を除去すること

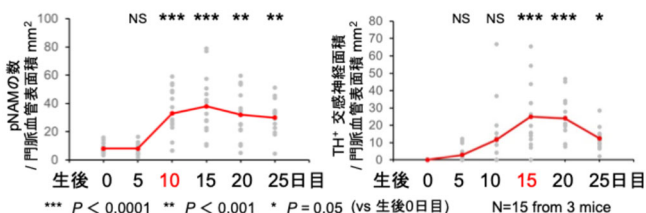


図5. pNAM と門脈交感神経の発生動態

により、神経ネットワークの構築にどのような影響が出るかを調べた。pNAM はマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) に依存して生存することがわかっていたため、M-CSF の受容体への結合を阻害する抗 CSF1R 抗体を用いて pNAM を枯渇させた。これにより、門脈血管の表面積に対して交感神経が占める面積が有意に減少することが明らかになった。この結果から、pNAM は門脈交感神経ネットワークの構築に寄与することが強く示唆された。

続いて、門脈交感神経が肝臓恒常性に及ぼす影響について解析を進めた。この実験では、6-hydroxydopamine (6-OHDA) を腹腔内投与し腹腔神経節を死滅させることで交感神経を除去した。まず交感神経の有無により肝組織中の遺伝子発現がどのように変化するかをバルク RNA-sequencing を活用して調べたところ、交感神経を除去した群で Vegfa や Plvap の発現上昇を認め、肝内類洞血管の透過性亢進が示唆された。そこで蛍光標識したデキストランを静脈内に注入し血管透過性を検討したところ、実際に類洞血管の透過性が亢進し、デキストランが組織内に蓄積する様子が確認できた。この結果を受けて、交感神経が作動しないと、腸管から異物 (微生物由来物質や食物由来抗原) が流入してきた際に肝内で炎症が惹起されやすくなるのではないかと考えた。そこで次に、リポ多糖 (LPS) の刺激に対する肝内炎症が交感神経の有無により変化するかどうかを検討した。その結果、交感神経を除去した群で、微量の LPS 刺激に対しても激しい炎症が惹起されるようになった。なお交感神経が存在する対照群では、この量の LPS 刺激では炎症はわずかしかなじなかった【図6】。以上の結果を総合すると、pNAM は門脈上の交感神経ネットワークの構築を助け、この門脈交感神経系は肝組織内の類洞血管の透過性を制御することで肝臓の免疫寛容性に寄与している可能性が示唆された。本研究成果は現在、論文文化に向けてまとめている (Takino et al., in preparation)。

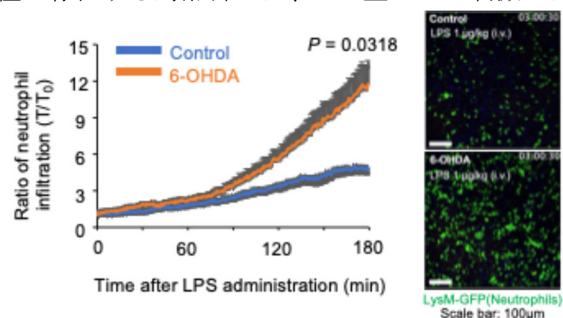


図6. 交感神経除去による LPS 刺激に対する肝内炎症応答の増強

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Miyamoto et al.	4. 巻 629
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 901-909
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 et al.	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 4417
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 該当する
1. 著者名 Yari et al.	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 18
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 該当する
1. 著者名 Taniguchi et al.	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 143
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 -

1. 著者名 Yari et al.	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 18
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 Uenaka et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Osteoblast-derived vesicles induce a switch from bone-formation to bone-resorption in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28673-2	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 Uenaka et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Osteoblast-derived vesicles induce a switch from bone-formation to bone-resorption in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28673-2	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 該当する

1. 著者名 Nishikawa et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Osteoclasts adapt to physioxia perturbation through DNA demethylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 e53035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202153035	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 Morimoto et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22402-x	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 Sudo et al..	4. 巻 218
2. 論文標題 Group 2 innate lymphoid cells support hematopoietic recovery under stress conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20200817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20200817	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 Sudo et al.	4. 巻 218
2. 論文標題 Group 2 innate lymphoid cells support hematopoietic recovery under stress conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Exp Med	6. 最初と最後の頁 e20200817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20200817	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 Morimoto et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 2136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22402-x	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 Hasegawa et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of an intravital imaging system for the synovial tissue reveals the dynamics of CTLA-4 Ig in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70488-y	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 Matsui et al.	4. 巻 80
2. 論文標題 Nonlinear Optics with Near-Infrared Excitation Enable Real-Time Quantitative Diagnosis of Human Cervical Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 3745-3754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-0348	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6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Masaru Ishii
2. 発表標題 Intravital Imaging-Based Single Cell Transcriptomics Identifies a Novel Macrophage Subset in the Liver
3. 学会等名 The second international school on advanced immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaru Ishii
2. 発表標題 Novel imaging-based methods for validating immunopharmacology on rheumatic diseases
3. 学会等名 19th World Congress of basic and clinical pharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaru Ishii
2. 発表標題 Intravital Imaging of live bone cells in vivo
3. 学会等名 The 49th International Musculoskeletal Biology Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaru Ishii
2. 発表標題 Arthritic osteoclastogenic macrophages
3. 学会等名 Annual Meeting of the American College of Rheumatology 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaru Ishii
2. 発表標題 Function of ILC2 in bone marrow
3. 学会等名 VIB-conference on Type 2 Immunity in Homeostasis and Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaru Ishii
2. 発表標題 Intravital imaging dissecting pathogenic macrophages in vivo
3. 学会等名 Cambridge Immunology Seminar (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〕

<http://www.icb.med.osaka-u.ac.jp/>
大阪大学医学系研究科生命機能研究科免疫細胞生物学 ホーム
<http://www.icb.med.osaka-u.ac.jp/>
大阪大学医学系研究科生命機能研究科免疫細胞生物学
<http://www.icb.med.osaka-u.ac.jp/>

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		
ドイツ	The University of Bonn		