課題番号	23 独先 11

【様式 5 独創的・先駆的研究】

学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕
実　績　報　告　書

令和　6　年　4　月　30　日

氏　　名：　梅田　香織

所属・資格：　医学部・助教

実施研究所：　医学部・総合医学研究所

1　研究課題

シングルセル解析から読み解く非アルコール性脂肪肝炎の病態制御

2　研究期間

令和　5　年度　～　令和　6　年度

※令和　　年度　～　令和　　年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏　　名	部科校・資格	役割分担
研究代表者	梅田　香織	医学部・助教	研究全体の総括及び実施
研究分担者	槇島　誠	医学部・教授	核内受容体の機能解析の助言
	和田　平	薬学部・准教授	肝障害マウスの解析
	山岸　賢司	工学部・准教授	シークエンス解析情報の解析

連携組織

組　織　名	役　割　分　担

※**ホームページ等での公開（☑可・□否）**いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。

4　現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として，以下の区分より自己評価を行ってください。
＜区分＞①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：　②　】・【達成度：　60　%】

5　研究目的

近年の食事の欧米化や運動不足などの生活習慣の変化により、我が国でも脂肪肝（非アルコール性脂肪性肝疾患, nonalcoholic fatty liver disease（NAFLD））の罹患者が増加している。このうち 10%ほどが炎症反応を伴う nonalcoholic steatohepatitis（NASH）を発症し、さらに一部が肝線維化、肝硬変、そして肝細胞癌へと進展する。従って、NAFLD から NASH への進展を予防することが重要となるが、肝臓に最も多く存在する肝細胞による代謝変化に加え、多様に存在する免疫細胞の機能及び分布変化が影響することから、その進展メカニズムは複雑で不明な点が多く、現在有効な治療薬は存在しない。近年開発されたシングルセル解析は単一細胞あたりの網羅的遺伝子発現解析を可能にした最先端のゲノミクス解析手法である。我々はこの手法を NASH などの肝障害モデルマウスの実験系に適用することにより、肝組織中に存在する肝臓免疫細胞の遺伝子発現情報を元に NAFLD から NASH への進展メカニズムの一端を解明できると考えた。そこで本研究では、シングルセル解析技術を用いて肝臓免疫細胞の詳細な解析を行い、NASH の新たな予防または治療標的を見出すことを目的とした。

6　研究概要

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%は非実質細胞と呼ばれ、免疫細胞や間葉系星細胞、類洞内皮細胞などが含まれる。肝臓に存在する免疫細胞には、肝常在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 細胞などが存在し、互いに、または肝細胞と相互作用しながら代謝、炎症、生体防御、抗腫瘍活性などの機能を発揮し、NASH などの肝障害に病態に関与する（参考文献[1]）。従って、肝細胞のみならずこれらの免疫細胞の詳細な機能解析が NASH の病態メカニズムの解明に不可欠である。我々は先行研究において、転写因子として機能する核内受容体のうち、オキシステロールの受容体である肝臓 X 受容体（liver X receptor, LXR）α/β 及びビタミン D 受容体（vitamin D receptor, VDR）が肝臓のある種の免疫細胞に発現及び作用することにより、肝障害の病態に影響することを欠損マウスを用いた検証により見出した [2-5]。しかし、上記の通り肝臓には多種多様な免疫細胞が存在するため、特定の細胞種に特定した解析では不十分であった。そこで、本研究では LXR α/β 及び VDR の肝臓免疫細胞における新規機能を発見し、NASH を含む肝障害の予防及び治療標的としての可能性を見出すことを目的とし、欠損マウスを用いた肝障害マウスの構築及び解析、そして肝臓免疫細胞を用いたシングルセル解析の解析手法の確立を行った。なお、昨年、欧州肝臓学会等により NAFLD や NASH の名称が新たに（metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD）及び metabolic dysfunction-associated steatohepatitis（MASH）と変更することが提唱されたため、以下、NAFLD 及び NASH については MASH 及び MASH と記載することとする。

7　研究結果（4,000 字以上記入のこと）

初年度である令和 5 年度は**1、肝臓免疫細胞を用いたシングルセル解析を実施するための肝障害モデルマウスの構築及び解析条件の検討**及び**2、シングルセル解析の解析手法の確立及び確立した手法の既存のシングルセル解析データへの展開**の 2 点について中心に研究を実施した。以下にその研究結果を報告する。

1、肝障害モデルマウスの構築及び解析条件の検討（梅田、槇島、和田）

先行研究において検討した全身性 LXRα/β 及び VDR 欠損マウスを用いた肝障害モデルマウスの解析を発展させ、以下の結果を得た。また、テキサス大学及び仏 GIE-CERBM (IGBMC) から供与を受けた LXR$\alpha^{floxed/floxed}$LXR$\beta^{floxed/floxed}$ マウスまたは松本歯科大学より供与を受けた VDR$^{floxed/floxed}$ マウスと The Jackson Laboratory より購入した Cre リコンビナーゼトランスジェニックマウスである *Albumin*-Cre、*Lysozyme M*-Cre または *Clec4f*-(Cre-tdTomato) マウスと交配させ、それぞれ肝細胞選択的、単球/マクロファージを含むミエロイド系細胞選択的、または Kupffer 細胞選択的 LXRα/β または VDR 欠損マウスを樹立し、解析を開始した。なお、マウスを用いた実験に関しては、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、以下の全ての動物実験について日本大学医学部に実験計画を申請し、承認を得た上で行った。

(1) MAFLD/MASH モデルマウスにおける LXRα 及び LXRβ 欠損の影響

これまでの先行研究により、LXRα を全身で欠損させたマウスは早期に MASH を発症し、通常は存在しない活性型マクロファージが炎症を誘導することを報告した[2]。また、LXRα/β 欠損マウスは通常飼育下で Kupffer 細胞及びマクロファージ組成が変化し、リポ多糖誘導性の急性肝炎を増悪させること[3]、一方で NKT 細胞が消失し、抗腫瘍活性が減弱することを見出した[4]。以上のことから、MASH の進展時に LXR が作用する免疫細胞群は主に Kupffer 細胞、マクロファージ及び NKT 細胞であることが予想された。そこで、まず食餌負荷による MASH モデルマウスの再構築を行った。先行研究では、1.25%コレステロール及び 12.5%脂肪 (ココアバター) 含有食を摂餌させると LXRα 欠損マウスは肝臓への顕著なコレステロール蓄積により約 4 週間で MASH を誘導したが[2]、このモデルではコレステロールの毒性が強く、肝障害の指標である血中トランスアミナーゼ値も高値であったため、ヒト MAFLD 及び MASH の病態モデルとしては適切ではないと考えた。そこで、動脈硬化誘導食として使用される飼料の組成に近い 0.2%コレステロール及び 20%脂肪(ココアバター)含有食[5]を西洋食として採用し、LXRα/β 欠損の影響を検討した。その結果、摂餌後約 8-12 週間後に LXRα/β 欠損マウスの肝臓において、誘導マクロファージなどの免疫細胞浸潤が認められ炎症を誘導した。次に、作製した数種の細胞選択的 LXRα/β 欠損マウスを用いて同様の解析を行った。その結果、フローサイトメトリーを用いて代表的な免疫細胞の細胞分布を解析したところ、通常飼育下において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、西洋食負荷によりその分布はさらに変化を認めた。現在、当該マウスを用いた詳細な解析を行っているところであり、令和 6 年度中にはシングルセル解析を実施し、肝臓免疫細胞全体の挙動を追跡する予定である。

〔7　研究結果（つづき)〕

(2) 肝障害モデルマウスにおける VDR 欠損の影響

先行研究により、VDR は肝細胞においてはその発現は非常に低いが、肝非実質細胞には発現し標的遺伝子発現を制御すること、またナタマメ由来レクチンであるコンカナバリン A 誘導性自己免疫性肝炎モデルにおいて、全身性 VDR 欠損マウスは野生型と比較し肝炎が顕著に減弱することを見出している[6]。そこで、MAFLD/MASH モデルを構築する前に細胞選択的 VDR 欠損マウスを用いてコンカナバリン A 誘導性肝炎モデルを解析し、VDR の標的細胞の絞り込みを行うこととした。その結果、ある種の細胞選択的欠損において、全身性欠損と同様の表現型を示すことを見出した。(1)の LXR 欠損のモデルと同様に、現在解析を進めており、令和 6 年度にシングルセル解析へと発展させる予定である。

以上、(1)及び(2)の検討により、シングルセル解析に用いる検体の条件を決定した。

2、シングルセル解析手法の確立及び展開（梅田、山岸）

(1) シングルセル解析手法の確立

シングルセルシーケンスデータの解析は工学部に設置された高性能ワークステーションを用いて実施した。また、解析手法については梅田が動脈硬化モデルマウスを用いて過去に実施した手法に基づき[5]、統計処理に特化したプログラミング言語である R (version 4.2.1) を用いた。今回、データ解析の確立のために用いたシングルセルデータ((2)に記載) は 10xGenomics 社が提供する遺伝子発現解析（RNA-seq）及び遺伝子上のオープンクロマチン領域を網羅的に検出するエピゲノム解析 Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC)-seq を同時に解析するシングルセルマルチオーム解析であり、単一細胞中に RNA-seq 及び ATAC-seq のシーケンスデータがそれぞれ含まれている。そこで、各解析に特化した R のプログラムパッケージ”Seurat v4”[7] 及び”Signac”[8] を用いて解析を行った。複数検体のデータ統合には RNA-seq 解析データより得られる変動遺伝子及び ATAC-seq 解析データより得られるオープンクロマチン領域の位置情報を用いて行い、次元圧縮、クラスタリング及び可視化を行うための手法を設計した。各細胞種の同定は既報の複数の論文の情報より得られた細胞選択的に発現する遺伝子情報を元に行うこととした。また、Gene Ontology 解析には"ClusterProfiler"[9] を、転写因子のモチーフ解析には"HOMER"[10]をそれぞれ用いた。以上、複数のプログラミングパッケージを組み合わせることによって一連のシングルセル解析手法を確立した。

(2) 確立した解析手法の既存のシングルセル解析データへの展開

上記(1)で確立した解析手法を令和 4 年度の文科省学術変革領域研究第 2 期先進ゲノム支援によって実施した野生型及び LXRα/β 欠損マウスの通常食及び西洋食負荷マウスの 4 群に展開し、検証した。検体は各マウスの肝臓より単離した非実質細胞のうち、好中球を除いた CD45 陽性の免疫細胞である。東京大学において、単離した細胞を用いて 10xGenomics 社のシングルセルマルチオーム解析システムにより作製されたライブラリーをイルミナ社のシーケンサー NovaSeq 6000 を用いてシーケンシング後、同じく 10xGenomics 社より供給された R のプログラムパッケージ"Cell Ranger"を用いて一次解析(マウスゲノム配列へのマッピング)を行い、得られたデータセットを以降の解析に用いた。

〔7　研究結果（つづき）〕

まず初めに、各データのフィルタリングを行った(図 1)。単一細胞中のオープンクロマチン領域のピーク数、全 RNA の発現量を検出することにより単一細胞あたりに相当する数値より逸脱した細胞を除去した。また、ミトコンドリア遺伝子の発現量を比較することにより、死細胞を除去し、単一の生細胞のみを選別した。次に、4 群のデータの統合(インテグレーション)を行った。まず、RNA-seq については各細胞に選択的に発現する変動遺伝子を抽出し、4 群間でアンカリングを行った。また、ATAC-seq についてはオープンクロマチン領域のピークデータを元に共通のピークセットを作成することにより、それぞれインテグレーションを行った。統合したデータは次元圧縮及びクラスタリングを行い、t 分布型確率的近傍埋め込み法（t-distributed Stochastic Neighbor Embedding, tSNE)を用いて可視化した(図 2)。その結果、免疫細胞群は RNA-seq 解析では 16 個のクラスター(tSNE プロット上で示されたドットの集団)に、ATAC-seq 解析では 15 個のクラスターに分類された。また、各クラスターに特異的に発現する遺伝子情報から、Kupffer 細胞、骨髄由来マクロファージ、T 細胞、NK 細胞、B 細胞、樹状細胞などが同定された。次に、各クラスターに含まれる細胞数を 4 群間で比較した。その結果、LXRα/β欠損群で骨髄由来の誘導マクロファージが増加するなど、これまで様々な細胞が混在したバルクの非実質細胞の検体を用いた遺伝子発現解析やフローサイトメトリーにより得られた結果を反映する結果が得られた。その一方で、バルクの解析では変化を認めなかったある種の細胞集団における遺伝子発現パターンが西洋食負荷、または LXRα/β欠損によりダイナミックに変化することが、本シングルセルレベルの解析により初めて見出すことができた。

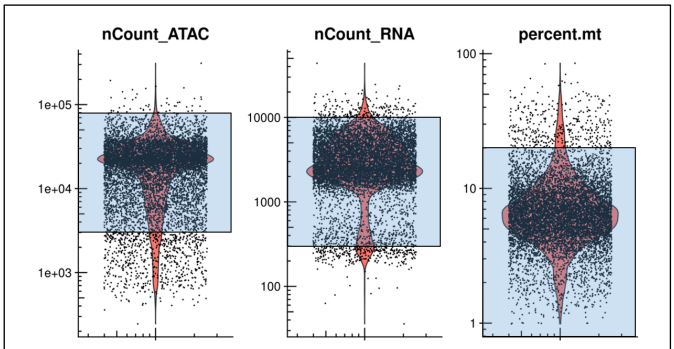


図 1　シングルセルデータのフィルタリングの一例
各ドットは単一細胞を示す。オープンクロマチン領域のピーク数(左)、RNA の発現量(中)、ミトコンドリア遺伝子の割合(右)を示したバイオリンプロット。枠内の細胞のみを選別し、以後の解析に用いた。

以上、(1)で確立したシングルセル解析手法を既存のデータセットへと展開させることに成功した。今後は、変化を認めた細胞集団のサブクラスタリングによる詳細な解析や遺伝子発現の動的変化を追跡する pseudotime 解析などのより高度な解析に展開させる予定である。

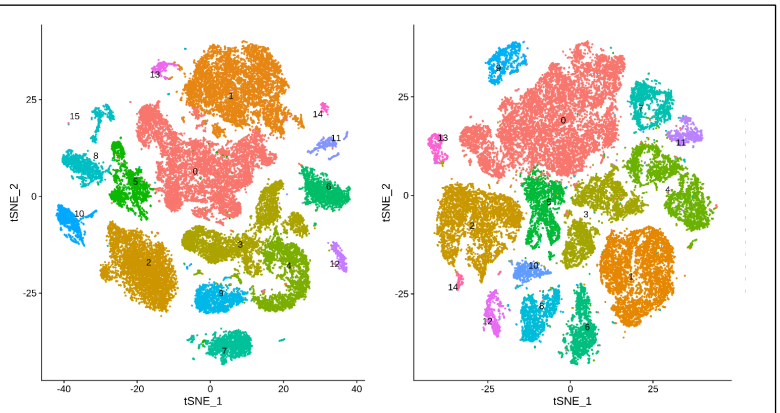


図 2　MASH モデルマウスの肝臓より単離した CD45 陽性免疫細胞を用いたシングルセル解析。4 検体を統合したシングルセル RNA-seq 解析(左)及び ATAC-seq 解析(右)のクラスタリング結果を tSNE プロットで可視化した。各ドットは単一の細胞を示し、色分けされた各クラスターは異なる細胞集団を示す。

〔7　研究結果（つづき)〕

総括

令和 5 年度の研究結果より、核内受容体 LXR α / β 及び VDR の細胞選択的欠損マウスを用いた肝障害モデルの解析を進めることにより、これまで全身性欠損で変化を認めた表現型に加えて新たな知見を見出すことができた。また、工学部に設置された高性能ワークステーションを用いることにより、シングルセル解析の一連の解析手法を確立できた他、実際に既存のデータに展開させることに成功した。以上の成果より、初年度の目標であった、シングルセル解析を実施するための材料や解析手法などの準備を整えることをほぼ達成できたことから、研究期間全体での達成度を 60 %とした。令和 6 年度は、令和 5 年度に医学部に導入した 10xGenomics 社のシングルセル用ライブラリー作製装置である Chromium Xi を用いて実際に MASH モデルマウスからの免疫細胞の単離、シングルセルライブラリーの作製、シーケンシングまでの一連の過程を確立すること、細胞選択的 LXR α / β 及び VDR 欠損マウスの細胞を用いてシングルセル解析を実施することにより、両受容体の MAFLD 及び MASH の病態制御における新規機能の発見を目指す。また、得られたデータを用いて論文作成に着手する予定である。

なお、本研究において用いた実験材料や実施した内容については、本学術助成金の他、科研費（21K06862 及び 22H04925 (PAGS)(梅田)、22K06919(槇島))、日本大学若手研究者環境整備支援助成金（令和 3 年度)、武田科学振興財団（令和 3 年度)、アステラス病態代謝研究会(令和 4 年度)(以上梅田)からの各助成によるものも一部含まれる。

参考文献（引用順）

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 (review)
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
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. **Endo-Umeda K**, Nakashima H, Uno S, Toyoshima S, Umeda N, Komine-Aizawa S, Seki S, Makishima M. Liver X receptors regulate natural killer T cell population and antitumor activity in the liver of mice. *Sci Rep*, 11:22595, 2021
5. **Endo-Umeda K***, Kim E, Thomas DG et al., Myeloid LXR deficiency induces inflammatory gene expression in foamy macrophages and accelerates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 42(6):719-731, 2022
6. Umeda N, **Endo-Umeda K**, Nakashima H, Kato S, Seki S, Makishima M. Concanavalin A-induced acute hepatitis is attenuated in vitamin D receptor knockout mice with decreased immune cell function. *J Leukoc Biol*, 106(4): 791-801, 2019
7. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E et al., Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, 184(13), 3573-3587, 2021
8. Stuart T, Srivastava A, Madad S, Lareau CA, Satija R. Single-cell chromatin state analysis with Signac. *Nat Methods*, 18(11):1333-1341, 2021
9. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*, 16(5):284-287, 2012
10. Heinz S, Benner C, Spann N et al., Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell*, 28;38(4):576-589, 2010