

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

梅田香織¹⁾, 山口涼香²⁾, 山岸賢司²⁾, 和田平³⁾, 槇島誠¹⁾

Single-cell analysis in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis

Kaori ENDO-UMEDA¹⁾, Suzuka YAMAGUCHI²⁾, Kenji YAMAGISHI²⁾,
Taira WADA³⁾, Makoto MAKISHIMA¹⁾

要旨

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、脂肪肝の罹患者が増加している。この内一部が炎症を伴う非アルコール性脂肪肝炎を発症することやその進展には免疫細胞による炎症反応が重要であることは知られているが、その制御は複雑であり、不明な点が多い。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ゲノミクス解析手法である。我々はこの手法を非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスの実験系に適用することにより、その進展メカニズムの一端を解明できると考えた。今回は、MASHモデルマウスの作製と解析及びシングルセル解析の解析手法の構築と既存データへの展開について経過を報告する。

1. はじめに

肝臓を構成する細胞の70%は肝細胞（実質細胞）であり栄養成分や薬物の代謝を担当するが、残りの30%は非実質細胞には類洞内皮細胞や間葉系星細胞に加え、肝固有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、NKT細胞、T細胞、B細胞などの多様な免疫細胞が互いに、または肝細胞と協調しながら代謝、炎症、生体防御、抗腫瘍活性など多岐にわたる機能を発揮する（図1）¹⁾。肝臓において脂質代謝異常等により脂肪肝（旧表記：非アルコール性脂肪性肝疾患 nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD, 現在は metabolic dysfunction associated fatty liver disease, MASLD へと名称変更）を呈すると、やがて一部が非アルコール性脂肪肝炎（旧表記：nonalcoholic steatohepatitis, NASH, 現在

は metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH へと名称変更）、肝線維化、肝硬変、そして肝細胞がんへと進展するが、MASLDから炎症反応を誘導するMASHへの進展には免疫細胞群の活性化が特に重要である。しかし、先述の通り肝臓には多種多様な免疫細胞が存在するため、その制御機構は複雑であり、未だ不明な点が多い。

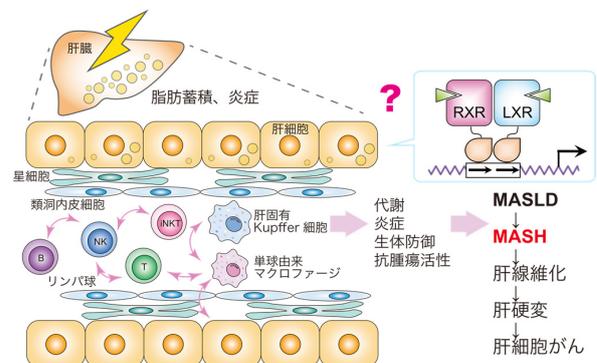


図1 肝臓に存在する多様な免疫細胞とその機能、肝障害への関与

1) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野
2) 日本大学工学部
3) 日本大学薬学部
責任者連絡先: 梅田香織, umeda.kaori@nihon-u.ac.jp

核内受容体はリガンド依存性転写因子であり、体内の様々な脂溶性代謝産物をリガンドとして認識し、標的遺伝子の発現を制御する。コレステロールの代謝産物であるオキシステロールの受容体として作用する肝臓X受容体 (liver X receptor, LXR) α 及びLXR β は、体内でコレステロール代謝調節を担うセンサーとして働くが、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も知られている。我々は先行研究において、全身性LXR α 欠損マウスが肝細胞への顕著なコレステロール蓄積を伴い、通常は存在しない活性化マクロファージが集積し早期にMASHを誘導すること²⁾、全身性LXR α / β 欠損マウスは通常飼育下で骨髄由来の誘導マクロファージが肝臓に集積し、急性肝障害に過敏となること³⁾、胸腺での分化成熟化異常により肝臓においてNKT細胞が消失し、抗腫瘍活性が減弱する等⁴⁾、LXR α / β による免疫細胞を介した肝保護作用を複数報告した。しかし、先行研究では先述の細胞群における個々の機能解析を行ったが、MASHの進展制御メカニズムを詳細にかつ正確に解明するためには、肝臓免疫系全体を把握する必要があると考えた。

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ゲノミクス解析である。従来の複数の細胞が混在したバルクの検体を用いるRNAシーケンス解析では見出すことのできなかった、希少な細胞群の情報が得られることから、多種多様な免疫細胞が存在する肝臓の解析には非常に有用である。そこで、シングルセル解析の解析手法をまずは本学内で確立すること、そしてLXR α / β 欠損マウスを用いたMASHモデルマウスの検体に適用することにより、MASH進展時の免疫細胞におけるLXR α / β の細胞選択的標的遺伝子または新規機能を明らかにすること、さらにLXR α / β のMASHの予防または治療標的としての可能性を見出すことを目指し、本研究を開始した。

2. 対象及び方法

1) 実験に用いた遺伝子改変マウス

野生型マウス (C57BL/6J) は日本クレアより購入した。全身性LXR α 及びLXR β 欠損マウスはテキサス大学サウスウェスタンメディカルセンターのDavid Mangelsdorf教授より供与を受け、C57BL/6J

マウスと10回以上バッククロスをかけた個体を用いた。LXR α ^{floxed/floxed} 及びLXR β ^{floxed/floxed} マウスは同じくMangelsdorf教授及び仏GIE-CERBM (IG-BMC) のPierre Chambon教授より供与を受け、The Jackson Laboratoryより購入した各種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細胞選択的LXR α 及びLXR β 欠損マウスを複製した。各実験には7~8週齢のオスマウスを使用した。なお、本研究において実施した全ての動物実験はカルタヘナ法、日本大学遺伝子組換え実験実施規定及び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) MASHモデルマウスの複製

マウスに通常食 (CE-2, 日本クレア) 及び0.2%コレステロール及び42%脂肪 (ココアバター) を含む西洋食 (日本クレア) を自由摂取により摂餌させた。先行研究において、全身性LXR α 欠損マウスは1.25%コレステロール及び15%脂肪 (ココアバター) 含有食により早期にMASHを誘導することを報告したが²⁾、本研究ではヒトMASHの病態を考慮し、動脈硬化誘導食として用いられ、コレステロールの毒性が軽度である0.2%のコレステロール含有量を採用した。8または12週間摂餌後、マウスを安楽死させ解析を行った。

3) MASHモデルマウスの解析

① 肝障害の評価

食餌依存性肝障害の評価のため、体重、肝重量、脾臓重量などの臓器重量の比較、肝組織の観察 (ヘマトキシリン-エオシン (hematoxylin and eosin, HE) 染色) 及び血中トランスアミナーゼ値により肝障害の程度を評価、比較した。また、血中総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸等の成分分析をテストワコー等の比色定量法を用いて行った。

② 肝臓免疫細胞の解析

マウスより全採血後、肝臓を摘出し、細切後、コラゲナーゼ反応により肝組織を分散させた。肝細胞と免疫細胞を含む非実質細胞を確実に分離するため、33%パーコール溶液を用いた密度勾配遠心分離法により肝細胞を除去し、非実質細胞分画を得た。赤血球を除去後、細胞数を計測し、リアルタイムPCR法を用いたバルクの遺伝子発現解析やマルチ

カラーフローサイトメトリーを用いた免疫細胞分布解析等の評価を行った。

③ 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差を用いて示し、統計解析はPrism 10を用いて一元配置分散分析を行った後にTukey's testを用いて各群間の比較を行った。

4) シングルセル解析の解析手法の構築及び展開

① シングルセル解析の解析手法の構築

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 (HPCシステムズ社製, Xeon CPU: 500 core以上, メモリ: 1,024 GB, HDD: 600 TB) を用いて実施した。解析には、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。

② 構築した解析手法の既存データへの展開

上記①で確立した解析手法を令和4年度の文部科学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LXR α / β 欠損マウスの通常食及び西洋食負荷マウスより単離した、好中球を除くCD45陽性肝臓免疫細胞の4群に展開した。肝臓免疫細胞の検体は、東京大学において10xGenomics社のシングルセルマルチオーム解析 (遺伝子発現解析と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の同時解析) システムを用いてシーケンスライブラリーを作製し、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を行った。得られたシーケンスデータ (FASTQ ファイル) について、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 ARC”を用いて一次解析 (マウスゲノム配列へのマッピング) まで完了し、最終的に得られたデータセットを以降の解析に用いた。

3. 結果

1) MASHモデルマウスの解析

① 全身性LXR α 及びLXR β 欠損の影響

野生型及び全身性LXR α / β 欠損マウスに西洋食を負荷したところ、両群共に西洋食負荷により体重増加を認めたが、野生型及び全身性LXR α / β 欠損間における体重及び肝重量の変化は認められなかつ

た。野生型において、西洋食負荷12週間経過後に血中総コレステロール値の増加が観察された。一方、LXR α / β 欠損マウスは通常食群においても野生型と比較して低値を示し、西洋食負荷の効果は認められなかったことから、コレステロール逆転送系が障害されていることが確認できた。野生型において、肝障害マーカーである血中トランスアミナーゼ値の西洋食負荷による増加は認められなかった。しかし、LXR α / β 欠損においては、通常食群においてすでに野生型と比較し有意な増加を認め、西洋食負荷によってさらなる増加傾向を示した。

次に、HE染色により肝組織の観察を行った。その結果、我々の過去の報告と一致してLXR α / β 欠損マウスの通常食負荷群において免疫細胞浸潤が認められた³⁾。野生型においては西洋食負荷群において肝臓への脂肪蓄積や肝細胞のバルーニングが観察されたが、LXR α / β 欠損においては肝細胞のバルーニングは検出されたものの脂肪蓄積は軽微であった。しかし、顕著な免疫細胞浸潤を認め、MASHを誘導することが示された。

② 細胞選択的LXR α 及びLXR β 欠損

肝臓に存在する免疫細胞等を標的としたCreトランスジェニックレポーターマウスを用いて数種類の細胞選択的LXR α 及びLXR β 欠損マウスを作製した。これらのマウスについてはこれまで肝臓免疫細胞に関する報告がないため、まずは通常食負荷の状態の肝組織の観察及び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を行った。その結果、Kupffer細胞、骨髄由来の誘導マクロファージ、T細胞等の代表的な免疫細胞の細胞分布を解析したところ、ある種の細胞選択的欠損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が異なることを見出した。また、その分布は全身性欠損とも異なる分布であった。肝組織のHE染色の結果、類洞構造の異常、肝細胞の増殖及び免疫細胞浸潤が観察された。さらに、西洋食負荷によりその免疫細胞分布変化はさらに顕著な差を認めた。

2) シングルセル解析の解析手法の構築及び展開

① シングルセル解析の解析手法の構築

今回展開するシングルセルマルチオーム解析は遺伝子発現解析とATAC-seq解析の同時解析であるため、Cell Ranger Arcを用いた一次解析によって得られたデータセットには単一細胞中にそれぞれのシー

ケンスデータが含まれている。そこで、各データ解析に特化したRのプログラミングパッケージである“Seurat v4”⁶⁾及び“Signac”⁷⁾を用いて解析した。複数検体のデータ統合（インテグレーション）には遺伝子発現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った⁸⁾。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Rのプログラミングパッケージを組み合わせることで一連のシングルセル解析手法を構築した。

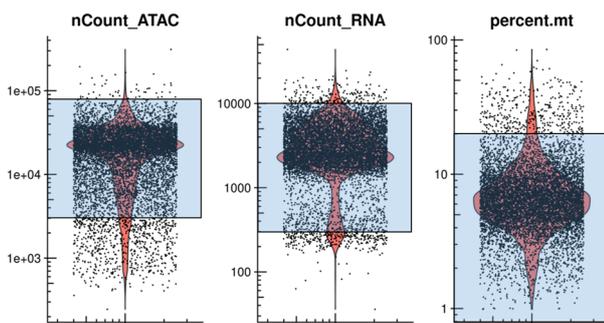


図2 シングルセルデータのフィルタリングの一例
各ドットは単一細胞を示す。オープンクロマチン領域のピーク数（左）、RNAの発現量（中）、ミトコンドリア遺伝子の割合（右）を示したバイオリンプロット。枠内の細胞のみを選別し、以後の解析に用いた。

② 構築した解析手法の既存のシングルセルデータへの展開

まず初めに、野生型及びLXR α / β 欠損マウスの通常食または西洋食負荷4検体について、データのフィルタリングを個々に行った。ATAC-seqデータについては単一細胞中のオープンクロマチン領域のピーク数、遺伝子発現解析については全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（図2）。

次に、4検体のデータのインテグレーションを遺伝子発現解析及びATAC-seqそれぞれについて行った。遺伝子発現解析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い、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4群間で共通するピークセットを作成し、データを統合した。インテグレーションした各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。その結果、遺伝子発現解析では16個の免疫細胞群へ、ATAC-seq解析では15個の免疫細胞群のクラスターへの分類に成功した（図3）。

また、既存の細胞のアノテーション方法に基づき、各クラスターに特異的にかつ高発現する遺伝子のパターンから、Kupffer細胞、骨髄由来の誘導マクロファージ、T細胞、NK細胞、B細胞、樹状細胞

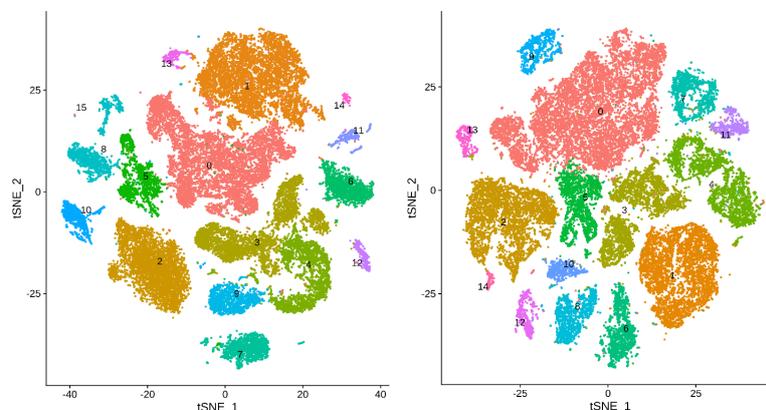


図3 MASHモデルマウスの肝臓より単離したCD45陽性免疫細胞を用いたシングルセル解析。

4検体を統合したシングルセル遺伝子発現解析（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。

などを同定した(図4)。次に、各クラスターに含まれる細胞数について、野生型及びLXR α/β 欠損マウスの通常食または西洋食負荷の4群間で比較を行った。その結果、LXR α/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、これまで我々が報告した知見³⁾を反映する結果が確認できた。その一方で、既存のフローサイトメトリーや非実質細胞を用いたバルクの遺伝子発現解析では着目してい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やLXR α/β 欠損によりダイナミックに変化することが、本解析により初めて示された。

4. 考察

初年度である令和5年度の研究成果より、全身性LXR α/β 欠損マウスがコレステロールの毒性の低い西洋食によってもMASHを早期に誘導することが示された。肝組織の観察によって脂肪蓄積が野生型と比較して減少したが、オイルレッドO染色を用いた脂肪染色や肝組織中のコレステロール、中性脂肪、脂肪酸等の定量分析等の詳細な解析を行う必要がある。本研究に先立ち実施した全身性欠損由来肝臓免疫細胞のシングルセルデータを用いて構築した解析手法を展開させた結果、西洋食及びLXR α/β 欠損によって細胞組成がダイナミックに変化するこ

とを見出した。今後はさらに詳細な解析を進め、LXRの標的細胞及び遺伝子、新規機能を特定する。細胞選択的LXR α/β 欠損を用いた検討についてはある種の細胞選択的欠損において、全身性欠損で認められた変化に加えた新たな知見を見出すことができた。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、全身性欠損の結果との比較を行う予定である。

また、我々はこれまでLXRに加えて同じく核内受容体であるビタミンD受容体(vitamin D receptor, VDR)の肝臓免疫系に対する影響についても解析を進めている。先行研究において、全身性VDR欠損マウスの自己免疫性肝障害モデルを解析した結果、Kupffer細胞の機能異常により肝炎が軽減することを報告した¹¹⁾。現在、MASHモデルマウスの肝臓免疫細胞におけるVDR影響についても全身性VDR欠損マウス及び細胞選択的VDR欠損マウスを用いた解析を検討しており、シングルセル解析へと発展させる予定である。さらに、脂質代謝異常を誘導することが知られている概日リズムなどの環境要因の影響についても検討し、肝臓免疫系を介したMASHの進展要因をさらに追求する。

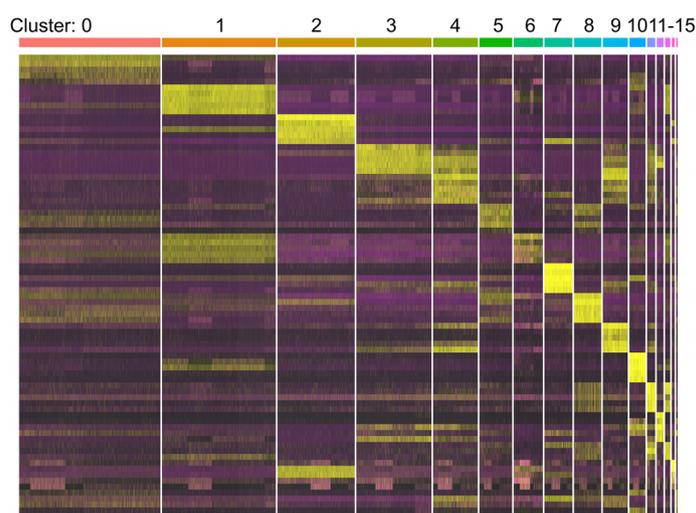


図4 各クラスターに選択的に発現する遺伝子を示したヒートマップ。シングルセルマルチオーム解析のうち、遺伝子発現解析のクラスタリング解析において検出された上位5つの遺伝子をヒートマップにて示した。

5. 結語

令和5年度は当学内でのシングルセル解析の確立を目指し、工学部内の高性能ワークステーションを用いることにより、シーケンスデータを用いたバイオインフォマティクス解析手法の構築及び既存データへ展開に成功した。令和6年度は医学部生化学分野内に設置した10xGenomics社のシングルセルライブラリー作製装置であるChromium Xiを用いて、実際にMASHモデルマウスより単離した免疫細胞を用いたライブラリーの作製からシーケンシングまで実施することにより、検体準備からデータ解析までの一連の解析手法の確立を目指す。本解析は肝臓免疫細胞のみならず、ヒト及びマウスのほとんどの組織を用いた解析に応用できる。また、生細胞に加え、パラフィン切片等固定化した検体からもライブラリー作製が可能となったため、容易に検体が準備できるようになった。今後は本解析手法を医学部他、生命科学系学部の研究に提供することにより、研究成果や人材育成、そして本学全体の研究推進力の発展に貢献していきたい。

(本研究は令和5年度日本大学学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。また、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、本学術研究助成金の他、科研費(21K06862及び22H04925(PAGS))、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)からの各助成によるものも一部含まれることを記載します。)

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 (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 et al., 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, Liu W, Dou H, Yalcinkaya M 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) Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM 3rd, Zheng S, Butler A et al., Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, 184 (13) , 3573-3587, 2021
- 7) Stuart T, Srivastava A, Madad S, Lareau CA, Satija R. Single-cell chromatin state analysis with Signac. *Nat Methods*, 18 (11) :1333-1341, 2021
- 8) Remmerie A, Martens L, Thoné T, Castoldi A, Seurinck R, Pavie B et al., Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver. *Immunity*, 53 (3) , 641-657, 2020
- 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, Bertolino E, Lin YC, Laslo P 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
- 11) 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