

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、代謝機能障害関連脂肪性肝疾患 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) や炎症を伴う代謝機能障害関連脂肪肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) の罹患が増加している。その発症及び進展には肝実質細胞である肝細胞のみならず、肝臓に豊富に存在する免疫細胞の関与が重要であるが、その詳細な制御機構は不明な点が多い。本研究では、近年急速に普及したシングルセル解析を用いてマウス由来肝臓免疫細胞の動態を解析することに成功したため報告する。

1. はじめに

肝臓を占める細胞の約70%は肝細胞 (実質細胞) であるが、残りの約30%を占める非実質細胞には類洞内皮細胞や間葉系星細胞に加え、肝常在 Kupffer細胞や単球由来マクロファージ、ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞, NKT細胞, T細胞, B細胞などの免疫細胞が多く含まれているため、肝臓は代謝臓器であるとともに免疫臓器であるとも言える¹⁾。これらの免疫細胞は門脈から取り込まれる栄養成分や外来異物に反応して相互に、または肝細胞と複雑に連携しながら代謝、炎症、生体防御や抗腫瘍活性等の免疫作用を制御し、肝恒常性を維持している。近年の食事の西洋化等による脂質代謝異常は脂肪肝やMASLDを呈するが、その一部がMASH、肝線維化、肝硬変、そして肝細胞癌へと進展する。このうち、MASLDからMASHへの進展には慢性炎症を伴うため、免疫細胞の活性化が重要となる。したがって、これらの非ウイルス性肝障害の

予防及び治療戦略を見出す上で、肝細胞の代謝機能解析のみならず、免疫細胞の詳細な機能解析が必要である。しかし、先述のように肝臓には多種多様な免疫細胞が存在する上、環境や刺激に対して複雑な制御を受けることから肝臓の免疫臓器としての機能解析はまだ十分に行われていない。

核内受容体はリガンド依存性転写因子であり、ヒトでは48種類が同定されている。多くの核内受容体は体内の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。肝臓X受容体 (liver X receptor, LXR) はコレステロールの代謝産物であるオキシステロールをリガンドとする核内受容体であり、LXR α と LXR β の2種類のアイソフォームを有する。LXRは体内でコレステロールの代謝調節を担う他、マクロファージなどの免疫細胞に発現し、抗炎症作用を有するため、高コレステロール血症やアテローム性動脈硬化症などの治療標的として注目されている²⁾。我々は先行研究におい

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

て、LXR欠損マウスの肝臓免疫細胞の解析を行った。その結果、LXR α 欠損マウスは肝臓への顕著なコレステロール蓄積を伴い、活性型マクロファージを集積させることによって食餌誘導性MASHを増悪させること³⁾、LXR α / β 欠損マウスはKupffer細胞や単球由来マクロファージ、NKT細胞の細胞分布が野生型と顕著に異なることを見出した^{4,5)}。これらの知見は、LXRが免疫細胞を介した肝保護作用を担う重要な因子であることを示している。しかし、これまでの解析は、着目した個々の細胞群の機能解析を行ったものであり、他に存在する多様な免疫細胞の挙動については未だ不明である。そこで、MASLDからMASHの進展メカニズムにおけるLXRの機能を詳細かつ正確に解明するためにも、肝臓免疫細胞全体の挙動を詳細に追跡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。先述の通り、肝臓には多種多様な細胞が存在するため肝臓免疫細胞の解析には有用な解析手法である。そこで、本学内においてシングルセル解析を実施するため、昨年度はライブラリー作製装置である10x Genomics社のChromium iXを導入した他、既存のシングルセルデータを用いてシークエンスデータの解析系を構築した。また、実験においては全身性LXR α / β 欠損マウスに加え、細胞選択的LXR α / β 欠損マウスを作製し、肝臓免疫細胞の解析を行った。その結果、全身性LXR α / β 欠損マウスは野生型と比較して早期にMASLD及びMASHを誘導することを確認した。また、作製した細胞選択的LXR α / β 欠損マウスの中で、肝細胞選択的LXR α / β 欠損マウスにおいて、通常飼育下にも関わらず肝臓免疫細胞数や血中トランスアミナーゼ値が全身性LXR α / β 欠損マウスと同様に増加していることを見出した。そこで、今回は肝細胞選択的LXR α / β 欠損マウスにおける肝臓免疫細胞を用いてシングルセル解析を実施し、全身性LXR α / β 欠損マウスとの比較を行ったため、以下で結果を報告する。

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 欠損 (LXR $\alpha^{-/-}$) 及びLXR β 欠

損 (LXR $\beta^{-/-}$) 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た。LXR $\alpha^{flxed/flxed}$ (LXR $\alpha^{fl/fl}$) マウスは同じくMangelsdorf教授より、LXR $\beta^{flxed/flxed}$ (LXR $\beta^{fl/fl}$) マウスは仏GIE-CERBM (IGBMC) のPierre Chambon教授より供与を受けた。LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$ マウスとThe Jackson Laboratoryより導入した*Albumin* (*Alb*) -Cre マウス (Stock No. 003574) を交配させることにより肝細胞選択的LXR α / β 欠損マウス (LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$ *Alb*-Cre^{tg/+}) を作製した。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及び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) シングルセル解析のための肝臓免疫細胞単離

マウスより肝臓を摘出後、コラゲナーゼによる肝組織分散及びパーコール密度勾配法による肝細胞除去によって肝非実質細胞を得た。得られた細胞をfluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した抗CD45抗体及び死細胞を標識するpropidium iodide (PI) と混合後、FACSAriaを用いてPI陰性及びCD45陽性の免疫細胞を単離した。

3) シングルセルライブラリーの作製

単離した細胞は10x Genomics社が提供するChromium Fixed RNA Profiling Reagent Kits 及びChromium iXを用いてシングルセルライブラリーを作製した。各ライブラリーは混合後、NovaSeq 6000を用いたシークエンス解析を行った。シークエンスデータはRのプログラムパッケージである"Cell Ranger ARC (ver.8.0.1)"を用いてマウスのリファレンスゲノム配列 (mm10) へのマッピング (一次解析) を行った。マッピング後のシークエンスデータについては同じくRのプログラムパッケージであるSeurat (ver. v5) を用いて二次解析を行った。

4) MASHモデルマウスの解析

マウスに通常食 (CE-2, 日本クレア製) または0.2%コレステロール及び42%脂肪を含有する西洋食 (TD88137, Envigo製) を自由摂取により摂餌させ、12週間後の肝臓を摘出した。肝障害の評価として、肝組織の観察及び血中トランスアミナーゼ値を評価した。また、血中、肝臓、脾臓における代表的

な免疫細胞の組成についてはFACSLyricを用いて解析した。

3. 結果

1) シングルセル解析のための細胞単離, ライブラリー作製及びシーケンス解析

シングルセル解析には野生型 (C57BL/6J), 全身性 LXR α / β 欠損 (LXR $\alpha^{-/-}$ LXR $\beta^{-/-}$), Floxed コントロール (LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$), 肝細胞選択的 LXR α / β 欠損 (LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$ Alb-Cre^{tg/+}) の各マウスを用いた。野生型は全身性 LXR α / β 欠損の, Floxed コントロールは肝細胞選択的 LXR α / β 欠損に対するコントロールとして用いた。各マウスより肝臓を摘出し, コラゲナーゼによる肝組織分散及びパーコール密度勾配法により肝非実質細胞を単離した。次に, 免疫細胞をセルソーターを用いて単離するため, 細胞を FITC 標識した抗 CD45 抗体及び生細胞を選別するため PI を処理後, セルソーターを用いて分析した。その結果, 野生型及び Floxed コントロールマウスは PI 陰性及び CD45 陽性の免疫細胞が肝臓非実質細胞のうち約 40% であったのに対し, 全身性 LXR α / β 欠損及び肝細胞選択的 LXR α / β 欠損マウスは約 80% であり, 免疫細胞の割合が高

いことが示された (図1, 上段)。この分画をソーティングした結果, 各マウス1頭あたり約 $1.5\text{--}2.0 \times 10^6$ 個の細胞を単離した。また, ソーティング後の細胞を再解析し, 全ての検体で精製度が 95% 以上であることが確認できた (図1, 下段)。シングルセルライブラリーの作製には 2.0×10^5 個から 2.0×10^7 個の細胞数が必要である。そこで, ライブラリー作製により多くの細胞を用いるため, 各マウスの条件において2頭分の細胞を等量ずつ混合し, 使用することとした。

ソーティングし, 等量ずつ混合した細胞はただちに固定後, 4℃にて保存した。その後, 10x Genomics 社が提供する Chromium Fixed RNA Profiling Reagent Kits のプロトコルに基づき, シングルセルライブラリーを作製した。作製した各ライブラリーはバイオアナライザーを用いて濃度及び品質を確認後, NovaSeq 6000 を用いたシーケンス解析を行った。

2) シングルセルシーケンスデータの解析

1) の作業から, 4 検体全てにおいて, 細胞単離, シングルセルライブラリーの作製及びシーケンス解析の一連の解析を行うことに成功した。シーケンスデータは Cell Ranger ARC を用いてマウスゲノム配列へのマッピング (一次解析) を行った。その

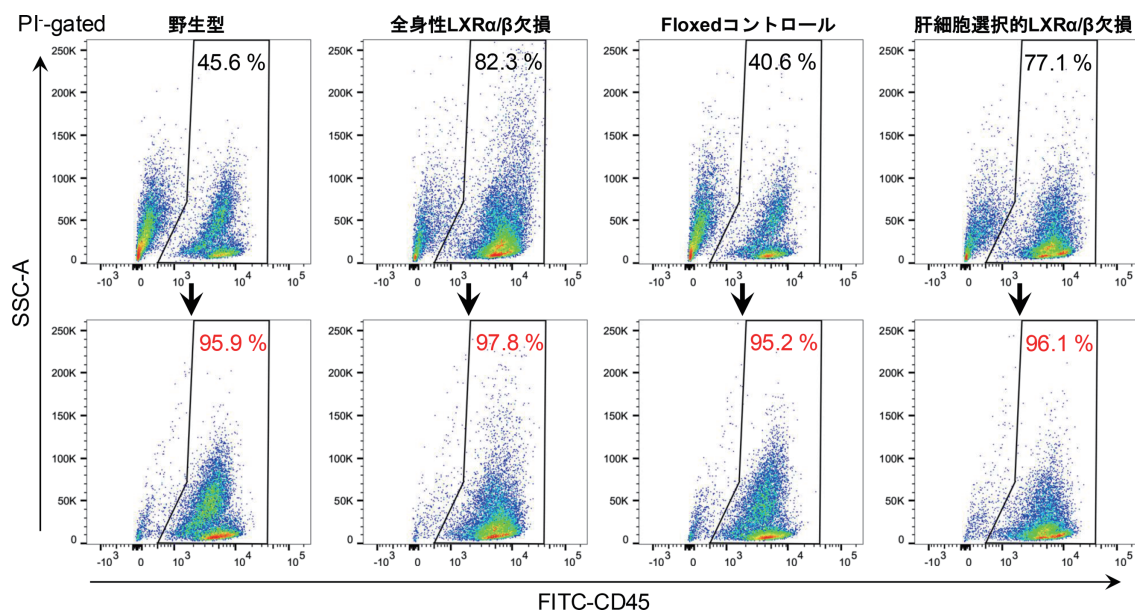


図1 セルソーターを用いた CD45 陽性免疫細胞のソーティング

野生型, 全身性 LXR α / β 欠損, Floxed コントロール, 肝細胞選択的 LXR α / β 欠損マウスより単離した肝臓非実質細胞を FITC 標識した抗 CD45 抗体を用いて免疫細胞を染色し, FACS Aria を用いて CD45 陽性免疫細胞をソーティングした。上段は各マウスの肝臓非実質細胞における PI 陰性 CD45 陽性細胞の割合を, 下段はソーティング後の細胞の一部を再解析した際の PI 陰性 CD45 陽性細胞の割合をドットプロットで示した。

結果、野生型からは8,754個、全身性LXR α / β 欠損からは9,140個、Floxedコントロールからは10,364個、肝細胞選択的LXR α / β 欠損からは11,327個の細胞の情報が得られた。次に、昨年度に既存のシーケンスデータを用いて構築した解析方法に基づき、Seuratを用いてシーケンスデータの二次解析を行った。まず、検出された遺伝子数やミトコンドリア遺伝子の割合等の情報から、死細胞や適切に単一細胞に分離されなかったアーティファクトを除去するフィルタリング操作を行った。その結果、野生型からは6,343個、全身性LXR α / β 欠損からは7,849個、Floxedコントロールからは8,048個、肝細胞選択的LXR α / β 欠損からは9,509個の細胞が選別された。次に、4検体のシーケンスデータを個別に次元削減、クラスタリング及びクラスター数を決定後、解析結果をuniform manifold approximation and projection (UMAP) を用いて可視化した。野生型の解析を行った結果、細胞群は16個のクラスターに分類された(図2)。各クラスターにおける細胞種を決定するため、上位に発現する変動遺伝子を抽出し、過去に報告されたシングルセルデータの情報^{6,7)}と比較した。その結果、まず、クラスター5及び14を除く全てのクラスターにおいてCD45をコードする*Ptprc*遺伝子の高い発現を認めたため、これらの細胞群は免疫細胞であることが示された(図3)。一方、*Ptprc*遺伝子の発現が非常に低い

クラスター5及び14については、それぞれ*F8*遺伝子及び*Hnf4a*遺伝子の発現が高いことから、細胞単離の過程で混入した類洞内皮細胞及び肝細胞であることが示された。同様に、その他の各クラスターの遺伝子発現パターンを解析し、細胞種を決定づけるマーカー遺伝子を抽出した。その結果、野生型には2種類のKupffer細胞(クラスター0及び12、マーカー遺伝子:*Timd4*及び*Vsig4*)、2種類のT細胞(クラスター1及び10、マーカー遺伝子:*Cd3e*)、B細胞(クラスター2、マーカー遺伝子:*Cd19*)、4種類の単球マクロファージ(クラスター4, 9, 13, 15、マーカー遺伝子:*F13a1*, *Pf4*, *Il12*及び*Ms4a2*)、NK細胞(クラスター6、マーカー遺伝子:*Klre1*)、樹状細胞(クラスター8、マーカー遺伝子:*Siglech*)、好中球(クラスター8、マーカー遺伝子:*S100a8*)、プラズマ細胞(クラスター11、マーカー遺伝子:*Jchain*)及び細胞増殖マーカー遺伝子の発現が高い細胞群(クラスター7、マーカー遺伝子:*Top2a*)が含まれていることが明らかとなった。次に、各クラスターにおけるLXR α をコードする*Nr1h3*遺伝子及びLXR β をコードする*Nr1h2*遺伝子の発現を解析した。その結果、*Nr1h2*遺伝子はクラスター14(肝細胞)を除く全てのクラスターにおいて発現が認められた。一方、興味深いことに*Nr1h3*遺伝子はクラスター14(肝細胞)に加え、免疫細胞の中ではクラスター0, 12(Kupffer細胞)及びクラスター9(単球またはマクロファージ)において選択的に高発現することが示された。野生型と同様に他の3検体についてもクラスタリングを行った結果、各検体の細胞群は全身性LXR α / β 欠損では14個、Floxedコントロールでは14個、肝細胞選択的LXR α / β 欠損では11個のクラスターに分類され、クラスター数は検体ごとに異なることが示された。

次に、野生型、全身性LXR α / β 欠損、Floxedコントロール及び肝細胞選択的LXR α / β 欠損を比較するため、4検体の統合(インテグレーション)を行った。インテグレーション後のデータのクラスタリングを行った結果、合計15個のクラスターが検出された(図4、発表前データのため細胞種は未記載)。変動遺伝子の情報を用いて細胞のアノテーションを行った結果、Kupffer細胞、3種類のT細胞、B細胞、3種類の単球マクロファージ、NK細胞、樹状細胞、好中球、細胞増殖マーカー遺伝子の発現が

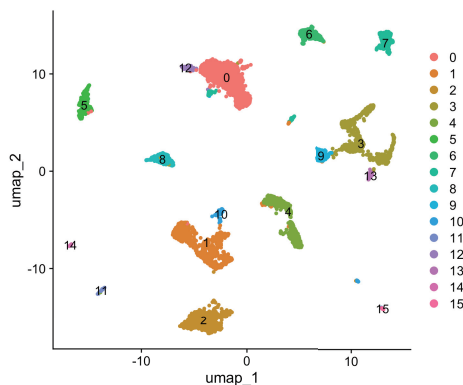


図2 野生型由来肝臓免疫細胞を用いたシングルセル解析

シングルセル解析によってクラスタリングされた細胞群をUMAPプロットで可視化した。各ドットは単一細胞を示し、色分けされた各クラスターは遺伝子発現パターンの異なる細胞集団を示す。野生型においてはクラスタリングの結果、16個のクラスターに分類された。

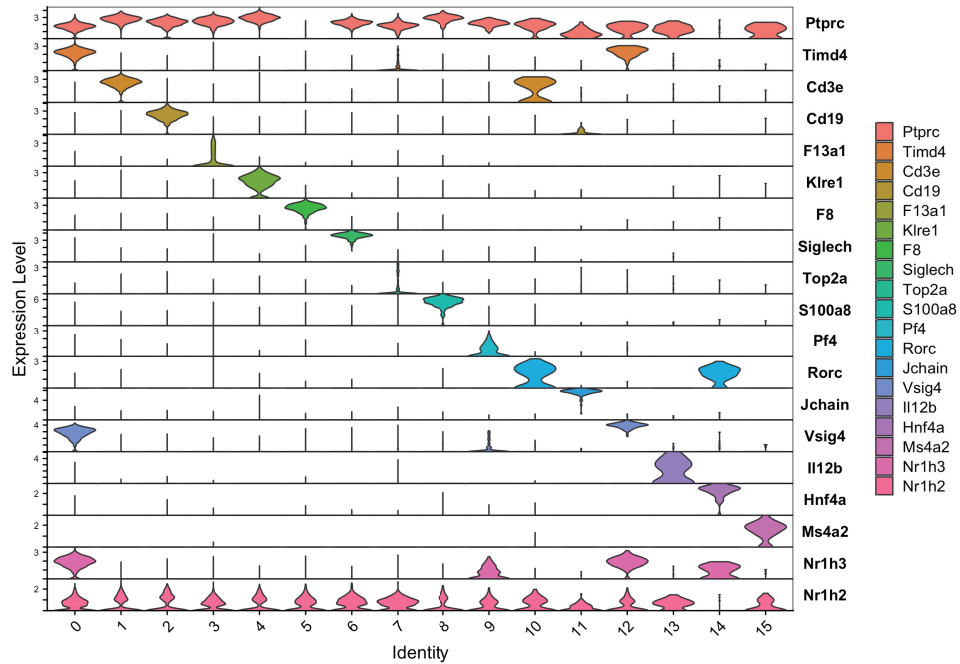


図3 野生型由来肝臓免疫細胞の各クラスターにおける遺伝子発現パターン

クラスター0から15の各クラスターにおいて選択的に発現する遺伝子 (*Timd4* から *Ms4a2*) 及び共通の免疫細胞マーカーであるCD45をコードする *Ptpcr* 遺伝子, LXR α をコードする *Nr1h3* 及び LXR β をコードする *Nr1h2* 遺伝子の発現パターンをヒートマップで示した。

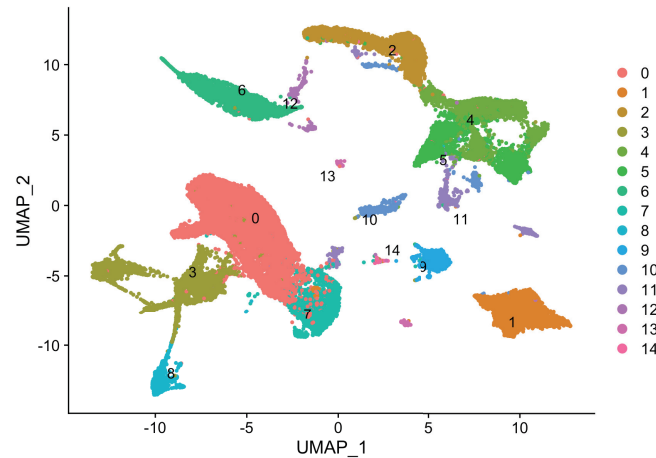


図4 4検体のインテグレーション後のUMAP

野生型, 全身性 LXR α / β 欠損, Floxed コントロール及び肝細胞選択的 LXR α / β 欠損の各シングルセル解析データをインテグレーションし, UMAP プロットを用いて可視化した。各ドットは単一細胞を示し, 色分けされた各クラスターは遺伝子発現パターンの異なる細胞集団を示す。インテグレーションの結果, 細胞群は15個のクラスターに分類された。

高い細胞群及び残存した類洞内皮細胞及び肝細胞が含まれていることが示された。インテグレーション後のクラスターには, 野生型において検出された細胞群 (図2) も含まれたが, 検出されなかった新規細胞群が存在したため, LXR α / β 欠損により細胞組成が変化することが示された。そこで, 野生型,

全身性 LXR α / β 欠損, Floxed コントロール及び肝細胞選択的 LXR α / β 欠損の4検体の細胞分布を比較した (図5)。その結果, まず, 野生型と Floxed コントロールにおける細胞分布パターンは類似することが確認できた。次に, 野生型と全身性 LXR α / β 欠損及び Floxed コントロールと肝細胞選択的

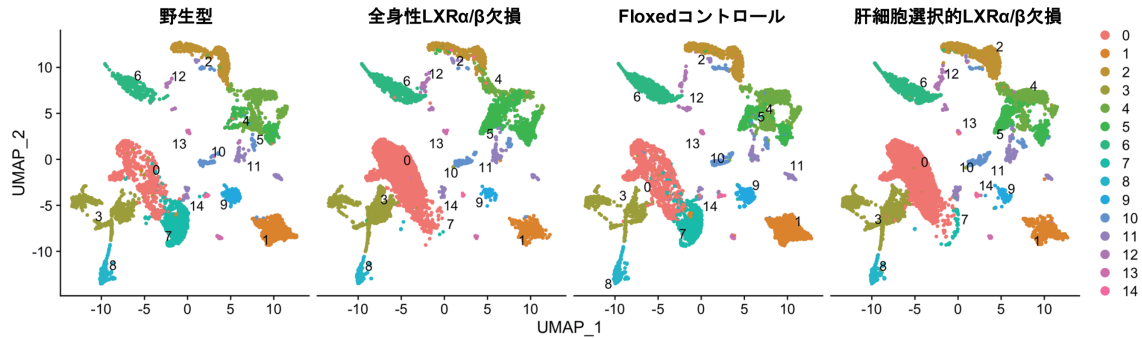


図5 肝臓免疫細胞を用いたシングルセル解析の4検体間の比較

左から野生型, 全身性 LXR α / β 欠損, Floxed コントロール, 肝細胞選択的 LXR α / β 欠損におけるインテグレーション後のシングルセル解析データを UMAP プロットを用いて検体ごとに可視化した。各ドットは単一細胞を示し、色分けされた各クラスターは遺伝子発現パターンの異なる細胞集団を示す。

LXR α / β 欠損をそれぞれ比較したところ、ある種のクラスターにおいて細胞分布パターンが異なることが示された。興味深いことに、全身性 LXR α / β 欠損と肝細胞選択的 LXR α / β 欠損のパターンは類似していた。

3) MASLD 及び MASH モデルマウスの解析

2) のシングルセル解析の結果より、LXR α / β 欠損により免疫細胞組成及び機能が変化するのは肝細胞の LXR α 及び LXR β に依存することが示されたが、これらの結果は通常食負荷の生理的条件下における効果であった。そこで、次に食餌誘導性 MASLD 及び MASH の病態モデルマウスにおける全身性及び肝細胞選択的 LXR α / β 欠損の影響を検討した。その結果、肝細胞選択的 LXR α / β 欠損マウスは全身性欠損と同様に肝臓及び脾臓の組織重量が有意に増加した。また、フローサイトメトリーを用いて肝臓免疫細胞組成を評価したところ、1) の結果を反映し、全身性欠損と肝細胞選択的欠損は類似の肝臓免疫細胞組成パターンを示した。

4. 考察

本年度の検討の結果、これまでの検討で見出した、生理的条件下において全身性 LXR α / β 欠損マウスで観察される肝臓免疫細胞の分布及び機能変化は肝細胞選択的 LXR 欠損マウスにおいても同様に観察されることがシングルセル解析を行うことによって明らかとなった。したがって、LXR α 及び LXR β は肝細胞において、脂質代謝制御を介して、または直接的に肝臓免疫細胞の分布及び機能制御に影響することが示された。近年、UK Biobank にお

けるヒトデータベースを用いた解析から、少なくとも 450 人に 1 人が LXR α の機能不全型変異体を保有していること、血中成分分析の情報から肝障害マーカーが有意に増加することが報告された⁸⁾。さらに、発見された機能不全型変異体の 1 つを肝細胞に発現させたマウスは MASH を早期に誘導することから^{8,9)}、我々が全身性及び肝細胞選択的欠損マウスを用いて見出した知見と一致し、LXR α 及び LXR β が肝免疫系恒常性維持及び肝障害抑制に必須な因子であることが示された。一方、先述の報告は、肝組織または単離した肝細胞に限定した解析であり、免疫細胞を用いた解析は報告されていない。したがって、本研究において我々が見出した知見は、MASH の病態制御における免疫作用を介した LXR α 及び LXR β のさらなる重要性を示す上で非常に重要な情報であると言える。今後は、今回確立したシングルセル解析や肝組織切片を用いてさらに詳細な解析を進めていく予定である。

5. 結語

令和 6 年度は、本研究の課題であった本学内でのシングルセル解析の実施及び解析について、実際に本検体を用いて達成することができた。その結果、これまでフローサイトメトリーを用いた個々の免疫細胞の検出や、肝臓非実質細胞を用いたバルクの RNA シークエンスなどの手法を用いた解析では見出すことのできなかった、希少細胞の情報や免疫細胞の全体像が把握できるようになった。なお、本解析手法は本研究で用いた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の細胞を用いて解析

が可能である。これまでは生細胞を用いて直ちにライブラリーを作製する必要があり、時間的な制限が問題であったが、最近は今回実施したように固定した細胞やパラフィン切片等を用いたライブラリー作製が可能となり、容易に検体が準備できるようになった上、短時間の反応系の実験にも利用可能になった。今後は、医学部内での技術提供及び普及に努めるとともに、本学全体の研究推進力の発展に貢献すべく他の医歯薬系学部である歯学部及び薬学部や、生物資源科学部及び文理学部等の生命科学系学部との連携を目指していきたい。

（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、本編で報告した内容は、日本大学本部発行の学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕実績報告書において重複して記載されていること、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, 22H04925 (PAGS) 及び25K10237）、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* 2019;20(20): E5045 (Review).
- 2) Endo-Umeda K, Makishima M. Exploring the roles of liver X receptors in lipid metabolism and immunity in atherosclerosis. *Biomolecules* 2025;15(4):579 (Review).
- 3) 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* 2018;159(3):1419-1432.
- 4) Endo-Umeda K, Nakashima H, Komine-Aizawa S, Umeda N, Seki S, Makishima M. Liver X receptors regulate hepatic F4/80 $\cdot$ CD11b $^{+}$ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice. *Sci Rep* 2018;8: 9281.
- 5) 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* 2021;11:22595.
- 6) Xiong X, Kuang H, Ansari S, Liu T, Gong J, Wang S et al., Landscape of Intercellular Crosstalk in Healthy and NASH Liver Revealed by Single-Cell Secretome Gene Analysis. *Mol Cell* 2019;75(3):644-660.
- 7) 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* 2020;53(3):641-657.
- 8) Lockhart SM, Muso M, Zvetkova I, Lam BYH, Ferrari A, Schoenmakers E et al., Damaging mutations in liver X receptor- α are hepatotoxic and implicate cholesterol sensing in liver health. *Nat Metab* 2024;6(10):1922-1938.
- 9) Clark AT, Russo-Savage L, Ashton LA, Haghshenas N, Amselle NA, Schulman IG. A mutation in LXR α uncovers a role for cholesterol sensing in limiting metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. *Nat Commun* 2025;16(1):1102.