

—特集 [肥満症治療の最前線 (8)]—

代謝異常関連脂肪肝炎における
マクロファージ研究の最前線

酒井真志人

日本医科大学大学院医学研究科分子遺伝医学分野

はじめに

代謝異常関連脂肪性肝疾患 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) の有病率は25%に及び、2型糖尿病患者における合併率は60%以上とさらに高い。10~20%のMASLDは、炎症と線維化を伴う代謝異常関連脂肪肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) に進行し、肝硬変や肝細胞癌の原因となるが、MASHの有効な治療法は確立されていない。MASHでは肝臓中の単球由来マクロファージが増加し、サイトカインの分泌や線維化促進因子による肝星細胞の活性化を介して、炎症と線維化の進展に寄与する。実際、肝臓における単球由来マクロファージの集積を遺伝的または薬理的に減少させると、MASHによる肝障害と線維化が改善することが報告されている。これらの結果から、MASHの病態解明において、肝臓マクロファージの変容機構の解明が重要であると考えられる。本稿では、MASHにおけるマクロファージが疾患特異的な形質を獲得するメカニズムに対するアプローチを最新の知見を交えつつ紹介する。

組織マクロファージの発生と由来

組織マクロファージはすべての臓器に存在し、組織恒常性の維持に重要な役割を果たす。例えば、マイクログリアは神経回路の形成に貢献している一方、破骨細胞は骨のリモデリングに寄与する。このようなマクロファージの組織特異的表現型の獲得機構の研究が進められてきた。

発生の過程では、マクロファージ前駆細胞が組織内に入るタイミングで急速に組織特異的な遺伝子発現が誘導される。また、マクロファージを本来の組織環境から移動させると、組織特異的な遺伝子発現が失われることから、組織マクロファージの形質は組織環境におけるシグナルによって誘導されることが明らかとなった^{1,2}。転写因子PU.1, C/EBP, AP-1はマクロファージの分化を決定する主要な転写因子 (系統決定

的転写因子)として知られているが、組織マクロファージはさらに環境に応答して組織特異的な転写因子を発現する。これらの環境シグナル応答性の転写因子がPU.1などの系統決定的転写因子とともに組織特異的なエンハンサーを形成することで、マクロファージは組織特異的な遺伝子発現と機能を獲得する。例えば、腹腔内マクロファージは大網組織由来のレチノイン酸による転写因子GATA6の発現誘導によりその機能を獲得する³。

これまでの系統追跡実験 (lineage tracing) の結果から、組織マクロファージは胎生期の卵黄囊あるいは胎児肝臓の赤血球骨髄球前駆細胞 (erythro-myeloid progenitor, EMP)、もしくは骨髄の造血幹細胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 由来の単球を起源とすることが明らかになっている⁴。組織マクロファージの起源は臓器によって異なり、心臓や消化管では出生後に胎生期由来のマクロファージが単球由来のマクロファージに置換されるが、健康な脳や肝臓では自己複製により胎生期由来のマクロファージが維持される。

肝臓では、卵黄囊由来のマクロファージが一旦生着した後、卵黄囊から胎児肝臓への造血の移行により胎児肝単球由来のマクロファージに大きく置き換えられる。これらの胎生期由来の組織マクロファージがクッパー細胞である。クッパー細胞は肝類洞内皮細胞上に存在し、自然免疫や鉄代謝、腸管由来のリポ多糖 (LPS) の解毒に重要な役割を果たす。クッパー細胞は出生後も自己複製によって維持されるが、細菌感染などにより脱落すると、循環中の単球が肝類洞に生着して、自己複製能を持ち、クッパー細胞に近い遺伝子発現を示す単球由来の肝臓マクロファージへと分化する⁵。

肝臓マクロファージの分化・機能維持に必要な
組織環境シグナル

筆者らはクッパー細胞を特異的に除去した後、肝類洞で単球が肝臓マクロファージへと分化する過程を解析し、肝臓マクロファージの分化・機能維持に必要な

肝臓由来シグナルを同定した⁶。まず、クッパー細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Clec4f-cre*-*tdTomato* マウスを作製し、Cre リコンビナーゼ依存性にジフテリア毒素受容体 (diphtheria toxin receptor, DTR) を発現する *Rosa26iDTR* マウスを交配することで、クッパー細胞特異的に DTR を発現するマウスを作成した。クッパー細胞特異的に DTR を発現するマウスにジフテリア毒素 (diphtheria toxin, DT) を投与すると、予想通り、クッパー細胞が除去された肝類洞に単球が遊走して肝臓マクロファージに分化した。そこで、肝類洞に生着した単球が肝臓マクロファージに分化していく過程の経時的なトランスクリプトーム解析を行った。その結果、肝類洞に生着した単球は、12 時間以内にクッパー細胞の系統決定的転写因子である *LXR α* をコードする *Nr1h3* を発現し、7 日後にはクッパー細胞に特異的な遺伝子である *Clec4f* を発現することが明らかになった。

次に、これらの肝臓マクロファージに特異的な遺伝子の発現誘導に必要な組織環境シグナルの同定を試みた。細胞内シグナル伝達経路が活性化されると、そのシグナルの下流で活性化される転写因子の結合モチーフを持つエンハンサーが活性化される。そのため、肝臓内で形成されるエンハンサーにおける転写因子の結合モチーフを明らかにすることで、肝臓マクロファージの分化を誘導する組織環境シグナルを同定できると考えられた。網羅的オープンクロマチン解析 (assay for transposase-accessible chromatin sequencing, ATAC-seq) によって同定された肝臓内で新規に形成されたエンハンサーでは、シグナル依存性の転写因子である *LXR*, *SMAD*, *RBPJ* の結合モチーフが濃縮されており、これらの転写因子が肝臓マクロファージの分化に重要であると考えられた。

さらに、これらの転写因子結合モチーフを持つエンハンサーの活性化に関わるリガンドを探索した結果、類洞内皮細胞に発現する Notch リガンドである *DLL4* と *TGF- β /BMP* ファミリー分子による Notch-*RBPJ* シグナルおよび *TGF- β /BMP-*SMAD** シグナルの活性化によって、肝臓マクロファージに特異的な遺伝子の発現誘導が起こることが明らかとなった。また、肝星細胞は、肝臓内でマクロファージコロニー刺激因子 (*M-CSF*) を最も多く発現する細胞であり、*TGF- β /BMP* ファミリー分子である *BMP9* を高発現していることから、類洞内皮細胞とともに肝類洞におけるマクロファージのニッチェを形成していると考えられた⁷。

MASH における単球・マクロファージの 微小環境依存的なリプログラミング

MASH では、循環血中の単球が肝臓に遊走して複数のマクロファージ集団を形成し、サイトカインの分泌や線維化促進因子による肝星細胞の活性化を介して、炎症と線維化の進展に寄与する (図 1)。MASH におけるマクロファージ集団の変化を明らかにするため、通常食もしくは MASH 誘導食を与えたマウスの肝臓の *CD45* 陽性 *CD146* 陰性細胞について、シングルセル RNA-seq を実施した。その結果、MASH の肝臓には、胎生期由来のクッパー細胞 (MASH Kupffer cell, KC-M) と肝類洞における単球由来マクロファージ (recruited macrophage occupying the Kupffer cell niche, KN-RM)、以前に報告された肝臓の単球由来マクロファージである *Ly6C^{hi}-RM* (*Ly6C*-high recruited macrophage) および *Ly6C^{lo}-RM* (*Ly6C*-low recruited macrophage) が存在することが明らかとなった。

これら 4 種類のマクロファージの遺伝子発現プロファイルを比較したところ、KC-M と KN-RM の遺伝子発現パターンはよく似ており、*Ly6C^{hi}-RM* および *Ly6C^{lo}-RM* とは大きく異なることが明らかとなった。つまり、胎生由来の KC-M と単球由来の KN-RM は異なる起源を持つが、近い遺伝子発現を示した。一方、*Ly6C^{hi}-RM* と *Ly6C^{lo}-RM* は KN-RM と同じ単球に由来するが、全く異なる遺伝子発現を示す。これらのマクロファージ集団の解剖学的位置を肝臓の血管構造に着目して解析したところ、KC-M と KN-RM は肝類洞に、*Ly6C^{hi}-RM* は門脈と中心静脈といった大血管 (>15 μ m) の周囲に存在し、*Ly6C^{lo}-RM* は中心静脈の周囲に分布していた。これらの結果から、*Ly6C^{hi}-RM* と *Ly6C^{lo}-RM* は、KC-M および KN-RM とは異なるニッチェに存在すると考えられた。上記の遺伝子発現解析と合わせて考えると、肝臓のマクロファージの遺伝子発現は、細胞の由来よりも微小環境 (ニッチェ) に依存すると考えられた⁸。

MASH では *Ly6C^{hi}* 単球が肝臓に遊走して、肝類洞ニッチェで KN-RM に、中心静脈周囲ニッチェでは *Ly6C^{lo}-RM* に分化する。分化の過程で、これらの細胞のエンハンサーランドスケープに起こる変化を明らかにするために、ATAC-seq によりオープンクロマチンを網羅的に同定して比較したところ、肝臓内で形成されたオープンクロマチンの約 75% が、それぞれの細胞に特異的であることが明らかになった。*LXR* などのクッパー細胞に重要な転写因子の結合モチーフは、KN-RM に特異的なオープンクロマチン領域で特異的に濃縮されていた。KN-RM と *Ly6C^{lo}-RM* の違いは、

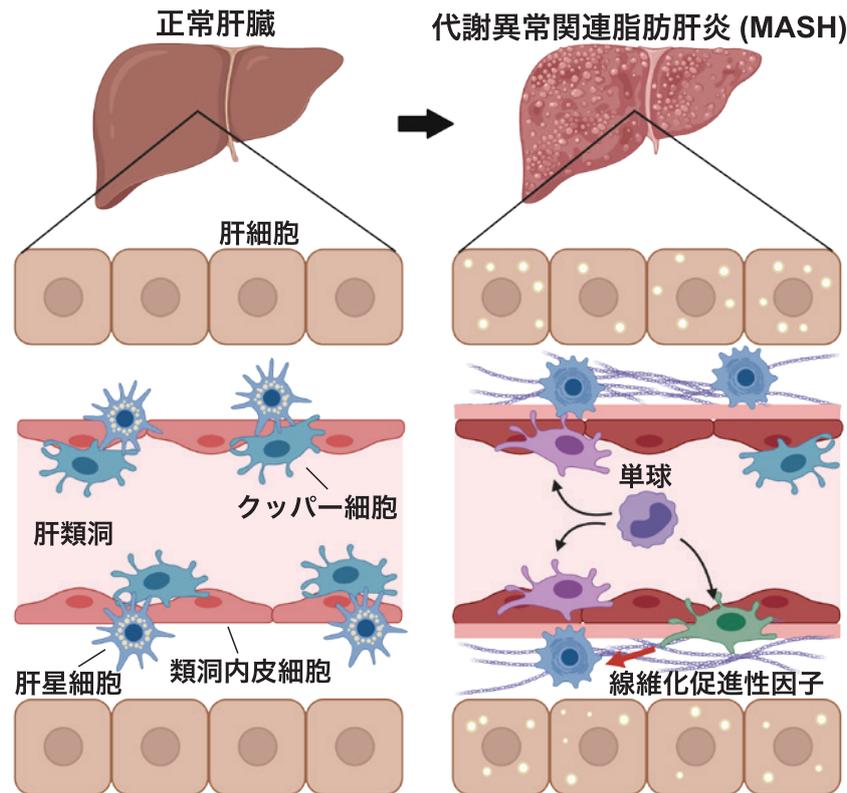


図1 MASHにおける肝臓マクロファージの多様化 (BioRender.com で作成。
<https://www.biorender.com>)

単球のエンハンサーが微小環境依存的なリプログラミングを受けることによって決定されていると考えられた⁸。

最近になって、クッパー細胞の遺伝子発現も、その位置によって異なることが報告された。スカベンジャー受容体MARCOを発現するクッパー細胞は、中心静脈よりも門脈領域に多く分布している。MARCO陽性のクッパー細胞は抗炎症性サイトカインであるIL-10を高発現しており、免疫抑制性マクロファージとして機能する。MARCO陽性クッパー細胞を除去すると、MASLD/MASHモデルの脂肪肝が増加することから、MARCO陽性クッパー細胞はMASLD/MASHにおいて保護的な機能を持つと考えられている⁹。

MASHにおけるクッパー細胞のリプログラミング

MASHにおけるクッパー細胞の転写制御の変化を明らかにするために、KC-Mにおいて、ATAC-seqによるオープンクロマチン部位の同定、ヒストンH3リシン27アセチル化(H3K27ac)のクロマチン免疫沈降(chromatin immunoprecipitation followed by sequencing, ChIP-seq)による転写活性の評価を行った。H3K27acは、転写制御部位の活性化と高い相関の

あるヒストン修飾である。KC-Mでは、定常状態のクッパー細胞との比較で、エンハンサー領域の18%にH3K27acの亢進もしくは減弱が見られた。クッパー細胞のMASH依存性の変化に寄与する転写因子を同定するために、これらの転写活性が変化したエンハンサーにおける転写因子結合モチーフを解析したところ、KC-Mで活性化したエンハンサーにおいて転写因子AP-1, NFAT, RUNX, EGRの結合モチーフが濃縮していた。また、KC-MではAP-1転写因子であるATF3をコードする*Atf3*と、*Egr2*, *Runx1*の遺伝子発現も上昇していた。これらの転写因子とその活性化に関わる上流シグナルが、MASHにおけるクッパー細胞の疾患依存性の変化に関与していると考えられる⁸。

肝硬変患者の肝臓のシングルセルRNA-seq解析から、TREM2とCD9を高発現し、コラーゲン線維上に存在するscar-associated macrophage (SAM)が同定された。複数の線維化促進性因子を発現することから、線維化促進性のマクロファージと考えられている¹⁰。また、肥満のヒトとマウスの脂肪組織と肝臓から、同様にTREM2/CD9高発現マクロファージであるlipid-associated macrophage (LAM)が同定され、代謝疾患への関与が示唆されている¹¹。筆者らは、マウスの

MASH モデルでは、クッパー細胞、単球由来マクロファージとともに TREM2/CD9 を高いレベルで発現することを見出した。また、それらの TREM2/CD9 高発現マクロファージでは、Trem2 と CD9 のエンハンサーに転写因子 LXR と AP-1 転写因子である ATF3 が結合しており、これらの転写因子が MASH における TREM2/CD9 高発現マクロファージの出現に関与すると考えられた⁸。

最近、MASLD におけるマクロファージの TREM2 の発現は肝細胞由来のスフィンゴシン 1 リン酸によって誘導されることが報告された。TREM2 によって貪食能が活性化されたマクロファージは、脂質を蓄積してアポトーシスを起こした肝細胞を貪食して処理する。一方、MASH では、シェダーゼ（膜貫通タンパク質を細胞外で切断する細胞表面タンパク分解酵素）である ADAM17 が増加して TREM2 を切断し、マクロファージの貪食能が低下する。その結果、肝細胞由来の DAMPs (damage-associated molecular patterns) が増加して炎症が増悪する¹²。そのため、TREM2 を切断から保護することは MASH の治療につながる可能性がある。

MASH におけるクッパー細胞死

定常状態のクッパー細胞と比較して KC-M で活性が低下したエンハンサーでは、転写因子 LXR の結合モチーフが濃縮していた。また、それに伴って、KC-M ではクッパー細胞に特異的な LXR の標的遺伝子の発現が大きく減少していた。そこで、KC-M における LXR の結合部位を、ChIP-seq により同定して定常状態のクッパー細胞と比較したところ、KC-M では主にクッパー細胞特異的エンハンサーにおいて LXR の結合が減少していることが明らかとなった。LXR 結合が減少したエンハンサーでは H3K27ac が減弱しており、KC-M におけるクッパー細胞特異的遺伝子の発現低下の原因と考えられた⁸。

転写因子 LXR α はクッパー細胞の生存・維持に重要であることから¹³、KC-M における LXR 結合部位の変化による LXR 標的遺伝子の減少が細胞死を引き起こす可能性が考えられた。そこで、MASH の肝臓において TUNEL 染色によりマクロファージの細胞死を検出したところ、KC-M の細胞死の頻度が亢進していることが明らかになった。MASH モデルにおいて KN-RM は、MASH 誘導食開始後 10 週までに検出され、徐々に蓄積して 30 週では KC-M の数を上回った。これらの結果から、MASH では KC-M の細胞死が誘導されて脱落し、徐々に KN-RM によって置換されると考えら

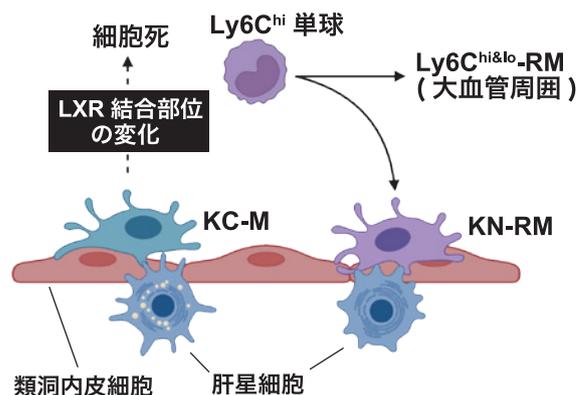


図2 MASHにおけるクッパー細胞の細胞死の誘導 (BioRender.comで作成. <https://www.biorender.com>)

れた (図2)⁸。

クッパー細胞を単球由来マクロファージで置換した後に MASH 誘導食を負荷したマウスでは、肝臓中性脂肪量が低下する一方で、肝障害が増悪することが報告されている¹⁴。この結果は、MASH において肝類洞に遊走した単球由来マクロファージはクッパー細胞とよく似た遺伝子発現を示すものの、同じではないことを示唆しており、機能的差異に関する解析が望まれる。

おわりに

MASH では複数の異なる遺伝子発現を示すマクロファージ集団が存在すること、それらのマクロファージの形質は存在するニッチに依存して決定されることが明らかとなってきた。現在、各マクロファージ集団の機能と MASH の病態進展における役割の解明が進められている。また、近年急速に進歩しているイメージングゲノミクスを用いたアプローチによって、微小環境におけるマクロファージと周囲の細胞間の相互作用がより詳細に明らかになっていくことが期待されている。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし。

文献

- Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, et al.: Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 2014; 159: 1327-1340.
- Mass E, Ballesteros I, Farlik M, et al.: Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 2016; 353: aaf4238. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4238>
- Okabe Y, Medzhitov R: Tissue-specific signals

- control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 2014; 157: 832–844.
4. Ginhoux F, Guillemins M: Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 2016; 44: 439–449.
 5. Blériot C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disson O, Lecuit M: Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* 2015; 42: 145–158.
 6. Sakai M, Troutman TD, Seidman JS, et al.: Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity. *Immunity* 2019; 51: 655–670. e8.
 7. Bonnardel J, T'Jonck W, Gaublot D, et al.: Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity* 2019; 51: 638–654. e9.
 8. Seidman JS, Troutman TD, Sakai M, et al.: Niche-Specific Reprogramming of Epigenetic Landscapes Drives Myeloid Cell Diversity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 2020; 52: 1057–1074. e7.
 9. Miyamoto Y, Kikuta J, Matsui T, et al.: Periportal macrophages protect against commensal-driven liver inflammation. *Nature* 2024; 629: 901–909.
 10. Ramachandran P, Dobie R, Wilson-Kanamori JR, et al.: Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level. *Nature* 2019; 575: 512–518.
 11. Jaitin DA, Adlung L, Thaiss CA, et al.: Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner. *Cell* 2019; 178: 686–698. e14.
 12. Wang X, He Q, Zhou C, et al.: Prolonged hypernutrition impairs TREM2-dependent efferocytosis to license chronic liver inflammation and NASH development. *Immunity* 2023; 56: 58–77. e11.
 13. Scott CL, T'Jonck W, Martens L, et al.: The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages. *Immunity* 2018; 49: 312–325. e5.
 14. Tran S, Baba I, Poupel L, et al.: Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 2020; 53: 627–640. e5.

(受付：2024年6月2日)

(受理：2024年9月18日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。