

—特集 [生命の階層を可視化・操作する最先端技術：神経科学が切り拓くバイオイメージングと疾患研究の新展開 (6)]—



シングルセル RNA-seq と空間情報の統合による 肝臓マクロファージ多様性の理解

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

近年、シングルセル RNA-seq (single-cell RNA sequencing: scRNA-seq) の普及により、組織や臓器を構成する細胞集団に対する理解は大きく変化した。従来のバルク RNA-seq では、多数の細胞をまとめて解析するため、異なる細胞集団の情報が平均化され、少数集団や一過性の細胞状態を捉えることが困難であった。これに対し、scRNA-seq は単一細胞ごとの遺伝子発現を直接比較できるため、一見同じ細胞種に見える集団の内部にも、実際には異なる分化段階、局在、機能状態をもつ細胞が共存していることを明らかにした。

この変化が最も顕著に現れた分野の一つが、組織マクロファージ研究である。マクロファージは自然免疫を担う細胞として古くから知られてきたが、近年では感染防御にとどまらず、発生、恒常性維持、代謝、組織修復、線維化制御など多様な生理機能に関与する細胞群として理解されている。さらに、その性質は一樣ではなく、発生起源と組織微小環境の双方によって特徴づけられる。scRNA-seq, ATAC-seq, 空間トランスクリプトミクス, 空間プロテオゲノミクスなどの技術の導入により、マクロファージの多様性は、単なる細胞表面マーカーの違いとしてではなく、局在と機能を反映した動的な状態として捉えられるようになった。

肝臓は、代謝、解毒、胆汁産生、免疫制御を担う高度に複雑な臓器である。門脈域から中心静脈域にかけて、酸素、栄養、ホルモン、腸管由来因子の勾配が形成されており、肝細胞のみならず、類洞内皮細胞、肝星細胞、免疫細胞などの非実質細胞も、その位置に応じて異なる性質を示す。したがって、肝臓マクロファージを理解するためには、各細胞が肝臓内のどこに位置し、どのような微小環境のもとで、どの細胞群と相互作用しているのかを統合的に考える必要がある。

本稿では、まず組織マクロファージの多様性をめぐるとの概念の変化を整理し、そのうえで肝臓マクロファージの分化とニッチ形成、代謝機能障害関連脂肪性肝疾

患 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: MASLD)/代謝機能障害関連脂肪肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis: MASH) におけるマクロファージ集団の変化、さらに空間解析技術がもたらした新しい理解について概説する。また、アルツハイマー病研究で報告された disease-associated microglia (DAM) の概念との対比を通して、肝臓マクロファージ研究の現在地を整理する。

組織マクロファージの理解の変遷

現在では、多くの組織マクロファージが胎生期に組織へ定着し、その後は組織内で自己複製しながら維持されることが広く受け入れられている。発生期に各臓器へ流入した前駆細胞は、その後それぞれの組織で異なる遺伝子発現プログラムを獲得し、脳ではマイクログリア、肝臓ではクッパー細胞、肺では肺泡マクロファージなど、臓器ごとに異なる機能を担うようになる¹。この理解により、マクロファージを一括りに扱うのではなく、臓器ごとの特異性を前提として研究する必要性が明確になった。

組織マクロファージは、発生期に生着した組織の環境シグナルに応答して特異的な転写因子を発現する。それらの転写因子は組織特異的な遺伝子発現を誘導し、各組織に適応した機能を付与する (図 1)^{2,3}。一方、組織から取り出したマクロファージは、培養条件下で元の組織特異性を失うことが知られている。したがって、組織マクロファージのアイデンティティは、発生起源によって規定される基盤に、組織環境からのシグナルが重なることで形成されると考えられる。

この考え方は肝臓においてとくに重要である。肝臓は腸管からの血流が最初に流入する臓器であり、門脈域から中心静脈域にかけて、血流中に含まれる栄養素、腸内細菌由来成分、酸素濃度などに大きな勾配が存在する。さらに、類洞内皮細胞、肝星細胞、肝細胞などがそれぞれ特有のシグナルを供給し、肝臓特有の微小

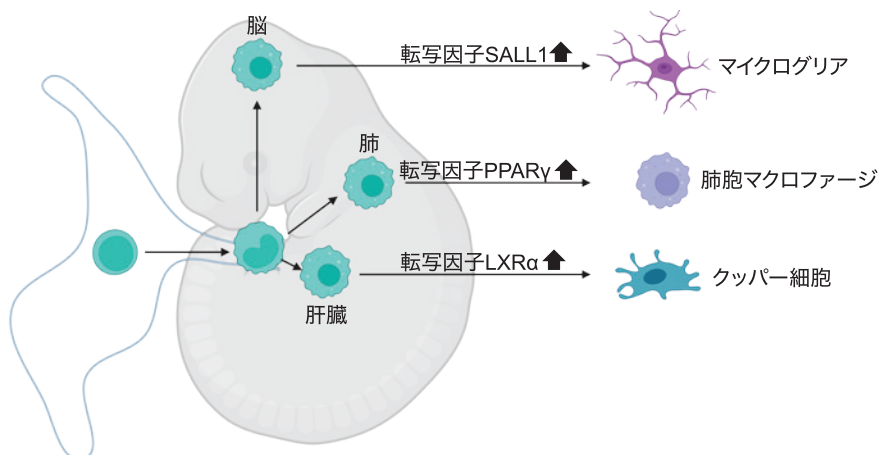


図1 環境シグナルによるマクロファージの組織特異的表現型の形成 (BioRender.comで作成)

環境を形成している。したがって、肝臓マクロファージの性質は、単に「肝臓に存在すること」によって決まるのではなく、「肝臓内のどこに位置するか」によって大きく異なる。

肝臓マクロファージの分化とニッチ

肝臓の胎生期由来の組織マクロファージであるクッパー細胞は、出生後も自己複製によって維持されており、自然免疫や鉄代謝、腸管由来のLPSの解毒などに重要な役割を担う。しかし、感染や慢性炎症などによりクッパー細胞が脱落すると、循環単球が肝臓へ流入し、クッパー細胞に近い形質を再び獲得する。このような「単球から肝臓常在型マクロファージへの分化過程」は、肝臓特有の微小環境を理解するうえで重要な現象である。

筆者らは、クッパー細胞を選択的に欠失させる系を用いて、単球が肝類洞へ遊走し、肝臓マクロファージへと分化していく過程を経時的に解析した。その結果、肝臓に遊走した単球は、肝類洞において転写因子LXR α の発現を高め、その後*Clec4f*などのクッパー細胞特異的遺伝子の発現を段階的に獲得していくことが示された。さらにATAC-seq解析により、この過程で新たに開くエンハンサー領域にはLXR, SMAD, RBPJのモチーフが多く存在することが明らかとなり、肝臓由来のシグナルが転写プログラムの再編成を誘導することが示唆された⁴。

さらに、その後の解析から、類洞内皮細胞、肝星細胞がそれぞれ異なる因子を供給し、単球にクッパー細胞様のアイデンティティを形成させることが示された。具体的には、類洞内皮細胞由来のDLL4による

Notchシグナルの活性化や、肝星細胞から供給されるBMP9によるBMPシグナルの活性化が、クッパー細胞特異的プログラムの成立に関与する⁴⁵。これらのシグナルが協調して作用することにより、肝類洞はクッパー細胞の分化と維持を支えるニッチとして機能する。

この理解は、肝臓マクロファージ研究に二つの重要な視点をもたらした。第一に、マクロファージの形質は細胞の由来だけでは決まらず、周囲の細胞群が供給するシグナルによって規定されるという点である。第二に、肝類洞そのものが均質ではない以上、クッパー細胞のニッチも一様ではないという点である。実際、近年の空間解析研究では、類洞内皮細胞や肝細胞のシグナル分布自体が門脈域と中心静脈域で異なり、それに応じてマクロファージの局在や機能も変化することが示されている。

MASHにおける肝臓マクロファージの多様性

MASHでは、肝臓マクロファージは量的にも質的にも大きく変化する。近年、ヒト肝臓に対するシングルセル解析の進展により、正常肝にも多様な免疫細胞集団が存在することが明らかとなってきた。こうした知見と並行して、線維化肝やMASH肝の解析から、病態進行に伴い単球由来マクロファージが増加するとともに、常在性クッパー細胞にも大きな転写変化が生じることが示されている。

ヒト肝硬変組織に対するシングルセル解析により、TREM2やCD9を高発現するscar-associated macrophage (SAM)が、線維化部位に集積するマクロファージ集団として同定された⁶。この研究の意義は、新たなマクロファージ集団を見出したことにと

どまらない。線維化部位では、マクロファージ、内皮細胞、間質細胞などが集積し、それらの間に特徴的な細胞間相互作用ネットワークが形成されていることが明らかとなった。すなわち、肝線維化病変は単なる組織障害としてではなく、特有の細胞構成と相互作用によって成立する空間的ニッチとして理解すべきであることが示された。

筆者らが MASH モデルマウスを用いて行ったシングルセル解析でも、MASH における肝臓マクロファージの多様性が明らかとなった。病態下でも残存する胎生由来クッパー細胞、肝類洞ニッチを占める単球由来マクロファージ (recruited macrophage occupying the Kupffer cell niche, KN-RM)、さらに血管周囲に局在する単球由来マクロファージの Ly6C^{hi}-RM (Ly6C-high recruited macrophage) および Ly6C^{lo}-RM (Ly6C-low recruited macrophage) が識別され、それぞれ異なる遺伝子発現とエピゲノム状態を示した。とくに重要なのは、同じ単球由来であっても、肝類洞に存在するマクロファージと血管周囲のマクロファージでは全く異なる遺伝子発現パターンを示す一方、由来の異なる細胞であっても同じニッチに入れば類似した状態へ収束する点である (図 2)。この結果は、MASH におけるマクロファージの多様性が、発生の起源よりも局所の微小環境による再プログラムに強く依存して形成されることを示している⁷。

さらに本研究では、MASH の進行に伴ってクッパー細胞の細胞死が増加し、単球由来マクロファージ (KN-RM) による置換が進行することが示された (図 3)。こ

の現象は単なる細胞数の補充ではなく、発生起源の異なるマクロファージ集団が肝類洞ニッチを占めることを意味していた。すなわち、MASH ではクッパー細胞数の変化に加えて、肝類洞マクロファージ集団の構成そのものが変化していることが示された⁷。

近年、MASH における TREM2 高発現マクロファージの機能についても理解が進んでいる。MASH の進行に伴い、死細胞や脂質残渣の処理に関わる TREM2 依存的 efferocytosis が障害され、その結果、炎症反応が遷延し病態の進展が促進されることが示されている⁸。この知見は、TREM2 高発現マクロファージを単なる炎症促進細胞としてではなく、組織保護と病態慢性化の双方に関与する細胞として理解する必要があることを示している。

疾患関連マクロファージという概念の広がり

疾患に応答して特定のマクロファージ集団が出現す

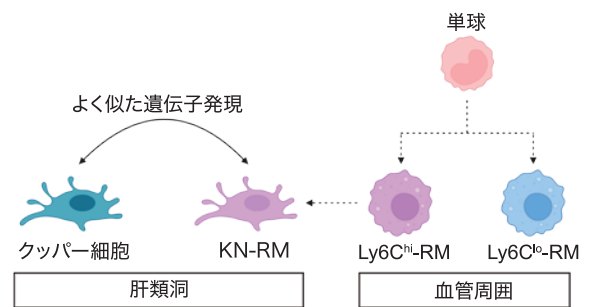


図 2 MASH におけるマクロファージのニッチ特異的な再プログラミング (BioRender.com で作成)

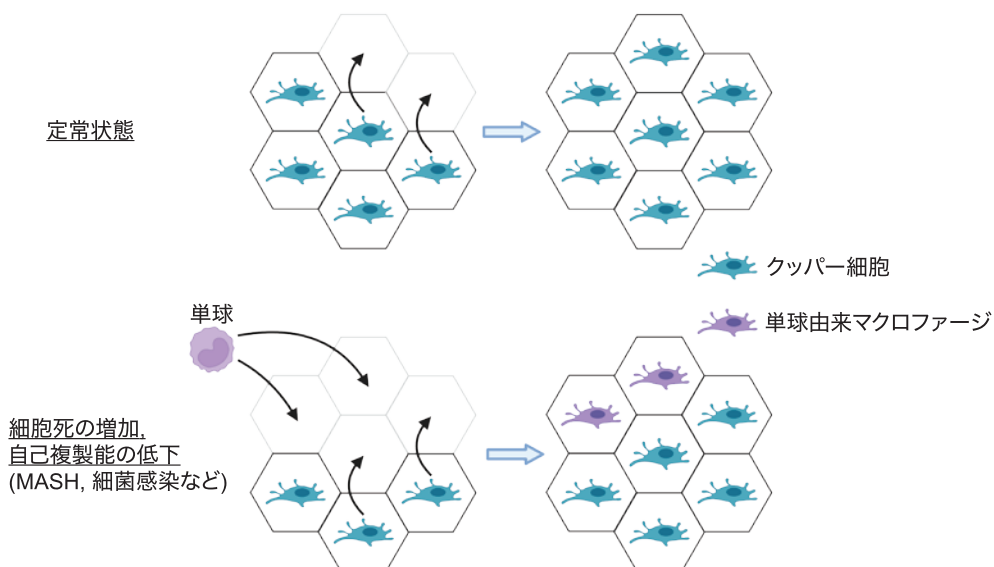


図 3 胎生由来クッパー細胞と単球由来マクロファージによる肝臓マクロファージ数の維持 (BioRender.com で作成)

るという概念を広く印象づけたのは、アルツハイマー病研究における disease-associated microglia (DAM) の発見である。アルツハイマー病モデルマウスの脳では、恒常性維持型マイクログリアとは異なる転写状態を示す細胞集団が出現し、*Trem2*, *ApoE*, *Lpl*, *Cst7* などの遺伝子発現が上昇することが示された⁹。さらに、この状態への移行は段階的に進行し、その成熟には TREM2 シグナルが必要であることが明らかとなった。この知見により、神経変性疾患における免疫細胞の役割に対する理解は大きく更新された¹⁰。

この概念は代謝疾患研究にも強い影響を与えた。脂肪組織では、肥満に伴って TREM2 陽性の lipid-associated macrophage (LAM) が出現し、脂質恒常性に関わることが示されている¹¹。肝臓でも、MASH や線維化に伴う TREM2, CD9, GPNMB, SPP1 などを高発現するマクロファージが報告されており、脂質過剰、組織障害、線維化に応答した疾患関連マクロファージが臓器横断的に存在する可能性が高い。

ただし注意すべき点は、同様の遺伝子発現を示すマクロファージであっても、その機能的な意味は臓器や局在する微小環境によって異なりうることである。脳における DAM、脂肪性肝疾患における LAM、線維化肝で報告されている SAM は、TREM2 や脂質代謝関連遺伝子の発現など一部に共通する特徴を示すものの、それぞれの組織環境の中で異なる役割を担っていると考えられる。したがって今後は、これらのマクロファージ状態が組織内でどのような分布を示し、どのような微小環境シグナルによって誘導され、どのような機能を担うのかを、空間情報と統合して理解していくことが重要である。

空間オミクス解析が明らかにした 肝臓マクロファージの局在

scRNA-seq の大きな限界は、組織から細胞を分散して解析するため、元の位置情報が失われる点にある。肝臓では、門脈域から中心静脈域にかけて明確な zonation が存在し、この空間的不均一性そのものが臓器機能の本質である。そのため、肝臓マクロファージ研究でも、細胞の遺伝子発現と位置情報を同時に解析する技術の導入が不可欠になってきた。

空間プロテオゲノミクスを用いた研究では、肝臓のマクロファージは従来考えられていたように肝臓洞内のクッパー細胞だけに限られるものではなく、中心静脈近傍、胆管周囲、さらに被膜下など、複数の解剖学的位置に対応したマクロファージニッチが存在することが示された。この研究では、抗体にオリゴヌクレオ

チドのバーコードを付加し、scRNA-seq と同時に細胞表面タンパク質を定量する CITE-seq (cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing), single-nucleus RNA-seq, 空間トランスクリプトミクス, 空間プロテオミクスなどの解析を統合することで、肝臓マクロファージの局在と分子的特徴の対応関係がより明確に示された¹²。その結果、肝臓の組織マクロファージはクッパー細胞のみから構成されるという従来の単純な理解は修正され、肝臓には解剖学的部位に応じた複数のマクロファージニッチが存在することが明確になった。

肝臓マクロファージの空間的不均一性が機能の違いとして示された近年の成果の一つに、門脈域近傍に偏在する MARCO 高発現マクロファージの報告がある。この研究では、門脈域近傍に存在するマクロファージが、腸内細菌由来成分などによる過剰な炎症から肝臓を保護する役割を担っていることが示された。さらに、これらの細胞を選択的に欠失させると、胆管炎様の変化や MASH の増悪が認められ、門脈域に存在する免疫抑制的マクロファージが肝臓の炎症制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった¹³。

この知見の意義は、肝臓の組織マクロファージを単一のクッパー細胞集団として捉えてきた従来の理解を修正した点にある。門脈域は腸管由来の分子や微生物関連成分が最初に流入する領域であり、そこで MARCO 高発現の免疫抑制的マクロファージが存在するという配置は、生理学的にも合理的である。すなわち、この研究は、肝臓マクロファージが均一な集団ではなく、門脈域など特定の部位に存在する細胞が、腸管由来の刺激による炎症を抑えるといった部位特異的な役割を担っていることを示した。

この視点は、MASLD/MASH の理解にも直接つながる。MASH は肝臓全体で均一に進行する病態ではなく、門脈域、類洞、中心静脈周囲、さらには線維化部位など、肝臓内の異なる空間領域ごとに異なる細胞応答が生じる病態として捉える必要がある。したがって、どのニッチでどのようなマクロファージ状態が出現し、それが組織保護に働くのか、あるいは線維化の進展を促すのかを見極めることが、今後の重要な課題である。

おわりに

近年のシングルセル解析および空間オミクス解析の進展により、肝臓マクロファージに対する理解は大きく変化した。従来、肝臓の組織マクロファージはクッパー細胞という比較的均一な細胞集団として捉えられ

てきた。しかし現在では、肝臓マクロファージは発生起源の違いに加え、肝小葉内の位置や周囲の細胞環境の影響を受けながら、異なる性質を示す複数の状態として存在していることが明らかになりつつある。とくに、単球由来マクロファージが肝臓内のニッチに入り、局所環境のシグナルに応答して肝臓特有の転写プログラムを獲得していく過程や、疾患関連マクロファージの出現は、組織環境がマクロファージの形質を大きく規定することを示す重要な例である。

MASLD/MASHの病態においても、肝臓マクロファージは単なる炎症細胞ではなく、組織修復、脂質代謝、線維化の制御など、さまざまな過程に関与することが明らかになってきた。さらに、MASHの進行に伴って胎生期由来クッパー細胞の減少、単球由来マクロファージの流入、線維化部位に集積するマクロファージ集団の出現など、肝臓マクロファージの構成そのものが変化することも示されている。したがって、疾患におけるマクロファージ機能を理解するためには、個々の細胞集団の遺伝子発現だけでなく、それらが肝臓内のどこに存在し、どの細胞群と相互作用しているのかを含めて解析することが重要である。

今後の研究では、シングルセル解析と空間解析を統合したオミクス解析がさらに重要になると考えられる。これにより、肝臓内の特定の部位で、どの細胞がどのようなシグナルに応答し、どのような役割を担っているのかを、より精密に理解することが可能になるだろう。また、このような空間的視点は、疾患関連マクロファージの役割を単純な炎症促進・抑制という枠組みで捉えるのではなく、組織環境との相互作用の中で理解するうえでも重要である。

肝臓は、腸管由来の血流を受けるとともに、代謝、解毒、免疫応答など多様な機能を担う臓器であり、その微小環境はきわめて複雑である。肝臓マクロファージの多様性を理解することは、MASLD/MASHのみならず、感染症、線維化、肝細胞癌など多くの肝疾患の理解にもつながる。今後、空間情報を統合した組織解析が進むことで、肝臓マクロファージの役割に対する理解はさらに深まり、新たな病態理解や治療標的の発見につながることを期待される。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし。

文 献

1. Mass E, Ballesteros I, Farlik M, et al.: Specification of

- tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 2016; 353: aaf4238.
2. 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.
3. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, et al.: Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* 2014; 159: 1312-1326.
4. 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.
5. Bonnardel J, T'Jonck W, Gaublomme 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.
6. 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.
7. 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.
8. Wang X, He Q, Zhou C, et al.: TREM2-dependent efferocytosis to license chronic liver inflammation and NASH development. *Immunity* 2023; 56: 58-77. e11.
9. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al.: A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 2017; 169: 1276-1290.e17.
10. Krasemann S, Madore C, Cialic R, et al.: The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* 2017; 47: 566-581.e9.
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. Williams M, Bonnardel J, Haest B, et al.: Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. *Cell* 2022; 185: 379-396.e38.
13. Miyamoto Y, Kikuta J, Matsui T, et al.: Periportal macrophages protect against commensal-driven liver inflammation. *Nature* 2024; 629: 901-909.

(受付 : 2026年3月14日)

(受理 : 2026年3月16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、非営利目的の場合、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、頒布を行うことが出来る。