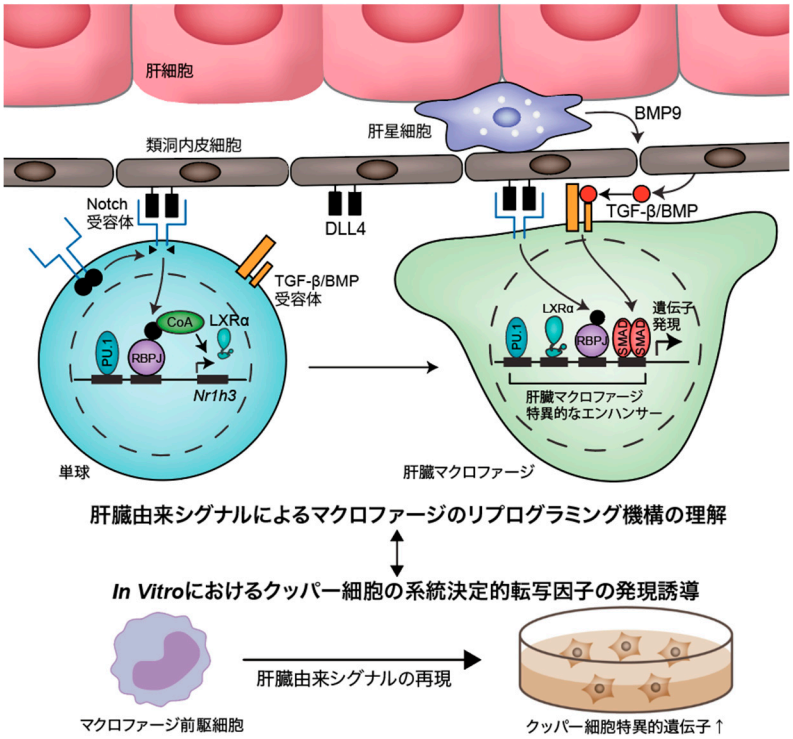
100　肝臓由来シグナルによるクッパー細胞分化法の研究開発	酒井　真志人

【目的】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確立・維持されているが、その分子メカニズムは十分に理解されていない。クッパー細胞は肝類洞に存在する組織マクロファージであり、自然免疫および鉄代謝に重要な役割を果たしている。我々はこれまでに、クッパー細胞に必要なニッシェシグナルの同定を行った。その結果、Notch-RBPJ シグナルと TGF-β／BMP-SMAD シグナルの活性化と、肝細胞由来の内因性 LXR アゴニストがクッパー細胞に特異的な遺伝子の発現に必要なことが明らかとなった。本研究では、肝細胞由来シグナルを再現することで、クッパー細胞に特異的な遺伝子を発現するマクロファージの分化法を開発する。

【方法】低濃度 LPS が DLL4 による転写因子 LXRα の発現誘導に与える影響を評価し、非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis：NASH）において類洞内皮細胞上に増加する Notch リガンドである JAG1 がマクロファージの遺伝子発現に及ぼす効果を DLL4 と比較解析した。また、ヒト単球由来マクロファージにおいて、DLL4 によるヒトのクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導を試みた。さらに、Cas9-ER-Hoxb8 細胞を作製し、*in vitro* において組織マクロファージの分化を解析するためのツールとしての可能性を検討した。

【結果】骨髄由来マクロファージにおいて、低濃度 LPS 刺激は Notch リガンド DLL4 による転写因子 LXRα の発現誘導を増強することが明らかとなった。腸管由来 LPS は、クッパー細胞の分化・機能維持に必要な環境シグナルの一つとして機能している可能性がある。また、Notch リガンド JAG1 は、DLL4 と比較してクッパー細胞の系統決定的転写因子の発現誘導効果が弱いことが明らかとなった。JAG1 には DLL4 に拮抗する作用が報告されていることからも、NASH における JAG1 の増加が NASH におけるクッパー細胞の変化を促進している可能性がある。DLL4 によるクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導は、ヒト CD14 陽性単球由来マクロファージにおいても確認された。ヒトの肝臓マクロファージにおける疾患依存性の変化を *in vitro* で解析するツールとして利用できる。Cas9-ER-Hoxb8 細胞においても、DLL4 によるクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導を確認できたため、ゲノム編集によるクッパー細胞の分化メカニズムの解析に有用と考えられた。

肝臓由来シグナルによる単球・マクロファージのリプログラミング機構の解析



100. 肝臓由来シグナルによるクッパー細胞分化法の研究開発

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

Key words : 肝臓, マクロファージ, クッパー細胞, 単球, 転写因子

緒　言

生体の全ての臓器には、マクロファージが分布し、免疫応答及び組織恒常性の維持に関与する。転写因子 PU.1、C/EBP、AP-1、RUNX はマクロファージの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、系統決定的転写因子と共に組織マクロファージ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［1, 2］。このように、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確立・維持されているが、その分子メカニズムは十分に理解されていない。

クッパー細胞は肝類洞に存在する組織マクロファージであり、自然免疫および鉄代謝に重要な役割を果たしている。定常時、クッパー細胞は胎生由来である。しかし、クッパー細胞が死んで除去されると、循環血液中の単球がリクルートされ、自己複製能を持ち、クッパー細胞と同様の遺伝子発現を持つ肝臓マクロファージに分化する。我々は、この現象を利用して、クッパー細胞に必要なニッシェシグナルの同定を行った。その結果、肝類洞内皮細胞上の Notch リガンド DLL4 による Notch-RBPJ シグナルの活性化、肝星細胞、類洞内皮細胞由来の TGF-β／BMP ファミリー分子による SMAD シグナルの活性化と、肝細胞由来の内因性 LXR アゴニストがクッパー細胞に特異的な遺伝子の発現に必要なことが明らかとなった。また、同定したシグナルを用いてマウスの単球由来マクロファージに *in vitro* でクッパー細胞に特異的な遺伝子の一部を発現させることに成功した［3］。本研究では、*in vitro* においてクッパー細胞分化法を改良すると共に、NASH において類洞内皮細胞上に増加する Notch リガンドである JAG1 がマクロファージの遺伝子発現に及ぼす効果を DLL4 と比較検討する［4］。また、ヒト単球由来マクロファージにおいて、クッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導を試みる。さらに、Cas9 と ER-Hoxb8 を発現するマクロファージ前駆細胞を作製することで、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いたクッパー細胞分化機構の解析のためのツールを確立する。

方法および結果

1. 低濃度 LPS 刺激は Notch リガンド DLL4 による転写因子 LXRα の発現誘導効果を増強した

クッパー細胞は肝類洞に存在し、腸管由来 LPS の解毒に重要な役割を果たす。腸管由来 LPS がクッパー細胞の分化・機能維持に重要な環境シグナルとして機能する可能性を考え、まず、低濃度（0.5 ng/ml）の LPS が、クッパー細胞のマスターレギュレーターである転写因子 LXRα の発現に与える影響を評価した。マウス骨髄前駆細胞を、3 日間 M-CSF（10 ng/ml）で刺激した後、DLL4 でコートしたディッシュ上に移動することにより、24 時間後、転写因子 LXRα をコードする *Nr1h3* の発現が誘導された（図 1a）。LPS のみによる刺激は、*Nr1h3* の発現を増加させなかったが（図 1a）、DLL4 刺激に LPS を追加することで、DLL4 による転写因子 LXRα の発現誘導効果が増強することが明らかとなった。

2. Notch リガンド JAG1 のクッパー細胞の系統決定的転写因子の発現誘導効果は DLL4 よりも弱かった

NASH において類洞内皮細胞上に増加する Notch リガンドである JAG1 が、マウス骨髄由来マクロファージの遺伝子発現に与える効果を DLL4 と比較検討した。マウス骨髄前駆細胞を、3 日間 M-CSF（10 ng/ml）で刺激した後、DLL4

もしくはJAG1でコートしたディッシュ上に移動して24時間刺激し、RNAを抽出してRNA-seqによる遺伝子発現解析を実施した。その結果、JAG1はDLL4と比較して、クッパー細胞の系統決定的転写因子であるLXRα（*Nr1h3*）、Spi-Cの発現誘導効果が弱いことが明らかとなった（図1b）。

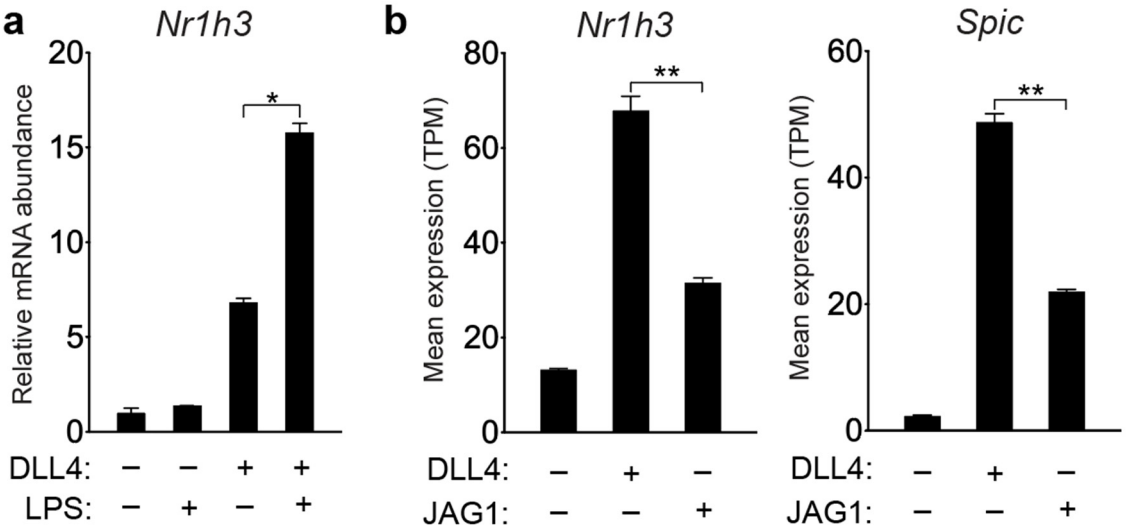


図1. マウス骨髄由来マクロファージにおける転写因子LXRα、Spi-Cの発現誘導

a）DLL4による*Nr1h3*発現誘導に対するLPS（0.5 ng/ml）刺激の効果。4群間の検定には、一元配置分散分析およびBonferroni多重解析を用いた。結果は平均値±標準誤差で示した。*p＜0.01。

b）Notchリガンド DLL4、JAG1が*Nr1h3*、*Spic*の発現に与える効果の比較。RNA-seqデータの遺伝子発現の差はDEseq2を用いて評価した。

**adjusted p value（p-adj）＜0.001。

3. Notchリガンド DLL4はヒトCD14陽性単球由来マクロファージにクッパー細胞特異的遺伝子の発現を誘導した

クッパー細胞は、様々な肝疾患における炎症と線維化の進展に関与している。しかし、ヒトの肝生検で採取できる肝組織には限りがあることから、ヒトの肝病態におけるクッパー細胞の表現型は、ほとんど明らかとなっていない。一方、ヒトの末梢血単核細胞から単球を単離することは容易である。そこで、ヒト単球由来マクロファージを用いて、クッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導を試みた。ヒトの末梢血単核細胞からCD14陽性単球をセルソーターによって分取し、3日間ヒトM-CSF（10 ng/ml）で刺激した後、DLL4でコートしたディッシュ上に移動して24時間刺激し、RNAを抽出してRNA-seqによる遺伝子発現解析を実施した。ヒトのクッパー細胞特異的遺伝子を、ヒト単球由来マクロファージ、および、ヒトマイクログリアと比較して4倍以上発現している339遺伝子と定義して、DLL4刺激がヒトのクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導に与える効果を解析した結果、53/339遺伝子がDLL4により誘導されることが明らかとなった（図2）。

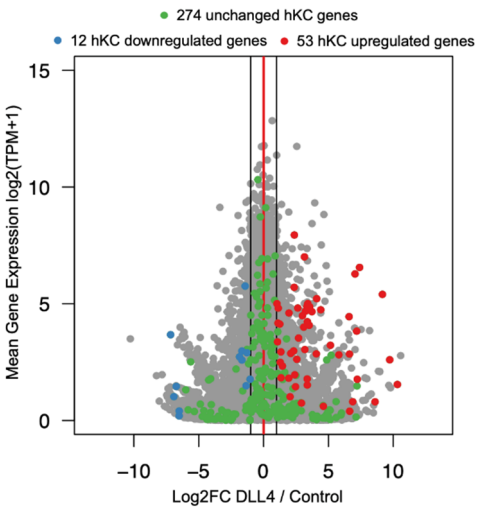


図 2.　ヒト CD14 陽性単球由来マクロファージに対する DLL4 刺激の効果
RNA-seq データの遺伝子発現の差は DEseq2 を用いて評価した。p-adj＜0.05、fold change＞2。

4.　Cas9-ER-Hoxb8 細胞における転写因子 Spi-C 発現は DLL4 によって増加し BMP9 によって抑制された

ER-Hoxb8 を発現させることで、マウス骨髄中のマクロファージ前駆細胞を不死化して細胞株を作製することができる。ER-Hoxb8 細胞は、培地中のエストラジオールを除去して Hoxb8 の機能を抑制し、M-CSF をメディウム中に追加することで、マクロファージへ分化する［5］。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集がクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導に与える影響を解析するために、Cas9 を発現する ER-Hoxb8 細胞を確立した。まず、Rosa26-Cas9$^{+/-}$マウス由来の骨髄前駆細胞に、レトロウイルスを用いて FLAG-ER-Hoxb8 を発現させ、エストラジオールと GM-CSF を含有するメディウム中で持続的に増殖する浮遊細胞株を確立した。次に、エストラジオールを除去して M-CSF（30 ng/ml）刺激によってマクロファージへと分化誘導すると共に、3 日間、DLL4 もしくは BMP9（50 ng/ml）によって刺激した。その結果、Cas9-ER-Hoxb8 マクロファージにおいても Spi-C の発現は DLL4 によって強く誘導されることが明らかとなった（図 3）。また、その効果は BMP9 によって抑制され、クッパー細胞特異的 SMAD4 欠損マウスのクッパー細胞で Spi-C の発現が増加することと矛盾しない結果が得られた（図 3）［3］。

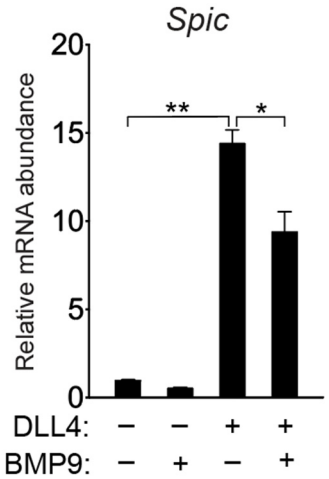


図 3.　Cas9-ER-Hoxb8 マクロファージにおける転写因子 Spi-C の発現誘導
Cas9-ER-Hoxb8 細胞における *Spic* 発現に対する DLL4、BMP9 刺激の効果。4 群間の定には、一元配置分散分析および Bonferroni 多重解析を用いた。結果は平均値±標準誤差で示した。*p＜0.05、**p＜0.01。

考　察

骨髄由来マクロファージにおいて、低濃度 LPS 刺激は Notch リガンド DLL4 による転写因子 LXR α の発現誘導効果を増強することが明らかとなった。肝類洞において腸管由来 LPS がクッパー細胞の分化・機能維持に必要な環境シグナルの一つとして機能している可能性がある。また、NASH の類洞内皮細胞において増加する Notch リガンドである JAG1 は、DLL4 と比較してクッパー細胞の系統決定的転写因子の発現誘導効果が弱かった。JAG1 には DLL4 に拮抗する作用が報告されていることからも、JAG1 の増加がクッパー細胞の NASH 依存性の変化に寄与している可能性がある。さらに、DLL4 によるクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導は、ヒト CD14 陽性単球由来マクロファージにおいても確認された。ヒトの肝臓マクロファージにおける疾患依存性の変化を *in vitro* で解析するツールとして有用と考えられる。Cas9-ER-Hoxb8 細胞においても、DLL4 によるクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導を確認できており、今後、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いてクッパー細胞分化機構の解析を進めていく。

謝　辞

本研究に助成のご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より御礼申し上げます。

文　献

1) Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, Stender JD, Chun HB, Garner H, Geissmann F, Glass CK. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. Cell. 2014 Dec 4;159(6):1327-40. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.023. PMID: 25480297.

2) Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, Jung S, Amit I. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. Cell. 2014 Dec 4;159(6):1312-26. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.018. PMID: 25480296.

3) Sakai M, Troutman TD, Seidman JS, Ouyang Z, Spann NJ, Abe Y, Ego KM, Bruni CM, Deng Z, Schlachetzki JCM, Nott A, Bennett H, Chang J, Vu BT, Pasillas MP, Link VM, Texari L, Heinz S, Thompson BM, McDonald JG, Geissmann F, Glass CK. Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity. Immunity. 2019 Oct 15;51(4):655-670.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2019.09.002. Epub 2019 Oct 3. PMID: 31587991.

4) Xiong X, Kuang H, Ansari S, Liu T, Gong J, Wang S, Zhao XY, Ji Y, Li C, Guo L, Zhou L, Chen Z, Leon-Mimila P, Chung MT, Kurabayashi K, Opp J, Campos-Pérez F, Villamil-Ramírez H, Canizales-Quinteros S, Lyons R, Lumeng CN, Zhou B, Qi L, Huertas-Vazquez A, Lusis AJ, Xu XZS, Li S, Yu Y, Li JZ, Lin JD. Landscape of Intercellular Crosstalk in Healthy and NASH Liver Revealed by Single-Cell Secretome Gene Analysis. Mol Cell. 2019 Aug 8;75(3):644-660.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.028. PMID: 31398325.

5) Wang GG, Calvo KR, Pasillas MP, Sykes DB, Häcker H, Kamps MP. Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. Nat Methods. 2006 Apr;3(4):287-93. doi: 10.1038/nmeth865. PMID: 16554834.