# 研究助成業績報告集

第 31 回 (2023 年度) バイエル循環器病研究助成 『動脈硬化と炎症・免疫メカニズム』

公益財団法人 循環器病研究振興財団

# \* 目 次 \*

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	動脈硬化性疾患における血管炎症・免疫制御メカニズムの解明	安達 裕助	1
2	シングルセルオミックス解析で挑む、動脈硬化性疾患免疫メカ ニズムの解明	江本 拓央	3
3	心血管システムにおける体細胞モザイクの解析とその臨床的意 義に関する研究	佐野 宗一	7
4	クローン性造血が大動脈瘤を進展させる機序の解明	由良 義充	17

## 動脈硬化性疾患における 血管炎症・免疫制御メカニズムの解明

東京大学医学部附属病院 循環器内科·特任研究員 安達 裕助

## I. 緒 言

心筋梗塞や脳卒中、大動脈疾患(瘤・解離)等の動脈 硬化性疾患による死亡者数は、日本人の死因でがんに 比肩する高い割合を占めており、動脈硬化性疾患の克 服を目指した動脈硬化の病態メカニズムの解明が不 可欠である 1.2。急性大動脈解離は、動脈硬化性疾患 の中でも死亡率と健康寿命にとりわけ大きな影響を 与える重大な疾患である。申請者らは、動脈硬化性疾 患の中でも特に急性大動脈解離に着目し、その炎症・ 免疫制御メカニズムの解明および新規診断モダリティの開発に挑んでいる。

## Ⅱ. 対象・方法

まず基本となる基礎的知見を得るために、動物実験と大動脈解離患者の剖検検体による検討を行った。マウスの大動脈解離モデルは、野生型マウス(C57BL/6J)にアンジオテンシン II、 $\beta$ -アミノプロピオニトリルを浸透圧ポンプで投与することにより誘発した3。ヒト剖検標本を用いて大動脈解離患者の血管周囲組織での炎症細胞集積を評価した。さらに、急性大動脈解離患者の非造影 CT 画像を用いて、血管炎症を非侵襲的に検知する機械学習プログラムを構築した。

## 皿. 結果

大動脈解離マウスモデルを用いた解析により、大動脈解離では血管周囲組織において炎症細胞(CD45+CD11b+F4/80+マクロファージ、特に CD11c+CD206-炎症性マクロファージ)の集積を認めることを血管周囲脂肪の間質血管細胞群(SVF)を用いたFACSによって確認した(図 1)。

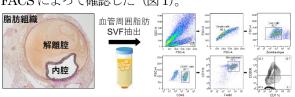


図1 大動脈解離モデルの作製と免疫細胞動態の把握

またヒト大動脈解離患者の病理組織標本を用いて、解離した血管周囲組織では誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 陽性炎症性マクロファージの集積を豊富に認めることを確認した (図 2)。

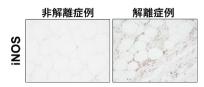


図2 ヒト大動脈解離における血管周囲炎症性マクロファージ集積 非造影 CT から大動脈を自動認識し、血管炎症を可 視化することに成功した。解離例では非解離例と比較 して、血管炎症のサロゲートマーカーとして知られて いる血管周囲脂肪減衰指数(FAI)値 ゆが有意に上昇し ており、急性大動脈解離診断に有用なマーカーとして 機能することが分かった(図 3)。





大動脈自動認識

血管炎症の可視化

図3 非造影 CT による大動脈の自動認識と血管炎症の可視化

## Ⅳ. 考察

急性大動脈解離における大動脈周囲脂肪組織の病態生理学的意義はこれまで十分に分かっていなかった。申請者らは、大動脈解離で血管周囲組織に著名な炎症が起きていることをマウスモデルに加えて、ヒト病理検体を用いて初めて示すことができた。また、大動脈解離で血管周囲の炎症マーカーである FAI が上昇することを、非造影 CT 画像から検出することができた。

## Ⅴ. 結 論

申請者らは、マウスモデルおよびヒト臨床サンプルを用いて、大動脈解離における血管周囲組織の炎症・

免疫動態に迫る基礎・臨床研究を展開している。大動脈周囲炎症をこれまで非侵襲的に捉える方法は乏しかったが、FAI は非造影 CT から算出できる非侵襲的な指標であり、造影剤を必要としない新たなバイオマーカーとして機能する可能性が考えられる。

## VI. 研究協力者

小室一成・東京大学循環器内科・教授 上田和孝・東京大学循環器内科・助教 瀧本英樹・東京大学循環器内科・講師

## Ⅷ. 参考文献

- Adachi Y, Ueda K, Takimoto E. Perivascular adipose tissue in vascular pathologies-a novel therapeutic target for atherosclerotic disease? Front Cardiovasc Med. 2023;10:1151717.
- 2) Adachi Y, Ueda K, Nomura S, et al. Beiging of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling. *Nat Commun.* 2022;13(1):5117.
- Hirakata S, Aoki H, Ohno-Urabe S, et al. Genetic deletion of Socs3 in smooth muscle cells ameliorates aortic dissection in mice. JACC Basic Transl Sci. 2020; 5, 126–144.
- Antonopoulos AS, Sanna F, Sabharwal N, et al. Detecting human coronary inflammation by imaging perivascular fat. *Sci Transl Med.* 2017; 9, eaal 2658.

## シングルセルオミックス解析で挑む、 動脈硬化性疾患免疫メカニズムの解明

神戸大学大学院医学研究科 内科学講座循環器内科学分野 医学研究員 江 本 拓 央

## I. 緒 言

動脈硬化性疾患の予防、治療について、この数十年に 大きく進歩したが、依然として死因として大きな割合 を占めていると同時に、健康寿命を縮める原因となっ ている。現在、動脈硬化性疾患、特に腹部大動脈瘤、 大動脈弁狭窄症について、腹部大動脈瘤には無症状で 発見されるが、手術適応の大きさまで有効な進展予防 法が存在しない。大動脈弁狭窄症については、高齢化 社会の患者数が激増し、経カテーテル的大動脈弁植え 込み術の適応が広がっているものの、薬物治療法が存 在しないという問題点が存在する。

動脈硬化は、免疫が大きく関わる慢性炎症性疾患であることが様々な研究で証明されてきたが、ヒトの病変部での解析を行うことが困難であった。しかし、近年病変部のシングルセル RNA シークエンス (scRNAseq)を行うことで、詳細に1細胞レベルでその組織の構成細胞を観察することが可能になった。申請者は以前冠動脈疾患において、慢性冠症候群患者 (安定狭心症) と急性疾患群患者 (不安定狭心症、心筋梗塞) の冠動脈粥腫切除術で切除したプラークをシングルセル RNA シークエンス比較解析を行い、マクロファージの subcluster の違いを捉えることに成功している。(参考文献1)

冠動脈プラークのシングルセル解析を行うと、 単球、樹状細胞、肥満細胞、TNF+ $M\phi$ 、C1Q+TREM2+fibrotic  $M\phi$ 、CXCL3+IL1B+ inflammatory  $M\phi$  に分けられた。IL1B を強く発現するのは、単球とinflammatory  $M\phi$  であり、いずれも急性冠症候群でのみ認めるものであったことから、IL1B 抗体の投与が心筋梗塞発症患者の 2 次予防に有効であったとする CANTOS trial (参考文献 2) をサポートする結果であった。また、骨髄の幹細胞に起こる体細胞遺伝子変異によるクローン性造血 (clonal hematopoiesis

with indeterminate potential, CHIP)の関与が動脈硬化性疾患について報告されている。しかし、免疫細胞に生じる体細胞遺伝子変異がトランスクリプトームやタンパクレベルで与える影響について未だ分かっていないことが多い。

本研究は、腹部大動脈瘤、大動脈弁狭窄症について 病変部のシングルセル解析を行い、その特徴を捉える と同時に、オミックス統合解析を行うことで、ゲノム 解析から疾患のリスク層別化を行い、さらに、疾患モ デルマウスを用いて発症メカニズムを解明し、リスク 層別化に基づいた治療法を探索することを目的とす る。

#### Ⅱ.対象・方法

## 1、腹部大動脈瘤

ヒトの腹部大動脈瘤で人工血管置換術適応となった患者について、瘤中心部とその中枢側で断端に近い組織を採取し、コラゲナーゼ処理、FACS ソーティングで CD45 陽性細胞を回収し、10X Chromium にてシングルセル化し、解析を行った。1、瘤中心部(5例)2、瘤中枢側断端部(3例)3、健常大動脈(公開データ3例)で比較検討した。また、空間的な位置情報を得るために、AKOYA phenocycler システムを用いて多重免疫染色を行った。

## 2、大動脈弁狭窄症

大動脈弁狭窄症弁置換術の適応となった、ヒト大動脈 弁狭窄症患者(AS)の大動脈弁 9 例とコントロール として大動脈弁閉鎖不全症(AR)の大動脈弁 4 例を 組織学的に比較、その後シングルセル RNA シークエ ンス比較解析を行った。

## Ⅲ. 結 果

## 1、腹部大動脈瘤

全体の細胞の UMAP を描き、annotation を行うと コントロールにおいてはほとんど認めなかった B 細胞が大動脈瘤断端部、中心部ともに著明に増加していることが分かった(図1)。

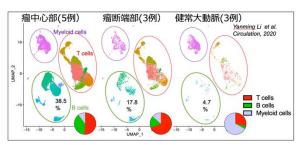


図1 ヒト大動脈瘤における、瘤中心部、瘤断端部、健常大動脈で シングルセル比較を行った。B細胞が大動脈瘤に集積している。

空間的な位置情報を得るために、AKOYA phenocycler システムを用いて多重免疫染色を行ったところ、CD68 陽性の単球マクロファージは内膜側に集積し、CD20 陽性 B 細胞や CD4、CD8 陽性 T 細胞は外膜側に集積していることが分かった。また B 細胞、 T 細胞は組織に局在するリンパ状の構造物、 Tertiary lymphoid structures (TLS)を形成していると考えられた(図 2)。

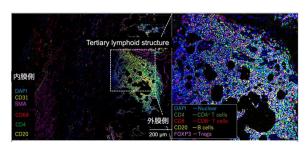


図2 ヒト大動脈瘤組織におけるAKOYA phenocycler 多重免疫染色 外膜側における、Tertiary lymphoid structure の形成。

これは現在報告のない新しい発見であり、多重染色を行えることで初めて明らかになったと考える。また、同じ scRNAseq を行い CD4+T 細胞の集団で UMAP を描いたところ、CD200 をマーカーとする Peripheral helper T 細胞(Tph 細胞)が出現していることが分かった。Tph は CXCL13 を発現しており、特に CXCL13 は B 細胞を呼び寄せるケモカインとして有名であり、B 細胞を呼び寄せることで、Tph を形成すると考えられる(図 3)。

B 細胞の大動脈瘤へ与える意義を証明するために 特異的に B 細胞を depletion する抗 CD20 抗体 (リ ツキシマブ) を投与する計画にしている。

腹部大動脈瘤のモデルマウスについては、Apoe-/-

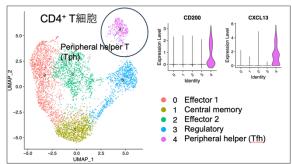


図3 図2と同一検体のCD4T細胞のシングルセル解析 Peripheral helper T細胞が集積している。

マウスに Western diet を8週間投与した後 アンギオテンシンⅡを 4 週間持続で infusion するモ デル (参考文献3)を使用している。以前の報告にて、 一報抗 CD20 抗体が有効であったことが報告されて いる(参考文献4)が、詳しいメカニズムが解明され ておらず、外膜側のB細胞やTLSの評価が行われて いない。大動脈の FACS、免疫染色、シングルセル解 析でB細胞やTLSの存在はヒトサンプルほど明らか な集積はないが確認している。そこで、もし抗CD20 抗体に大動脈瘤抑制効果を確認し、シングルセル RNAseq を用いてそのメカニズムを解明する段階で ある。また同時にヒトサンプルで、TLS の集積が何に 反応して生じているのかという疑問があり、シングル セルレパトア解析を実施し、その clonal expansion を 評価すると同時にレパトア配列から抗原を推定する 手法を試している。

## 2、大動脈弁狭窄症

AS と AR の代表的な手術サンプルの写真を見るとその厚さや層構造に大きな違いが見られ、組織学的な解析においては、AS において石灰化の周囲にはCD68 陽性のマクロファージの集積を認めた。一方、AR の大動脈弁サンプルでは、CD68 陽性のマクロファージがまばらに認められ、その分布に大きな違いが認められた(図 4)。

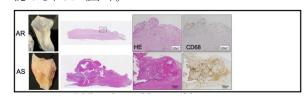
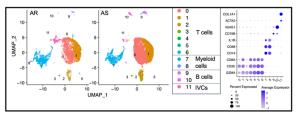


図4 大動脈弁閉鎖不全症(AR)と大動脈弁狭窄症(AS)の外観の違い HE、CD68 染色。

免疫細胞の比率が低いことが考えられたので、、CD45 陽性の免疫細胞をソーティングし、シングルセル解析 を行い UMAP を描くと、一番多く認められたのは T 細胞で、その次に Myeloid 細胞がくるという順番であった。 T 細胞が一番大きな細胞集団であるというのは、冠動脈プラークでも共通した所見であり、マウスの動脈硬化性病変とは異なっている。 B 細胞は小さな



細胞集団であった(図5)。

図5 シングルセル解析。全体。

Myeloid 細胞をさらに解像度を上げて UMAP を描くと、マクロファージの細胞集団は My.0 LYVE1 resident macs、My.1 Inflammatory macs、My.2 C1Q resident like macs、My.3 TREM2 macs、 My.4 Clasical monocytes、My.5 DCs、My.6 MregDCs と 7 つの細胞集団に分けることができた。興味深いことに AS では、My.0 LYVE1 resident macs が減少し、逆に My.2 C1Q resident like macs、My.4 Clasical monocytes が増加するという特徴を得ることができた。Monocyte の浸潤は急性冠症候群でも認めた所見であり、動脈硬化性疾患の病態に深く関わっていると考える(図 6)。

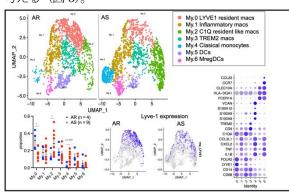


図6 シングルセル解析。Myeloid細胞。

My.0 LYVE1 resident macs の減少は特徴的であり、GO解析では、Cargo receptor activity や Scavenger receptor activity が集積しており、個別の遺伝子発現では、COLEC12、MRC1、DAB2 の発現が特徴であることが証明された。この resident macrophage が減少することは Scavenger 作用の減弱が病態に関わっていることが示唆される所見であった。さらには、ARと ASで My.1 Inflammatory macs 同士の遺伝子発現を網羅的に比較した場合、AS において IL1B の発現が上昇していることがあり、より炎症が強いことが示

唆された (図7)。

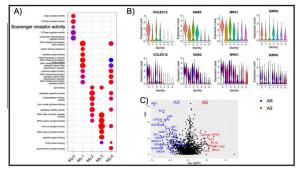


図 7 Myeloid 細胞の機能比較。A) Gene ontology (GO) 解析。B) それぞれの細胞集団における遺伝子発現。C) Inflammatory マクロファージにおける遺伝子発現の比較。AS vs AR

ヒトサンプルのシングルセル解析からは現象の因 果関係や、薬物介入の有効性などの評価ができない。 現在、大動脈弁狭窄症モデルについては、いいモデル がなかなかない現状があるが、山形大学が開発した wire injury モデル(参考文献 5)を用いて、炎症や、 マクロファージの貪食機能にフォーカスを当てて現 在介入実験を行っている。

## Ⅳ. 考察

#### 1、腹部大動脈瘤

B 細胞の集積は他の動脈硬化性疾患では認められない所見であり、大動脈瘤に特徴的なものである。今回の結果から、TLSの形成については明らかになった。しかし、その意義については全く分かっておらず、今後のマウスにおけるメカニズムの研究結果が待たれる。また、腹部大動脈瘤における CHIP の関与についてもまだ分かっていないことが多く、現在その関係を1細胞レベルで解析している。

#### 2、大動脈弁狭窄症

シングルセル RNA 解析から、AS 症例では AR 症例と比べ、スカベンジャー機能を有するレジデントマクロファージの割合が減少する一方、単球が多く浸潤していることが分かった。病理学的所見からは、AS 症例の石灰化周囲にマクロファージの集積が見られ、マクロファージ機能への介入は、大動脈弁狭窄症に対する今後の新たな治療ターゲットになりうる。大動脈弁狭窄症モデルへの介入によってより詳細なメカニズムを解明していきたい。

#### Ⅴ. 結 論

シングルセル解析でヒトの手術サンプルから1細胞レベルでの現象を捉えることに成功した。今後はこの

結果を用いて治療介入方法をマウスの研究で明らかにしていきたいと考えている。CHIPを含めたリスク層別化を行なった上で、各々の患者にあった個別化医療の展開へと結びつけることが目標となる。

## VI. 研究協力者

岡田健次・神戸大学医学部心臓血管外科・教授

高橋宏明・神戸大学医学部心臓血管外科・准教授

山中勝弘・神戸大学医学部心臓血管外科・講師

井上大志・神戸大学医学部心臓血管外科・特定助教

長命俊也・神戸大学医学部心臓血管外科・特定助教

平田健一·神戸大学医学部循環器内科·教授

山下智也・神戸大学イノベーション研究科・教授

佐々木直人・神戸薬科大学医療薬学研究室・准教授

## Ⅷ. 参考文献

- Emoto T, Yamamoto H, Yamashita T et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Distinct Immune Landscape of Myeloid Cells in Coronary Culprit Plaques Causing Acute Coronary Syndrome. Circulation. 2022.145:1434-1436.
- Ridker P, Everett B, Thuren T et al.
   Antiinflammatory Therapy with Canakinumab
   for Atherosclerotic Disease. N Engl J Med. 2017.
   377:1119-1131
- 3) Shinohara R, Nakashima H, and Emoto T et al. Gut Microbiota Influence the Development of Abdominal Aortic Aneurysm by Suppressing Macrophage Accumulation in Mice. *Hypertension*. 2022, 79:2821-2829.
- 4) Schaheen B, Downs E, and Serbulea V et al. B-Cell Depletion Promotes Aortic Infiltration of Immunosuppressive Cells and Is Protective of Experimental Aortic Aneurys. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016. 36:2191-2202
- Honda S, Miyamoto T, and Watanabe T et al. A Novel Mouse Model of Aortic Valve Stenosis Induced by Direct Wire Injury. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34:270-278.

## 心血管システムにおける体細胞モザイクの解析と その臨床的意義に関する研究

―動脈硬化病変における体細胞モザイク―

国立循環器病研究センター・独立型研究室長 佐野宗一

## I. 緒 言

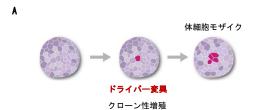
心疾患は日本の死因の第二位である¹。既知の危険因子に対する薬物治療や患者教育が普及している今日においても、心疾患の患者数は増加し続けており、新たな危険因子の同定とそれに対する介入が求められている。そこで、本研究では、動脈硬化病変の体細胞モザイクに関する研究開発を提案した。

体細胞モザイクは、臓器や組織において正常細胞が変異細胞に置き換わってゆく現象のことであり、疾患や形質との関連が注目されている(図 1A)。近年のシーケンシングテクノロジーの発展を背景に、人体のあらゆるパーツの体細胞モザイクが記載されており、そのリストには心血管の体細胞モザイクも含まれる<sup>2</sup>(図 1B)。

研究代表者はかねてより、動脈硬化病変の体細胞モザイクが病態形成の重要なプレイヤーであるという仮説を提唱してきた3。それを受けていくつかの研究グループから、動脈硬化病変のシーケンシングデータが報告され始めている45。しかし、体細胞モザイク形成に必須のドライバー変異(図1A)や体細胞モザイク化した病変の予後については未だ明らかではないというのが現状である。

本研究では、動脈硬化病変の体細胞モザイクの臨床的 意義を明らかにすることを目的としている。私たちの 仮説は「動脈硬化病変の体細胞モザイク化は、病変の 進展や不安定化に寄与する」である (図 2)。報告者ら は特に、病変の平滑筋細胞の体細胞モザイクに注目している (以下)。より大局的には、本研究開発によってこれまでとは全く別の角度から動脈硬化症の新たな治療標的を探索し、将来の治療薬創出につなげることを目指している。

また、これに加えて、動脈硬化病変、とくに病変の平滑筋細胞の体細胞モザイクの解析を優先する科学的



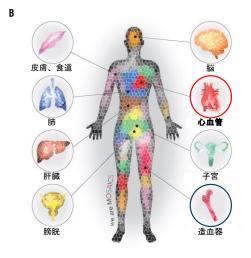


図1. 人体は加齢と共に体細胞モザイクを呈する。 ドライバー変異した細胞が、適応優位性を獲得し増殖することで、体細胞モザイクが形成される。血液のモザイク(クローン性造血)は心血管疾患を促進する。心血管システムのモザイクについては研究が遅れている。

#### 根拠は以下の通りである3。

- ヒト、マウスの動脈硬化病変が体細胞モザイク化 していることが生化学的、遺伝子工学的手法によ り示されている 68。また、体細胞モザイク化の一 因が平滑筋細胞にあることが示唆されている。平 滑筋細胞は病変の進展や不安定化への寄与が大 きい細胞であり、体細胞変異という視点からその 機能を検証する意義が大きい。
- 病変を形成するその他の細胞(白血球、血管内皮

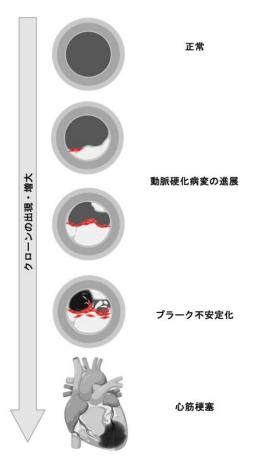


図 2. 内膜平滑筋細胞のモザイクは動脈硬化の進展やプラークの不安定化に関わる。

動脈硬化の進展とともに中膜平滑筋細胞が内膜に遊走し、病 変の進展や不安定化に寄与する。研究代表者は、ドライバー 変異した平滑筋クローン(赤色)の増大と機能変化が病変の 転機に関わっているのではないかと考えている。

細胞)の関与も当然考えられる。実際、白血球の体細胞モザイク化(クローン性造血)については研究代表者らがすでに研究を進めてきた。血管内皮細胞の体細胞モザイク化については、先行研究がなく情報に乏しいため、本研究に関しては平滑筋細胞にまずは主眼を置くこととした。

正常な動脈は体細胞モザイク化していないことが明らかになっている6。

本研究開発は、世界で初めて動脈硬化病変の体細胞モザイクを遺伝子レベルで解析し、動物実験や臨床検体の解析によりその臨床的意義を検証するものである。

心血管システムの体細胞モザイクに関しては、1973年にはEP Benditt らの生化学的実験により、動脈硬化病変が体細胞モザイク化していることが観察されていたが、その後の研究は国内外において進んでいない(Proc Natl Acad Sci USA. 1973)。本研究は、EP Benditt らの研究に基づき、動脈硬化病変の体細胞モ

ザイクに対して新しい視点からアプローチし、動脈硬 化の新たな病態解明を目指している。

また、本研究は、世界で初めて動脈硬化病変の体細胞 モザイクを遺伝子レベルで解析し、動物実験や臨床検 体の解析によりその臨床的意義を検証するものであ る。

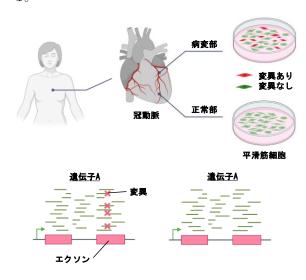


図 3. 同一人物の冠動脈正常部・病変部から単離培養した平滑 筋細胞の全ゲノム解析

両者を比較することで、病変部の平滑筋細胞にだけ存在する変 異(体細胞変異)を同定することができる。

#### Ⅱ. 対象・方法

# 1. 同一個体からサンプリングした冠動脈の正常部 と病変部の比較

同一個体に由来する正常部の血管平滑筋細胞と病変部の血管平滑筋細胞を全ゲノム解析し、それぞれを遺伝子レベルで比較することで、病変部にのみ存在する遺伝子 A の変異を同定する(図 3)。

サンプル間で、その他のバックグラウンド (SNP や変異原への暴露) が同一であるため、本法で同定される体細胞変異は信頼性がきわめて高いと考えられる。

## 2. ヒト冠動脈平滑筋細胞における遺伝子 A の機能 解析

方法 1 で同定した遺伝子 A の変異が血管平滑筋細胞 へ及ぼす影響を検討するため、ヒト冠動脈平滑筋細胞 ( HCASMC, human coronary artery smooth muscle cells:初代培養細胞)を用いた *In vitro* の解析を行う。遺伝子 A をノックアウト (あるいは過剰発現)した HCASMC を樹立し、その表現型を解析する。

## 3. 遺伝子A改変マウスを用いた病態解明研究

血管平滑筋細胞の遺伝子 A の変異が、そもそも動脈 硬化症の進展に寄与するのか、またそのメカニズムは 如何なるものか、を *In vivo* の実験系にて解析する。

## 4. 血管平滑筋細胞特的遺伝子 A ノックアウトマウスの表現型解析

タモキシフェン誘導性血管平滑筋特異的遺伝子 A ノック ア ウトマウス (Myh11CreERTGene A floxfloxROSAtdTomatoApoer\*) とコントロールマウス (Myh11+Gene A floxfloxROSAtdTomatoApoer\*) に食餌性高コレステロール血症を誘導し、遺伝子 A 欠損平滑筋細胞の増殖優位性(モザイクの形成)、及び動脈硬化病変への寄与を組織学的に評価する。

タモキシフェンの腹腔内投与により、平滑筋細胞特異的に遺伝子 A 欠損と tdTomato 発現を誘導する。投与2週間後に高脂肪食を開始し、その0、8、16週間後に愛護的に屠殺する。タモキシフェンの投与量を調整することで、変異細胞量をコントロールすることが可能である。以下の2通りの実験を計画している。

- 低容量タモキシフェン: ごく少数の平滑筋細胞に のみ Cre を発現させるシステム。遺伝子 A 欠損 細胞 (tdTomato+) の *In vivo* での増殖優位性を 組織学的に評価する。
- 高容量タモキシフェン:多数の平滑筋細胞に Cre を発現させるシステム。動脈硬化巣のサイズ (Oil Red O 染色)・壊死コアの面積 (HE 染色)、線維 性被膜の厚さ (Masson Trichrome 染色) などを 組織理学的に評価する。

#### 遺伝子発現解析

In vivoでの遺伝子 A 欠損平滑筋細胞の機能を明らかにするために、シングルセル RNA シーケンシング (scRNA-seq, single cell RNA sequencing) による単一細胞レベルでの網羅的な遺伝子発現解析を行い、その結果を多角的に検証する。また、本項目のマウスでの知見と方法 2 のヒト冠動脈平滑筋細胞での知見を突合し整合性を検証する。

高脂肪食負荷後のクアドラブルおよびコントロールのマウスから大動脈を採取後、酵素処理により単細胞に分散する。 フローサイトメーターを用いてtdTomato+平滑筋細胞を単離し、死細胞除去後、ドロップレットベースのシングルセル解析に進む。scRNA-seqには研究開発代表者がこれまでに使用してきたプロトコールを使用する(Sano Set al. Science. 2022)。

- ■シングルセル RNA シーケンシングのプロトコール
- ライブラリー作成: Chromium Single Cell v3.1 3' Reagent Kit (10x Genomics)
- シーケンス反応: P2 2x100 Sequencing Kit (Illumina)
- ・シーケンサー: NextSeq 2000 Sequencer (Illumina)
- ・パイプライン: Seurat v4.0.4、SCENIC v1.2.4、 PHATE v1.0.7 R package

scRNA-seq の解析データは組織染色法、定量的逆転写 PCR 法(RTPCR)による裏付けを行う。また、細胞の遊走能や泡沫細胞化など Ex vivoでの実験も活用し、多角的に遺伝子 A 欠損平滑筋細胞の機能を解析する。さらに、一連の実験により治療標的となりうるメカニズム(変異による炎症反応の亢進など)を同定できた場合、 Myh11CreERT Gene A floxflox ROS Atd Tomato Apoe マウスに阻害剤や中和抗体を投与することでその表現型が改善するか検証する。

# 5. 動脈硬化病変の mutational landscape の解明 (申請時の項目を以下に示す。)

多施設共同研究により動脈硬化病変における平滑筋 細胞の遺伝子 A の体細胞変異およびその他の mutational landscape を解明する。解析は各研究室で行うが、得られたデータの結合をスムーズに行うために、検体の保存方法、ライブラリー作成とシーケンス反応の試薬、シーケンサーの機種、データ解析のためのパイプライン、などは施設間で同一のプロトコールを共有する。

## ■臨床試験計画骨子

<基本デザイン>

観察研究

<対象>

・登録基準: 中等度ないし高度(狭窄度 50% 以上)の頸動脈狭窄病変に対し頸動脈内膜剥離術 (carotid endarterectomy, CEA) を施行した症例の 手術検体。症候性、無症候性は問わない。

大阪公立大学での解析 --- 同大学脳神経外科学、彦根 市立病院脳神経外科より検体を入手する。

慶應義塾大学での解析 --- 同大学脳神経外科学より検体を入手する。

※検体の入手先については今後、増加する可能性が高い。

- ・除外基準:なし。抗がん剤や放射線による治療歴がある症例を除外しない。
- ・目標検体数:100~150 検体(300~450 ゲノム)
- ・検体の保存: FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋)

血液検体(-20℃にて保存)

●サンプルサイズの積み上げに関して:

本研究項目の目的は、動脈硬化病変の変異パターンを 詳かにするために可能な範囲で多くの臨床検体を解析することであるため、申請時には目標サンプル数を 設定しなかった。

#### <実施期間>

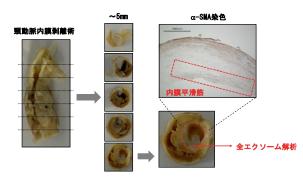
2021 年 12 月~2026 年 3 月までに手術を行った症例 の検体を解析する。

## <解析方法>

全エクソーム解析

#### ■手術検体の処理

ホルマリン固定した筒状の手術検体を5mm 幅で輪切りにし、個別にパラフィン包埋する。パラフィン切片を一枚作製し、平滑筋細胞マーカーである $\alpha$ -SMAを染色する。 $\alpha$ -SMA の染色領域を参考に、対応するパラフィンブロック内の残検体から内膜平滑筋層と考えられる部分を目視にて切り出す( $\mathbf{Z}$ 4)。検体の全長が1.5cm の場合、3 個(1.5cm  $\div 0.5$ cm = 3)に分割された検体をそれぞれ解析する。



#### 図4.手術検体の処理

検体を 5mm 幅ごとの輪切りにし、パラフィン包埋する。α-SMA 染色像を参照し、内膜平滑筋細胞が豊富に含まれる部分を目視 にて切り出す。

## ■データ解析に関して

シーケンスデータの QC およびトリミングには以下の基準を適用する。

1. アダプターコンタミネーション(アダプターシーケンスとの 10 塩基以上の一致、10%以下のミスマッチのみ許容)を検出した場合、paired reads とも除去する。

- 2. 塩基の10%以上が不確かである場合、paired reads とも除去する。
- 3. 塩基の 50%以上が低品質 (Phred quality<5) の場合、paired reads とも除去する。

Burrows Wheeler Aligner (BWA) 、Samtools 、Sambamba ソフトウェアによるリファレンスゲノム へのマッピング、ソーティング、PCR duplicates の 除去を経て最終的な BAM ファイルを生成する。バリアントの検出には Mutect2 joint-calling による同一 患者の手術検体と血液検体の一括解析を行う(図5)。

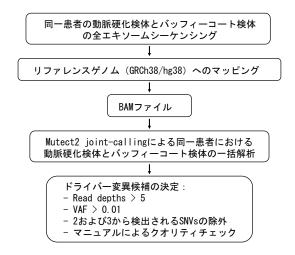


図5. ドライバー変異候補の決定までのフローチャート

アノテーションにはANNOVAR ソフトウェアを用いるが、バリアントの選定にはdbSNP、1000 Genome、esp6500、GnomAD、CADD、HGMD、COSMIC などのデータベースも利用する。とくに、報告者らはアミノ酸変化を伴う変異に関心があるため、Consensus CDS、RefSeq、Ensemble、UCSC などのトランスクリプトデータベースも活用する。

なお、偽陽性を減らすため supportive reads>5 であることも条件に加える。

#### Ⅲ. 結果

1. 同一個体からサンプリングした冠動脈の正常部 と病変部の比較による遺伝子 A の機能喪失型変 異の同定

白人女性 (57歳、高血圧症) からサンプリングした冠動脈の正常部 (N: normal) と病変部 (P: plaque) のそれぞれから単離した平滑筋細胞 (SMC: smooth muscle cells) を全ゲノム解析を実施し、その結果から、病変部の平滑筋細胞にのみ存在する遺伝子 A の機能喪失型変異を同定した。なお、サンプルへの血管

内皮細胞や白血球のコンタミネーションの可能性は フローサイトメトリー、リアルタイム PCR により否 定した。

SMC-N と SMC-P を Human SMC Growth Medium (Cell Applications, Cat# 311-500) 下で培養した後、ゲノム DNA を抽出し全ゲノム解析した。全ゲノム解析のプロトコールの概要は以下の通りである。

## ■全ゲノム解析

ゲノム DNA: SMC, 200ng

ライブラリー作製: NEB Next® UltraTM DNA Library Prep Kit

シーケンス反応: Novaseq 6000 S4 Reagent Kit (Paired-end, 150bp)

解析装置: Novaseq 6000 PE150

クオリティコントロール: アダプターシーケンスの除去、Phred quality によるリードの選定など リファレンスゲノムとマッピング方法: GRCh38, Burrows Wheeler Aligner (BWA)

シーケンシングの Average depth は 30x (N)、39x (P) であった。解析の結果、病変部の平滑筋細胞にのみ存在する遺伝子 A の変異 (p.Xnnfs, 28bp ins, VAF=N) を同定した。遺伝子 A の変異は最も確からしいドライバー変異での一つであると考えている。

また、SMC-N と SMC-P が確かに同一個体に由来する (サンプルの取り違えがない) ことを Conpair ソフトウェア (Bergmann EA, *Bioinformatics*. 2016) を用いて確認した。

#### リシーケンシングによるバリアントの確認

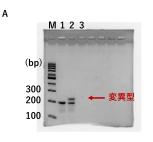
同定したバリアントを Sanger シーケンシングにより 確認した。

アッセイの性質上、この 28 塩基挿入型遺伝子 A は高い確率で生殖細胞変異ではなく体細胞変異であると言える。

さらに正常部 (N) と病変部 (P) の平滑筋細胞を 90:10 の割合で共培養したところ、継代を重ねるごとに後者由来の変異型シグナルが増強していく様子が観察され、本患者における病変部の平滑筋細胞の競合優位性が示された (図 6B)。

注:この時点では病変部の平滑筋細胞の競合優位性が 遺伝子Aの変異によるものかは不明であり、結果2で の検討事項とした。

## 2. ヒト冠動脈平滑筋細胞における遺伝子 A の機能 解析



M: マーカー 1: 正常部(N) 2: 病変部(P) 3: 水

M N 0 1 2 3 4 5 6 7 P M

## 図 6. 変異型遺伝子 A の確認

В

A Genotyping PCR 産物のアガロースゲル電気泳動。野生型=193bp、変異型=221bp。

B. 正常部と病変部の平滑筋細胞の共培養。継代毎に A の genotyping PCR を施行した。病変部の平滑筋細胞は競合優位性 があることが分かる。

結果 1 で同定した遺伝子 A の欠損が血管平滑筋細胞へ及ぼす影響を検討するため、ヒト冠動脈平滑筋細胞(HCASMC、human coronary artery smooth muscle cells:初代培養細胞)を用いた *In vitro* の解析を行うこととした。遺伝子を A ノックアウトしたHCASMC を樹立した。

#### 遺伝子Aノックアウト冠動脈平滑筋細胞の樹立

CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術により遺伝子 A ノックアウト HCASMC (Gene A-KO-HCASMC) を樹立した。具体的には、レンチウイルスによって細胞にCas9/gRNA を送達し遺伝子編集する手法を習熟しており、本項目でもその系を用いた(Sano S et al. Circ Res. 2018; Sano S et al. Science. 2023)。レンチウイルスベクターには pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP(Addgene, Cat#57823)を使用した。レンチウイルスベクターに gRNA 配列をクローニングし、psPAX2

(Addgene, Cat#12260)、pMD2.G (Addgene, Cat#12259) とともに HEK293T 細胞にトランスフェクトすることでレンチウイルスを作製し、精製した。 HCASMC にレンチウイルスを感染させ、tRFP 陽性細胞をソーティングすることで細胞の樹立を完了した。

樹立した Gene A-KO-HCASMC は、親株(野生型細胞、wild type (Wt)-HCASMC)とその他の遺伝的背景が同一(isogenic)であるため、遺伝子A ノックアウトの効果だけを検討できるという利点がある。また、CRISPR/Cas9 システムによるオフ・ターゲット効果の可能性を除外するために異なる gRNA を用いて複数のクローンを作製した。

gRNA のクローニングに用いる配列は以下の通りである。コントロールである Wth CASMC の樹立にはゲノムを切断しない gRNA (Non-targeting) を送達した。

#### Gene A-1:

5'-CACCGGCAGCGCGGCTATCGTGGC-3' ソーティング前の細胞の TIDE (Tracking of Indel by DEcomposition) の結果を**図7**に示す。

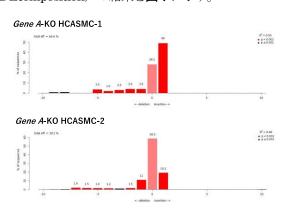


図7. 遺伝子 A 編集ヒト冠動脈平滑筋細胞の TIDE 解析結果 TIDE 解析はゲノム編集技術を用いた後に生じる挿入や欠失 (インデル) を特定し、分析するためのツールである。いずれの gRNA が効率良く機能していることが分かる。

gRNA-GeneA-1 を用いて樹立した GeneA -KO-HCASMC (tRFP) および WT-HCASMC (GFP) を 10:90 の割合で混合して培養・継代を繰り返したところ、前者の割合が継代ごとに増加するのが観察され、GeneA 遺伝子欠損によって平滑筋細胞に競合優位性 (competitive advantage) が付与されることが確認

できた (図8)。

gRNA- GeneA -2 で樹立した細胞についても同様の傾向が認められた。

# 3. 血管平滑筋細胞特異的遺伝子 A ノックアウトマウスの作製

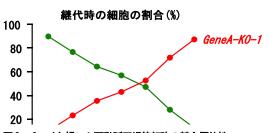
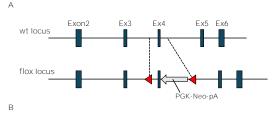


図8. GeneA欠損ヒト冠動脈平滑筋細胞の競合優位性 野生型との共培養アッセイでは、継代ごとに GeneA欠損細胞の 比率が増加することが観察された。

以下の 4 系統のマウスの交配による血管平滑筋細胞 特異的ノックアウトマウス (4遺伝子改変マウス)の 樹立には時間を要し、現在は交配が完了している。

- Apoe ノックアウトマウス (Apoe<sup>→</sup>)
- Cre ノックインマウス (Myh11<sup>CreERT</sup>)
- tdTomato ノックインマウス (ROSAtdTomato)
- Gene A-floxマウス (Gene Aflox/flox) (図9)



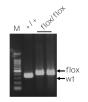


図9. GeneA-flox マウスのセットアップ

(A) ターゲティングコンストラクト。loxP 配列を赤三角形で示している。

(B) GeneA-flox マウスのジェノタイピング PCR。

遺伝子 A ノックアウトマウス (Gene A-KO Myh11<sup>CreERT</sup> Gene Afloxflox ROSAtdTlomatoApoe<sup>A</sup>) では Apoe<sup>A</sup>バックグラウンドであるため食餌性に動脈硬

化症を誘導できる。また、タモキシフェン投与により 血管平滑筋細胞特異的に Cre リコンビナーゼが誘導 され遺伝子 A がノックアウトされるとともに赤色蛍 光 (tdTomato) を呈するため、組織学的な局在判定や ソーティングに利用できる。

**Limitation**: *Myh11<sup>CreERT</sup>* locus は Y 染色体上にあるため Gene A-KO は必然的にオスでの解析となり、メスでの *In vivo* 解析はできない。

## 4. 遺伝子Aシーケンシング法の確立

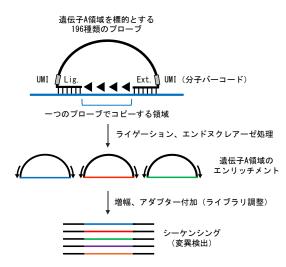
申請時の計画では、頸動脈内膜剥離術で得られた FFPE 検体より内膜平滑筋層をマイクロダイセクションにより切り出し、全エクソーム解析を行う予定であった。しかし、ゲノム量が微小であり、十分なカバレッジを確保することが困難であったため、このアプローチからの撤退を決定した。

代わりに、標的を遺伝子 A に絞った解析に方針を転換した。そして、単分子分子逆位プローブ(single molecule molecular inversion probes, smMIPs)を設計した。

報告者の研究室は、22個の CHIP 遺伝子(血液の体細胞変異によって引き起こされるクローン性造血の原因遺伝子)をターゲットシーケンシングするためにsmMIPs を使用している。本研究では、対象とする遺伝子を遺伝子 A 一つに限定して smMIPs プローブを設計した。

smMIPs は、特定のゲノム領域を捕捉する技術で、単 一鎖の DNA 分子を使用する (図 2)。 これらのプロー ブには、ゲノムの特定の配列に相補的な配列が含まれ ており(キャプチャアーム)、ターゲット配列と結合 する。プローブがターゲット配列に結合すると、リガ ーゼ反応によってキャプチャアーム間のギャップが 埋められる。その後、関心領域が増幅され、シーケン シング用のライブラリが作製される。各プローブには バーコードが付与され、個別のターゲットの識別が可 能である。報告者は、MIPGEN ソフトウェア (https://github.com/shendurelab/MIPGEN) を使用 して、遺伝子 A のエクソん領域全長をカバーするた めに 196 個の smMIPs プローブを設計した (図 10)。 シーケンス深度が不足しているゲノム領域に対して は、追加のプローブを手動で設計し、プローブセット を最適化した。

従来の全エクソーム解析が1 検体あたり40,000~5,0000 円と高額であったが、smMIPsでは、1 検体あたりのコストが2,000~3,000 千円に抑えられる。



#### 図 10. smMIPs プローブの構造と動作原理

smMIPs プローブは捕捉するゲノム領域に特異的に結合するための二つのキャプチャアーム(Lig、Ext)を有する単鎖 DNA である。ゲノム領域に結合すると、リガーゼ反応でキャプチャアームの間隙が埋められ、関心領域がプローブに「コピー」される。その後、Inverse PCR 反応で関心領域が増幅され、アダプター付加を経てライブラリが構築される。

#### その他の成績 1 (Nat Cardiovasc Res. 2024)

男性の血液細胞は加齢と共にY染色体を喪失する 「Y 染色体モザイク」という現象を示すことが知ら れている (mosaic loss of Y chromosome, LOY)。報 告者はこれまでの研究で、UK バイオバンクの登録 者 223,550 人の末梢血遺伝子データを解析し、血液 の LOY と心血管疾患の関連を解析し、血液の LOY 細胞の割合が高い男性ほど、心血管疾患の死亡リス クが高いことを明らかにした。特に、血液のLOY細 胞の割合が40%以上の男性では、心不全による死亡 リスクが 2.42 倍に増加していた。さらに、動物実験 により、血液の LOY は様々な臓器の障害を引き起 こすことが明らかになった。心臓では、Y染色体を 欠損したマクロファージが TGF-β1 (transforming growth factor-beta 1)を過剰に産生することで線維 芽細胞を活性化し、心臓線維化を促進していること を明らかにした%

本研究助成金の一部は、血液の体細胞モザイクの一つであるY染色体モザイクが心不全を促進するメカニズムを解明するために使用された。

報告者は、マウスの白血球にある Y 染色体の中の特定の遺伝子 (*Uty、Kdm5d、Ddx3y、Eif2s3y*) が失われることが、血液の LOY で心不全が悪化する原因であると考えた。そこで、これらの遺伝子が血液特異的に欠損したマウスを作製し、それぞれのマウスの心不全感受性を圧負荷モデル (横行大動脈狭窄

術)を用いて解析した <sup>10</sup>。その結果、血液特異的 *Uty* 欠損マウスのみが、コントロールマウスに比べて心不全感受性が高いことが明らかとなった。この結果から、加齢に伴う血液の Y 染色体喪失によって *Uty* 遺伝子欠損が引き起こされ、それにより心不全が悪化すると考えられました。

UTY は他の遺伝子の転写を調整するエピジェネティ ック分子であることから、Uty遺伝子を欠損する白血 球の心臓における機能を解析した。本研究では、白血 球の中でも特に心臓マクロファージに焦点を当てて 解析した。心臓マクロファージには炎症を亢進するマ クロファージや、線維化を促進するマクロファージが 存在する。横行大動脈狭窄術7日目に心臓に集簇した 白血球をセルソーターによって単離し、シングルセル マルチオミクス解析を行なったところ、Uty遺伝子を 欠損したマクロファージは、線維化を促進するマクロ ファージの性質を帯びる傾向が強いことが明らかと なった。このことが、血液のLOYにおいて心不全が 悪化する一因と考えられた。 さらに、の LOY を示し た男性の心臓の検査を実施したところ、やはり線維化 が強く引き起こされていることが分かりました(図 **11**)<sub>。</sub>

本成果は国際科学誌 Nature Cardiovascular Research に掲載された(Horitani K *et al. Nat Cardiovasc Res.* 2024)。



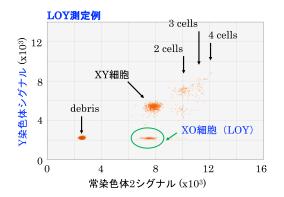
図 11. 血液のY染色体モザイクが心不全を促進するメカニズム の解明

血液の Y 染色体モザイクでは、Y 染色体上に存在する Uty遺伝 子が欠損するために、心臓マクロファージの活性化状態が線維化促進型に偏るため、心臓線維化が促進し心不全が悪化すると 考えられた。

## その他の成績 2 (Advanced Biology. 2024)

性染色体欠失細胞を高感度、ハイスループット、かつコスト効率よく測定する方法を開発した<sup>10</sup>。この方法は、multiplex single-cell droplet PCR(sc-dPCR)を

応用しており、細胞を PCR 反応液とともに液滴に封入し、PCR 反応により生成される Y 染色体や X 染色体由来のシグナルを検出するものである。それぞれの染色体に、約20セットのプローブがデザインされており、染色体のコピー数を蛍光強度に変換することで性染色体欠失細胞を単細胞レベルで検出することができる(検出感度: <0.1%)。Y 染色体についてはシグナルの完全欠損を持って LOY と判定し、女性の X 染色体についてはシグナルのにはシグナルの(男性の XY 細胞レベルへの)減弱をもって LOX と判定する(図12)。



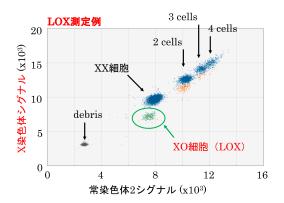


図 12. Multiplexed sc-dPCR 法による血液中の性染色体喪失細胞(XO 細胞)の測定。

縦軸が Y/X 染色体由来のシグナルであり、緑で囲まれた領域の細胞が XO 細胞である。

**上**: 男性、下: 女性

彦根中央病院の職員および患者の血液を検査した結果、次のことが明らかとなった。

- ◆ 全ての男性の血液サンプルにおいて、Y染色体を 欠失した細胞が存在した。
- Y 染色体を欠失した細胞の割合は、年齢とともに 急激に増加するカーブを示した。
- ◆ 全ての女性の血液サンプルにおいても、X染色体を欠失した細胞が存在した。

- X 染色体を欠失した細胞の割合は、年齢とともに 増加する傾向があった。
- X 染色体欠失細胞の割合は Y 染色体欠失細胞の割合よりかなり低く、ほとんどの症例で 5%以下であった。

本成果は国際科学誌 Advanced Biology に掲載された (Tsuchiya J et al. Advanced Biology: 2024)。

## Ⅳ. 考察

私たちの細胞には一生を通じて変異が蓄積する。ヒトが生きてゆく過程で生じる後天的な変異のことを体細胞変異といい、親から受け継ぐ先天的な変異とちがい、子孫に受け継がれることはない。体細胞変異は、最初に変異が起こった細胞が増殖し、その結果生まれる細胞にのみ受け継がれる。

体細胞変異の大部分は変異細胞の適応性(生存や増殖)に影響しない。一方、変異細胞に増殖、生存の優位性を与える稀な体細胞変異はドライバー変異と呼ばれるが、ドライバー変異する遺伝子(ドライバー遺伝子)は、組織や細胞のタイプごとに異なることが明らかになっている。例えば、食道上皮では TP53や NOTCH1がドライバー遺伝子であり、血液細胞では DNMT3Aや TET2がドライバー遺伝子となっている。また、ドライバー変異があるからといって、その細胞ががん化していることはなく、この場合の変異細胞は病理学的に正常である。

ドライバー変異のある細胞から増殖した細胞も元の細胞と同じドライバー変異を持つため、時が経つにつれて、組織内には変異を共有する細胞の集団(クローン)が形成される。この変異細胞のクローン性増殖が組織の至るところで起こるため、ヒトが加齢するとともに、組織に多彩なクローンがパッチワークのように混在する「体細胞モザイク」が形成される(本申請書では、体細胞モザイクをクローン性増殖とほぼ同義語として用いている)。近年のシーケンシング技術の進歩を背景に、検体中の変異細胞の割合が一定以上になるとシーケンシングによりその変異を検出することができるようになった。今では、あらゆる組織が体細胞モザイクを呈していることが明らかになっており、その臨床的意義に関心が集まっている。

報告者はこれまで、造血の体細胞モザイクであるクローン性造血の研究に従事し、クローン性造血では変異した白血球が炎症を亢進することで、心不全や動脈硬化といった循環器病が悪化することを明らかにした。造血の体細胞モザイクが血液細胞の性質を変化させ

るのと同様、動脈硬化巣の体細胞モザイクはより直接 的にプラークの性状を変化させる可能性があるが、動 脈硬化巣の体細胞モザイクに関しては世界的にも全 く研究が進んでいない。また、体細胞変異は発がんの 文脈で研究されることがほとんどであったが、シーケ ンシングテクノロジーの進歩を背景に、現在ではあら ゆる正常組織での体細胞変異が記載されるに至って いる。本研究がテーマとしているのは血管(血管平滑 筋)という、発がんとはほとんど無縁の組織・細胞で あり、体細胞変異研究の新たな展開が期待れる。

## V. 結 論

心血管疾患における体細胞モザイクの臨床的意義は まだほとんど解明されておらず、今後も継続的な研究 が必要である。

## VI. 研究協力者

千原英夫・彦根市立病院・脳神経外科部長 牧貴紀・彦根中央病院・脳神経外科医長 安西淳・慶應義塾大学医学部循環器内科学・特任講師 渡邊陽介・山梨大学大学院総合研究部医学域内科学講 座循環器科内科学教室・助教

## VII. 参考文献

- 厚生労働省 令和2年(2020)人口動態統計(確定数)の概況
- 2. Yizhak K, Aguet F, Kim J, Hess JM, et al. RNA sequence analysis reveals macroscopic somatic clonal expansion across normal tissues. Science 2024;364:eaaw0726.
- Sano S, Wang Y, Walsh K. Somatic mosaicism: implications for the cardiovascular system. Eur Heart J 2020;41:2904-2907.
- Sleptcov AA, Zarubin AA, Bogaychuk PM, et al. Human exome sequence data in support of somatic mosaicism in carotid atherosclerosis. Data Brief 2021;39:107656.
- Steffensen LB, Kavan S, Jensen PS, et al. Somatic mutations reveal clonal cell populations in atherosclerotic plaques. medRxiv 2022.
- Benditt EP, Benditt JM. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. Proc Natl Acad Sci U S A 1973;70:1753-1756.

- Chappell J, Harman JL, Narasimhan VM, et al. Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models. Circ Res 2016;119:1313-1323.
- Jacobsen K, Lund MB, Shim J, et al. Diverse cellular architecture of atherosclerotic plaque derives from clonal expansion of a few medial SMCs. JCI Insight 2017;2:e95890.
- Sano S, Horitani K, Ogawa H, et al. Hematopoietic loss of Y chromosome leads to cardiac fibrosis and heart failure mortality. Science 2022; 377:292-297.
- Sano S, Oshima K, Wang Y, et al. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-16/NLRP3 Inflammasome. J Am Coll Cardiol 2018;71:875-886.
- Sano S, Oshima K, Wang Y, et al. CRISPR-Mediated Gene Editing to Assess the Roles of Tet2 and Dnmt3a in Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. Circ Res 2018;123:335-341.
- Sano S, Wang Y, Yura Y, et al. JAK2V617F -Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Pathological Remodeling in Murine Heart FailureJACC Basic Transl Sci 2019;4:684-697.
- 13. Sano S, Wang Y, Ogawa H, et al. TP53-mediated therapy-related clonal hematopoiesis contributes to doxorubicin-induced cardiomyopathy by augmenting a neutrophilmediated cytotoxic response. JCI Insight. 2021;6:e146076.
- 14. Horitani K, Chavkin NW, Arai Y, et al. Disruption of the Uty epigenetic regulator locus in hematopoietic cells phenocopies the profibrotic attributes of Y chromosome loss in heart failure. Nat Cardiovasc Res 2024;3:343– 355.
- Tsuchiya J, Maki Y, Ayano M, et al. A Novel Method for Acquired Sex Chromosome Mosaicism. Adv Biol 2024.

## クローン性造血が大動脈瘤を進展させる機序の解明

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科

由良義充

## I. 緒 言

ヒト骨髄に存在する造血幹細胞は、①白血球(免疫 細胞)、赤血球、血小板の3系統に分化する多分化能、 ②自身と同一の細胞を複製する自己複製能の両方を 持つことで、全身の臓器に必要な血液細胞を供給しな がら骨髄における造血幹細胞の数を維持している。造 血幹細胞が複製する際に一定の確率で遺伝子変異(体 細胞変異)が起き、その変異により細胞の複製能が高 まった場合には、最初は1つの細胞(クローン)であ った変異造血幹細胞が増殖し、時間の経過とともに骨 髄中で一定の割合を占めるようになる。この状態はク ローン性造血と呼ばれ、加齢と共に頻度が増加し 70 歳以上の高齢者の1-2割に認められる。この際に変異 造血幹細胞から分化した免疫細胞にも遺伝子変異が 引き継がれる。これまでクローン性造血は血液がんの 原因となる以外に病的な意義は不明であったが、近年 疫学的、実験的な検討から心臓血管病の独立した危険 因子であると報告された (Jaiswal et al. Nat. Rev. Cardiol.2020)。我々もクローン性造血が複数の心臓 血管病を悪化させることを動物実験から報告してき た。これは体細胞変異を受け継いだ免疫細胞が機能変 化を起こし、心臓、血管で過剰な炎症、組織傷害を起 こすという全く新しい病態メカニズムである(図 1. Yura et al. JACC Basic Transl Sci. 2020)。今後はク

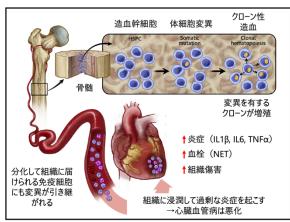


図1. クローン性造血が免疫細胞の機能を変化させ、過剰な炎症を引き起こすこと で新血管疾患を悪化させる。

ローン性造血に着目した新規診断・治療の開発が期待 されている。

加齢と共に頻度がする心臓血管病の中で、日本人の 10万人あたり3-10人の頻度で発症する大動脈瘤は、 症状なく経過し破裂した場合には救命することが極 めて難しく、外科的な治療以外には有効な治療が存在 しない医療ニーズの高い疾患である(2020年、大動 脈瘤・大動脈解離診療ガイドライン)。高血圧や脂質異 常などの動脈硬化の危険因子をコントロールしても 瘤が進行する患者が多く存在するため、未知の因子が 病態の進行に関連していると思われる。大動脈瘤の進 展に単球やマクロファージ、マクロファージから分化 した破骨細胞による細胞外マトリックスプロテアー ゼの過剰分泌が関連することが指摘されており (Raffort J, et al. Nat Rev Cardiol, 2017.)、我々がお こなった解析においても、大動脈瘤病態マウスの大動 脈において、これらの自然免疫系の細胞が著明に浸潤 している。

大動脈瘤の病態に免疫細胞が重要であるという知見とクローン性造血が免疫細胞を介して慢性炎症を 惹起するという新知見を合わせて考えた時、免疫細胞が大動脈瘤の病態に大きく関与しており、クローン性 造血が病態を悪化させる可能性があるとの着想に至った。そこで本研究ではこの仮説を基礎的解析と疫学的解析から検証し、将来の新規診断・治療の可能性を提唱する。

## Ⅱ. 対象・方法

実験 1. 大動脈瘤病態におけるクローン性造血の与 える影響の解明

ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II を刺激として加え、大動脈瘤を引き起こすマウスモデルを用いる。本研究では、疫学的に最も高頻度に検出される遺伝子の一つである DNA 脱メチル化酵素 TET2 に着目する。Tet2 欠損マウス (Tet2-/-) から採取した骨髄細胞を放射線照射された ApoE 欠損マウスに移植し、

Tet2 変異を持つクローン性造血モデルマウスを作成する。次に、このマウスにアンジオテンシン II の刺激を加え、大動脈の径を経時的にエコーで測定する(図2参照)。組織学的検討としては、結合組織染色(エラスチカ・ワン・ギーソン染色)と各種免疫細胞の免疫染色を行い、Tet2-/-群において特に変化の顕著な所見を同定する。

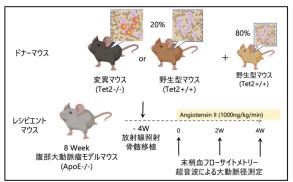


図2. Tet2クローン性造血モデルマウスにおける腹部大動脈瘤の評価

実験 2. Tet2 変異免疫細胞が大動脈拡張を促進する メカニズムの解明

Tet2 変異免疫細胞が大動脈壁に及ぼす影響を調べるため、腹部大動脈瘤モデルマウスの大動脈に浸潤している免疫細胞をフローサイトメトリーで分析する。腹部大動脈瘤モデルマウスの大動脈における変異免疫細胞を確認後、これらの細胞を FACS によって単離し、RNA シーケンス解析を実施する。その結果に基づき、Tet2 変異免疫細胞が大動脈の拡大を促進するメカニズムを細胞実験を通じて検証する。

実験 3. 大動脈瘤患者におけるクローン性造血の検 出とその臨床所見との比較

実験 1.-2.の動物・細胞を用いた基礎実験に加えて、より強固に仮説を検証するために、ヒト検体を用いた解析を計画している。大動脈瘤患者における末梢血液検体から DNA を抽出し、エラー修正ターゲット次世代シークエンスを用いてクローン性造血の遺伝子変異を検出する。高齢者に高頻度に見られるクローン性造血遺伝子としてエピジェネティック修飾因子(DNMT3A, TET2, ASXL1)、DNA 傷害応答因子(TP53, PPM1D, ATM, CHK2)、スプライシング因子(SRSF2, SF3B1)をターゲットとする。クローン性造血のステータス(有無、程度)と病態の進展の関連を明らかにして、クローン性造血が大動脈瘤の進展に及ぼす影響を明らかにする。

## Ⅲ. 結 果

実験 1. Tet2 クローン性造血モデルマウスにアンジ

オテンシン II を投与し、エコー解析により大動脈の拡張を確認した。結果、Ctrl 群と比較して、Tet2変異群では顕著な血管径の拡大が確認された(未発表データ、図3)。組織学的検討では、結合組織染色(エラスチカ・ワン・ギーソン染色)および各種免疫細胞の免疫染色を行った。Tet2-/-群では弾性繊維の菲薄化と断裂が観察された(未発表データ、図4)。免疫染色では、Tet2変異群において血管内皮細胞下にマクロファージの著しい浸潤が確認された。

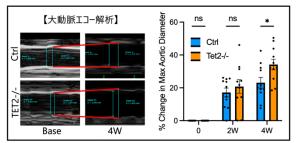


図3. クローン性造血モデルマウスでは腹部大動脈径がより拡大。

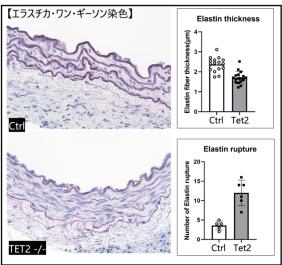


図4. クローン性造血モデルマウスでは、弾性繊維の菲薄化、断裂が増強。

実験 2. ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II を刺激として与えた後、大動脈組織を単離し免疫細胞のフローサイトメトリー解析を行った結果、単球やマクロファージといった自然免疫に関わる細胞群が大動脈壁に多く浸潤していたことが確認された。これにより、大動脈瘤の病態にこれらの細胞群が影響を及ぼしている可能性が高いと考えられる。その後、大動脈に浸潤するマクロファージを FACS によって回収し、RNA シークエンス解析を行ったところ、炎症、免疫応答、破骨細胞分化に関連する多数の遺伝子の発現が顕著に変化していた(未発表データ)。この知見を検証するために、Tet2変異マクロファージの破骨細胞への分化能を評価する細胞実験を行った。骨髄由来マクロファージを培養し、RANKL (Receptor activated

nuclear factor kappa ligand)を添加して破骨細胞へ分化させた結果、Tet2 変異マクロファージでは、TRAP 陽性破骨細胞への分化が優位に亢進していることが確認された(未発表データ、図5)。破骨細胞への分化において鍵となる分子は RANK であり、RANK 欠損マクロファージでは破骨細胞への分化が抑制される(Boyce BF et al., Arch Biochem Biophys, 2008)。現在、レンチウイルス/CRISPR-Cas9のシステム(Yura Y et al., Circ Res, 2021)を用いて、Tet2とRANKの両欠損骨髄細胞を作成中であり、この遺伝子編集骨髄細胞を ApoE 欠損マウスに移植し、Tet2/RANK 両欠損骨髄細胞を持つマウスを作成する。このマウスの解析を通じて、Tet2 変異破骨細胞の病態への影響を明らかにする予定である。

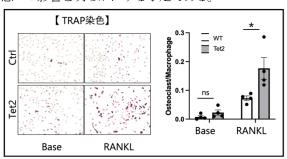


図5. Tet2変異マクロファージはよりTRAP陽性細胞へ分化する

実験 3. ヒト検体を用いた解析では、実験計画書が倫理委員会の承認を受けており、目標検体数に対する同意書の取得、血液検体の採取、および DNA の抽出が完了している。今後は次世代シーケンスを用いた解析を進め、クローン性造血のプロファイルを明らかにし、大動脈瘤の臨床経過との関連性を検証する予定である。

## Ⅳ. 考 察

ここまでの研究では、主に動物実験を通じてクローン性造血が大動脈瘤の悪化に寄与している可能性を示唆する結果が得られている。その機構については現在、研究を進行中であり、Tet2変異を持つマクロファージの分化が重要な役割を担っていると考えられる。引き続き、細胞実験、動物実験、およびヒト検体の解析を通じて、この仮説の検証を進める方針である。

大動脈瘤において、破骨細胞は多くの細胞外マトリックスプロテアーゼを分泌し、結果として弾性繊維の傷害を引き起こし、病態の進行に寄与していることが報告されている(Raffort J, et al. Nat Rev Cardiol. 2017)。Tet2変異を持つマクロファージが破骨細胞に分化しやすくなることで、大動脈瘤の進展を助長する

可能性があるため、そのメカニズムを明らかにすることが重要である。先行研究でも、Tet2変異マクロファージは破骨細胞様の特性への分化が増強されることが示唆されており(Kim PG et al. J Exp Med. 2021)、これは我々の研究結果と一致する。

動脈硬化や虚血性心不全において、Tet2変異マクロファージは NLRP3 インフラマソームを活性化し、IL1 βの分泌を亢進させることで病態の進行を助長するとこれまでの研究で提唱されている。今回、大動脈瘤におけるメカニズムはこれとは異なるものであり、病態ごとに Tet2 クローン性造血が病態を助長するメカニズムが異なる可能性がある。そのため、個別病態ごとの検討の重要性が強調される。

今後、クローン性造血と心血管病の研究が進むことで、将来の医療に変革をもたらす可能性がある。例えば、大動脈瘤患者におけるクローン性造血の遺伝子変異の種類や変異細胞の割合を特定することにより、病態の進行が高リスクである群を同定し、この知見に基づく個別化医療が検討される。クローン性造血という新たな視点は、現行の医療を超える可能性を持ち、その実現は社会的に大きな意義を持つ。

## ♥. 結 論

モデルマウスを用いた解析から、クローン性造血が 大動脈病態を悪化させること、そのメカニズムの一端 が明らかとなった。この知見を活かして、今後新たな ゲノム医療への道が開かれる可能性がある。

#### VI. 研究協力者

竹藤 幹人・名古屋大学医学部循環器内科・講師 米川 淳・名古屋大学医学部循環器内科・大学院生

#### Ⅶ. 参考文献

- Jaiswal S et al. Nat Rev Cardiol. 2020 Mar;17(3):137-144.
- 2) Yura Y et al. JACC Basic Transl Sci. 2020 Feb 24;5(2):196-207.
- 3) Raffort J et al. Nat Rev Cardiol. 2017 Aug;14(8):457-471.
- Boyce BF et al. Arch Biochem Biophys. 2008
   May 15;473(2):139-46.
- 5) Yura Y et al. Circ Res. 2021 Sep 3;129(6):684-698
- 6) Kim PG et al. J Exp Med. 2021 Dec 6;218(12):e20211872.