

大動脈弁狭窄症への先制医療の開発

江本拓央

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

【研究の背景】

大動脈弁狭窄症(AS)は大動脈弁が動脈硬化性変化によって硬化し、左室から上行大動脈への血流が妨げられる病態であり、高齢化社会において、増加し続けている。現在のところ、狭窄度が進行し、失神や心不全症状の出現があれば、外科的もしくは経カテーテル的大動脈弁置換術の適応になるが、有効な薬物治療は存在しない。大動脈弁のシングルセル解析は既に一報論文が出ている¹⁾が、繊維化石灰化を含んだ組織をシングルセル化することが非常に難しく、マクロファージは数%しか検出されておらず、その多様性についての評価ができなかった¹⁾。

申請者は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、マクロファージの細かな違いを捉えることに成功している²⁾。そこで、免疫細胞にフォーカスを当てたシングルセル解析を行うことでマクロファージの多様性を捉え、治療標的を見出したい。骨髄でのクローン性増殖(CHIP)が関与しているのかゲノム解析と併せてマルチオミックス解析を行う。

【目 的】

AS について、シングルセル RNA シークエンス解析を行い、大動脈弁逆流症(AR)と比較することで、その特徴を捉え、治療標的を見出すこととした。ARは正常例ではないが、機械的な異常から起こるものであり、弁の石灰化や動脈硬化性の変化は認めない。

【方 法】

弁置換術の適応となった AS 患者の大動脈弁 9 例とコントロールとして AR の大動脈弁 4 例について、CD45 で sorting を行い、全免疫細胞のシングルセル解析を行った。AR と AS において、遺伝子発現に差があるのかを解析した。また CHIP については、Whole exome 解析を行った。

【結 果】

AS と AR の代表的な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。

Myeloid 細胞の 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 Classical 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 Classical monocytes が増加するという特徴を得ることができた。

大動脈弁のマクロファージの特徴としては、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。また、9 例の AS 患者のうち 3 例に CHIP を認め、CHIP 奨励ではマクロファージの集積が目立つ結果であった。最後に T 細胞の解析において特徴的にみられたのは、NK 細胞が AS でのみ観察された。NK 細胞は動脈硬化を悪化させる報告に働くという報告はあるものの実際に AS にどのような作用機序を持つかについては、知られていない。

【考 察】

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。また NK 細胞の集積を認めた。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。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

現在のところ、AS に対する有効な薬物治療法がない中で、マクロファージへの介入の可能性を示すことができた。また、CHIP による層別化が有効である可能性が示唆された。

【参考・引用文献】

1. Xu K et al. Cell-Type Transcriptome Atlas of Human Aortic Valves Reveal Cell Heterogeneity and Endothelial to Mesenchymal Transition Involved in Calcific Aortic Valve Disease. *ATVB*.40:2910–2921. 2020.
2. Emoto T et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Distinct Immune Landscape of Myeloid Cells in Coronary Culprit Plaques Causing Acute Coronary Syndrome. *Circulation*.145:1434–1436. 2022.