

川崎病の冠動脈微小環境における時空間トランスクリプトミクスによる創薬基盤研究

平井健太

岡山大学病院 小児科

【研究の背景】

川崎病は、1967年に日本で最初に報告された全身性血管炎である。後天性小児心疾患の原因としてもっとも頻度が高く、年々増加傾向にあるが、最初の報告から50年以上経過した現在でも血管炎が起こる原因は不明である。治療法として免疫グロブリン療法 (IVIG) があるが、川崎病患者の24.4%はIVIG治療抵抗性であり、炎症が遷延すると重篤な合併症である巨大冠動脈瘤を生じ、冠動脈破裂や心筋梗塞により突然死のリスクとなる。

近年、川崎病モデルマウスを用いた研究により、冠動脈炎の病態として自然免疫が関与していることがわかってきた。川崎病様の冠動脈炎を惹起する *Candida albicans* water-soluble fraction (CAWS) は、Dectin-2/Syk/JNK/NF- κ B 経路で NLRP3 インフラマソームを活性化し、上記を腹腔内投与したマウスの冠動脈周囲には好中球やマクロファージなどの免疫細胞が集積している¹⁾。

一方、細胞1個1個の遺伝子発現を網羅的に解析する single cell RNA-seq (scRNA-seq) の手法が発展し、心臓領域でも動脈硬化、心肥大や心筋炎といったマウスモデルにおいて CD45 陽性細胞の解析がなされ、新たな病態解明や治療ターゲットの発見に寄与している²⁻⁴⁾。川崎病においては、患者の末梢血単核球を用いた scRNA-seq の報告はあるが⁵⁾、川崎病モデルマウスの心臓由来細胞を用いた報告はない。

【目 的】

本研究では、川崎病モデルマウスの心臓組織から抽出した細胞を用いて、scRNA-seq による mRNA の網羅的発現解析を行うことで、冠動脈微小環境における免疫細胞と血管内皮細胞や線維芽細胞などの非免疫細胞との細胞間クロストークを網羅的に解析し、冠動脈瘤発症機構の解明や新規治療薬ターゲットの同定を目的とする。

【方 法】

川崎病モデルマウスは、4週齢雄の DBA/2 マウスに CAWS 1 mg を5日間連続で腹腔内投与することで作製した。IVIG 投与の有無による冠動脈微小環境の経時的変化を評価する目的で、下記の通り scRNA-seq を計画した。CAWS 投与によるモデル作製の前日に生理食塩水を前投与する CAWS 群、IVIG を前投与する IVIG+CAWS 群、炎症を惹起しない Control 群を設定した (各 n=12)。CAWS 初回投与から1、7、28日後にマウスから心臓を摘出して、酵素処理によりシングルセル化した。mRNA 発現量の少ない CD45 陽性の免疫細胞も十分に評価できるように、セルソーティングにより CD45 陽性/陰性細胞に分けた後に、両者を用いて scRNA-seq を実施した。Cell Ranger による一次解析を実施した後に、UMAP で次元削減を行うことでデータを視覚化し、クラスタリングとアノテーションを実施して二次解析を行った。さらに高次解析として、エンリッチメント解析を用いて発現遺伝子の機能パスウェイを解析した。

【結 果】

CAWS 群において、好中球やNK細胞などの免疫細胞が増加し、炎症を司るサイトカインやケモカインの遺伝子発現上昇

を認めた。CAWS 群は 1 日後に活性化好中球、7 日後に NK 細胞が増加し、28 日後には多彩な免疫細胞の増加を認めた。IVIG+CAWS 群においては、CAWS 群と比較して細胞分布の変化を認めたが、活性化好中球の増加は完全には抑制できていなかった。

高次解析として、IVIG の有無による好中球のエンリッチメント解析を実施したところ、IVIG により細胞死や血小板活性化の関連遺伝子は抑制されていたが、NF- κ B 経路や好中球の血管内皮への migration は抑制されておらず、これらが IVIG 抵抗性の川崎病に対する治療ターゲットとなりうることを明らかにした。さらに、本研究で得られた scRNA-seq データと、ヒト由来細胞に低分子化合物を暴露させた 72 万種類の応答遺伝子発現データを活用することで、川崎病に最適化した Transformer 型 AI 薬効予測モデル(GDTrans-KD)を独自に構築した。この予測結果をもとに、川崎病の新規治療薬候補を検証中である。

【考 察】

本研究成果により、川崎病モデルマウスの冠動脈微小環境における経時的な遺伝子発現の変化を網羅的に解析することができた。川崎病患者の末梢血単核球における scRNA-seq のメタ解析において、急性期に CD177 陽性の活性化好中球が増加しているという既報があるが⁶⁾、本研究で川崎病モデルマウスの冠動脈微小環境においても活性化好中球が増加しており、ヒトとモデルマウスの病態の相同性が明らかとなった。IVIG 前投与により、細胞死や血小板活性化の関連遺伝子は抑制できていたが、NF- κ B 経路や好中球の血管内皮への migration、活性化好中球の浸潤は完全に抑制できておらず、これらを標的とした創薬が有効である可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

川崎病モデルマウスの scRNA-seq を実施することで、IVIG の有無による冠動脈微小環境の経時的な遺伝子発現プロファイルを得た。さらにこのデータを活用することで、川崎病に最適化した AI 薬効予測モデルを独自に構築した。これらの成果をもとに、新規標的遺伝子や新規治療薬候補を検証中である。

【参考・引用文献】

- 1) Anzai F, Watanabe S, Kimura H, Kamata R, Karasawa T, Komada T et al. Crucial role of NLRP3 inflammasome in a murine model of Kawasaki disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2020; 138: 185-196.
- 2) Cochain C, Vafadarnejad E, Arampatzi P, Pelisek J, Winkels H, Lye K et al. Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of aortic macrophages in murine atherosclerosis. *Circ Res.* 2018; 122(12): 1661-1674.
- 3) Martini E, Kunderfranco P, Peano C, Carullo P, Cremonesi M, Schorn T et al. Single-cell sequencing of mouse heart immune infiltrate in pressure overload-driven heart failure reveals extent of immune activation. *Circulation.* 2019; 140(25): 2089-2107.
- 4) Hua X, Hu G, Hu Q, Chang Y, Hu Y, Gao L et al. Single-cell RNA sequencing to dissect the immunological network of autoimmune myocarditis. *Circulation.* 2020; 142(4): 384-400.
- 5) Wang Z, Xie L, Ding G, Song S, Chen L, Li G et al. Single-cell RNA sequencing of peripheral blood mononuclear cells from acute Kawasaki disease patients. *Nat Commun.* 2021; 12(1): 5444.
- 6) Beltran JVB, Lin FP, Chang CL, Ko TM. Single-cell meta-analysis of neutrophil activation in Kawasaki disease and multisystem inflammatory syndrome in children reveals potential shared immunological drivers. *Circulation.* 2023; 148(22): 1778-1796.