

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02908

研究課題名(和文)血管の組織修復における細胞間相互作用の解明

研究課題名(英文)Cell-cell interactions in tissue repair of blood vessels.

研究代表者

上田 和孝 (Ueda, Kazutaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60375798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：動脈における病的血管リモデリング(いわゆる動脈硬化)は血管恒常性維持システムの破綻によって生じる。動脈硬化の形成において炎症は重要な役割を果たすが、その調節機構は未だ完全には解明されていない。我々は、マウス大腿動脈ワイヤ傷害モデルにおいて、血管傷害がPVATのbeiging(褐色脂肪組織様変化)を誘導し、これが炎症反応を調整して血管のリモデリングを保護するメカニズムであることを特定した。また、1細胞RNAシーケンシングにより、beige脂肪細胞由来の抗炎症因子としてneureglin4を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血性心疾患、脳卒中、大動脈解離といった動脈硬化性疾患による死亡者数は現在の日本ではがんに比肩する高い割合を占めていることから、動脈硬化性疾患の克服は喫緊の課題である。しかしながら、動脈硬化に関する研究はこれまでも数多くなされてきたものの、既存の治療法は十分に満足できる効果を挙げているとは言い難い。本研究で得られた知見は、PVATの血管炎症とリモデリングにおける重要な役割を示唆し、動脈硬化の治療に新たなアプローチをもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Although inflammation plays critical roles in the development of atherosclerosis, its regulatory mechanisms remain incompletely understood. We identified that vascular injury induces the beiging (brown adipose tissue-like phenotype change) of perivascular adipose tissue (PVAT), which fine-tunes inflammatory response and thus vascular remodeling as a protective mechanism. In a mouse model of endovascular injury, macrophages accumulate in PVAT, causing beiging phenotype change. Inhibition of PVAT beiging by genetically silencing PRDM16, a key regulator to beiging, exacerbates inflammation and vascular remodeling following injury. Single-cell RNA sequencing reveals that beige adipocytes abundantly express neuregulin 4 (Nrg4) which critically regulate alternative macrophage activation. These findings suggest the pivotal roles of PVAT in vascular inflammation and remodeling and will open a new avenue for treating atherosclerosis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 血管周囲脂肪組織 細胞間相互作用 遺伝子改変マウス 光制御性Cre-loxPシステム 1細胞トランスクリプトーム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患、脳卒中、大動脈解離といった動脈硬化性疾患による死亡者数は現在の日本ではがんに比肩する高い割合を占めていることから、動脈硬化性疾患の克服は喫緊の課題である。しかしながら、動脈硬化に関する研究はこれまでも数多くなされてきたものの、既存の治療法は十分に満足できる効果を挙げているとは言い難い。新しい効果的な動脈硬化予防・治療薬の開発のためには、既存の概念を越えた新しい視点から動脈硬化の発症・進展メカニズムの本質を捉える必要がある。

血管リモデリング機序の議論は、従来、Ross R による動脈硬化の内皮障害仮説(NEJM 1976)を受けて血管内皮の炎症が血管全体の炎症に進展するという”inside-out”理論を中心に展開されてきたが、近年では世界の複数の研究室から、血管外膜以遠の外周組織の重要性も報告されてきており(Takaoka M. *Circ Res* 2009, Oikonomou EK. *Lancet* 2018, Chang L. *Circulation* 2018 等)、血管周囲からの”outside-in”の進展機序にも注目が集まっている。申請者らも、急性血管内膜傷害後の血管組織を経時的に観察し、血管傷害後に血管自体に先行して血管周囲組織への免疫細胞の集積が生じることを見出している。

こうした背景から、「動脈硬化メカニズムの本質は何か」という疑問を明らかにするには、血管周囲組織も含めた血管全体から病態のダイナミズムを理解することが不可欠といえる。近年急速な進歩を続ける 1 細胞解析技術により、集団組織から個別細胞の分子的特徴の把握が可能となり、最近では動脈硬化プラークの細胞成分などの血管組織を用いた 1 細胞解析結果が報告されてきており、血管リモデリングの詳細な分子病態が明らかになりつつある(Fernandez DM. *Nat Med* 2019, Wirka RC. *Nat Med* 2019)。だが一方で、技術的な制約もあり、これまでの解析では血管リモデリングにおける分子病態の挙動をとらえることはできていなかった。そこで本研究では最新の解析法を活用してこの点を明らかにすることとした。

### 2. 研究の目的

本研究は、動脈硬化性疾患の新たな治療法の開発の基盤構築につながる、血管ストレス応答における動脈硬化形成メカニズムを統合的に理解することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3- 褐色化ブロックマウスを用いた褐色化 PVAT による炎症制御メカニズムの解明

本研究では、adipoq-Cre PRDM16 flox: 脂肪褐色化制御分子 PRDM16 の脂肪特異的 KO マウス(褐色化ブロックマウス)、および UCP1 KO: 褐色脂肪の特徴的機能分子 UCP1 の KO マウス(褐色脂肪機能ブロックマウス)を用いて検討を行った。これらのマウスを用いてワイヤー擦過による大腿動脈の内皮傷害を作成した後、免疫組織染色による免疫細胞浸潤(マクロファージ(M1/M2)、好中球、リンパ球、マスト細胞など)、qRT-PCR による炎症性サイトカイン発現、EVG 染色(内膜/中膜壁厚比)による血管リモデリングの変化を検討した。

#### 3- 1 細胞解析による褐色化 PVAT 由来の抗炎症性分泌因子の同定

我々は褐色化 PVAT 由来 stromal vascular fraction (SVF)細胞株を樹立した。興味深いことに、褐色化 PVAT-SVF の培養上清はマクロファージの炎症性サイトカイン発現を抑制した。このことから褐色化 PVAT は何らかの抗炎症因子を分泌していると考えている。本研究では、脂肪組織の 1 細胞トランスクリプトーム解析を行い、バルク解析では把握の難しい精密な遺伝子発現変化の解析を行った。得られたデータから褐色化 PVAT 由来の抗炎症性分泌因子の候補を絞り込む作業を行った。

#### 3- 褐色化 PVAT をターゲットとした新規動脈硬化治療薬開発の基盤構築

血管傷害後の炎症細胞浸潤や血管リモデリングに対する、脂肪褐色化を刺激する薬剤の効果を検討する。β3 受容体刺激薬は脂肪褐色化を強力に促進することが知られることから、

本研究では  $\beta 3$  受容体刺激薬(CL316243)の動脈硬化への作用を検討した。また、1細胞解析によって同定された褐色化 PVAT 由来の炎症抑制因子について、そのマクロファージに対する炎症制御作用を検討した。

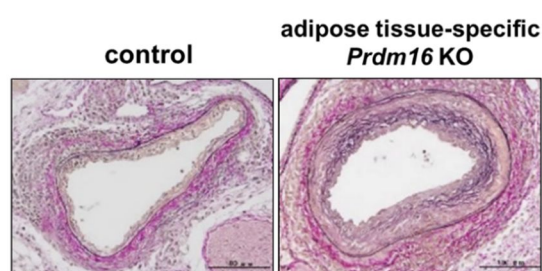
#### 4. 研究成果

##### 4- PVAT 褐色化は傷害後の血管炎症を終息に導く

褐色化ブロックマウス(adipoq-Cre PRDM16 flox)において血管傷害を作成すると、傷害 14 日後の血管内膜肥厚が野生型マウスに比べて増悪した。F4/80 による免疫染色では、PVAT および血管におけるマクロファージの集積の程度には両群で差がなかった一方で、褐色化ブロックマウスにおいては、炎症型マクロファージマーカーである iNOS 陽性細胞数は顕著に増加しており、一方で抗炎症型マクロファージである CD206 陽性細胞数は減少していたことから、褐色化をブロックすることでマクロファージの性質が変化することが示唆された。

次に、褐色化 PVAT がマクロファージの性質を制御するメカニズムを検討するために、褐色化脂肪において特徴的に発現する機能分子である UCP1 をノックアウトしたマウス(UCP1 KO マウス)を用いて同様の実験を行ったところ、意外にも、血管傷害後のリモデリングに違いは見られなかった。このことから、褐色化 PVAT は UCP1 発現とは異なる機序でマクロファージに働きかけ、性質を変化させている可能性を考えた。

Adipose tissue-specific Prdm16 KO mice  
(Adiponectin<sup>Cre</sup>; Prdm16<sup>flox/flox</sup>)



##### 4- 1細胞解析による褐色化 PVAT 由来の抗炎症性分泌因子の同定

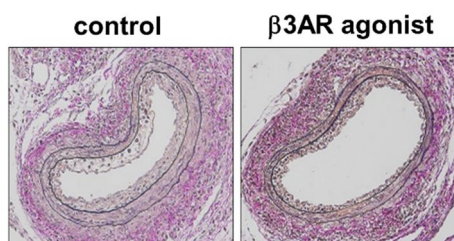
そこで我々は、PVAT 脂肪組織を用いた 1細胞解析を試みた。マウス大腿動脈にワイヤーによる血管傷害を加えた後に PVAT を採取したが、得られる組織量が極めて少ないこと、また、脂肪細胞のみならず膠原線維などの比較的弾性の強い組織も含まれることから、細胞をきれいに単離していく作業に難渋しており、現在も分離法の最適化を試みている。

一方で、マウス内臓脂肪組織を用いた 1細胞解析結果については過去に報告があったことから、その結果を活用した解析を並行して行った。細胞ごとの発現遺伝子の特徴によるクラスター分類で、マウス内臓脂肪は個別の特徴を有する 15 のクラスターに分類された。その中で、褐色化を刺激する  $\beta 3$  受容体刺激薬投与後の脂肪において、ある一つのクラスター(C7)が特徴的に現れることが分かった。このクラスターの特徴を詳しく見てみると、褐色脂肪に特徴的に発現する遺伝子群(*Ucp1*, *Cidea*, *Ppargc1a* 等)が増加しており、本クラスターは褐色化した脂肪細胞の群であることが分かった。Gene Ontology によって遺伝子の機能的特徴を解析により、分泌タンパクである neuregulin4 コードする遺伝子 *Nrg4* が見出された。

##### 4- 褐色化 PVAT 制御による血管炎症抑制効果

$\beta 3$  受容体刺激薬(CL316243)は PVAT の褐色化を強く促進することを確認した。この CL316243 をマウス大腿動脈周囲に塗布したのち、血管傷害を加えたところ、傷害 14 日後の血管では、iNOS 陽性細胞数が減少し、CD206 陽性細胞数は増加しており、血管リモデリングは有意に抑制された。また、上記研究 2 で同定した neuregulin4 を用いて培養マクロファージ細胞(RAW264.7)を刺激すると、マクロファージの抗炎症型へのシフトが起こり、炎症性サイトカインの発現も減少した。

Browning activation inhibits vascular remodeling



#### 4- 考察および結論

本研究から、血管傷害後に生じる PVAT の褐色化によって、PVAT から分泌される因子がマクロファージに作用し抗炎症型へシフトさせることで、血管の炎症を収束に導き、病的な血管リモデリングを抑制することが示唆される。この結果は、褐色化刺激薬が動脈硬化予防・治療に有用である可能性を示唆するものであり、今後は、将来の臨床への応用の可能性を見据え、血管傷害以外の血管疾患モデルでの検討や、ヒトの動脈サンプルを用いた検討などをさらに行っていく予定である。

本研究により、血管傷害後には PVAT が褐色化することで血管の炎症を収束に導き、病的な血管リモデリングの抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Numata Genri, Takimoto Eiki, Kariya Taro, Adachi Yusuke, Tokiwa Hiroyuki, Toyoda Masayuki, Mafune Ryo, Saito Yoshihiro, Nakamura Shun, Ueda Kazutaka, Ikeda Yuichi, Komuro Issei	4. 巻 323
2. 論文標題 A pacing-controlled protocol for frequency-diastolic relations distinguishes diastolic dysfunction specific to a mouse HFpEF model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H523 ~ H527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00241.2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Adachi Yusuke, Ueda Kazutaka, Nomura Seitaro, Ito Kaoru, Katoh Manami, Katagiri Mikako, Yamada Shintaro, Hashimoto Masaki, Zhai Bowen, Numata Genri, Otani Akira, Hinata Munetoshi, Hiraike Yuta, Waki Hironori, Takeda Norifumi, Morita Hiroyuki, Ushiku Tetsuo, Yamauchi Toshimasa, Takimoto Eiki, Komuro Issei	4. 巻 13
2. 論文標題 Being of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32658-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Liu Pang-Yen, Fukuma Nobuaki, Hiroi Yukio, Kunita Akiko, Tokiwa Hiroyuki, Ueda Kazutaka, Kariya Taro, Numata Genri, Adachi Yusuke, Tajima Miyu, Toyoda Masayuki, Li Yuxin, Noma Kensuke, Harada Mutsuo, Toko Haruhiro, Ushiku Tetsuo, Kanai Yoshimitsu, Takimoto Eiki, Liao James K., Komuro Issei	4. 巻 8
2. 論文標題 Tie2-Cre Induced Inactivation of Non-Nuclear Estrogen Receptor- Signaling Abrogates Estrogen Protection Against Vascular Injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 55 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2022.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Adachi Yusuke, Kiyosue Arihiro, Ando Jiro, Kawahara Takuya, Kodera Satoshi, Minatsuki Shun, Kikuchi Hironobu, Inaba Toshiro, Kiriya Hiroyuki, Hirose Kazutoshi, Shinohara Hiroki, Saito Akihito, Fujiwara Takayuki, Hara Hironori, Ueda Kazutaka, et .al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Factors associated with left ventricular reverse remodelling after percutaneous coronary intervention in patients with left ventricular systolic dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80491-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Takayuki, Takeda Norifumi, Hara Hironori, Ishii Satoshi, Numata Genri, Tokiwa Hiroyuki, Maemura Sonoko, Suzuki Takaaki, Takiguchi Hiroshi, Kubota Yoshiaki, Seo Kinya, Sakata Asuka, Nomura Seitaro, Hatano Masaru, Ueda Kazutaka, et. al.	4. 巻 144
2. 論文標題 Three-Dimensional Visualization of Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1452 ~ 1455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kazutaka Ueda
2. 発表標題 Being of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling.
3. 学会等名 Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 守俊 (Sato Moritoshi) (00323501)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授  (12601)	
研究分担者	瀧本 英樹 (Takimoto Eiki) (20709513)	東京大学・医学部附属病院・講師  (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------