

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17152

研究課題名（和文）骨髄をターゲットとした新たな動脈硬化予防法の開発

研究課題名（英文）Development of bone marrow targeting therapy against atherosclerosis

研究代表者

江本 拓央（Emoto, Takuo）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80855023

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄をターゲットとした新規動脈硬化予防法を開発することを目標に、動脈硬化モデルマウスにおける、骨髄中の単球、骨髄のニッチ細胞のシングルセル解析を行なったが、単球の増加は認めるものの、動脈硬化に特異的な新規細胞集団の発見にまでは至らなかった。一方、ヒトの冠動脈プラークのシングルセル解析からは単球やマクロファージが急性冠動脈を起こすプラークには集積していることがわかり、プラーク形成や不安定化に関わることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
動脈硬化における骨髄での単球増加を示すことができた。特異的な細胞集団の発見にまではいたらなかったが、骨髄の単球造血が動脈硬化に与える影響の一端を示すことができたと思う。

研究成果の概要（英文）：We tried to clarify atherosclerosis specific monocyte population in blood and bone marrow by single cell RNA sequencing. Although we found an increase of monocyte population in bone marrow, we could not find atherosclerosis specific cell populations in bone marrow or bone marrow niche. Single-cell RNA sequencing revealed more monocytes, mast cells and inflammatory macrophages accumulated in coronary plaques involved in acute coronary syndrome in comparison to culprit plaques for chronic coronary syndrome.

研究分野：動脈硬化

キーワード：骨髄 単球 動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、骨髄中の様々な周囲細胞(ニッチ)に分化と増殖が制御されている。動脈硬化の発生や増悪に重要な単球とその前駆細胞も骨髄中でニッチに囲まれ、制御されていることが研究代表者の研究で明らかになった。動脈硬化形成時に単球の造血がどのように行われているのかはわかっていない。またヒトの冠動脈プラークの形成また、不安定化にマクロファージがどのように関与しているのかなどはわかっていない部分も大きい。

2. 研究の目的

冠動脈疾患患者や動脈硬化発生状態における単球とその制御に関わる骨髄ニッチの特徴を捉えることで、治療介入の標的を探索し、その上流である骨髄から動脈硬化巣に存在する単球の機能制御をする新規動脈硬化予防法を開発すること。また、ヒトの冠動脈プラーク動脈硬化層をシングルセル解析することで、冠動脈プラークへ実際骨髄から介入できる可能性があるのかを調べた。

3. 研究の方法

(1)骨髄での単球の制御(マウス)

コレステロール負荷に対する骨髄の幹細胞前駆細胞の反応を LDL 受容体欠損マウスで継続的に調べる。具体的には、高コレステロール食負荷 1 週間、4 週間、12 週間において、Flow cytometry を用いて、幹細胞 (Lineage- ckit+ SCA1+ CD48- CD150+)、前駆細胞である Granulocyte-mono cyte progenitors (GMP)、単球の前駆細胞 common monocyte progenitors (cMop)、単球の細胞の割合、細胞数を通常食群と比較する。また、骨髄のニッチ細胞について、Single cell RNA sequence 解析を行い、ニッチ細胞におけるコレステロール負荷の有無で変わってくる遺伝子発現に着目する。

(2)ヒトの冠動脈プラークの解析(ヒト)

ヒト冠動脈プラークを慢性冠症候群患者(安定狭心症)と急性疾患群患者(不安定狭心症、心筋梗塞)とシングルセル比較解析し、単球の浸潤やマクロファージが治療ターゲットとなりうるかを検証した。

4. 研究成果

(1)骨髄での単球の制御(マウス)

動脈硬化における骨髄での単球の前駆細胞(cMop)、単球増加を示すことができた。骨髄のニッチ細胞については、次の Figure1 に示すとおり、いくつかの細胞集団に分けることができたが、高コレステロール食に特徴的な細胞集団の出現はなかった。また各細胞集団における単球造血に関与するサイトカインの発現の差を調べたが(Figure2) 優位な差を検出できなかった。

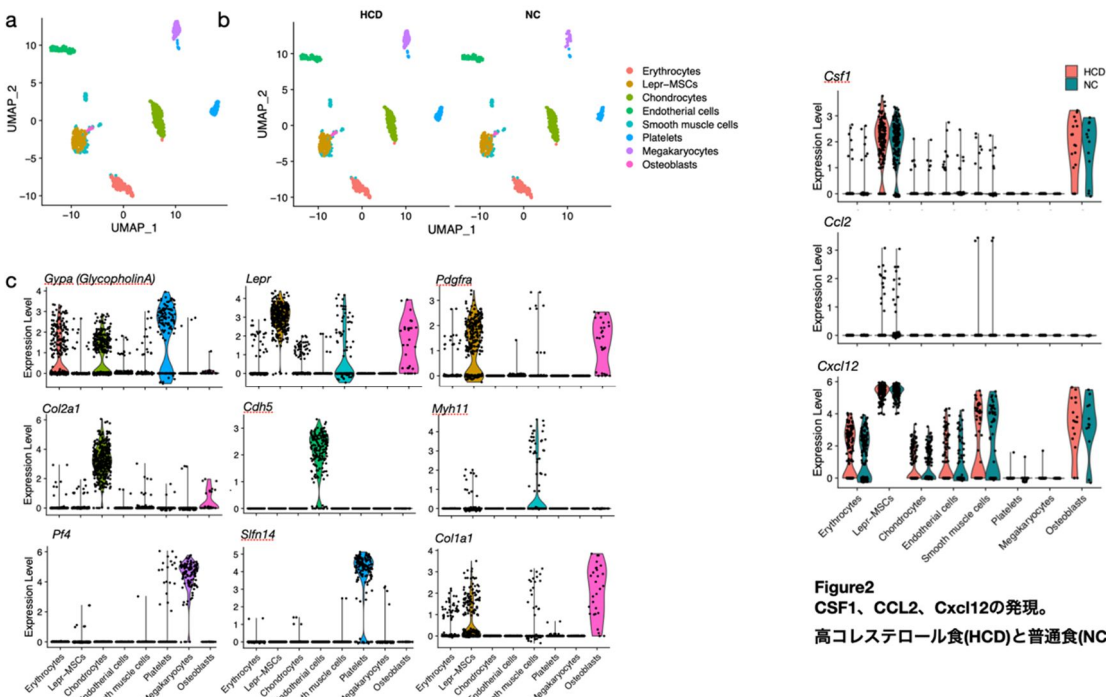


Figure1 動脈硬化マウスにおける骨髄ニッチ細胞の構成

Figure2 CSF1, CCL2, Cxcl12の発現。高コレステロール食(HCD)と普通食(NC)の違い

(2) ヒトの冠動脈プラークの解析 (ヒト)

現在唯一冠動脈プラークを得ることができる手技である冠動脈粥腫切除術 (Directional coronary atherectomy: DCA) で得られたサンプルを用いてシングルセル RNA シークエンス (scRNAseq) を行い、ヒト冠動脈プラークを解析することに成功し、興味深い知見を得た (Circulation.2022 May 3;145(18):1434-1436.)。

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 DCA で切除したプラークを scRNAseq で解析し、比較を行った。Myeloid cell にフォーカスして解析した

ところ、単球、マクロファージ (Mφ)、樹状細胞、肥満細胞を認めた。Mφ の分画はそれぞれの特徴的な遺伝子発現から、TNF+ Mφ、C1Q+ TREM2+ fibrotic Mφ、CXCL3+IL1B+ inflammatory Mφ の 3 つに分けられた (Figure3)。

IL1B を強く発現するのは、単球と IL1B+inflammatory Mφ 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、CANTOS trial (Ridker PM et.al N Engl J Med. 2017;377(12):1119-1131) をサポートする結果であった。CXCL3 については、好中球の CXCR2 に結合することで、好中球の活性化遊走に参与することが報告されており、動脈硬化については報告がないものの、炎症性疾患の治療への応用の可能性が示されており、現在は COPD の治療薬として期待されている。

さらには RNA のスプライシング情報をもとに、細胞がどのように分化していくのかを調べる Velocity 解析を行った (La Manno G et al. Nature.2018;560(7719):494-498.)。Velocity 解析で示したように、慢性冠症候群では、C1Q+ TREM2+ fibrotic Mφ と TNF+ Mφ の一部が CXCL3+IL1B+ inflammatory Mφ への分化は違う方向へ向かっていることが示唆されたが、急性冠症候群では、C1Q+ TREM2+ fibrotic Mφ から TNF+ Mφ や CXCL3+IL1B+ inflammatory Mφ への 1 方向への変化が認められた (Figure4)。

Mφ の可塑性、また epigenome により Mφ の分化誘導を制御できる可能性が示された。また骨髄で造血された単球の浸潤、またその制御から動脈硬化へ介入できる可能性を示すことができたと考えている。

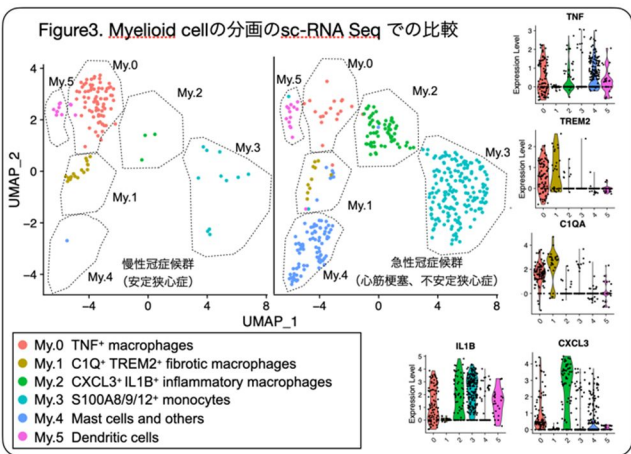
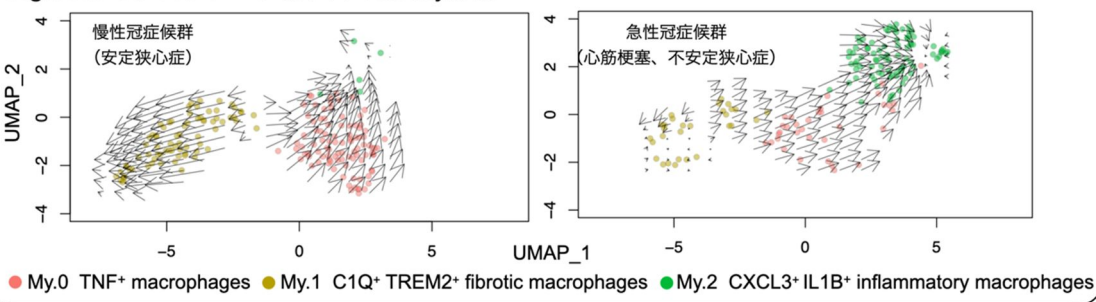


Figure4. マクロファージ分画のVelocity解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Emoto Takuo, Yamamoto Hiroyuki, Yamashita Tomoya, Takaya Tomofumi, Sawada Takahiro, Takeda Shintaro, Taniguchi Masayuki, Sasaki Naoto, Yoshida Naofumi, Saito Yoshihiro, Sivasubramaniyam Tharini, Otake Hiromasa, Furuyashiki Tomoyuki, Robbins Clinton S., Kawai Hiroya, Hirata Ken-ichi	4. 巻 145
2. 論文標題 Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Distinct Immune Landscape of Myeloid Cells in Coronary Culprit Plaques Causing Acute Coronary Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1434 ~ 1436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058414	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------