

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20879

研究課題名（和文）血液細胞の後天的Y染色体喪失によって心不全が進行するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Hematopoietic loss of Y chromosome and its impact on heart failure

研究代表者

佐野 宗一（Sano, Soichi）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：80647884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究開始時、血液の後天的Y染色体喪失（mosaic loss of Y chromosome, LOY）と心血管疾患との関連は不明であった。本研究では、UKバイオバンクに登録された22万人のデータを解析し、血液中のmLOYが心血管疾患および心不全関連の死亡リスクの増加と関連していることを示した。さらに、血液特異的Y染色体欠失マウス（LOYのモデルマウス）では、死亡率の上昇、加齢に伴う線維化の進行、および心機能の低下が明らかになった。Y染色体を欠失した心臓マクロファージは、より強い線維化傾向を示し、TGF- $\beta$ 1中和抗体の投与により、mLOYマウスの心機能障害が改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液の後天的Y染色体喪失は、生物学的男性にのみ見られる現象であり、疾患における性差を考える上で重要である。この研究では、臨床研究と動物実験を組み合わせることで、Y染色体を喪失した血液細胞が男性の心臓病を悪化させることやその仕組みについて解明しました。特に、Y染色体を失ったマクロファージという免疫細胞が心臓の線維化を引き起こし、心臓の機能を障害することが分かりました。本研究により、性差に基づく新たな心臓病治療法の開発に向けた第一歩が踏み出されたと考えられます。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic mosaic loss of Y chromosome (mLOY) is associated with increased risk of mortality and age-related diseases in men, but the causal and mechanistic relationships have yet to be established. Here, we show that male mice reconstituted with bone marrow cells lacking the Y chromosome display increased mortality and age-related profibrotic pathologies including reduced cardiac function. Cardiac macrophages lacking the Y chromosome exhibited polarization toward a more fibrotic phenotype, and treatment with a transforming growth factor-beta (TGF-beta) neutralizing antibody ameliorated cardiac dysfunction in mLOY mice. A prospective study revealed that mLOY in blood is associated with an increased risk for cardiovascular disease and heart failure-associated mortality. Together, these results indicate that hematopoietic mLOY causally contributes to fibrosis, cardiac dysfunction, and mortality in men.

研究分野：循環器内科学

キーワード：後天的Y染色体喪失 クローン性造血 バイオバンク 心不全モデル マクロファージ CRISPR/Cas9 シングルセル解析

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。

### 1. 研究開始当初の背景

白血球の後天的な Y 染色体喪失 (Mosaic loss of Y chromosome: LOY) は、男性の性染色体である Y 染色体を喪失した細胞が加齢とともに血液中に増加する現象であり、ヒトにおける最も頻度の高い体細胞変異である。研究開始当初には、LOY を有する男性は生命予後が不良であること、さらにはアルツハイマー病や固形がんといった様々な加齢性疾患の発症が増加することが報告されていた。しかし、これらの疫学研究によって LOY と様々な加齢性疾患との関連が示されていた一方で、LOY と疾患の因果関係を検証するための実験研究はまだ存在していなかった。そのため、LOY が単なる加齢の「結果 (老化マーカー)」に過ぎないのか、あるいは心不全を含めた様々な加齢疾患の「原因」であるのかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、血液中での Y 染色体喪失が臨床的にどれほど重要であるかを解明することである。Y 染色体は男性にのみ存在し、性別決定や精子形成に重要な役割を果たす性染色体である。しかし、Y 染色体上の遺伝子には血液細胞で発現しているものもあり、まだ解明されていない Y 染色体の機能が存在する可能性が示唆されている。一方で、男性では血液細胞から Y 染色体が失われる現象、Hematopoietic Loss of Y Chromosome (LOY) が知られている。この現象は年齢とともに頻度が増加し、70 歳以上の男性の 40% 以上で観察され、ヒトにおける最も一般的な体細胞変異とされている (Thompson DJ. *Nature*. 2019)。最近の研究では、血液の LOY のある男性は LOY のない男性に比べて、がんやアルツハイマー病などの疾患のリスクが高いことが報告されている (Lars LA. *Nat Genet*. 2014; Forsberg LA. *Hum Genet*. 2017)。しかし、これらの疫学研究からは血液の LOY と疾患との因果関係を結論することが困難であり、そのメカニズムも未解明である。そこで申請者は、「Y 染色体を欠失した血液細胞は疾患の原因そのものなのではないか」という仮説に基づいて研究を開始した。

### 3. 研究の方法

臨床研究と動物実験の両方のアプローチを組み合わせ、血液の LOY と疾患の因果関係について研究した。

#### 1. UK バイオバンクデータの解析

UK バイオバンクの登録者 223,550 人分の末梢血遺伝子データ (DNA マイクロアレイ) を使用し、血液の LOY と疾患の疫学的関連を解析した。マイクロアレイデータより、LRR (Log R Ratio) や BAF (B Allele Frequency) などの指標を導き出し、それらの指標をもとに LOY を算出した。

- LRR は、ゲノム中のコピー数変化を示す指標である。LRR が正の値であれば、コピー数が増加していることを示し、負の値であれば減少していることを示す。血液の LOY の場合、Y 染色体の喪失により、Y 染色体の LRR が低下する。
- BAF は、特定の遺伝子座におけるアレルの強度 (コピー数) の比率を示す。Y 染色体が失われると BAF が 0.5 から離れた値をとる。

得られた LOY 値を臨床データ (ICD10 における I00~I99: 心血管疾患) と照合し、COX 比例ハザードモデルで解析した。

#### 2. 動物実験によるメカニズムの解析

UK バイオバンクデータの解析により得た知見をもとに、動物実験によるメカニズムの解析を行った。血液の LOY のモデルマウスは、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて造血幹前駆細胞から Y 染色体を除去し (Y 染色体セントロメアを標的とする gRNA をレンチウイルスにより送達)、その細胞を野生型レシピエントマウスに骨髄移植することで作製した (図 1)。

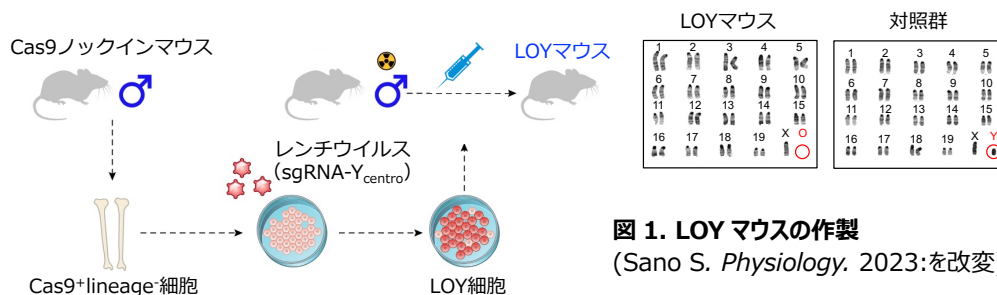


図 1. LOY マウスの作製  
(Sano S. *Physiology*. 2023;を改変)

そして、LOY マウスに横行大動脈縮窄術 (transverse aortic constriction, TAC) を施し、心不全の進行を心エコー図法、組織学的解析 (ピクロシリウス染色)、分子生物学的解析 (ELISA、qPCR) などで評価した。さらに、セルソーティングおよびシングルセル RNA シーケンシングにより、TAC により心臓に集簇した白血球の遺伝子発現解析を行なった。ライブラリ調整およびシー

ケンサーにはそれぞれ Chromium Single Cell v3.1.3' Reagent Kit (10x Genomics) と NextSeq 2000 (Illumina) を使用した。

#### 4. 研究成果

##### 1. 血液の LOY は心不全の予後を決定する。

UK バイオバンクデータの解析により、血液中の LOY 細胞の割合が高いほど、心血管疾患による死亡のリスクが高いことが明らかとなった (図 2、左)。さらに、LOY 細胞が 40%以上の男性では、うっ血性心不全による死亡リスクは 2.42 倍に増加していた (図 2、右)。

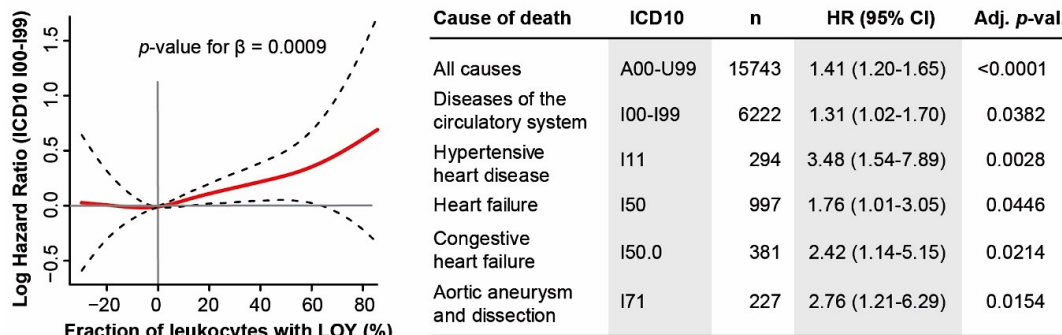


図 2. 血液の LOY は心血管死のリスクを増加させる。

左: COX 比例ハザードモデル (年齢、喫煙、アルコール BMI、人種、血圧、コレステロール、糖尿病で調整)。右: 同様のモデルを用いた LOY 細胞>40%での解析。

##### 2. Y 染色体を欠失したマクロファージは心臓線維化を促進する。

LOY マウスは、コントロールマウスに比べて、TAC による心不全が進行しやすいことが明らかとなった。また、TAC により心不全に陥った LOY マウスの心臓では、線維芽細胞がより活発に増殖し、線維化がより進行していた。LOY マウスの心臓では、リン酸化 SMAD2 陽性の線維芽細胞が増加していることも、線維芽細胞の異常な活性化を示すものであった。さらに、TAC により心臓に集簇した白血球のシングルセル RNA シーケンシングにより得たデータを、PHATE アルゴリズム (Moon KR. *Nat Biotech.* 2019) を用いて次元削減・可視化することで、Y 染色体を欠失したマクロファージは線維化促進マクロファージ (*Lyve1<sup>+</sup>Mrc1<sup>+</sup>*) に分化する傾向が強いことが明らかとなった。

また、SCENIC アルゴリズム (Aibar S. *Nat Methods.* 2017) を用いた解析では、LOY マクロファージにおいて線維化促進性の遺伝子制御ネットワークがより豊富に機能していた。さらに、LOY マクロファージでは TGF-β1 が過剰に産生されていた (図 3)。バルク RNA シーケンシングにおいても Y 染色体が欠失したマクロファージでは、TGF-β1 をはじめとする線維化を促進する遺伝子の発現が増加していることが確認された。

TGF-β1 の過剰な産生が LOY マクロファージによって心不全の悪化の引き起こす可能性が示唆されたため、TGF-β 中和抗体の投与実験を実施した。その結果、中和抗体の投与により、LOY マウスとコントロールマウスの両群で心不全の進行や心臓線維化の程度に差がなくなった。

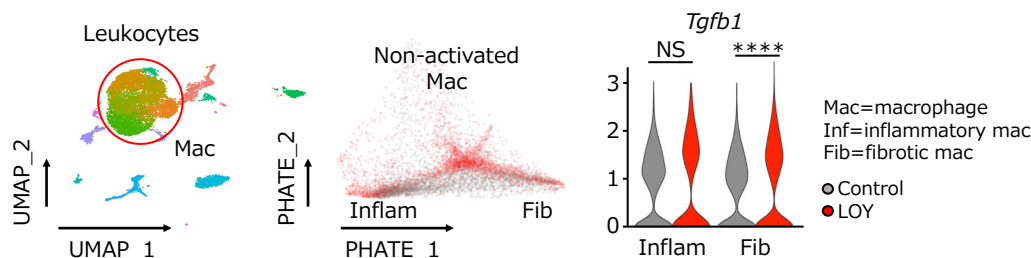


図 3. LOY マクロファージは線維化を促進する。

左、中央: 心臓白血球のシングルセル解析の UMAP による次元削減と、マクロファージの PHATE による次元削減。右: *Lyve1<sup>+</sup>Mrc1<sup>+</sup>* LOY マクロファージは *Tgfb1* の発現が高い。\*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

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 1件）

1. 著者名 Sano Soichi et al.	4. 巻 377
2. 論文標題 Hematopoietic loss of Y chromosome leads to cardiac fibrosis and heart failure mortality	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 292 ~ 297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abn3100	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

心血管モザイク研究室HP <a href="https://www.ncvc.go.jp/res/divisions/cvm/">https://www.ncvc.go.jp/res/divisions/cvm/</a>
---

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			
米国	University of Virginia			
スウェーデン	Uppsala University			