

令和 6 年 5 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16105

研究課題名（和文）マクロファージをターゲットとした新しい心血管イベント予防法開発

研究課題名（英文）Development of a new therapy targeting macrophages

研究代表者

江本 拓央（Takuo, Emoto）

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：冠動脈粥腫切除術で得られる慢性冠症候群患者のプラークと急性冠症候群患者のプラークをシングルセルRNAシーケンス（scRNAseq）で比較すると、ACSプラークでのみCXCL3+IL1B+ inflammatory Mを認めため、このMの動脈硬化不安定性に与える意義について調べるため、動脈硬化退縮モデルを使い、抗IL1B抗体とCXCL3の受容体であるCXCR2阻害薬の2剤にて動脈硬化の進展を食い止めることができる可能性を示すことができた。また、CD4陽性T細胞に着目すると、central memory CD4陽性T細胞がACSプラークでのみ集積していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化の予防、治療について、この数十年で大きく進歩したことが平均寿命の延長に大きく貢献したが、依然として動脈硬化性疾患は死因として大きな割合を占めている。中でも心筋梗塞、不安定狭心症を含む急性冠症候群における致死率は高く、その予防は極めて重要である。組織の性状を判別できる血管内エコーで冠動脈プラークを経時的に観察した研究では、その性状は時間とともに変化することが示されており、治療介入の可能性が言われている。現在のところ、不安定プラークを安定化させる心血管イベント抑制法の開発が望まれており、本研究の結果が新しい治療法開発につながると考えている。

研究成果の概要（英文）：Acute coronary syndrome (ACS) represents the culminating clinical manifestation of atherosclerotic plaque rupture. We characterized the immune cell composition of the coronary culprit plaques causing ACS by contrast with those causing CCS (CCS plaques). We previously demonstrated a unique immune landscape of myeloid cells; monocytes, mast cells, and CXCL3 + IL1B+ inflammatory macrophages were detected only in the ACS plaques. In addition, we showed the suppression of the development of atherosclerosis by inhibiting IL1B or CXCR2 in LDL receptor knockout models. CD4T cells were divided into five distinct clusters; Effector, Naive, Cytotoxic, central memory and FOXP3+ regulatory CD4T cells. The proportion of central memory CD4+ T cells was higher in the ACS plaques. Correspondingly, dendritic cells also tended to express more HLAs and co-stimulatory molecules in the ACS plaques, suggesting CD4T cell could be a therapeutic target.

研究分野：循環器内科

キーワード：動脈硬化 シングルセル解析 冠動脈疾患 急性冠症候群 慢性冠症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

最新の我が国の人口動態統計では、死因の第2位が心疾患でありその内訳では、動脈硬化を原因とする、虚血性心疾患が多くを占める。動脈硬化の予防、治療について、この数十年で大きく進歩したことが平均寿命の延長に大きく貢献したが、虚血性心疾患の中でも、突然発症する心筋梗塞を含む急性冠症候群(ACS)における致死率は高く、その予防は極めて重要である。組織の性状を判別できる血管内エコーで冠動脈プラークを経時的に観察した研究では、その性状は時間とともに変化することが示されており、治療介入の可能性が言われている。物理的な狭窄具合とは関係なく、狭窄度が低くとも急性冠症候群が発症することが報告されており、不安定プラークを安定化させる心血管イベント抑制法の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

冠動脈粥腫切除術(directional coronary atherectomy: DCA)で得られる慢性冠症候群(安定狭心症)患者のプラークと急性冠症候群患者のプラークをシングルセル RNA シークエンス(scRNAseq)で比較し、それぞれの細胞集団における、ACSプラークの特徴を明確に捉えた。動脈硬化モデルマウスを用いて、ACS特異的に認められる細胞集団をターゲットにした治療介入を模索し、最終的には新たな治療法の開発へと結びつけることを目標としている。

### 2. 研究の方法

#### (1) 動脈硬化退縮実験

動脈硬化退縮モデル(LDL受容体ノックアウトモデルに高脂肪高コレステロール食を負荷して動脈硬化を強く誘導した後に、普通食に戻すモデル)を使い、食事を普通食に戻した際に、同時にオメガ3脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸やT細胞の活性化を抑制する抗CD3抗体を投与すると、動脈硬化を退縮させる効果があることを報告しており、このモデルを用いて、プラークの安定化、退縮の評価を行った[1, 2]

#### (2) マウスへの介入方法

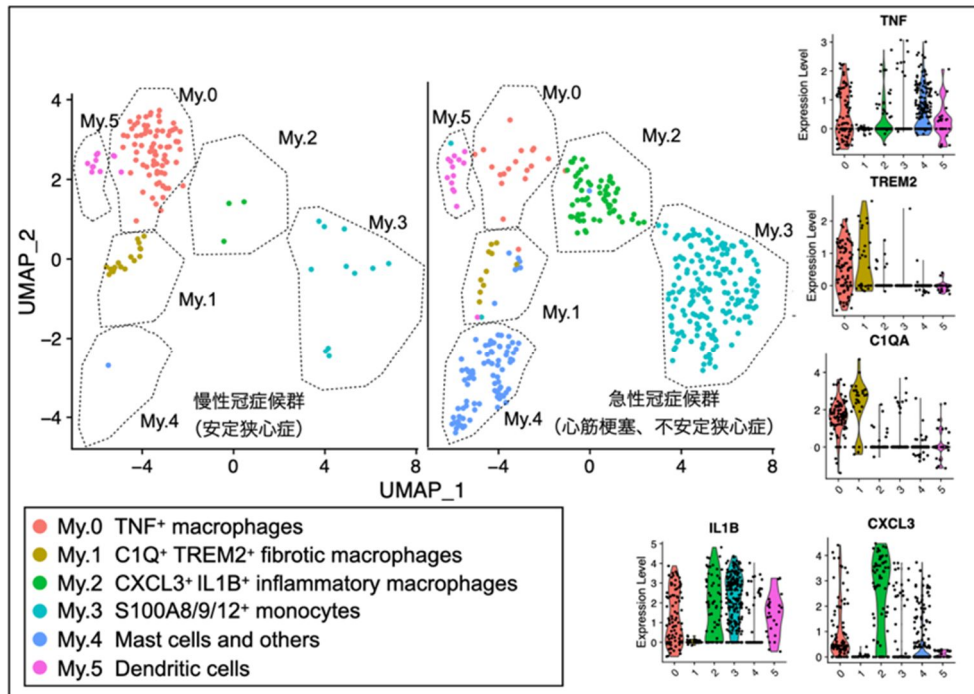
Humanで得られた結果をもとにその因果関係を証明するため、抗IL1B抗体(Bio X Cell, BE0246)、CXCR2阻害薬(R and D, SB225002)、抗CD40LG(Bio X cell, BE0017)を用いたプラークの安定化また退縮効果をこのマウスモデルを用いて判定した。早期短期間での治療を想定して、普通食に戻して、Day1、4、7日目にhigh doseを投与し、4週間後に動脈硬化を評価するプロトコールを採用した。

### 4. 研究成果

#### 1. 急性冠症候群を発症するプラークの特徴

冠動脈疾患患者のDCAで切除したプラークをscRNAseqで解析した。Myeloid cellにフォーカスして解析したところ、Myeloid cellの分画において、単球、マクロファージ(M $\phi$ )、樹状細胞、肥満細胞を認めた。M $\phi$ の分画はそれぞれの特徴的な遺伝子発現から、TNF $^+$ M $\phi$ 、C1Q $^+$ TREM2 $^+$ fibrotic M $\phi$ 、CXCL3 $^+$ IL1B $^+$  inflammatory M $\phi$ の3つに分けられた。慢性冠症候群(安定狭心症)と急性冠症候群(急性心筋梗塞、不安定狭心症)のプラークを比較すると、IL1Bを強く発現するのは、単球とCXCL3 $^+$ IL1B $^+$  inflammatory M $\phi$ であり、いずれも慢性冠症候群では認めず、急性冠症候群でのみ認めるものであった(図1)。

2017年にCANTOS trialにおいて、心筋梗塞後、かつ高感度CRP2mg/L以上の症例において、抗IL1B阻害薬カナキマブを3ヶ月に1回ずつ継続して投与すると、4年間の観察期間内の心筋梗塞・脳卒中・心血管死亡率は低下させることが報告されている[3]。現在のところその費用対効果が悪いと見られ、FDAの決断で抗IL1B阻害薬カナキマブは臨床での使用は許可されていないが、本結果は、この臨床研究の結果を裏付けるものであった[4]。



**図1. 冠動脈プラークの骨髄球系細胞のシングルセルRNAシーケンス解析**  
慢性冠症候群と急性冠症候群での細胞分画の違いを調べたところ、CXCL3+IL1B+ inflammatory Mφ、S100A8/9/12+ monocytes、Mast cell and othersの3つの細胞集団は急性冠症候群でのみ認められる集団であった。

前述の CXCL3+IL1B+ inflammatory Mφ については、マウスでもこの population に似た inflammatory Mφ の存在が報告されている[5, 6]。CXCL3+IL1B+ inflammatory Mφ の function を cancel するために抗 IL1B 抗体と CXCL3 の受容体である CXCR2 阻害薬の 2 剤を同時に投与すると、動脈硬化の進展を食い止めることができる可能性を示すことができた(図2)。実際の冠動脈プラークから得たデータを元に仮説を組み立てているため、マウスでの研究の結果はそのままヒトのデータの解釈につながり、臨床的意義は大きい。しかし2剤をヒトの治療へ使うというのは費用対効果や副作用の面であまり有用とは言い難い。そこで、本研究はなぜこのような細胞集団が出現してきたかを明らかにする計画を進めていく方向で考えており、シングルセル ATAC シーケンスを併用することでエピジェネティクスからの介入の可能性を解明すること、また Clonal hematopoiesis との関連を明らかにしたいと考えている。

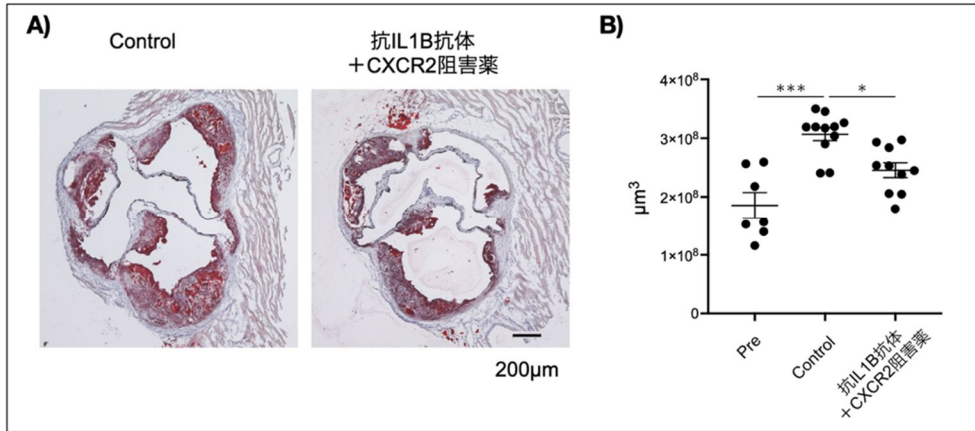


図2．抗IL1β抗体とCXCR2阻害薬が動脈硬化プラークに与える影響

方法の通り示したタイムコースで、LDL受容体欠損マウスに8週間高脂肪高コレステロール負荷した後に、抗IL1β抗体とCXCR2阻害薬を投与した時の大動脈基部における動脈硬化形成を評価。

A) 大動脈基部オイルレッドO染色した、代表的な写真を示す。

B) 動脈硬化を100μm毎に6連続切片で評価し、そのAUCを比較した。(Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test)

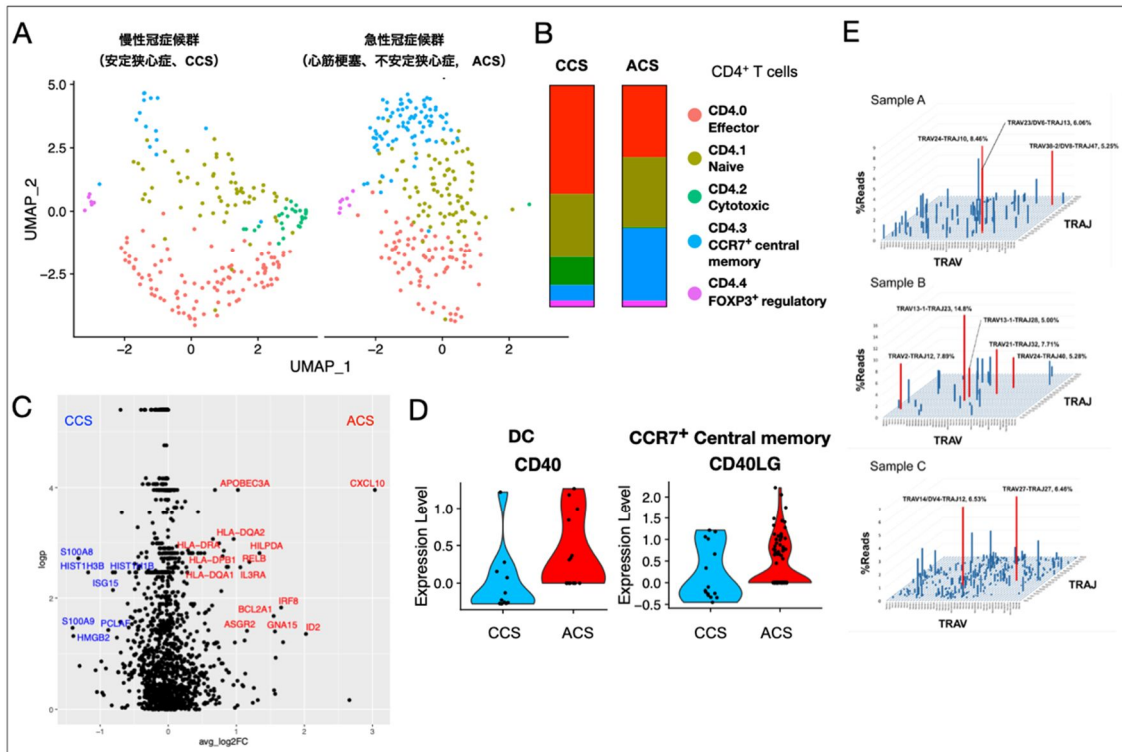


図3．冠動脈プラークのCD4陽性T細胞のシングルセルRNAシーケンス解析と樹状細胞との関係

A) 慢性冠症候群(CCS)と急性冠症候群(ACS)でのCD4陽性T細胞の細胞分画の違いを示す。

B) それぞれの細胞集団の比率を示す。

C) 樹状細胞におけるCCSとACSでの遺伝子発現の違いをvolcano plotで表示した。

D) DCからのCD40、CCR7 central memoryからのCD40LGの発現が共にACSで高かった。

E) ACSプラークにおける、バルクレパトア解析。3サンプルでclonal expansionを確認した。

続いて、DCAの解析においてCD4陽性T細胞に着目すると、5つのsub-cluster、Effector、Naïve、Cytotoxic、central memory、Regulatory CD4陽性T細胞が存在し、急性冠症候群の

プラークでのみ central memory CD4<sup>+</sup>T 細胞が集積していることが分かった。また、樹上細胞において HLA-DR, DQ, DP の発現と合わせて、共刺激分子である CD40 や CXCL10 という T リンパ球を呼び寄せるケモカインの 1 種が急性冠症候群で発現が上昇していた。また、バルクでレパトア解析を行ったところ、Clonal expansion を確認しており、何らかの抗原に反応していることが判明した [7]

樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞との相互作用に着目し、CD40LG に対する抗体治療が、動脈硬化を安定化させる作用もあるのではないかと考えており、動脈硬化退縮マウスで CD40LG 中和抗体の投与を行い、プラーク安定化、退縮作用を調べることにした。結果は、現在のところ、動脈硬化の進展を食い止める作用は CD40LG 抗体にはなかった。

#### <引用文献>

- 1) Kita T, Yamashita T, Sasaki N, Kasahara K, Sasaki Y, Yodoi K, Takeda M, Nakajima K, Hirata K. Regression of atherosclerosis with anti-CD3 antibody via augmenting a regulatory T-cell response in mice. *Cardiovasc Res.* 2014;102(1):107-17. doi: 10.1093/cvr/cvu002.
- 2) Nakajima K, Yamashita T, Kita T, Takeda M, Sasaki N, Kasahara K, Shinohara M, Rikitake Y, Ishida T, Yokoyama M, Hirata K. Orally administered eicosapentaenoic acid induces rapid regression of atherosclerosis via modulating the phenotype of dendritic cells in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(9):1963-72.
- 3) Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ; CANTOS Trial Group. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017; 377(12):1119-1131.
- 4) Emoto T, Yamamoto H, Yamashita T, Takaya T, Sawada T, Takeda S, Taniguchi M, Sasaki N, Yoshida N, Saito Y, Sivasubramaniyam T, Otake H, Furuyashiki T, Robbins CS, Kawai H, Hirata KI. Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Distinct Immune Landscape of Myeloid Cells in Coronary Culprit Plaques Causing Acute Coronary Syndrome. *Circulation.* 2022; 145(18):1434-1436.
- 5) Kim K, Shim D, Lee JS, Zaitsev K, Williams JW, Kim KW, Jang MY, Seok Jang H, Yun TJ, Lee SH, Yoon WK, Prat A, Seidah NG, Choi J, Lee SP, Yoon SH, Nam JW, Seong JK, Oh GT, Randolph GJ, Artyomov MN, Cheong C, Choi JH, Cochain C et al. Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models. *Circ Res.* 2018 ;123(10):1127-1142.
- 6) Zerneck A, Winkels H, Cochain C, Williams JW, Wolf D, Soehnlein O, Robbins CS, Monaco C, Park I, McNamara CA, Binder CJ, Cybulsky MI, Scipione CA, Hedrick CC, Galkina EV, Kyaw T, Ghosheh Y, Dinh HQ, Ley K. Meta-Analysis of Leukocyte Diversity in Atherosclerotic Mouse Aortas *Circ Res.* 2020; 127(3):402-426.
- 7) Takeda S, Emoto T, Yamashita T, Yamamoto H, Takaya T, Sawada T, Yoshida T, Inoue M, Suzuki Y, Hamana T, Inoue T, Taniguchi M, Sasaki N, Otake H, Ohkawa T, Furuyashiki T, Kawai H, Hirata KI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2024;44(5):1135-1143.

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda Shintaro, Emoto Takuo, Yamashita Tomoya, Yamamoto Hiroyuki, Takaya Tomofumi, Sawada Takahiro, Yoshida Takeshi, Inoue Masatoshi, Suzuki Yuya, Hamana Tomoyo, Inoue Taishi, Taniguchi Masayuki, Sasaki Naoto, Otake Hiromasa, Ohkawa Takenao, Furuyashiki Tomoyuki, Kawai Hiroya, Hirata Ken-ichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Single-Cell RNA Sequencing Reveals an Immune Landscape of CD4 T Cells in Coronary Culprit Plaques With Acute Coronary Syndrome in Humans	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 1135-1143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.123.320409	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 江本拓央
2. 発表標題 急性冠症候群を発症した冠動脈プラーク内免疫細胞のシングルセル解析
3. 学会等名 第50回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 江本拓央
2. 発表標題 急性冠症候群を発症する冠動脈プラーク免疫細胞の特徴
3. 学会等名 NGS EXPO 2022
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Takuo Emoto
2. 発表標題 Immune Cell Landscape of Coronary Culprit Plaques Causing Acute Coronary Syndrome.
3. 学会等名 CSC Joint Sessions-the 24th Congress of the Chinese Society of Cardiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 江本拓央
2. 発表標題 Difference between ACS and CCS culprit lesions: Lessons from Single cell RNA Sequence Analysis
3. 学会等名 日本循環器学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江本拓央
2. 発表標題 シングルセル解析で解き明かすプラーク不安定化メカニズム
3. 学会等名 動脈硬化学会
4. 発表年 2024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

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