

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 6 年 4 月 24 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 神戸大学大学院医学研究科
職 名 医学研究員
研究代表者 江本 拓央

下記のとおり令和4年度の共同研究成果を報告します。
記

(課題番号:)

1. 共同研究課題名	大動脈弁狭窄症を引き起こすマクロファージのエピゲノム制御を 1 細胞レベルで捉える。		
2. 共同研究目的	大動脈弁狭窄症は、大動脈弁が狭小化することによって、収縮期の左室から上行大動脈への血流が妨げられる病態であり、高齢化社会において増加し続けている。大動脈弁に存在する常在性マクロファージ、動脈硬化に起因する石灰化を誘導するようなマクロファージなどの存在、そのエピゲノム制御を捉え、また平滑筋や弁の支持組織がどのように変化しているのか、実際のヒト疾患サンプルで捉えることで治療標的を見出したい。		
3. 共同研究期間	令和 5 年 4 月 1 日 ~ 令和 6 年 3 月 31 日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属等	職名等	役割分担
(研究代表者) 江本 拓央	神戸大学大学院医学研究科 循環器内科学分野	医学研究員	研究の実施
(分担研究者) 山下 智也	神戸大学 イノベーション研究科 先端医療学分野	准教授	研究の統括
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	代謝エピジェネティクス分野	氏 名 稲垣 毅 教授

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

大動脈弁狭窄症は大動脈弁が狭小化することによって左室から上行大動脈への血流が妨げられる病態であり、高齢化社会において、増加し続けている。そのメカニズムは、動脈硬化を基盤、大動脈弁が肥厚硬化するが、狭窄へと進行することにある。現在のところ、狭窄度が進行し、失神や心不全症状の出現があれば、外科的もしくは経カテーテル的大動脈弁置換術の適応になるが、有効な薬物治療は存在しない。弁置換術の適応となった、ヒト大動脈弁狭窄症患者の大動脈弁とコントロールとして大動脈弁閉鎖不全症の大動脈弁をシングルセル比較する。現在シングルセル解析の問題点として、細胞の形態やその性質上シングルセル化することが難しい場合が多く存在することが言われている。細胞から核のみを抽出することで、満遍なくどの細胞も収集できる、single nuclear RNA seq (snRNAseq) を行うことで1細胞化の難しい細胞の情報を得ることができると報告されている。ただ、弱点もあり、核内の情報に限られてしまうため、細胞質中の RNA の情報が失われてしまう。また、核の状態で特定の細胞集団をとってることができず、細胞集団を限定して sorting することが難しい。免疫細胞があまり多く含まれない組織において、免疫細胞を解析することが困難となる。

そこで、免疫細胞については、コラゲナーゼ処理を行い、CD45 陽性細胞として FACS sorting して集めてきた細胞集団について scRNAseq を行い、また、サンプルの同部位を冷凍処理し、全体の情報そして epigenome 制御を解明するためにシングル核 RNA+ATAC シークエンスを計画した。epigenome の解釈について申請者は解析の経験がないので、共同計画としてアドバイスを頂く予定とした。

7. 共同研究の成果

まずは、免疫細胞のシングルセル解析を行った。弁置換術の適応となった、ヒト大動脈弁狭窄症患者 (AS) の大動脈弁 9 例とコントロールとして大動脈弁閉鎖不全症 (AR) の大動脈弁 4 例を組織学的に比較、その後シングルセル RNA シークエンス比較解析を行った。

AS と AR の代表的な写真を見るとその厚さや層構造に大きな違いが見られ、組織学的な解析においては、AS において石灰化の周囲には CD68 陽性のマクロファージの集積を認めた。一方、AR の大動脈弁サンプルでは、CD68 陽性のマクロファージがまばらに認められ、その分布に大きな違いが認められた (図 1)。

CD45 陽性の免疫細胞をソーティングし、シングルセル解析を行い UMAP を描くと、一番多く認められたのは T 細胞で、その次に Myeloid 細胞がくるという順番であった。B 細胞は小さな細胞集団であった (図 2)。

Myeloid 細胞をさらに解像度を上げて UMAP を描くと、マクロファージの細胞集団は My.0 LYVE1 resident macs、My.1 Inflammatory macs、My.2 C1Q resident like macs、My.3 TREM2 macs、My.4 Classical monocytes、My.5 DCs、My.6 MregDCs と 7 つの細胞集団に分けることができた。興味深いことに AS では、My.0 LYVE1 resident macs が減少し、逆に My.2 C1Q resident like macs、My.4 Classical monocytes が増加するという特徴を得ることができた。Monocyte の浸潤は急性冠症候群でも認めた所見であり、動脈硬化性疾患の病態に深く関わっていると考える (図 3)。

さらには、My.0 LYVE1 resident macs の減少は特徴的であり、GO 解析では、Cargo receptor activity や Scavenger receptor activity が集積しており、個別の遺伝子発現では、COLEC12、MRC1、DAB2 の発現が特徴であることが証明された。この resident macrophage が減少することは Scavenger 作用の減弱が病

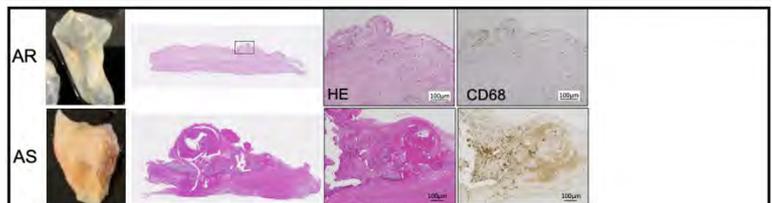


図1 AS、ARの代表的な写真と、HE染色、CD68染色

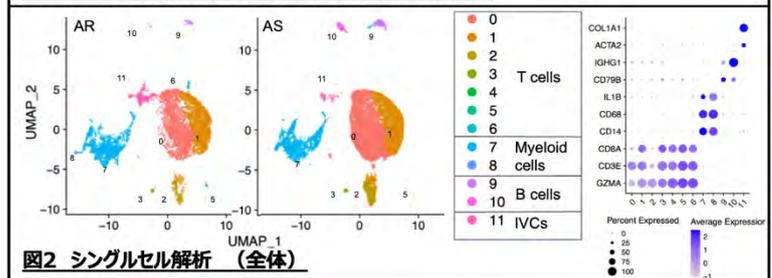


図2 シングルセル解析 (全体)

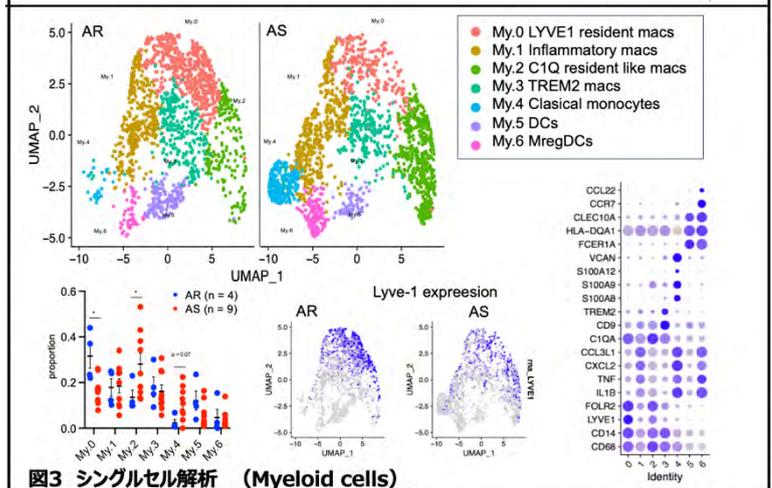


図3 シングルセル解析 (Myeloid cells)

態に関わっていることが示唆される所見であった。さらには、ARとASでMy.1 Inflammatory macs 同士の遺伝子発現を網羅的に比較した場合、ASにおいてIL1Bの発現が上昇していることがあり、より炎症が強いことが示唆された(図4)。

最後にT細胞の解析において特徴的にみられたのは、NK細胞がASでのみ観察された(図5)。NK細胞は動脈硬化を悪化させる報告に働くという報告はあるものの実際にASにどのような作用機序を持つかについては、知られていない。

シングルセルRNA解析から、AS症例ではAR症例と比べ、スカベンジャー機能を有するレジデントマクロファージの割合が減少する一方、単球が多く浸潤していることが分かった。またNK細胞の集積を認めた。病理学的所見からは、AS症例の石灰化周囲にマクロファージの集積が見られ、マクロファージ機能への介入は、大動脈弁狭窄症に対する今後の新たな治療ターゲットになりうる。

しかし、残念ながら、冷凍した組織からシングルセルRNA+ATACシーケンスを行う計画を立て、核を露出して、回収を試みたが、ASサンプルの特性として、石灰化があり、ATACシーケンスに回すことができなかった。核回収のキットとして、1 OX Chromium Nuclei Isolation with RNase Inhibitor (1000494)やMinute™ Single Nuclei and Cytosol Isolation Kit for Adipose Tissues/Cultured Adipocytes (AN-029)など様々な手法を試みたが、うまく核の露出ができず、ATACシーケンスを行うことができなかった。

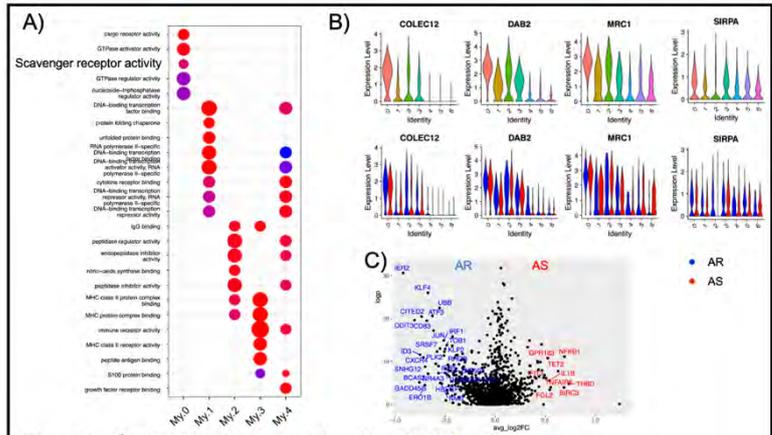


図4 シングルセル解析 (Myeloid cellsの機能解析)

A, GO解析 B, 各clusterのscavenger receptorの発現とその比較 C, My.1におけるDEG Volcano plot

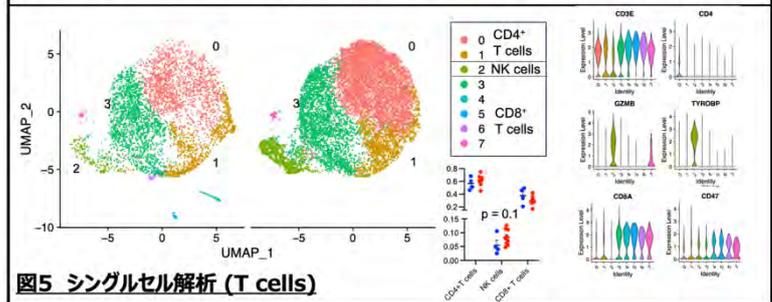


図5 シングルセル解析 (T cells)

8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り記載してください。なお、論文の場合は、PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@jimu.gunma-u.ac.jp

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文
なし

②この共同研究に基づくとの記載のある論文
なし

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名, 開催日, 演題)
日本循環器学会総会、2024年3月9日、Intense Impact of Immune Cells on Aortic Valve Stenosis.

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)
シングルセル ATAC シーケンスの方法論や解釈の仕方についてメールなどのやり取りで意見交換を行った。