シングルセル・分子病理解析から紐解く大動脈解離発症機序の解明

柳沢裕美

筑波大学生存ダイナミクス研究センター

【研究の背景】

大動脈解離は、大動脈の内膜亀裂により血液が中膜に流入し、解離により大動脈破裂や臓器灌流不全をひき起こす疾患で、病院到着前死亡は約 6 割と極めて高い¹⁾。マルファン症候群 (MFS) や MFS 類縁疾患においては若年突然死の原因である。MFS の原因遺伝子は、細胞外基質 ECM である fibrillin-1 (FBN1) をコードする *FBN1* 遺伝子である。FBN1 はミクロフィブリルとよばれる弾性線維の足場タンパクの主要成分であり、血管壁の構築と維持に関与することが知られている。しかし、特定の時期に再現性を持って解離を自然発症する大動脈解離マウスモデルは報告されていない。

【目 的】

本研究では、我々が独自に作製した自然発症の大動脈解離 (AD) マウスを用いて、炎症性単球や近年報告された MAC^{AIRs} などの血管内膜在住マクロファージと内皮細胞 (内皮細胞) との相互作用を分子病理解析により検証し、シングルセル解析を用いて解離誘発因子の同定を試みる。解離の発症機序を理解し、解離予防と治療につなぐ基盤を確立することを目的とする。

【方 法】

家族性大動脈解離患者から同定した、細胞外基質 FBN1 遺伝子の新規ミスセンス変異をゲノム編集法を用いてマウスに導入し、ヒトと同じ大動脈解離を再現性よく自然発症する AD マウスを確立した (投稿準備中)。AD マウスを用いて、大動脈解離の発症前 (生後 3 週齢) と発症後 (生後 5 週齢) の大動脈組織切片を作製し、病理解析 (Hematoxylin and Eosin 染色、Hart's 染色、免疫蛍光染色) を行った。解離前の外膜集積細胞、内膜上のモノサイト/マクロファージ様細胞、亀裂の形成とともに中膜に浸潤するマクロファージの性状を解析した。野生型と AD マウスの上行大動脈の En face 標本作製し、VE-cadherin、CD45 による染色を行い、内皮細胞の形態と血流に対する配向を観察した。さらに、3 週齢と 5 週齢の上行大動脈 (n=3-4/genotype) を採取し、FACS 用に調整した。7-ADD による死細胞除去後、10x Genomics によりライブラリーを調整し、Seurat (R-package) を用いてシングルセルレベルの遺伝子発現解析を行った。

【結 果】

① 解離前 (生後 3 週齢) と解離発症後 (生後 4~5 週齢) の大動脈における炎症細胞の分子病理解析

解離前の内皮細胞を En face 染色で観察したところ、野生型 (WT) 内皮細胞は血流に沿って配向するが、AD 内皮細胞は配向障害を示し血流センシング異常が示唆された。また、CD45⁺陽性細胞が内皮細胞上に多数認められ、3D surface rendering による観察では、CD45⁺細胞が内皮細胞から潜り込むような画像が得られた。これらは CD68⁺;MHCII⁺細胞で、M1 マクロファージの前駆細胞と考えられた。また、ICAM-1 や VCAM-1 の細胞接着因子の発現が内皮細胞で増加している所見が得られた。5 週齢で内膜~中膜にかけて亀裂が進行している病変部では、Lyc6⁺細胞 (炎症性単球) が亀裂部から中膜に入り込んでいる所見が見られた。CD206⁺;F4/80⁺マクロファージは血管外膜に集積しており、M2 マクロファージと考

えられた。M2 マクロファージの外膜からの血管侵入像は認められなかった。

② シングルセル RNA 解析による解離特異的なシグナルおよび細胞群の同定

5 週齢のシングルセル RNA 解析の結果、モノサイト/マクロファージクラスターが AD マウスで増加していた。このクラスターをさらに feature plot で解析したところ、モノサイト(Ccr2+, Plac8+)、外膜 M2 マクロファージ(Lyve1+, Fcrl2+)、内膜在住マクロファージ(Cxcl16+, Cd72+)のサブクラスターが存在していることがわかった。さらに、AD マウスに特異的な平滑筋細胞クラスターを発見した。AD 特異的平滑筋細胞では、Col4 や HSPG2、ラミニンなどの基底膜 ECM の発現を認めた。このクラスターでは、ECM organization、 cell-cell junction などに分類される遺伝子の変動が観察された。

【考 察】

本研究から、ヒトの大動脈解離を再現した AD マウスモデルを確立した。この AD マウスの病理組織の観察から、解離発症前に内膜亀裂(intimomedial tears)が生じていることがわかった。またその背景には、内皮細胞のメカノセンシング異常と内皮細胞の活性化、および骨髄モノサイト由来の M1 マクロファージの内膜への浸潤が関与しているものと思われた。また、M2 マクロファージは外膜に局在し、大血管への浸潤は認められなかった。さらに、AD 特異的平滑筋細胞クラスターを同定した。この平滑筋細胞群では、基底膜 ECM の発現が増加しており、内皮細胞から平滑筋細胞への内皮間葉転換か、あるいは平滑筋細胞から内皮細胞への間葉内皮転換が起きて解離を進行させている可能性もある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本邦における大動脈解離の発症頻度は 15.8 人/10 万人²⁾と報告されているが、発症前の自覚的症状に乏しく、発症すると急速に進行し生命を脅かす。本研究では、解離初期の分子病理変化を捉えたことで、内皮細胞のメカノセンシング異常による活性化と、炎症細胞の大動脈への浸潤を捉えることができた。さらに、異常な平滑筋細胞の出現が、解離の進行を促進している可能性も考えられた。これらの知見から、大動脈解離の発症機序に迫ることで、今後さらに介入ポイントを同定できる可能性が高い。突然死につながる解離の発症や進行を止めることにより、患者と家族の生活の質を向上することができる。その結果、医療費を抑えることも可能となる。

【参考・引用文献】

1: 2020 年改訂版 大動脈瘤・大動脈解離診療ガイドライン.

2: Higo Y, Sawayama Y, Takashima N, Harada A, Yano Y, et al. *Circulation J*. doi:10.1253/circj.CJ-22-0759.