

2024年度 交流助成 成果報告（海外留学）



氏名 清水 寛平

留学先 Yale University, New Haven, CT, USA
Department of Biomedical Engineering

留学期間 2024年7月1日～2025年5月31日

1. 留学中に実施した研究テーマ

私が本期間に主たる研究者として携わったプロジェクトは、動脈瘤病変における血行力学ストレス依存的な遺伝子発現・シグナルカスケードの時間的・空間的变化の解明である。

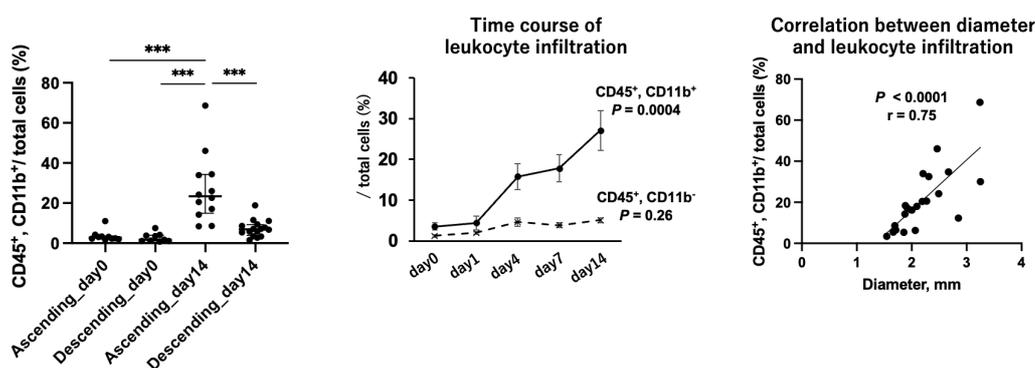
2. 留学期間中の研究成果

近年、細胞ごとの遺伝子発現解析が進むにつれて、従来の形態学での分類では明らかにされてこなかった細胞分類が進んでおり、注目されてきている。また病変部では、健常組織にはない細胞種の出現や、組織中の細胞構成が時間的・空間的にダイナミックに変化し、病態形成に関わっている。動脈瘤病変では、健常時・病初期の中膜平滑筋細胞主体の細胞構成から、病気の進行につれて外膜線維芽細胞や炎症細胞主体の細胞構成に変化し、血行力学ストレスの受け手も徐々に交代する。この過程において、血行力学ストレスに応じた病変部細胞での遺伝子発現・シグナルカスケードの変化の詳細は未解明である。今回、血行力学ストレスの上昇にともなって病変部へ浸潤する炎症細胞に着目し、第一に炎症細胞自体の遺伝子発現の多様性や病気の進行前後での変化を明らかにすることを目的とした。さらに、病変部に浸潤した炎症細胞が、その他の病変構成細胞との細胞間ネットワークを介して、動脈瘤病態をどのように制御しているかを解析することを最終目標とした。本プロジェクトにつき、以下のような進展がありました。

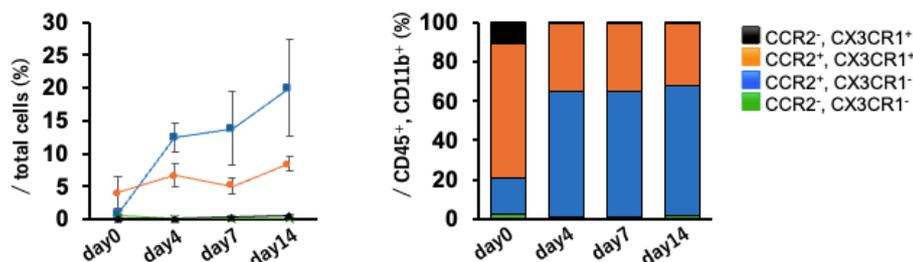
① マウスモデルの樹立

マウスの上行大動脈に発生する動脈瘤モデルは、以前より複数報告されてきた。しかし、炎症を生じるまでの期間が非常に長いことや、炎症の程度が軽度であること、病態を促進させるために投与した薬剤自体が炎症細胞の表現型を強く変えてしまうことなど、モデル動物としての様々な課題があった。これらの課題を克服するために、我々は8週齢のマルフアン症候群のマウスモデル(Fbn1^{C1041G/+})に、高血圧誘導（血管収縮剤であるL-NAMEと高塩分食の投与）を行うことで、高血圧誘導開始(day0)より短期間(4日以内)に血行力

学ストレス依存的に炎症を惹起することに成功した。また、炎症反応は病変が発生する上行大動脈に特異的で、炎症の程度が病変の増大とよく相関することを本モデルで示した。病変部に浸潤している炎症細胞の大部分がマクロファージ(CD45⁺, CD11b⁺)であったため、以降の解析ではマクロファージを主体とした病態形成に着目することとした。



病変部マクロファージの多様性と病態進行に伴う各分画の割合を明らかにするために、マクロファージをさらに細分化するマーカー (CCR2, CX3CR1, および Lyve1) にてフローサイトメトリーを試行し、CCR2 陽性・CX3CR1 陰性 (・Lyve1 陰性：データ非表示) のマクロファージ分画が病変進行時に増加しているが明らかとなった。



CCR2⁺, CX3CR1⁻ cells are the major population among the infiltrated leukocytes

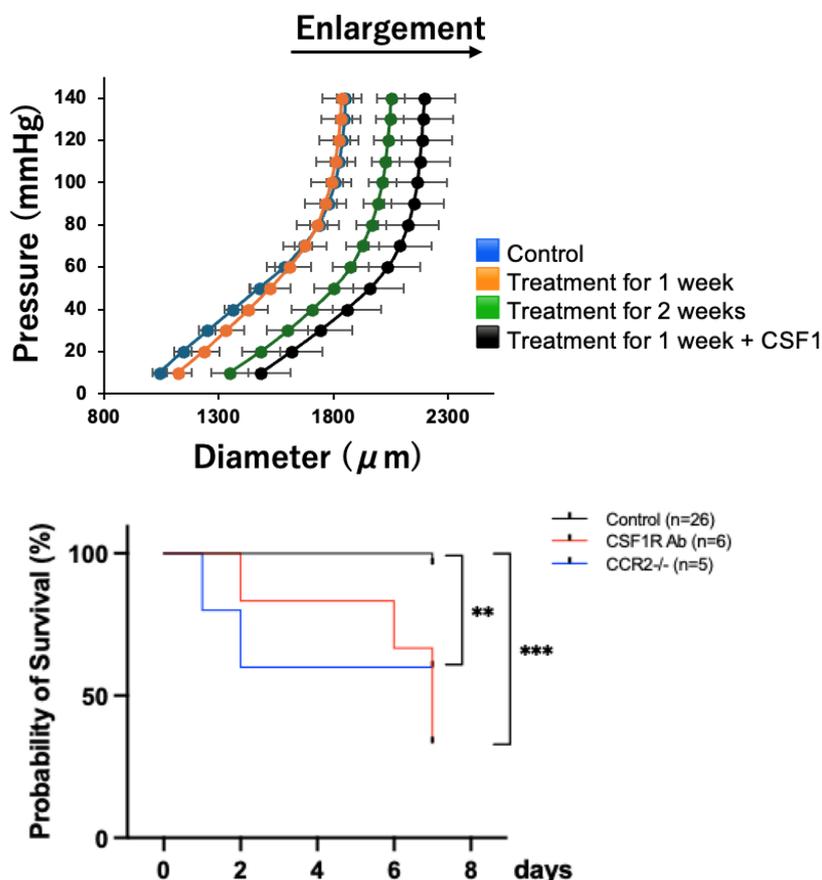
② マクロファージを介した病変表現型の解析

本モデルを用いて、動脈瘤の進行にマクロファージがどのように関与しているかを解析した。血行力学ストレスの上昇に対する、急性期から亜急性期 (1-2 週間以内) の病態にフォーカスした場合、以下のどちらかが仮説として妥当であると考えた。

- (A) マクロファージは炎症反応を介して、血管壁強度の低下を引き起こし、さらなる病態の悪化を引き起こす
- (B) マクロファージは損傷した血管壁の修復を促し、病態抑制的に働く (つまり仮説(A)の逆)

この仮説検証のために、マクロファージのコロニー刺激因子である①colony stimulating factor (CSF)1 の投与、およびその受容体の阻害作用を持つ②抗 CSF1 受容体抗体の投与を

実施した。当初、これらの実験では反対の表現型（一方で増大や破裂の促進、もう一方で増大抑制）を予想していたが、結果は予想に反して、CSF1の投与で病変の増大（破裂なし）、抗CSF1受容体抗体の投与では病変の破裂が促進される結果であった。さらに、病変部に浸潤していたマクロファージの多数がCCR2（マクロファージの遊走因子であるCCL2の受容体）陽性であった結果をふまえて、本モデルマウスをCCR2ノックアウトマウスと交配させ、③Fbn1^{C1041G/+} ; CCR2^{-/-}マウスでも生存解析を実施した。③のマウスでは、マクロファージの遊走阻害（病変部マクロファージの数の減少）が期待されるが、このマウスでの生存解析では②の実験と類似した結果（破裂の促進）が得られた。本解析は現在、データ数を増やし、さらに解析の精度を上げているところである。現時点までの結果より、血行力学ストレスの上昇に伴い病変部に浸潤したマクロファージは、単純に病態を促進・抑制の単軸での役割を担うものではなく、病変部微小環境に応じて遺伝子発現パターンを変化させて、組織修復・増大・破裂などのアウトカムの方角性を規定する、と仮説を修正した。



3. 今後の研究計画

本プロジェクトの最終的な目的達成のために、先述した介入実験のグループごとに single-cell RNA-seq を実施し、各表現型で優位に働いているマクロファージ分画を明らかにする

予定である。さらに、病変部におけるマクロファージの数・表現型・空間分布、さらに血管壁線維芽細胞や平滑筋細胞などの他の細胞種との細胞間コミュニケーションを明らかとし、各群の表現型の違いを説明する遺伝子発現・シグナルカスケードを解析する。最後に、破裂につながると考えられシグナルカスケードの抑制による、動脈瘤の新規治療を探索する予定である。

4. その他と謝辞

今回の留学期間中の研究経験を通じて、血行力学ストレスと炎症反応の関連について洞察を深めることができました。特に、“細胞の多様性”という比較的新しく、今後さらなる発展が期待される概念について学び、実際の病気の表現型の多様性ともリンクさせて、病気を多面的に捉えるきっかけを得ることができました。この度の経験をもとに、今後も引き続き本領域の研究を発展に寄与するよう努めて参ります。

最後になりましたが、この度の海外留学で得られた大変貴重な経験をサポートして下さった貴財団に心より御礼申し上げますとともに、貴財団の今後益々のご発展をお祈り申し上げます。



ラボの同僚たち