

「腹部大動脈瘤において形成される Tertiary lymphoid structure (3 次リンパ組織)の役割  
解明」

神戸大学大学院医学研究科 内科学講座循環器内科学分野

江本 拓央

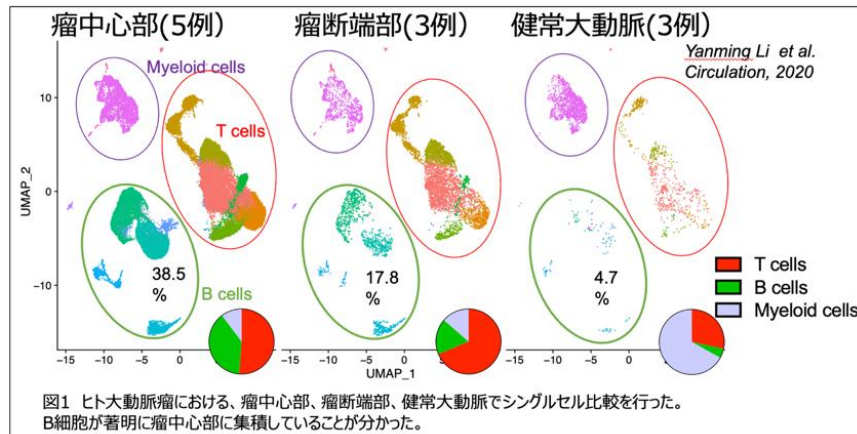
1 研究の背景と目的

腹部大動脈瘤は、不明の原因により壁の局所的脆弱化から拡張をきたす疾患であり、無症状のうちに数年の経過で瘤径の進行性拡大、ひいては破裂をきたす。いったん破裂すると半数以上の患者が突然死の転機を取る。腹部大動脈瘤の現在の治療方針としては、5cm に至れば手術適応とされている。それ以下の小さい大動脈瘤については、経過観察となり、喫煙者であれば禁煙、高血圧患者であれば、降圧療法が行われるが、十分なものではなく、瘤径の拡大を確実に抑制できる内科的治療法は存在しない。

申請者はトロント大学に 2017 年から 3 年間留学経験があり、その際に、タバコ大動脈瘤モデルの確立に携わった。冠動脈疾患などの動脈硬化性疾患と腹部大動脈瘤では、脂質異常症、高血圧などのリスクファクターがオーバーラップしているが、糖尿病がリスクにならないこと、また男性、年齢、喫煙がより、腹部大動脈瘤の強力なリスクファクターである点が特徴である。そこで、腹部大動脈瘤患者の実に 90%が喫煙者であることに事実に着目し、アポリポプロテイン E 欠損 (Apoe<sup>-/-</sup>) マウス (動脈硬化モデルマウス) に高脂肪食を負荷し、タバコの煙に 1 日 2 回暴露させることで、臨床に近い腹部大動脈瘤モデルマウスの作成に成功した。タバコの煙に暴露させると Apoe<sup>-/-</sup>マウスに高脂肪食を付加しただけでは、なかなか形成されなかった腹部の動脈硬化粥腫が形成され、その動脈硬化粥腫と一致して瘤が形成され、動脈硬化が直接的に瘤の原因になっていることを証明した。さらにはシングルセル解析を駆使し、ヒトにおいてもマウス大動脈瘤モデルにおいても大動脈瘤に TREM2 陽性マクロファージが存在し、その遺伝子発現の特徴から、大動脈瘤へ悪影響を及ぼす細胞集団であることを突き止めた。さらには TREM2 をノックアウトしたマウスの骨髄を動脈硬化モデルマウスに移植し、タバコ負荷をすると瘤形成に保護的に働くことを証明した(Thayaparan D, **Emoto T (corresponding author)**. *Nature Immunology*. 2025. 26(5):706-721.202)。

さらに、神戸大学においてヒトの腹部大動脈瘤で人工血管置換術適応となった患者について、瘤中心部と其中枢側で断端に近い組織を採取し、コラゲナーゼ処理、FACS ソーティングで CD45 陽性細胞を回収し、10X Chromium にてシングルセル化し、解析を行った。1、瘤中心部(5 例) 2、瘤中枢側断端部(3 例) 3、健常大動脈 (公開データ 3 例) (Yanming Li et al. *Circulation*.2020 Oct 6;142(14):1374-1388)で比較検討した。全体の細胞の UMAP を描き、annotation を行うとコントロールにおいてはほとんど認めなかった B 細胞が大動脈瘤断端部、中心部ともに著明に増加していることが分かった (図 1)。また、空間的な位置情報を得るために、AKOYA phenocycler システムを用いて多重免疫染色を行ったところ、CD68 陽性の単球マクロファージは内膜側に集積し、CD20 陽性 B 細胞や CD4、CD8 陽性 T 細胞は外膜側に集積していることが分かった。また B 細胞、T 細胞は組織に局在するリンパ節様構造物、Tertiary lymphoid structures (TLS)を形成していると考えら

れた。



## 2 研究方法・研究内容

### 1) 大動脈瘤に存在する T 細胞、B 細胞のシングルセルレパトア解析

腹部大動脈瘤で人工血管置換術適応となった患者について、瘤中心部とその中枢側で断端に近い組織を採取し、コラゲナーゼ処理、FACS ソーティングで CD45 陽性細胞を回収し、10X Chromium にてシングルセル化した。さらには、シングルセルレパトア解析を行った。シングルセルレパトア解析とは、シングルセルレベルで BCR TCR の塩基配列を同定し、clonal な増殖が起こっているのを調べる手法である。

### 2) B 細胞が大動脈瘤形成に及ぼす影響を明らかにする。

B 細胞の大動脈瘤へ与える意義を証明するために特異的に B 細胞を depletion する抗 CD20 抗体 (リツキシマブ) 投与を行った。モデルとしては、神戸大学で以前より使用している、*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスに Western diet を 8 週間投与したのち、アンギオテンシン II を 4 週間持続で infusion する大動脈瘤モデル (Shinohara R and Emoto T et al. Hypertension. 2022 Dec;79(12):2821-2829) を用いた。

### 3) ゲノム解析において、Clonal hematopoiesis with intermediate potential (CHIP) の有無を検索し、免疫細胞に与える影響を調べる。

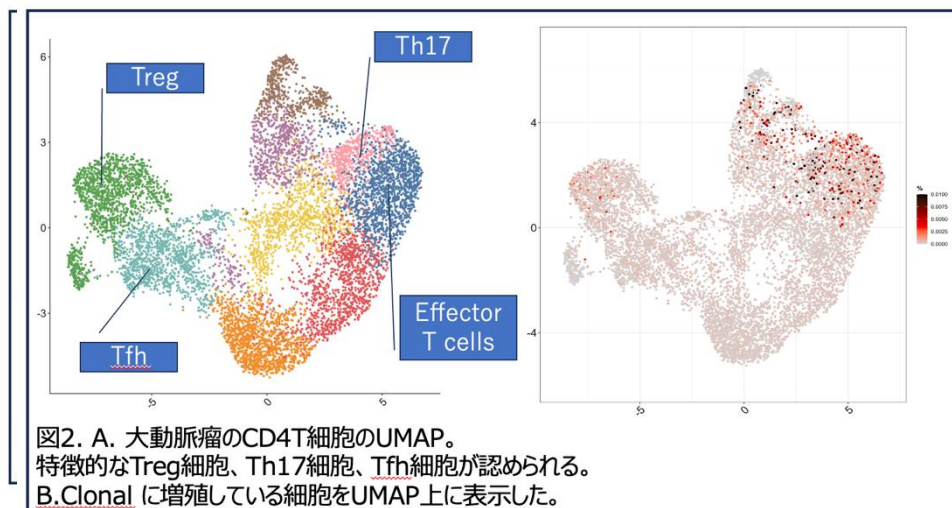
CHIP が動脈硬化初め様々な慢性炎症性疾患に影響を及ぼすことは広く証明されている。中でも、TET 2 の欠損が単球マクロファージに与える影響については、動物実験にて、様々な報告があり、マクロファージからの IL-18 を始めサイトカインの発現が増えることが証明されている。大動脈瘤に関しても CHIP の関与の報告があることが報告された (Yonekawa J et al. JCI 2026 Feb 25:e198708)。

CHIP 陽性の患者に対して病変部のシングルセル RNA シークエンスの情報と merge させる genotyping of transcriptome の手法を用いることで、1 細胞レベルで CHIP 由来の体細胞遺伝子変異を持った細胞かどうかを解析することに成功した。現在 1 サンプルについての解析が終わっている。

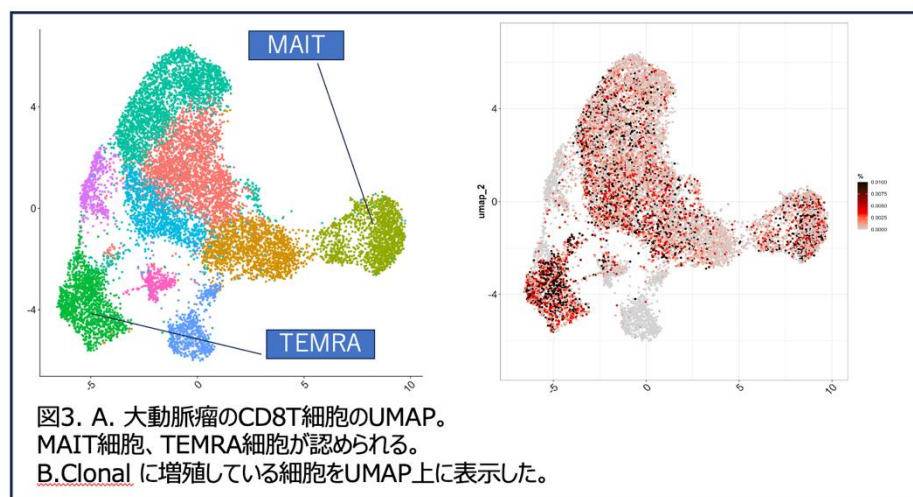
## 3 研究成果

## 1) 大動脈瘤に存在する T 細胞、B 細胞のシングルセルレパトア解析

CD4T 細胞については、他のサンプルとの相違点として、制御性 T 細胞 (Treg 細胞)、follicular helper CD4T 細胞 (Tfh 細胞)、Th1、Th17 細胞が存在することが挙げられる。レパトア解析からは、Th1、Th17 細胞を中心として、clonal に増殖していることが分かった (図 2)。



CD8T 細胞については、TEMRA (T effector memory cells re-expressing CD45RA)、MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) 細胞が認められているのが非常に特徴的である。TEMRA は一般に CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> の細胞集団で、しばしば CD28 低下、KLRG1 上昇、granzyme/perforin 高発現 を伴う終末分化寄りの集団である。MAIT 細胞は半固定 T 細胞受容体を発現し、非古典的抗原提示分子である MR1 を介して、細菌由来のビタミン B2 代謝産物を認識する自然免疫様 T 細胞である。MAIT 細胞の特徴的な点は、その活性化様式にあり、非古典的抗原依存的活性化に加えて、T 細胞受容体非依存的にも活性化される。このため、感染のみならず、慢性炎症環境においても容易に活性化され得る。活性化された MAIT 細胞は、IFN- $\gamma$  や TNF といった炎症性サイトカインに加え、granzyme/perforin を介した細胞傷害活性を示す。MAIT 細胞は自然免疫と獲得免疫をつなぐ存在として、補体系や細胞間相互作用を介した慢性炎症の形成に関与する重要な細胞集団と考えられる。レパトア解析からはこの 2 つの細胞集団が clonal expansion していることが判明し、非常に重要な役割を担っていると考えられる (図 3)。



TLS は、炎症や感染、老化などの刺激によって非リンパ臓器に形成される異所性のリン

パ組織で、局所における免疫応答の起点として機能するもので、この働きについては現在空間トランスクリプトーム解析 Xenium で TLS 内の遺伝子発現を解析することで、その瘤形成に対する役割を明らかにしようと考えている。また、現在免疫ペプチドミクス解析を行い、MHC class 1 class2 が発現するペプチドを解析し、T 細胞、B 細胞を活性化する抗原に迫る研究を行っている。

## 2) B 細胞が大動脈瘤形成に及ぼす影響を明らかにする。

B 細胞の大動脈瘤へ与える意義を証明するために特異的に B 細胞を depletion する抗 CD20 抗体 (リツキシマブ) 投与を行ったが、*ApoE*<sup>-/-</sup> マウスに Western diet を 8 週間投与したのち、アンジオテンシン II を 4 週間持続で infusion する大動脈瘤モデルにおいては、大動脈瘤の発生割合に変化はなかった。

B 細胞には様々な B 細胞が含まれており、IgM を産生する B1 細胞はデブリや死細胞を除去するような方向に働き、動脈硬化保護的な役割を担っている可能性がある。また、IgG を産生する B2 細胞は補体の活性化、マクロファージ活性化の可能性があり、動脈効果が悪化することが報告されている (Pattarabanjird T et al. JACC Basic Transl Sci. 2021 Jun 28;6(6):546-563.)。それらの結果をふまえると、全体の B 細胞を depletion することについては、治療薬とはなりにくいのではないかと考えている。さらなる検討が必要である。

## 3) ゲノム解析において、Clonal hematopoiesis with intermediate potential (CHIP)の有无を検索し、免疫細胞に与える影響を調べる。

血液のゲノム解析から TET2 変異陽性と分かっているサンプルについて、その病変部のマクロファージにおける、TET2 変異陽性細胞と正常の TET2 変異陰性細胞の遺伝子発現の差を調べた。すると IL6 の発現が TET2 変異陽性の細胞で高いなどのことが分かってきた。今後はさらに CHIP 陽性患者の解析を増やして、その影響を 1 細胞レベルで解析したい。また、マクロファージだけでなく、CHIP の T 細胞への影響へも解析を広げていきたい。

## 4 生活や産業への貢献および波及効果

大動脈瘤の形成において、集積している B 細胞や T 細胞について、シングルセル研究でその特徴が分かってきた。今後はさらに研究を進めて、B 細胞 T 細胞の役割、TLS の役割を見出し、大動脈瘤に対する先制医療を確立したい。

また、CHIP 陽性細胞を 1 細胞レベルで解析する技術の開発に成功した。この技術は今後、大動脈瘤の研究だけでなく、CHIP の関わる全ての疾患について大きく役立つと考えている。

本助成金を頂き、上記のように研究を進めることができました。心から感謝申し上げます。