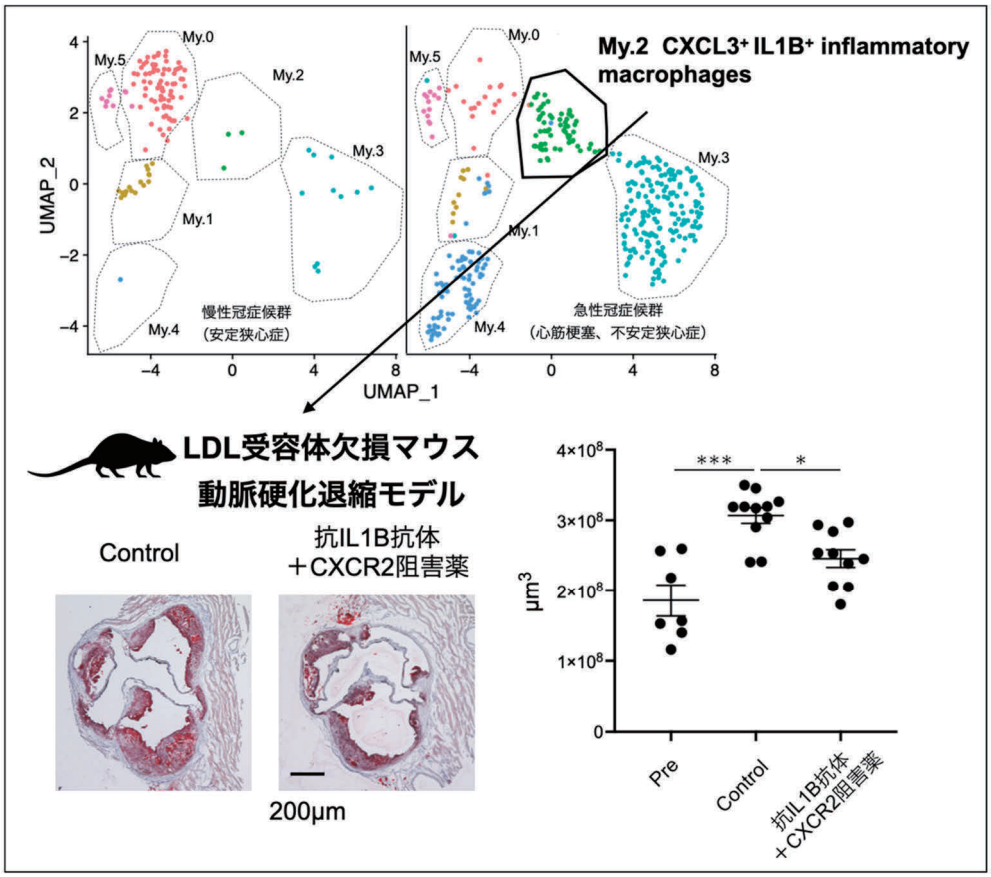
| 159　冠動脈プラークを安定化させる治療法の開発 | 江本　拓央 |
|---|---|

【目的】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。プラークの不安定性をターゲットにした治療法の開発が望まれている。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ることを第一の目標にした。そして、ヒトのデータだけでは、その因果関係が証明できないため、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。

【方法】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）を用いて、プラークの安定化、退縮を評価した。抗 IL1B 抗体、CXCR2 阻害薬、抗 CD40LG 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とした。

【結果】$CXCL3^{+}IL1B^{+}$ inflammatory M$\phi$ の function をキャンセルするために抗 IL1B 抗体と 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。実際の冠動脈プラークから得たデータを基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。炎症性マクロファージ誘導機構を明らかにする計画を進めていく。

ヒト冠動脈症候群で認めた炎症性マクロファージをターゲットした治療法開発



# 159. 冠動脈プラークを安定化させる治療法の開発

江本　拓央

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

Key words：動脈硬化，シングルセル解析，マクロファージ，T 細胞

## 緒　言

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。様々な角度から動脈硬化モデルマウスを使って、動脈硬化予防の研究がなされているが、マウスモデルでは、ACS という病態を再現することができず、プラークの破綻を抑制するという観点からの研究は実施が困難であった。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、ステント治療ではなく、プラークの不安定性をターゲットにした治療法の開発が望まれている。

現在、唯一冠動脈プラークを得ることができる手技である冠動脈粥腫切除術（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、マクロファージや CD4T 細胞の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（結果の項目参照）。ヒトのデータだけでは、特異的に認められた細胞集団がプラークの不安定化に作用するのかその因果関係が証明できないため、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。

## 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（BE0246、Bio X Cell）、CXCR2 阻害薬（SB225002、R &D Systems）、抗 CD40LG（BE0017、Bio X cell）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（図 1）。

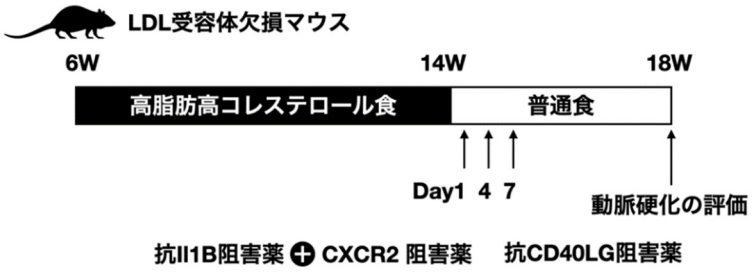



図 1. 実験方法の模式図
LDL 受容体欠損マウスに高脂質高コレステロールを負荷し普通食に変更後に、抗 IL1B 阻害薬や CXCR2 阻害薬にて介入を行った。

## 結果および考察

### 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（Mϕ）、樹状細胞、肥満細胞を認めた。Mϕの分画はそれぞれの特徴的な遺伝子発現から、$TNF^+$ Mϕ、$C1Q^+$ $TREM2^+$ fibrotic Mϕ、$CXCL3^+$ $IL1B^+$ inflammatory Mϕ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 Mϕ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 2）。2017 年に CANTOS trial において、心筋梗塞後，かつ高感度 CRP 2 mg/L 以上の症例において、抗 IL1B 阻害薬カナキヌマブを 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ため、FDA の決断で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］。

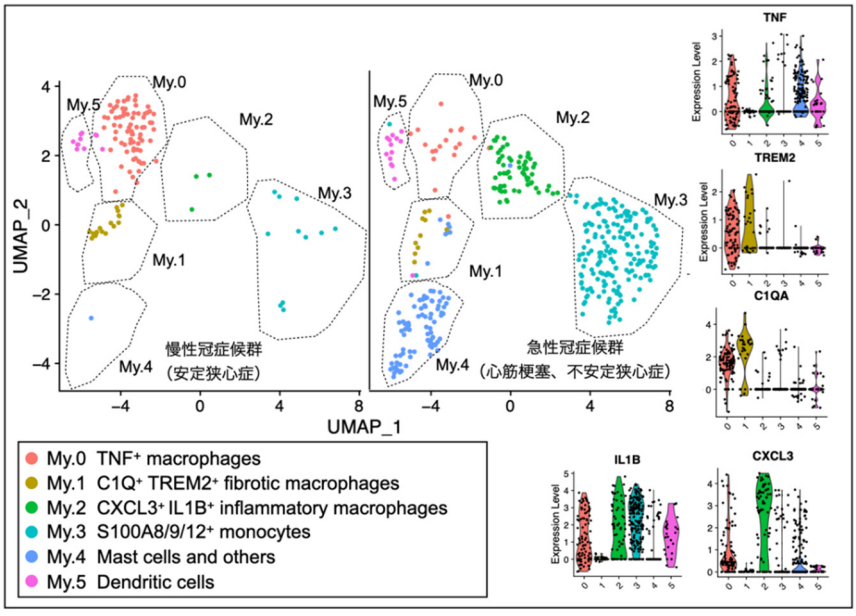



図 2. 冠動脈プラークの骨髄球系細胞のシングルセル RNA シークエンス解析
慢性冠症候群と急性冠症候群での細胞分画の違いを調べたところ、$CXCL3^+$ $IL1B^+$ inflammatory Mϕ、$S100A8/9/12^+$ monocytes、Mast cell and others の 3 つの細胞集団は急性冠症候群でのみ認める集団であることが分かった。

また、CD4 陽性 T 細胞に着目すると、central memory CD4 陽性 T 細胞が急性冠症候群のプラークでのみ集積していることが分かる、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（図 3、論文投稿中）。

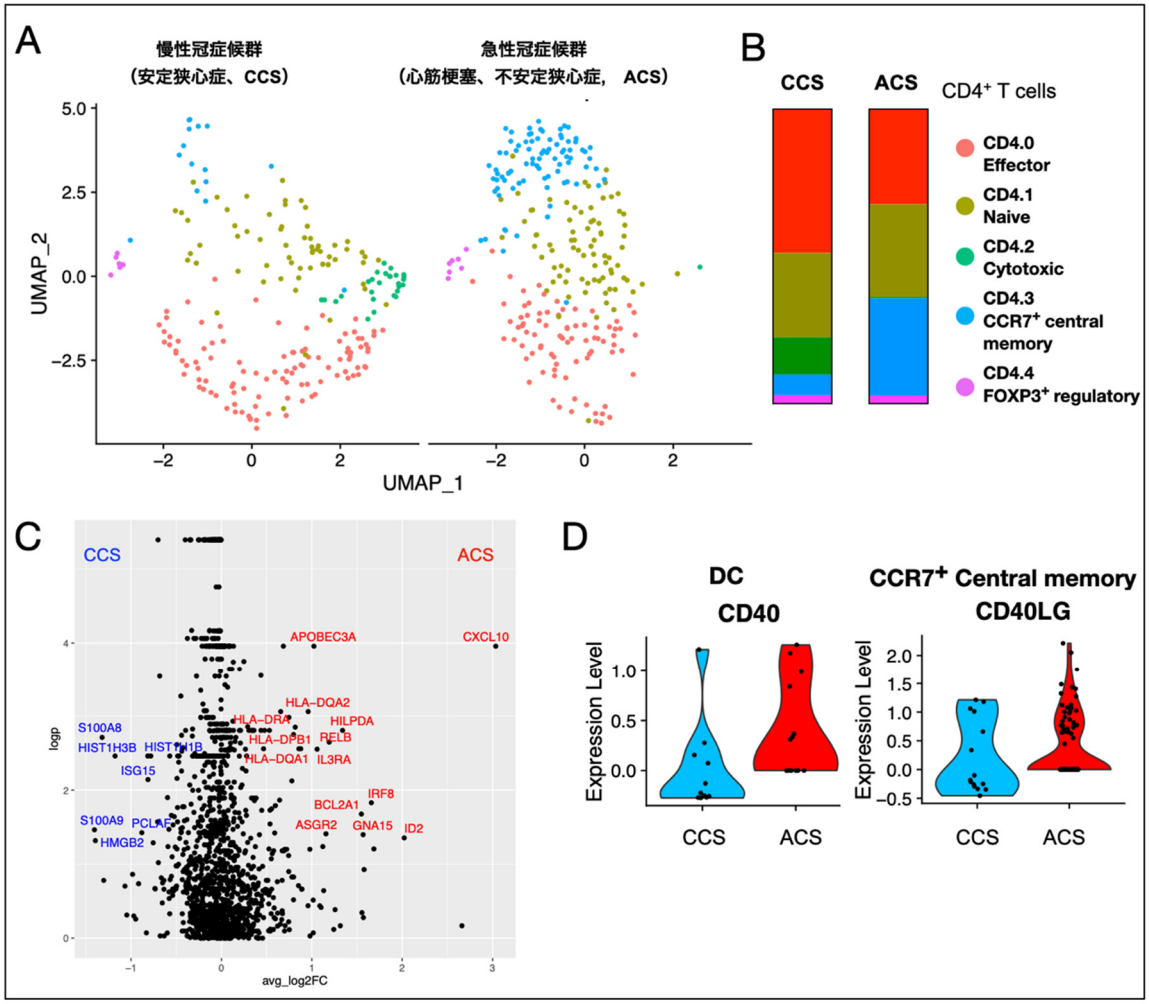



図 3. 冠動脈プラークの CD4 陽性 T 細胞のシングルセル RNA シークエンス解析と樹状細胞との関係

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。

**2. 抗 IL1B 抗体と CXCR2 阻害薬のコンビネーション治療がプラークの安定化につながる**

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 4）。実際の冠動脈プラークから得たデータを基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 シークエ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。

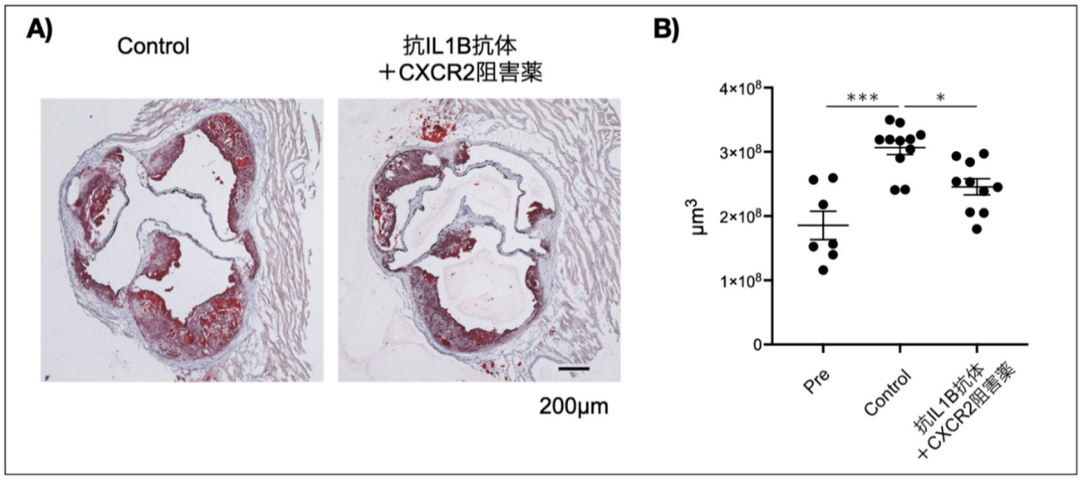



図 4. 抗 IL1B 抗体と CXCR2 阻害薬が動脈硬化プラークに与える影響
方法の通り示したタイムコースで、LDL 受容体欠損マウスに 8 週間高脂肪高コレステロール負荷した後に、抗 IL1B 抗体と CXCR2 阻害薬を投与した時の、大動脈基部における動脈硬化形成を評価した。
A) 大動脈基部オイルレッド O 染色した、代表的な写真を示す。
B) 動脈硬化を 100μm 毎に 6 連続切片で評価し、その AUC を比較した。
***$p < 0.001$、*$p < 0.05$（Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test）。

### 3. 抗 CD40LG 抗体はプラークの安定化につながるか

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とした。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。しかし、以前の動脈硬化モデルマウスにおいて、CD40-CD40LG が動脈硬化進展に重要な役割を果たしていることは報告されているところから［7］、抗体の投与量や投与回数を検討する必要があり、再度実験を行っているところである。

## 共同研究者・謝辞

本研究について、姫路循環器病センターの高谷具史先生、山本裕之先生、加古川中央市民病院の澤田隆弘先生には冠動脈粥腫摘除術を行いサンプルを供与頂きました。また、神戸大学大学院医学研究科循環器内科学の平田健一教授、神戸大学院科学技術イノベーション研究科の山下智也教授の助言のもと研究を行いました。深く御礼申し上げます。

## 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 Apr 1;102(1):107-17. doi: 10.1093/cvr/cvu002. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24403315

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 Sep;31(9):1963-72. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.229443. Epub 2011 Aug 4. PMID: 21817104

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 Sep 21;377(12):1119-1131. doi: 10.1056/NEJMoa1707914. Epub 2017 Aug 27. PMID: 28845751

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 May 3;145(18):1434-1436. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058414. Epub 2022 May 2. PMID: 35500048

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 Oct 26;123(10):1127-1142. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312804. PMID: 30359200

6) Zernecke 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 Jul 17;127(3):402-426. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316903. Epub 2020 Jul 16.PMID: 32673538

7) Bosmans LA, van Tiel CM, Aarts SABM, Willemsen L, Baardman J, van Os BW, den Toom M, Beckers L, Ahern DJ, Levels JHM, Jongejan A, Moerland PD, Verberk SGS, van den Bossche J, de Winther MMPJ, Weber C, Atzler D, Monaco C, Gerdes N, Shami A, Lutgens E. Myeloid CD40 deficiency reduces atherosclerosis by impairing macrophages' transition into a pro-inflammatory state. Cardiovasc Res. 2022 May 19:cvac084. doi: 10.1093/cvr/cvac084. Online ahead of print. PMID: 35587037