



# Intense impact of IL-1 $\beta$ expressing inflammatory macrophages in acute aortic dissection

井上, 大志

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9004号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492513>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Intense impact of IL-1 $\beta$ expressing inflammatory macrophages in acute aortic dissection

急性大動脈解離における IL-1 $\beta$  発現炎症性マクロファージの重要な影響

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻岡田健次教授（主任教授）)

井上 大志

## 内容要旨

### (背景)

急性大動脈解離(AAD)は非常に高い死亡率を伴う疾患であり、特に Stanford A 型 AAD は、発症から 48 時間以内に死亡率が急速に上昇し、緊急の外科手術を要する致死病的病態である。AAD の発症には、平滑筋細胞の経年的な喪失やそれに伴う細胞外マトリックスの破壊の関与が報告されており、これらが動脈壁の脆弱化とそれに続く AAD の原因となると考えられている。またマクロファージや好中球といった炎症細胞は血管平滑筋細胞や血管内皮細胞を介して AAD の発症に寄与していることも報告されている。しかしこれらのメカニズムから具体的な治療ターゲットを見出すためには、さらに詳細な遺伝子発現の解析が必要である。本研究ではシングルセル RNA シークエンス解析(scRNA-seq)を用いて、AAD 患者の大動脈内に存在する特異的な細胞集団を炎症細胞の観点から探索した。またヒト AAD でみられた特異的なマクロファージの増加と AAD の発症の因果関係を、Angiotensin II (Ang II) と  $\beta$ -aminopropionitrile monofumarate (BAPN) によって誘導したマウス大動脈解離モデルで検証した。さらに薬物治療の新規ターゲットとしてインターロイキン  $1\beta$  (IL- $1\beta$ )に着目し、マウス AAD モデルに対する抗 IL- $1\beta$  抗体の投与実験を行った。

(方法)

ヒト AAD サンプルにおける scRNA-seq では、神戸大学医学部附属病院で緊急手術を施行された 2 人の患者の上行大動脈壁を、既知の報告(Li Y et al. Circulation 2020;142:1374-1388)で使用された心臓移植の 3 人のレシピエントおよびドナーより採取された正常大動脈壁のデータサンプルと比較検討した。

マウス AAD モデルは 9 週齢、オスの C57BL/6J に対し、Ang II は浸透圧ポンプを使用して持続投与し、BAPN は飲料水に 5g/L の濃度に混合して投与して作成した。薬剤投与後 7 日目に大動脈壁を採取してフローサイトメトリー解析および scRNA-seq 解析を施行した。薬剤投与後組織学的に AAD を来したマウス(n=3)を Aortic Dissection 群(AD 群)、薬剤投与後 AAD を来さなかったマウス(n=5)を Non-Aortic Dissection 群(non-AD 群)、薬剤非投与のマウス(n=5)を Wild 群(W 群)として 3 群で比較検討した。

抗 IL-1 $\beta$  抗体の投与実験では、より明確な抗 IL-1 $\beta$  抗体の治療効果を検証するため、BAPN の濃度は 1g/L としてマウス AAD モデルを作成した。薬剤投与後 14 日で大動脈を採取し AAD の発生を組織学的に確認した。抗 IL-1 $\beta$  抗体と Isotype IgG はそれぞれ 2 回/週で腹腔内投与した。それぞれ n=14 とし

て治療効果を比較検討した。

(結果)

ヒト AAD サンプルから 13844 個の細胞を解析した。これらを遺伝子発現パターンから 14 種類の主要な細胞タイプに分類した。さらにこれらのうち 9460 個の *PTPRC*(*CD45*)陽性炎症細胞を抽出し、11 種類の細胞タイプに分類した。骨髓系細胞 (*CD68*, *CD14*, *CSF1R*, *S100A8*) は 4 種類、T 細胞 (*CD3E*) は 2 種類、NK 細胞 (*NKG7*)、B 細胞 (*CD79A*)、形質細胞 (*MZB1*)、肥満細胞(*CPA3*)がそれぞれ 1 種類であった。T 細胞と骨髓系細胞が全体の細胞集団のうち約 80%の主要な細胞集団であった。AAD 群と Control 群で各クラスターの細胞組成を比較したところ、骨髓系細胞で細胞発現が大きく異なっていたことから骨髓系細胞をさらに抽出して再分類した。骨髓系細胞はさらに 9 種類に分類された。Control 群では *CIQ*陽性マクロファージや樹状細胞が多く発現していた一方で、AAD 群では *IL1B* 陽性炎症性マクロファージと *S100A8/9*陽性の古典的な単球が主要な細胞集団であった。さらに Trajectory 解析を行いこれらの細胞分化の過程を検討したところ、AAD 群で多く認められた *IL1B* 陽性炎症性マクロファージは *S100A8/9* 陽性の古典的な単球から分化しており、これらの一連の細胞集団が AAD 群で特異的に増加して

いることが確認された。組織検査では、これらのマクロファージは中膜内の特に AAD によって現れた偽腔に沿って発現しており偽腔の形成に関与していることが示唆された。

ヒト AAD 大動脈サンプルで特異的に発現していた *IL1B* 陽性炎症性マクロファージが AAD 発症前から発現しているのか、もしくは AAD の反応性に増加しているのかを検証するため前述したマウス AAD モデルを用いた scRNA-seq を行い再検証した。この実験で用いたマウス AAD モデルは 14 日間で 90% の AAD 発症率であるため、薬剤投与後 7 日目に AAD を来さなかった non-AD 群は AAD 発症前状態であると想定した。scRNA-seq により 16 種類の細胞タイプに分類した。マクロファージおよび単球は 4 種類であった。ヒト AAD の大動脈サンプルの結果をもとに、IL1 シグナリングにおける細胞間での相互関係を CellChut 解析で検証した。その結果、IL1 シグナリングにおける主要な送り手が単球、マクロファージ、好中球であるのに対して、主要な受け手は血管平滑筋細胞や線維芽細胞を含む非炎症細胞であった。ヒト AAD 群で認められた *IL1B* 陽性マクロファージがマウスモデルでも発現しているのかを検証するため、単球/マクロファージを含む細胞集団を抽出して再分類した。この細胞集団は 8 種類に再分類された。*Il1b* 陽性炎症性マクロファージは non-AD 群および AD 群で高発現しており、これらの結果からヒト

AAD 群でみられた *IL1B* 陽性炎症性マクロファージは AAD 発症前から大動脈内に存在していることが示唆された。

これらの知見を臨床応用するため、さらに抗 IL-1 $\beta$  抗体を用いた介入実験を行った。その結果、抗 IL-1 $\beta$  抗体投与群は非投与群に比べて 14 日の AAD による破裂回避率は 90% vs 60% ( $p=0.029$ ) となり有意に低下させた。AAD の好発部位である上行大動脈および腎動脈上胸腹部大動脈のうち、AAD を発症していない部位を抽出して組織学的検証を追加した。中膜に占めるエラスチン範囲は上行大動脈、胸腹部大動脈いずれにおいても抗 IL-1 $\beta$  抗体投与群で有意に高く、抗 IL-1 $\beta$  抗体のエラスチン保護作用が示唆された。

#### (結論)

AAD に特異的な *IL1B* 陽性炎症性マクロファージを同定した。この特異的な *IL1B* 陽性炎症性マクロファージは AAD 発症前より大動脈内で存在し、大動脈内のエラスチン破壊に寄与し、AAD による大動脈破裂に関与していることが示唆された。抗 IL-1 $\beta$  抗体は将来の新たな低侵襲治療となる可能性がある。

| 論文審査の結果の要旨                       |                                                                                                                                                                             |     |       |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|
| 受付番号                             | 甲 第 3414 号                                                                                                                                                                  | 氏 名 | 井上 大志 |
| 論文題目<br>Title of<br>Dissertation | <p>急性大動脈解離における IL-1<math>\beta</math> 発現炎症性マクロファージの重要な影響</p> <p>Intense impact of IL-1<math>\beta</math> expressing inflammatory macrophages in acute aortic dissection</p> |     |       |
| 審査委員<br>Examiner                 | <p>主 査 42回 亮<br/>Chief Examiner</p> <p>副 査 篠原 正和<br/>Vice-examiner</p> <p>副 査 溝 渕 知 司<br/>Vice-examiner</p>                                                                 |     |       |

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)



### (背景)

急性大動脈解離(AAD)は非常に高い死亡率を伴う疾患であり、病型によっては緊急の外科手術を要する致死的病態である。しかしながら AAD の発症の直接的な発生メカニズムは十分に解明されていない。本研究ではシングルセル RNA シークエンス解析(scRNA-seq)を用いて、AAD 患者の大動脈内に存在する特異的な細胞集団を炎症細胞の観点から探索した。またヒト AAD でみられた特異的なマクロファージの増加と AAD の発症の因果関係を、Angiotensin II (Ang II) と  $\beta$ -aminopropionitrile monofumarate (BAPN) によって誘導したマウス大動脈解離モデルで検証し、臨床応用を念頭にしたマウス AAD モデルに対する抗 IL-1 $\beta$  抗体の投与実験を行った。

### (方法)

ヒト AAD サンプルにおける scRNA-seq では、神戸大学医学部附属病院で緊急手術を施行された 2 人の患者の上行大動脈壁を、既知の報告 (Li Y et al. Circulation 2020;142:1374-1388) で使用された正常大動脈壁のデータサンプルと比較検討した。マウス AAD モデルは C57BL/6J に対し、Ang II は浸透圧ポンプを使用して持続投与し、BAPN は 5g/L の濃度に混合した飲料水を投与して作成した。薬剤投与後組織学的に AAD を来したマウスを Aortic Dissection 群(AD 群)、薬剤投与後 AAD を来さなかったマウスを Non-Aortic Dissection 群(non-AD 群)、薬剤非投与のマウスを Wild 群 (W 群) として 3 群で比較検討した。抗 IL-1 $\beta$  抗体の投与実験では、抗 IL-1 $\beta$  抗体と Isotype IgG はそれぞれ 2 回/週で腹腔内投与した。

### (結果)

ヒト AAD サンプルから 13844 個の細胞を解析した。これらのうち 9460 個の *PTPRC*(*CD45*)陽性炎症細胞を抽出し、11 種類の細胞タイプに分類した。AAD 群と Control 群で各クラスターの細胞発現が大きく異なっていたことから骨髓系細胞 (*CD68*, *CD14*, *CSF1R*, *S100A8*) を抽出して再分類した。Control 群では *C1Q* 陽性マクロファージが多く発現していた一方で、AAD 群では *IL1B* 陽性炎症性マクロファージと *S100A8/9* 陽性の単球が主要な細胞集団であった。Trajectory 解析では、AAD 群で多く認められた *IL1B* 陽性炎症性マクロファージは *S100A8/9* 陽性の単球から分化し、一連の細胞集団が AAD 群で特異的に増加していることが確認された。

ヒト AAD 大動脈サンプルで特異的に発現していた *IL1B* 陽性炎症性マクロファージが AAD 発症前から発現しているのか、もしくは AAD の反応性に増加しているのかを検証するためマウス AAD モデルを用いた scRNA-seq を行った。16 種類の細胞タイプに分類され、ヒト AAD の大動脈サンプルの結果をもとに、IL1 シグナリングにおける細胞間での相互関係を CellChat 解析で検証した。その結果、IL1 シグナリングにおける主要な送り手が単

球、マクロファージ、好中球であるのに対し、主要な受け手は血管平滑筋細胞や線維芽細胞を含む非炎症細胞であった。単球/マクロファージを含む細胞集団を抽出すると8種類に再分類された。*IL1B*陽性炎症性マクロファージは non-AD 群および AD 群で高発現しており、これらの結果からヒト AAD 群でみられた *IL1B*陽性炎症性マクロファージは AAD 発症前から大動脈内に存在していることが示唆された。

これらの知見を臨床応用するため、さらに抗 *IL-1β* 抗体を用いた介入実験を行った。抗 *IL-1β* 抗体投与群は非投与群に比べて AAD による破裂回避率は 90% vs 60% ( $p=0.029$ )と有意に低かった。AAD の好発部位である上行大動脈および腎動脈上胸腹部大動脈のうち、AAD を発症していない部位を抽出して組織学的検証を追加した。中膜に占めるエラスチン範囲はいずれにおいても抗 *IL-1β* 抗体投与群で有意に高く、抗 *IL-1β* 抗体のエラスチン保護作用が示唆された。

#### (結論)

AAD に特異的な *IL1B*陽性炎症性マクロファージを同定した。この特異的な *IL1B*陽性炎症性マクロファージは AAD 発症前より大動脈内で存在し、大動脈内のエラスチン破壊に寄与し、AAD による大動脈破裂に関与していることが示唆された。

#### (総括)

本研究は、ヒト急性大動脈解離サンプルを用い、*IL1B*陽性炎症性マクロファージ特異的に増加すること、またマウスモデルから、*IL-1β*が大動脈内のエラスチン破壊に寄与すること、そして抗 *IL-1β* 抗体によりエラスチンが保護作用を示すことを明らかにした報告である。これは、致死率の高い急性大動脈解離の発生メカニズムの解明に寄与するのみならず、*IL-1β*が新規治療のターゲットになり得ることを示した点で価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。