

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09156

研究課題名(和文) 動脈硬化における炎症・免疫機序の解明および新規治療法・予防法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the role of immunoinflammatory responses in atherosclerotic disease and development of novel immunotherapies

研究代表者

佐々木 直人 (SASAKI, NAOTO)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00514746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Foxp3を発現する制御性T細胞(Treg)を特異的に減少させた易動脈硬化マウスを用いた解析により、Foxp3陽性Tregは炎症・免疫反応を制御し、動脈硬化病変の形成抑制に寄与することが示された。免疫抑制性分子CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4)を過剰発現する易動脈硬化マウスを用いた解析により、CTLA-4は過剰な免疫応答を抑制し、動脈硬化抑制的に働くことが明らかになった。UVBの波長の紫外線照射は、Foxp3陽性Tregの誘導に伴う大動脈の炎症反応の抑制により、腹部大動脈瘤の形成および関連死亡を抑制することが示された。

研究成果の概要(英文)：Using atherosclerotic Foxp3+ regulatory T cell (Treg)-depleted mice, we provided direct evidence that Foxp3+ Tregs play a protective role in the development of atherosclerosis by regulating immunoinflammatory responses. Using atherosclerotic CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) transgenic mice, we demonstrated that CTLA-4 regulates atherosclerosis by suppressing pathogenic immune responses. We found that UVB irradiation reduced the development and related mortality of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in mice and that these protective effects were associated with systemic expansion of Foxp3+ Tregs and reduced inflammatory responses in aortic aneurysmal lesions.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 腹部大動脈瘤 炎症・免疫反応

1. 研究開始当初の背景

近年ますます増加している動脈硬化性疾患の発症機序を解明し、有効な治療法や予防法を開発することが切に望まれている。動脈硬化症は慢性炎症性疾患であるという考えが一般的となったが、直接的にその炎症・免疫反応を制御することによる治療法は、未だ臨床において確立されていない。獲得免疫系の中心的役割を果たす T 細胞の中には、炎症を引き起こすようなエフェクター T 細胞と、炎症を負に制御するような制御性 T 細胞 / Regulatory T cell (Treg) が存在し、このバランスが前者に傾くことにより、動脈硬化の病態悪化に寄与することが明らかになった。しかし、Treg が動脈硬化形成を抑制することの直接的な証拠は得られていない。

我々は、獲得免疫系の制御により動脈硬化が治療・予防できることを示してきた。抗 CD3 抗体や活性化型ビタミン D をマウスに経口投与し、腸管リンパ組織および動脈硬化病変部において Treg および免疫寛容に働く樹状細胞を誘導し、動脈硬化初期病変の形成が抑制されることを報告した (*Circulation*. 120:1996-2005, 2009, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30:2495-2503, 2010)。適量の紫外線 (UVB) 照射を用いて、皮膚樹状細胞の機能修飾により Treg を誘導して動脈硬化形成の抑制が得られることを発見した (*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 37:66-74, 2017)。しかし、ヒトにおいて、UVB 照射による Treg の誘導や抗動脈硬化作用については検討されていない。Treg の数を劇的に増やし、その抑制能を高める方法を確認し、動脈硬化の治療に有効であることを報告した (*Journal of the American Heart Association*. 3:e000719, 2014)。

大動脈瘤は進行すれば死亡率が高く、近年増加の一途をたどっているが、その発症や進展の機序はいまだ不明な点が多く、特に効果的な内科的治療法はない。その病態悪化において、動脈硬化性疾患と共通した慢性炎症が重要な役割を果たすことが明らかになってきている。動脈硬化に伴う大動脈瘤形成においてもまた、Treg が抑制的に働くことを発見した (*Hypertension*. 65:889-895, 2015)。しかし、UVB 照射による大動脈瘤形成の抑制効果については明らかではない。

獲得免疫系の制御による治療を考える際に、具体的なターゲットとなる分子の同定が重要である。共刺激分子である CTLA-4 は、Treg および活性化されたエフェクター T 細胞において高発現し、いずれの細胞においても免疫抑制性に働き、Treg 側にバランスを傾けることが示唆されている。CTLA-4 欠損マウスは重篤な自己免疫疾患により死亡し (*Science*. 270:985-988, 1995)、ヒトにおいても、*CTLA4* 遺伝子の異常により (*Science*. 345:1623-1627, 2014) 自己免疫疾患を発症することが報告されており、この分子は過剰な免疫応答の抑制において必須の役割を果た

す。しかし、動脈硬化性疾患におけるこの分子の役割は不明である。CTLA-4-免疫グロブリン融合蛋白 (CTLA-4 Ig) は、CTLA-4 分子と同様に、T 細胞の活性化を抑制することにより、関節リウマチの治療において有効である (*N Engl J Med*. 349:1907-1915, 2003)。動脈硬化における CTLA-4 分子の役割の解明により、新規治療法の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

動脈硬化性疾患における炎症・免疫反応の関与の解明を行い、その制御による新規治療法・予防法を見出し、臨床応用を目指す。

(1) 制御性 T 細胞が動脈硬化抑制に関与することの直接的な証明と、分子レベルでの抑制機序について明らかにする。

(2) 動脈硬化形成における CTLA-4 の役割を明らかにする。

(3) UVB 照射による腹部大動脈瘤形成の抑制効果・機序を明らかにする。

(4) ヒトにおいて、UVB 照射による免疫系、血圧、および血管内皮機能への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 転写因子である Foxp3 は内在性 Treg に最も特異的な分子であり、その抑制能の維持において必要不可欠である。共同研究により、DEREG マウス (Foxp3 陽性制御性 T 細胞特異的ジフテリアトキシンレセプター・eGFP 融合蛋白発現トランスジェニックマウス) を入手しており、このマウスへのジフテリアトキシンの投与により、特異的かつ容易に Foxp3 陽性 Treg を減少させることが可能である。DEREG マウスと LDL 受容体遺伝子欠損 (*Ldlr*^{-/-}) マウスとを交配して DEREG/*Ldlr*^{-/-} マウスを作製した。一定期間のジフテリアトキシン投与を行うことにより Treg を減少させて、全身の免疫反応、脂質代謝および動脈硬化病変形成に与える影響について検討した。リンパ組織および大動脈における免疫細胞の評価はフローサイトメトリーを用いて行った。

(2) 共同研究により、ヒト CD2 プロモーターを用いたマウス CTLA-4 の過剰発現マウスを入手しており、*Apoe*^{-/-} マウス (アポリポ蛋白 E 遺伝子欠損マウス) と交配して CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-} マウスを作製した。このマウスを用いて、リンパ球における CTLA-4 の細胞内・細胞外へのシグナルの増強により動脈硬化病変形成が抑制されるかどうかについて検討した。リンパ組織における免疫細胞数や活性化状態の評価については、フローサイトメトリーを用いて行った。リンパ組織由来の T 細胞や樹状細胞などの機能の評価については、*in vitro* の assay 系を用いて、フローサイトメトリーにより行った。

(3)高脂肪食負荷を行った *Apoe*^{-/-}マウスを用いて、浸透圧ポンプによるアンジオテンシンの持続皮下投与を行い、腹部大動脈瘤を誘発させた。皮膚への UVB 照射による大動脈瘤の発症率、死亡率への影響について評価した。次に、*DEREG/Apoe*^{-/-}マウスを用いて FcγR3 陽性 Treg を全身性に選択的に除去した状態でアンジオテンシン 投与により腹部大動脈瘤を誘導し、UVB 照射による腹部大動脈瘤の発症率、死亡率への影響について評価した。リンパ組織における免疫細胞の評価はフローサイトメトリーを用いて行い、病変部における炎症・免疫細胞の評価は免疫染色を用いて行った。

(4)神戸大学医学部附属病院皮膚科に通院または入院中の、UVB 療法を受ける予定である乾癬などの皮膚科疾患患者に対し、UVB 療法開始前と開始 3 ヶ月後の計 2 回、以下の検査を行った。末梢血中のビタミン D および炎症関連物質の測定、フローサイトメトリーによる Treg などの免疫細胞の評価、血管内皮機能の測定、家庭血圧の測定を行った。臨床データについてはカルテより収集した。

4. 研究成果

(1)Treg の減少した *DEREG/Ldlr*^{-/-}マウスの脾臓および大動脈では、コントロールマウスと比較して、IFN- γ 産生ヘルパー T 細胞の有意な増加を認めた。Treg の減少により、血液中のコレステロール値に変化を認めなかったが、大動脈を含めた全身における免疫応答の増強とともに、動脈硬化病変形成の促進を認めた。Treg は、炎症免疫応答を制御することにより、動脈硬化病変の形成抑制に寄与することが示された。

(2)CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスの大動脈基部の動脈硬化病変の面積は、コントロールのマウスと比較して有意な減少を認めた。フローサイトメトリーを用いた検討により、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスのリンパ組織において、コントロールのマウスと比較してエフェクター T 細胞の数が有意に少ないことを見出した。CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスの CD4 陽性 T 細胞からの IFN- γ の産生は、コントロールのマウスに比べて有意に抑制されていた。

in vitro において、CTLA-4 を高発現した CD4 陽性 T 細胞は、通常の T 細胞と比較して T 細胞受容体を介した刺激による増殖が有意に抑制されていた。さらに、CD4 陽性 T 細胞と CD11c 陽性樹状細胞を共培養すると、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスの T 細胞は、樹状細胞における共刺激分子 CD80/CD86 の発現を低下させることにより、他の T 細胞への副刺激シグナルが入るのを抑制して、T 細胞の活性化を抑制することが明らかになった。

本研究結果より、リンパ球における免疫抑制性分子 CTLA-4 の過剰発現は、炎症免疫応答を抑制することにより、動脈硬化病変形成

の抑制に寄与することが明らかになった。CTLA-4 Ig (アバタセプト) は、CTLA-4 と類似の作用を有し、関節リウマチの治療薬として臨床使用されているが、重篤な副作用の頻度は比較的低く、病態進展の抑制に有効であることが報告されている。本研究結果より、CTLA-4 Ig を用いた治療など、CTLA-4 分子を標的とした新規治療法の開発につながることを期待される。

以上の研究成果については、原著論文として報告を行った (Matsumoto T et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36:1141-1151, 2016)。

(3)UVB 照射マウスでは、非照射マウスと比較して腹部大動脈瘤破裂による死亡ならびに大動脈瘤の発症が有意に抑制された。UVB 照射マウスでは、皮膚流入領域リンパ節および脾臓において、活性化された FcγR3 陽性 Treg の増加を認めた。腹部大動脈瘤病変部では、UVB 照射は CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの集積を抑制した。

DEREG/Apoe^{-/-}マウスを用いて FcγR3 陽性 Treg を全身性に選択的に除去した結果、UVB 照射による腹部大動脈瘤発症・破裂の抑制効果は消失した。UVB 照射は FcγR3 陽性 Treg を誘導することにより、腹部大動脈瘤病変部における炎症・免疫応答を抑制し、腹部大動脈瘤の形成および関連死亡を抑制することが示された。

大動脈瘤は病変が進行すれば、破裂による死亡を防ぐために外科的治療を行わざるを得ないが、高齢者では外科的治療の合併症のリスクが高く、非侵襲的な内科的治療法・予防法の開発が望まれている。UVB 照射は、皮膚疾患治療の病状の改善に有効な治療法として確立されており、重篤な副作用は報告されていない。UVB 照射は、経済的負担の少ない新規の大動脈瘤治療法として期待される。今後、UVB 照射による病態改善の詳細な機序や、効果的かつ副作用を最小限に抑えた照射条件が明らかになれば、大動脈瘤などの心血管疾患への臨床応用の可能性がある。

以上の研究成果については、原著論文として報告を行った (Hayashi T et al. *J Am Heart Assoc.* 6(9):e007024, 2017)。

(4)皮膚疾患患者における UVB 療法は、血液中の Treg の割合や血管内皮機能には明らかな影響を与えなかった。血圧が高値の患者において、UVB 療法により血圧が低下する傾向を示した。UVB 療法により、血液中の貯蔵型ビタミン D の濃度は増加する傾向を示し、活性型ビタミン D の濃度は有意に増加した。本研究において、UVB 療法による血管内皮機能の改善や血圧低下などの血管保護効果や、Treg の増加作用を認めなかったが、その理由としては症例数が少ない (n=8) ことも考えられる。今後、症例数を増やして検討することが望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Hayashi T, Sasaki N*, Yamashita T, Mizoguchi T, Emoto T, Amin HZ, Yodoi K, Matsumoto T, Kasahara K, Yoshida N, Tabata T, Kitano N, Fukunaga A, Nishigori C, Rikitake Y, Hirata KI. (*corresponding author) Ultraviolet B Exposure Inhibits Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice by Expanding CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J Am Heart Assoc.* 6(9):e007024, 2017. doi: 10.1161/JAHA.117.007024. (査読有り)
2. Sasaki N*, Yamashita T*, Kasahara K, Fukunaga A, Yamaguchi T, Emoto T, Yodoi K, Matsumoto T, Nakajima K, Kita T, Takeda M, Mizoguchi T, Hayashi T, Sasaki Y, Hatakeyama M, Taguchi K, Washio K, Sakaguchi S, Malissen B, Nishigori C, Hirata K. (*corresponding authors) UVB exposure prevents atherosclerosis by regulating immunoinflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37:66-74, 2017. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308063. (査読有り)
3. Amin HZ*, Sasaki N*, Hirata KI. (*corresponding authors) Regulatory T Cell Immunity in Atherosclerosis. *Acta Med Indones.* 49(1):63-68, 2017. <http://www.actamedindones.org/index.php/ijim/article/view/352/pdf> (査読有り)
4. Matsumoto T, Sasaki N*, Yamashita T, Emoto T, Kasahara K, Mizoguchi T, Hayashi T, Yodoi K, Kitano N, Saito T, Yamaguchi T, Hirata K. (*corresponding author) Overexpression of CTLA-4 prevents atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36:1141-1151, 2016. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306848. (査読有り)
5. Yamashita T, Sasaki N, Kasahara K, Hirata K. Anti-inflammatory and immune-modulatory therapies for preventing atherosclerotic cardiovascular disease. *J Cardiol.* 66(1):1-8, 2015. doi: 10.1016/j.jjcc.2015.02.002. (査読有り)

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 佐々木直人、溝口泰司、Hilman Zulkifli Amin、堀部紗世、河内正二、山下智也、平田健一、力武良行、紫外線照射による動脈硬化性疾患に対する抑制効果の検討、日本薬学会第 138 年会、2018 年
2. Naoto Sasaki、Ultraviolet B exposure prevents atherosclerotic cardiovascular disease by regulating immunoinflammatory responses. 第 46 回日本免疫学会学術集会、2017 年
3. 佐々木直人、林友鴻、福永淳、錦織千佳子、山下智也、平田健一、力武良行、紫外線照射による動脈硬化抑制効果の検討、第 39 回日本光医学・光生物学会、2017 年
4. 林友鴻、佐々木直人、江本拓央、溝口泰司、吉田尚史、田畑諭子、Hilman Zulkifli Amin、山下智也、平田健一、アンジオテンシン II 誘導性マウス大動脈瘤モデルを用いた、紫外線照射による大動脈瘤抑制効果の検討、第 49 回日本動脈硬化学会総会、2017 年
5. Hilman Zulkifli Amin, Naoto Sasaki, Kazuyuki Kasahara, Takuo Emoto, Tomohiro Hayashi, Taiji Mizoguchi, Yoshiyuki Rikitake, Tomoya Yamashita, Ken-ichi Hirata, Foxp3⁺ regulatory T cells inhibit the development of atherosclerosis by regulating immunoinflammatory responses. 第 49 回日本動脈硬化学会総会、2017 年
6. Tomohiro Hayashi, Naoto Sasaki, Tomoya Yamashita, Takuo Emoto, Taiji Mizoguchi, Naofumi Yoshida, Tokiko Tabata, Hilman Zulkifli Amin, Ken-ichi Hirata、Ultraviolet B Irradiation Inhibits the Development of Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Regulating Immuno-Inflammatory Responses. 第 81 回日本循環器学会学術集会、2017 年
7. Tomohiro Hayashi, Naoto Sasaki, Tomoya Yamashita, Takuo Emoto, Taiji Mizoguchi, Naofumi Yoshida, Tokiko Tabata, Hilman Zulkifli Amin, Ken-ichi Hirata、Ultraviolet B Exposure Limits Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice. 第 24 回日本血管生物医学会学術集会、2016 年
8. 林友鴻、佐々木直人、江本拓央、溝口泰

- 司、吉田尚史、Hilman Zulkifli Amin、松本卓也、山下智也、平田健一、アンギオテンシン 誘導性マウス大動脈瘤モデルを用いた、UVB 照射による大動脈瘤抑制効果の検討、第 48 回日本動脈硬化学会総会、2016 年
9. 佐々木直人、山下智也、平田健一、動脈硬化における制御性 T 細胞の役割、第 48 回日本動脈硬化学会総会、2016 年
 10. Naoto Sasaki, Takuya Matsumoto, Takuo Emoto, Taiji Mizoguchi, Tomohiro Hayashi, Tomoya Yamashita, Ken-ichi Hirata, Co-inhibitory molecule CTLA-4 regulates atherosclerosis by suppressing T cell and dendritic cell activation in mice. 第 48 回日本動脈硬化学会総会、2016 年
 11. Takuya Matsumoto, Naoto Sasaki, Takuo Emoto, Taiji Mizoguchi, Tomohiro Hayashi, Tomoya Yamashita, Ken-ichi Hirata, Overexpression of CTLA-4 prevents atherosclerosis by suppressing T cell activation in mice. 第 80 回日本循環器学会学術集会、2016 年
 12. Naoto Sasaki, Tomoya Yamashita, Kazuyuki Kasahara, Takuo Emoto, Takuya Matsumoto, Taiji Mizoguchi, Tomohiro Hayashi, Ken-ichi Hirata, Ultraviolet B exposure prevents atherosclerosis. 第 80 回日本循環器学会学術集会、2016 年
 13. 松本卓也、佐々木直人、江本拓央、溝口泰司、林友鴻、吉田尚史、山下智也、平田健一、共免疫抑制分子 CTLA-4 による動脈硬化抑制機構の解明、第 23 回日本血管生物医学学会学術集会、2015 年
 14. 佐々木直人、山下智也、笠原和之、福永淳、山口智之、江本拓央、淀井景子、松本卓也、中島健爾、北智之、武田匡史、溝口泰司、林友鴻、佐々木義浩、畠山真弓、田口久美子、鷲尾健、坂口志文、錦織千佳子、平田健一、紫外線(UVB)照射を用いた新規動脈硬化治療法の開発、第 23 回日本血管生物医学学会学術集会、2015 年
 15. 佐々木直人、山下智也、福永淳、山口智之、坂口志文、錦織千佳子、平田健一、紫外線 (UVB) 照射による動脈硬化抑制効果の検討、第 43 回日本臨床免疫学会総会、2015 年
 16. Takuya Matsumoto, Naoto Sasaki, Tomoya Yamashita, Kazuyuki Kasahara, Keiko Yodoi, Takuo Emoto, Taiji Mizoguchi, Ken-ichi Hirata, Proatherogenic Immune Responses are Regulated by Overexpression of a Coinhibitory Molecule CTLA-4 in Apolipoprotein E-deficient Mice. 第 79 回日本循環器学会学術集会、2015 年
 17. Keiko Yodoi, Tomoya Yamashita, Naoto Sasaki, Kazuyuki Kasahara, Yoshihiro Sasaki, Takuo Emoto, Takuya Matsumoto, Taiji Mizoguchi, Tomoyuki Kita, Ken-ichi Hirata, Foxp3+ Regulatory T Cells Play a Protective Role in Angiotensin II-induced Aortic Aneurysm Formation in Mice. 第 79 回日本循環器学会学術集会、2015 年
 18. Kazuyuki Kasahara, Naoto Sasaki, Tomoya Yamashita, Keiko Yodoi, Takuya Matsumoto, Takuo Emoto, Taiji Mizoguchi, Ken-ichi Hirata, Foxp3+ Regulatory T Cells and T Regulatory Type 1 Cells Cooperatively Inhibit the Development of Atherosclerosis in Mice. 第 79 回日本循環器学会学術集会、2015 年
 19. Tomoya Yamashita, Naoto Sasaki, Ken-ichi Hirata, Intestinal Immunity and Gut Microbiota as Therapeutic Targets for Preventing Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. 第 79 回日本循環器学会学術集会、2015 年
 20. Naoto Sasaki, Tomoya Yamashita, Ken-ichi Hirata, Regulatory T Cells and Tolerogenic Dendritic Cells are Critical Immunomodulators Linking the Skin and Intestinal Immune System to Atherosclerosis. 第 79 回日本循環器学会学術集会、2015 年
- 〔図書〕(計 1 件)
制御性 T 細胞、佐々木直人、山下智也、平田健一、メディカルレビュー 動脈硬化予防、Vol.15, No.3, 89-91, 2016
- 〔その他〕
ホームページ等
神戸大学薬科大学 医療薬学研究室
http://www.kobepharm-u.ac.jp/edrs/faculty_member_list/medical_pharmaceutics.html
6. 研究組織
 - (1)研究代表者
佐々木 直人 (SASAKI NAOTO)

神戸薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：00514746

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
笠原 和之 (KASAHARA KAZUYUKI)
江本 拓央 (EMOTO TAKUO)
林 友鴻 (HAYASHI TOMOHIRO)
松本 卓也 (MATSUMOTO TAKUYA)
(神戸大学・医学研究科)

溝口 泰司 (MIZOGUCHI TAIJI)
神戸薬科大学・薬学部・研究員
研究者番号：40806882