

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790372

研究課題名（和文）血管新生の制御を標的とした、免疫細胞活性化分子を介する動脈硬化新規治療法の開発

研究課題名（英文）New therapeutic strategy of atherosclerosis targeting immune system for inhibition of angiogenesis

研究代表者

中野 誠 (NAKANO MAKOTO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30513551

研究成果の概要（和文）：T細胞活性化システムである OX40/OX40L 系の抑制により、マウスの動脈硬化病変における外膜血管新生の抑制ならびに動脈硬化病変の減少が認められた。マウスの骨髄置換実験により、本現象に対する骨髄細胞上の OX40L の関与は少ないものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：OX40/OX40 ligand (OX40L) system, which activates T cells, decreased atherosclerotic lesion through inhibition of vasa vasorum angiogenesis in mice. Bone marrow transplantation of mice revealed that OX40L system in bone marrow did not contribute to this phenomenon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症、動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では、食生活の欧米化や高齢化により、重症動脈硬化性疾患が増加している。OX40 (CD134) は、tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily に属し、T-cell receptor (TCR) の結合の後に T 細胞に発現される T 細胞活性化分子である。一方、human T-cell leukemia virus type-1 感染 T 細胞に発現する分子として着目されていた

glycoprotein 34kDa (GP34) が OX40 のリガンド (OX40L) であることが、東北大学グループにより明らかにされた。またやはり東北大学グループにより、OX40L が活性化 B 細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞や血管内皮に発現していること、T 細胞と抗原提示細胞の OX40/OX40L 系を介する相互作用が T 細胞活性化に必須であることが明らかにされた。実際の疾患モデルにおいても、既に自己

免疫性脳炎や多発性筋炎の病態に重要な役割を有することが知られており、海外では、ヒト OX40L 阻害抗体を用いた免疫疾患への臨床治験が開始されている。我々は、これまでも心血管疾患と液性因子、炎症に関する研究を行っており、低酸素により誘導される液性因子であるエリスロポエチンと、その受容体である、エリスロポエチン受容体、あるいは高脂血症治療薬であるスタチン製剤が、骨髄由来血管内皮前駆細胞や液性因子を介して低酸素性肺血管リモデリングや虚血後血管新生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。近年、動脈硬化の進行における T 細胞の重要性が報告されたため、OX40/OX40L 系が心血管病においても重要な役割を担うものと着想した。今回も、既にヒト冠動脈動脈硬化病変において OX40L が血管内皮に発現すること、また、動脈硬化発症マウスである ApoE 遺伝子欠損マウスと OX40L 遺伝子欠損マウスを掛け合わせたダブル遺伝子欠損マウスが、ApoE 遺伝子欠損マウスに比して動脈硬化面積が減少していることを証明したが、OX40/OX40L 系の抑制による動脈硬化病変減少の詳細な機序はまだ不明である。

## 2. 研究の目的

動脈硬化病変が著明に進行し血行再建術の適応外となった場合、有効な治療法がなく、その予後は極めて不良である。近年、新たな治療戦略として、細胞療法や液性因子による動脈硬化性疾患への治療が試みられているが、その効果は未だ限定的なものである。近年の研究により、動脈硬化病変の進展の際に血管壁が低酸素状態に陥るため、外膜側からの新生血管が血管壁の酸素供給路として重要視されている。しかしながら、同時にこの外膜からの新生血管は免疫細胞、サイトカインをも供給してしまい、血管壁の炎症を促

進する役割も担ってしまうと考えられている。

本研究では、炎症制御システムである OX40/OX40L 系の動脈硬化病変における役割を詳細に検討する予定であるが、OX40/OX40L 系の欠如により、動脈硬化病変における炎症性液性因子の減少が生じ、その結果、外膜の血管新生の減少や、骨髄由来細胞の動員が減少することが予想される。免疫系が動脈硬化病変での血管壁の炎症や外膜での血管新生、また、骨髄由来細胞との相互作用を介して動脈硬化病変に影響を与えることが示されれば、極めて新規性に富み、特色的な研究と考えられる。

現在、臨床使用されている薬剤の中には、動脈硬化病変における外膜の新生血管をターゲットとした薬剤は見受けられず、本研究により、OX40/OX40L 系による、血管壁の炎症や外膜の血管新生の減少を介した動脈硬化病変の抑制が確認できれば、今までにない全く新たな視点での新規治療法の開発につながるため、病理学的意義にも、かつ臨床的意義にも富んだ研究であると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究は、動脈硬化病変の進行における OX40/OX40L の意義に関して、基礎的、免疫学的解析を施行した。平成 22 年度には ApoE/OX40L 遺伝子ダブル欠損マウス、ApoE 遺伝子欠損マウスの動脈硬化病変における免疫細胞、それらの分泌するサイトカイン、血管新生について免疫組織学的に検討した。血管新生に差を認めたため、血管新生を観察するゲルである、マトリゲルによる検討も施行した。平成 23 年度には、ApoE 遺伝子欠損マウスの骨髄を野生型マウスもしくは OX40L 遺伝子欠損マウスの骨髄で置換したキメラマウスを作成し、動脈硬化病変に対する骨髄由来細胞の役割についての検討を行った。本実験により、動脈硬化病変形成における骨髄細胞

上のOX40/OX40L系の役割が明らかになるものと考えられた。具体的には下記の骨髓置換モデルを作成した。

骨髓置換モデルの作成；ApoE遺伝子欠損マウス (ApoE<sup>-/-</sup>) の全身にX線(4.8Gy×2回)を照射したのち、2種類のマウス(野生型マウス；WT, OX40L遺伝子欠損マウス；OX40L<sup>-/-</sup>)由来の骨髓(BM)を移植し、以下の骨髓置換キメラマウスを作成した。

(a) ApoE<sup>-/-</sup>/ WT -BMキメラマウス

(b) ApoE<sup>-/-</sup>/ OX40L<sup>-/-</sup>-BMキメラマウス

以上のキメラマウスに10週齢から12週間の期間、高脂肪食を摂取させ、動脈硬化モデルを作成し、動脈硬化病変の程度を比較した。これらのキメラマウスの血管局所はOX40L遺伝子発現に関してはwildであるため、内皮、平滑筋などの血管側の動脈硬化病変を形成する要素は同一である。従って、これら2群のキメラマウスの比較により、マクロファージやT細胞を含む、骨髓由来の血球系の細胞におけるOX40Lの動脈硬化病変形成への役割を検討することができる。

また、これらのマウスの末梢血を採取し、フローサイトメトリーの手技を用いて、骨髓由来と考えられる c-kit 陽性、sca-1 陽性細胞の測定を行った。これらの細胞数に変化が認められた場合、骨髓細胞上の OX40L が動脈硬化疾患における骨髓由来細胞の動員を制御していることが示される。

#### 4. 研究成果

ApoE 遺伝子単独欠損マウス、ApoE/OX40L 遺伝子ダブル欠損マウス間で中性脂肪、総コレステロールに有意な差を認めず、OX40L の欠損による脂質代謝への影響は非常に少ないものと考えられた。

マウス大動脈を上行大動脈から総腸骨動脈分岐部まで摘出し、Oil-red O 染色を用いて動脈硬化面積の評価を施行したところ、ApoE 遺伝子単独欠損マウスに比して、ApoE/OX40L 遺伝子ダブル欠損マウスでは動脈硬化病変が有意に減少していた。同様に、マウス大動脈弁において、Oil-red O 染色を

用いて動脈硬化面積を測定したところ、やはり ApoE 遺伝子単独欠損マウスに比して、ApoE/OX40L 遺伝子ダブル欠損マウスでは動脈硬化病変が有意に減少していた。免疫組織学的手法を用いた解析では、ApoE 遺伝子単独欠損マウスと ApoE/OX40L 遺伝子ダブル欠損マウスとの間で、マクロファージ、平滑筋細胞などの動脈硬化の安定性に関する細胞成分については有意な差を認めなかったが、ApoE 遺伝子単独欠損マウスに比して、ApoE/OX40L 遺伝子ダブル欠損マウスでは血管外膜における微小血管数の減少を認め、外膜における血管新生の減少が示唆された。血管新生に有意な差を認めなかったため、野生型マウス、OX40L 欠損マウスの皮下に血管新生を観察するゲルであるマトリゲルを埋め込み、新生血管数を測定した。マトリゲルのみでは、OX40L 遺伝子欠損マウス間で新生血管数に差を認めなかったが、マトリゲルに血管内皮増殖因子を混入したところ野生型マウスではマトリゲル中に豊富な血管新生を認めるのに対し、OX40L 遺伝子欠損マウスでは新生血管数が有意に減少していた。これら動脈硬化病変の減少、血管新生の増加が血管局所の OX40L、あるいは骨髓に由来する OX40L のいずれに起因するものか詳細に検討するため、次の実験を施行した。

ApoE 遺伝子欠損マウス (ApoE<sup>-/-</sup>) の全身に X 線を照射したのち、2 種類のマウス (野生型マウス；WT, OX40L 遺伝子欠損マウス；OX40L<sup>-/-</sup>) 由来の骨髓(BM)を移植し、以下の骨髓置換キメラマウスを作成した。

(a) ApoE<sup>-/-</sup>/ WT-BM キメラマウス

(b) ApoE<sup>-/-</sup>/ OX40L<sup>-/-</sup>-BM キメラマウス

これら 2 群のキメラマウス間には中性脂肪、総コレステロールに有意な差を認めなかった。これらのキメラマウスを用いて動脈硬化モデルを作成し、動脈硬化病変の程度を比較したところ、2 群間で有意な差を認めなかった。キメラマウスの末梢血を採取し、フローサイトメトリーの手技を用いて、c-kit, sca-1 陽性の骨髓由来細胞の測定を施行したが、2 群間で有意な差は認めなかった。

また、野生型の GFP マウス、ならびに OX40L<sup>-/-</sup> の GFP マウスを用いて以下のキメラマウスを作製した。

(a) ApoE<sup>-/-</sup>/ WT-BM(GFP)キメラマウス

(b) ApoE<sup>-/-</sup>/ OX40L<sup>-/-</sup>-BM(GFP)キメラマウス

これら 2 群のマウスにおいて、同様に動脈硬化面積を測定したところ、やはり有意な差を認めなかった。また、大動脈における GFP 陽性細胞の面積を測定したところ、2 群間でやはり有意な差を認めなかった。

本結果から、OX40L は外膜血管新生を介し、動脈硬化病変の形成に重要な役割を呈していると考えられ、その機序として、骨髄細胞の関与は少ないものと考えられた。

## 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 1 件)

(1)OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization.

Nakano M., Shimokawa H, et.al  
Cardiovascular Research 2010;88:539-546.

(査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)Genetic Deletion of OX40 Ligand Suppresses the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice

中野 誠、下川宏明、他

World Congress of the ISHR 2010,  
2010. 5. 16, 京都 国立京都国際会館

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 誠 (NAKANO MAKOTO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 30513551

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :