

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：14501
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23790849
研究課題名（和文） 動脈硬化形成における制御性 T 細胞の関与の解明と新規動脈硬化予防法・治療法の開発
研究課題名（英文） Investigation of molecular mechanisms of athero-protection by regulatory T cells and development of novel strategies for preventing atherosclerosis
研究代表者 佐々木 直人 (SASAKI NAOTO) 神戸大学・医学研究科・助教 研究者番号：00514746

研究成果の概要（和文）：

動脈硬化症の発生・進展における制御性 T 細胞(Treg)の役割を検討した。高脂血症下において Treg は T 細胞を中心とした免疫細胞の活性化を抑制していることが示唆されたが、Treg の減少により血液中のコレステロール値の低下を認め、動脈硬化形成には影響を与えなかった。動脈硬化モデルマウス(apoE-KO)に紫外線(UVB)照射を行うことにより動脈硬化形成が有意に抑制され、その抑制の機序として強い抑制能を有する Treg の関与が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the role of regulatory T cells (Tregs) in the development of atherosclerosis. Under hypercholesterolemia, Treg depletion led to augmented effector T cell responses and a significant decrease in plasma cholesterol levels, and did not affect the atherosclerotic lesion size. Ultraviolet B (UVB) irradiation significantly reduced atherosclerosis development in *ApoE*^{-/-} mice compared to controls. This was associated with systemic expansion of Tregs exhibiting potent suppressor function and suppressed effector T cell responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：動脈硬化症、炎症、免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

日本人の4人に1人は心臓病や脳血管疾患などの動脈硬化性疾患で死亡している。高齢化や危険因子となりうる成人病の罹患率の上昇などによりさらに増加が見込まれ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、血管内皮細胞障害から始まる慢性炎症性疾患であるという考えが一般的となり、単球や T 細胞などの免疫細胞がそ

の発症や進展の中心的役割を果たしていることが明らかになっている。動脈硬化病変には酸化 LDL や熱ショック蛋白などのある種の特異的抗原が存在し、それがマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞によってヘルパー T 細胞に抗原提示されて、T 細胞の活性化が起こり、病態を進行させていると考えられる。

近年、自己免疫疾患やアレルギー疾患などにおいて、主にヘルパー T 細胞による病的な免疫反応を抑制するような制御性 T 細胞／

Regulatory T cell (Treg)が重要な役割を果たしていることが報告されている(Sakaguchi S. *Cell*. 2008)。最近、高脂血症モデルである apolipoprotein E 欠損マウス(apoE-KO)を用いて、Treg の数が減少した CD80/86、CD28 ノックアウトマウスの骨髄細胞および末梢 T 細胞の移入を行い、内在性の CD25 陽性 Treg の割合を減少させると、動脈硬化が悪化することが報告された(Ait-Oufella H et al. *Nat Med*. 2006)。内在性の CD25 陽性 Treg は胸腺内のみならず、腸管関連リンパ組織においても産生され、誘導型 Treg と言われ注目されている。我々は抗 CD3 抗体の経口投与を行い、腸管内で Treg を誘導することにより、有意に動脈硬化初期病変の形成が抑制されることを報告した(Sasaki N et al. *Circulation*. 2009)。Treg の誘導には、腸管内に多く存在する未熟な樹状細胞が関与することが報告されている。最近、我々は活性型ビタミン D の経口投与により、腸管内にて未熟な樹状細胞および Treg を誘導して、有意に動脈硬化病変形成を抑制することを発見し、報告した(Takeda M et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010)。

以上の報告からすると、動脈硬化疾患についても、Treg が病態を抑制している可能性が示唆されるが、その直接的な証拠はなく、抑制の詳細な機序は未だ十分には解明されていない。

動脈硬化症にはどのような抗原が関与するかは未だ不明な点が多いが、未知の多くの抗原によるヘルパーT細胞を介した過剰な免疫反応を、Treg を調節・誘導することにより抑制するという方法は、非常に合理的であると思われる。以前より、紫外線照射(特に UVB, 290-320nm の波長)により、マウスの接触性皮膚炎のモデルにおいて免疫反応が抑制されることが報告されたが、その一つの機序として UVB 照射による Treg の誘導が示唆されている(Shreedhar VK et al. *J Immunol*. 1998)。同様に、UVB 照射は Treg を誘導することにより動脈硬化を抑制する可能性があり、新規の動脈硬化性疾患の治療法・予防法となり得ることが期待される。

2. 研究の目的

- (1) 動脈硬化症の発生・進展における制御性 T 細胞の役割を明らかにすること。
- (2) 動脈硬化モデルマウスを用いて、主に制御性 T 細胞の数や機能を調節することによる、新規の動脈硬化予防法もしくは治療法を開発すること。

3. 研究の方法

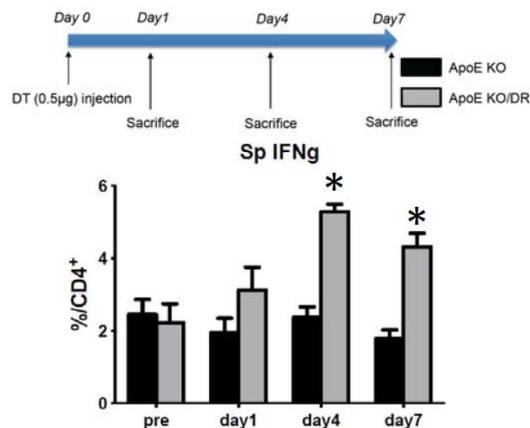
- (1) 転写因子である Foxp3 は内在性 Treg に最も特異的な分子であり、その抑制能の維持において必要不可欠である。共同研究により、

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 apoE-KO マウスとを交配して DEREG/apoE-KO 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。

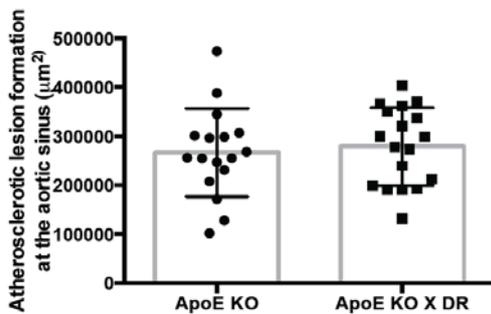
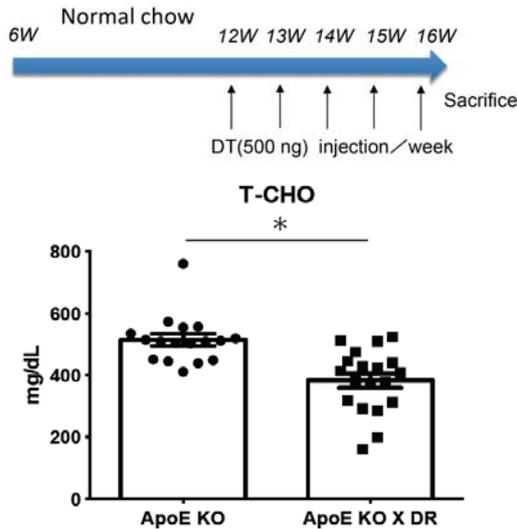
(2) 普通食で飼育した apoE-KO マウスにおいて、5kJ/m²の線量のUVB照射を週に1回、6週齢から開始して20週齢までの合計14回施行した。20週齢にて大動脈基部での動脈硬化の定量評価を行った。動脈硬化病変部での炎症関連免疫細胞(Treg、T細胞、マクロファージ)や不安定性(平滑筋細胞、膠原繊維)などの評価は免疫染色を用いて行った。リンパ節、脾臓でのTregなどの免疫細胞の数や活性化の状態の評価についてはフローサイトメトリーを用いて行った。脾臓細胞を用いたサイトカインの産生については、ELISAを用いて定量評価を行った。

4. 研究成果

(1) DEREG (Depletion of regulatory T cell) マウスと apoE-KO マウスとを交配して DEREG/apoE-KO マウスを作製した。高脂血症下で Treg を減少させると脾臓における CD4 陽性 T 細胞中のインターフェロン γ (IFN- γ) 産生細胞の割合は著明に増加し、高脂血症下において、Treg は T 細胞を中心とした免疫細胞の活性化を抑制していることが示唆された(下図)。

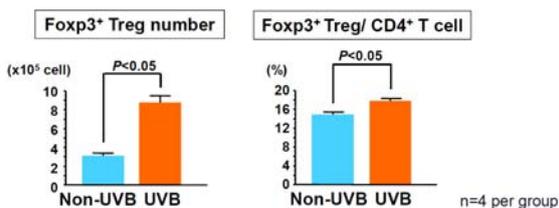


この DEREG/apoE-KO マウスで効果的に Treg を減少させるためのジフテリアトキシンの投与量および回数を検討し、適切な投与プロトコールを決定した。一定期間 Treg を減少させたマウスでは血液中のコレステロール値の著明な低下を認めた(次ページ図)。Treg の減少は動脈硬化形成に影響を与えなかつ

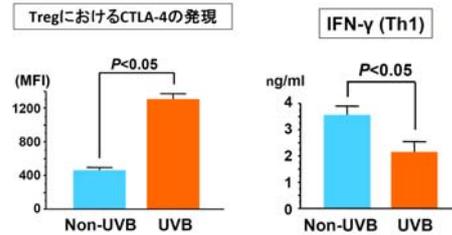


た (次ページ図)。エフェクターT細胞の活性化による動脈硬化促進作用に対して、血液中コレステロールの減少が動脈硬化抑制的に作用したために、結果として動脈硬化病変は不変であったのではないかと予想される。今後さらなる検討が必要であるが、具体的には、Treg がコレステロール代謝へ与える影響の検討や、コレステロール値が変化しにくいような条件下で Treg の減少が動脈硬化形成へ与える影響を調べることを考えている。

(2) UVB 照射によりリンパ組織での Treg の増加 (下図) およびその免疫抑制に関わる重要な分子である CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) の著明な発現増加を認めた (右上図)。脾臓細胞を分離し、T細胞の刺激薬である Concanavalin A で刺激して上澄みの細胞培養液中のサイトカインについて ELISA を用いて測定したところ、Th1 (タイプ 1 ヘルパーT 細胞) 由来の炎症性サイトカインである IFN- γ の有意な産生低下を認

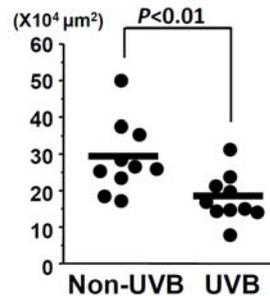


めた (右上図)。



apoE-KO マウスを用いて週に 1 回の UVB 照射を 6 週齢から開始して 20 週齢までの合計 14 回行い、大動脈基部での動脈硬化の定量評価を行ったところ、動脈硬化形成が有意に抑制されることが明らかになった (下図)。免疫染色を用いて動脈硬化病変部での炎症性細胞浸潤の評価を行ったところ、UVB 照射群にて、マクロファージおよび CD4 陽性 T 細胞の浸潤の著明な減少を認めた。

大動脈基部のプラーク面積



UVB 照射による動脈硬化抑制における Treg の関与を直接的に証明するために、上記で作製した DEREK/apoE-KO マウスを用いて UVB 照射の実験を行った。このマウスでは UVB 照射による動脈硬化抑制効果が消失する傾向が見られ、UVB 照射による動脈硬化抑制の機序として Treg の関与が示唆された。今後、解析するマウスの数を増やして同様の実験を行っていく予定である。

UVB 照射による Treg の誘導において、Langerin 陽性皮膚樹状細胞の機能修飾の関与の可能性が報告されている。予備実験の結果ではあるが、我々は UVB 照射によりこの細胞集団が皮膚から所属リンパ節へと移動し、Treg を誘導することに関わることを観察している。UVB 照射による Treg の誘導および動脈硬化抑制における皮膚 Langerin 陽性樹状細胞の果たす役割のさらなる検討を行っていく予定である。

適量の UVB 照射により有意な動脈硬化形成の抑制が得られた。その機序の一つとして、強い抑制能を有する Treg が全身で誘導され、T 細胞の活性化が抑制されていることが示唆された。UVB 照射は新規の動脈硬化性疾患の治療法・予防法となり得ることが示唆された。

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 2 件)

- ① Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Hirata K. Dendritic cells in atherogenesis: Possible novel targets for prevention of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 19:953-961, 2012. (査読有り)
- ② Sasaki N, Yamashita T, Takeda M, Hirata K. Regulatory T cells in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb.* 19:503-515, 2012. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Kasahara K, Sasaki N. A novel mouse model to deplete regulatory T cells uncovers their role in atherogenesis under hypercholesterolemia. 第 77 回日本循環器学会学術集会、2013 年 3 月 15 日、横浜
- ② Sasaki N. Anti-atherogenic role of ultraviolet radiation -induced regulatory T cells in a mouse model of atherosclerosis. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸
- ③ 佐々木 直人 動脈硬化性疾患予防・治療のための抗炎症戦略 -制御性T細胞誘導を介する抗動脈硬化免疫療法の試み- 第34回心筋生検研究会・招待講演、2012 年 11 月 24 日、松本
- ④ Sasaki N. Activation of regulatory T cells by ultraviolet irradiation controls atherogenesis in mice. 第 85 回米国心臓学会議、2012 年 11 月 6 日、米国 ロサンゼルス
- ⑤ Sasaki N. A novel ultraviolet-based phototherapy against atherosclerosis targeting regulatory T cells and skin dendritic cells. XVI International Symposium on Atherosclerosis (ISA2012)、2012 年 3 月 26 日、オーストラリア シドニー
- ⑥ Sasaki N. A novel ultraviolet-based phototherapy against atherosclerosis targeting regulatory T cells and skin dendritic cells. 第 76 回日本循環器学会総会・学術集会・Young

Investigator's Award 優秀賞受賞講演、
2012 年 3 月 16 日、福岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/iml/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 直人 (SASAKI NAOTO)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：00514746