

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591073

研究課題名(和文)急性冠症候群発症に関わるPSGL-1陽性CD4 T細胞の責任冠動脈における役割

研究課題名(英文)The role of PSGL-1-expressing CD4 T cells in the culprit lesion of acute coronary syndrome

研究代表者

佐藤 加代子(Sato, Kayoko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：20246482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化進展や粥腫不安定化に白血球の血管内皮細胞(EC)への接着と浸潤は重要である。急性冠症候群(ACS)の責任冠動脈血、粥腫ではP-selectin glycoprotein ligand-1(PSGL-1)+CD4 T細胞を多数認め、ECに強く接着、E/P-selectinを介しアポトーシスを誘導した。さらにApoE-/-マウスの動脈硬化進展、IFN +CD4 T細胞、IL17+CD4 T細胞増加と粥腫への浸潤、血管壁のアポトーシスはPSGL-1-/-ApoE-/-マウスで抑制された。すなわち、PSGL-1陽性CD4 T細胞は動脈硬化進展と粥腫不安定化に重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adhesion of circulating leukocytes to the endothelial cells (ECs) and subsequent trans-endothelial migration are important in the development of atherosclerosis. This process is predominantly mediated by adhesion molecules, which are expressed on ECs and leukocytes. The culprit coronary artery and atherosclerotic plaque from patients with acute coronary syndrome (ACS) underwent the thrombus-aspiration therapy contained abundant PSGL-1+CD4+T cells. These PSGL-1+CD4+T cells strongly bound to both P-selectin and E-selectin, and induced EC apoptosis.

Furthermore, in apolipoprotein E (ApoE) deficient mice, the advanced atherosclerosis with many activated IFN +CD4 T cells, IL17+CD4 T cells, and apoptosis were observed. In contrast, these features were inhibited in PSGL-1/ApoE double deficient mice, contributing more stabilized morphologic features. We concluded that PSGL-1 expressing CD4+T cells participate directly in the development of atherosclerosis and plaque instability in ACS.

研究分野：医歯薬学・循環器内科学

キーワード：PSGL-1 動脈硬化 急性冠症候群 炎症 免疫 接着分子 T細胞 白血球

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性冠症候群とT細胞

心筋梗塞、不安定狭心症、心臓突然死を含む急性冠症候群(ACS)に代表される虚血性心疾患が日本の死亡原因に占める割合は、年々増加している。申請者はこれまでT細胞がACS発症にどのように関与しているのかを検討してきた。ACS患者CD4 T細胞および動脈硬化粥腫に浸潤しているCD4 T細胞が標的細胞である血管平滑筋細胞に接着した際、CD3とLFA-1からなるCytotoxic immunologic synapseを形成する。その際、CD4 T細胞ではZAP-70のリン酸化に続き細胞内Ca濃度が上昇、それに続き標的細胞内Ca濃度が上昇してアポトーシスが誘導される()。また、これらCD4 T細胞はTRAIL / DR5を介する刺激で血管平滑筋細胞や血管内皮細胞にアポトーシスを誘導し、粥腫破綻や粥腫糜爛を引き起こして粥腫不安定化に関与する可能性を明らかとした()。また、同じく粥腫に浸潤している形質細胞様樹状細胞は、トールライクレセプター9 (TRL9)を介する刺激を受けてINFを産生し、それによりCD4 T細胞上のTRAIL発現が増強されることも明らかとした()。さらに、不安定粥腫にはCD83やCD86陽性の活性化した形質細胞様樹状細胞が多数浸潤しており、CCL19やCCL21を産生して、CD40L陽性活性化T細胞を粥腫に引き寄せ、Th1サイトカインであるINF、TNFも多く発現していることを明らかとした()。

(2) P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)と動脈硬化

一方、50歳以下の女性ACS患者の主な病理学的機序は、粥腫糜爛とされている。我々の閉経前後の更年期女性の検討では、ACS患者と同様に強く活性化したCD4 T細胞が多く認められ、そのCD4 T細胞は接着分子PSGL-1を多く発現していた。また、血管内皮細胞にPSGL-1依存的に強く接着しアポトーシスを誘導することを明らかとした()。最近、PSGL-1^{-/-}/ApoE^{-/-}DKOマウスでは、動脈硬化マウスでの主な単球サブセットであるLy-6C^{hi}浸潤が有意に減少して動脈硬化進展が抑制されたと報告された()。しかし、どのような機序で動脈硬化進展が抑制されたのか不明であった。単球やT細胞に恒常的に発現するPSGL-1は活性化後にセレクチンに結合して効果作用を現すことが報告されているが、動脈硬化粥腫局所の進展や不安定化における役割も解明されていない。

2. 研究の目的

ACS発症を来たす特定の責任冠動脈病変に、CD4 T細胞が浸潤して粥腫を不安定化する機序を解明する。すなわち、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)発現CD4 T細胞が、責任冠動脈の硬化病変に浸潤し、

粥腫の進展と不安定化をもたらすACS発症に至る機序を明らかにするとともに、血管に炎症障害を起こす作用を抑制する治療の研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

ACS責任冠動脈病変へCD4 T細胞が浸潤する機序、および責任冠動脈不安定粥腫でのCD4 T細胞サブセットの役割を明らかにするため、ヒト正常コントロール末梢血およびACS患者末梢血、血栓吸引療法で得られたACS責任冠動脈血と組織、さらにマウスを利用して以下の検討を行なった。

(1) ACS患者におけるCD4 T細胞上の接着分子発現のFACSによる解析。

(2) ACS発症を来たした責任冠動脈病変の不安定粥腫と血栓におけるT細胞、マクロファージ、好中球、PSGL-1発現CD4 T細胞の免疫染色。

(3) PSGL-1陽性CD4 T細胞が責任冠動脈へ浸潤する機序のselectin binding assay、rolling-adhesion assayによる検討。

(4) 粥腫不安定化に関わるPSGL-1陽性CD4 T細胞による血管内皮細胞・血管平滑筋細胞アポトーシスシグナルをアポトーシスアッセイ、PARP断片を免疫染色、caspase-3活性をFACSで各々検討。

(5) ApoE^{-/-}マウスおよび我々が作成したPSGL-1^{-/-}/ApoE^{-/-}マウスを用いて、PSGL-1発現CD4 T細胞の動脈硬化進展と粥腫不安定化への関与を検証するため、動脈硬化進展をスタン染色、CD4 T細胞サブセット(Th1、Th2、Th17、制御性T細胞)を脾臓より単離した末梢単核球を用いてFACSで解析。さらに、動脈硬化粥腫のT細胞サブセット浸潤と血管内皮細胞および血管平滑筋細胞のselectin発現とアポトーシスを免疫染色で解析した。

4. 研究成果

(1) ACS患者T細胞上に発現する接着分子

Contに比較してACS末梢血CD4 T細胞では、integrin₂およびPSGL-1発現が有意に亢進していた(図1A)。さらに責任冠動脈血では末梢血よりもCD4 T細胞上のPSGL-1発現が亢進していた(図1B)。

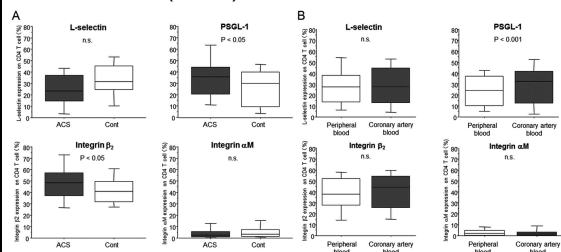


図1 ACS患者におけるPSGL-1陽性CD4 T細胞の増加

(2) 責任冠動脈病変における炎症細胞浸潤

ACS急性期に血栓吸引療法で責任冠動脈より得た動脈硬化粥腫には多数のCD3陽性T細胞、CD68陽性マクロファージ、少数のMPO陽性好中球の浸潤を認めた。血栓には、CD3 T

細胞、マクロファージ、好中球いずれも多数認められた。また、動脈硬化粥腫、血栓ともに多くの PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞が存在していた(図 2)。

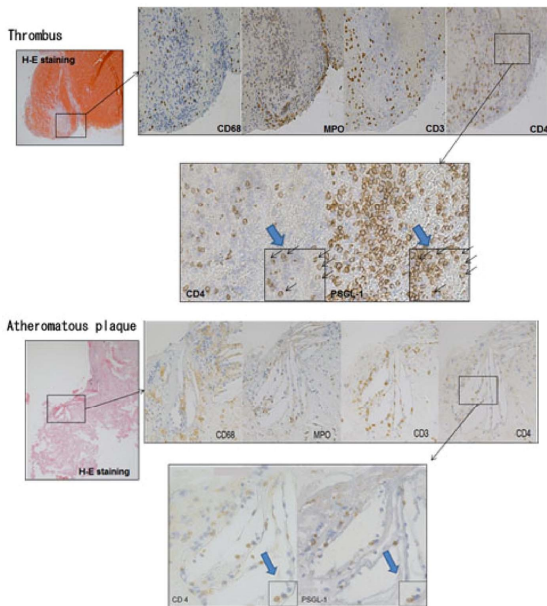


図 2 責任冠動脈粥腫における PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞

(3) PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞の E-/P-selectin を介する血管内皮細胞接着

ACS 患者 CD4 T 細胞は CD3 による TCR 刺激により CD69 陽性の活性化 T 細胞が増加し、PSGL-1 発現も亢進した。Binding assay により活性化 PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞は E-selectin、P-selectin 両者に結合し(図 3)、血管内皮細胞に正常コントロールに比較して強く接着した(図 4)。

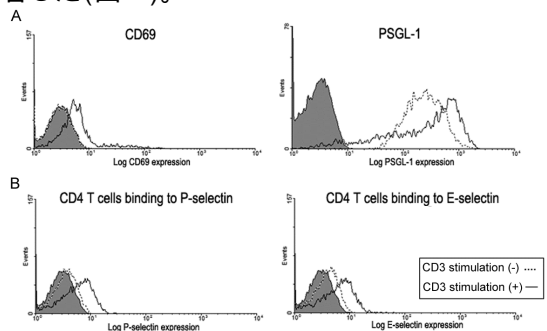


図 3 ACS 患者 CD4 T 細胞の活性化に伴う PSGL-1 発現亢進と P-selectin および E-selectin への結合

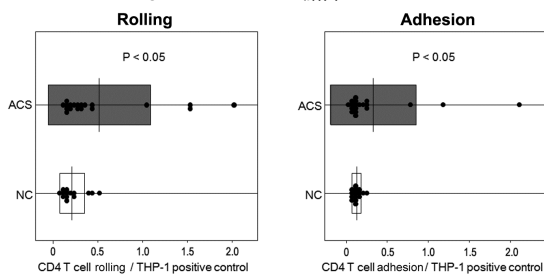


図 4 ACS 患者 CD4 T 細胞の血管内皮細胞への強い接着

(4) PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞による血管内皮細胞障害

責任冠動脈に強く発現する PSGL-1 陽性 CD4

T 細胞の粥腫不安定化への関与を検討するため、アポトーシスアッセイを行った。その結果、ACS 患者末梢血 CD4 T 細胞は血管内皮細胞にアポトーシスを強く誘導し(図 5A)、末梢血に比較し冠動脈血 CD4 T 細胞は強くアポトーシスを誘導した(図 5B)。また、このアポトーシスは CD4 T 細胞を抗 PSGL-1 抗体で前処理すると抑制され、PSGL-1 依存的であった(図 5C)。さらに、アポトーシスを来した血管内皮細胞に PARP 断片化の増加および活性化カスプース 3 発現の増加を認めた(図 6)。

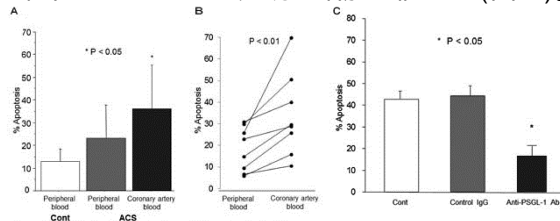


図 5 ACS 患者 PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞による血管内皮細胞アポトーシス

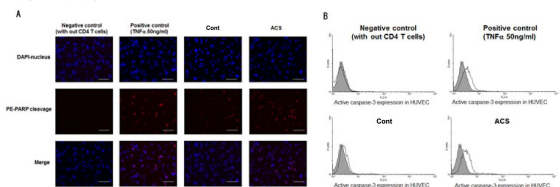


図 6 ACS 患者 PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞による活性化 Caspase-3 を介する血管内皮細胞アポトーシス

(5) ApoE^{-/-} マウス (ApoE^{-/-}) および PSGL-1^{-/-}ApoE^{-/-} マウス (PSGL-1^{-/-}ApoE^{-/-}) を用いた PSGL-1 発現 CD4 T 細胞の動脈硬化進展と粥腫不安定化への関与

ApoE^{-/-}18W および PSGL-1^{-/-}ApoE^{-/-}18W を普通食(ND)または高脂肪食(HFD)で 8W 飼育すると、Vital や体重増加には両群間で差異は認められなかったが、ApoE^{-/-} HFD 群では動脈硬化が著明に進展した。ところが、PSGL-1^{-/-}ApoE^{-/-}マウスでは動脈硬化進展は非常に抑制されていた(図 7A、B)。

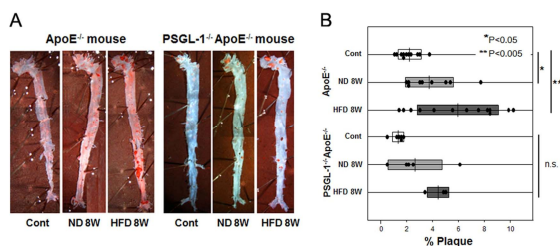


図 7 PSGL-1 ノックアウトによる動脈硬化進展抑制

また、脾臓より単離した末梢単核球を FACS で解析した結果、ApoE^{-/-}では 18W Cont の段階ですでに CD69 陽性の T 細胞活性化を認めたが、PSGL-1^{-/-}ApoE^{-/-}では T 細胞の活性化は抑制されていた。さらに、ApoE^{-/-}では動脈硬化進展に伴い IFN⁺Th1 および IL17⁺Th17 の発現増加を認めたが、PSGL-1^{-/-}ApoE^{-/-}では抑制されていた。一方、Th2 や Treg には変化は認められなかった。

さらに、ApoE^{-/-}で認められた動脈硬化粥腫への CD4⁺IFN⁺Th1 および CD4⁺IL17⁺Th17 の浸

潤、および E-selectin、P-selectin の血管内皮細胞(CD34)、血管平滑筋細胞(α-SMC)での発現増加や TUNEL 陽性アポトーシスは PSGL-1^{-/-}ApoE^{-/-}では抑制されていた(図8)。

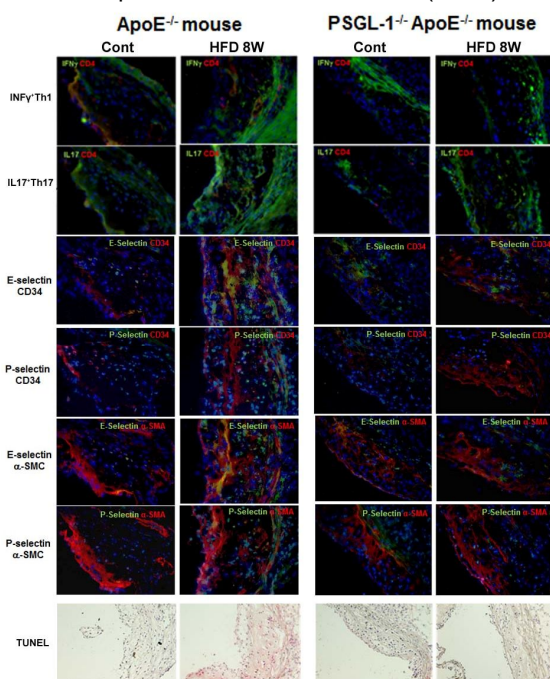


図8 PSGL-1 ノックアウトによる粥腫安定化

本研究により、PSGL-1 は T 細胞を活性化し E-selectin/ P-selectin を介して、CD4⁺IFN⁺Th1、CD4⁺IL17⁺Th17 をはじめとする炎症細胞を動脈の血管内皮下に引き寄せ、動脈硬化進展、さらには ACS 患者の責任冠動脈では PSGL-1 依存的に血管内皮細胞にアポトーシスを誘導し、粥腫不安定化をもたらす ACS 発症に深く関与することが明らかとなった。

今後、ApoE^{-/-}マウスおよび PSGL-1^{-/-}ApoE^{-/-}ダブルノックアウトマウスより得た CD4 T 細胞を次世代型シーケンサーにて transcriptome analysis を網羅的に行い、動脈硬化進展や粥腫不安定化における PSGL-1 による T 細胞活性化やヘルパー T 細胞分化のシグナル制御、および PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞の P-selectin、E-selectin 結合後の血管傷害メカニズムについて研究を進展させ、新たな ACS のバイオマーカーおよび治療の開発を目指す。

<引用文献>

Pryshchep S, Sato K, Goronzy JJ, Weyand CM, T-cell Recognition and Killing of Vascular Smooth Muscle Cells in Acute Coronary Syndrome. *Circ Res*, 98: 1168-1176, 2006.
Sato K, Niesser A, Kopecky SL., Frye RL., Goronzy JJ, Weyand CM, TRAIL-expressing T cells induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in the atherosclerotic plaque. *J*

Exp Med, 203(1):239-50, 2006.
Sato K, Nuki T, Gomita K, Weyand CM, Hagiwara N, Statins reduce endothelial cell apoptosis via inhibition of TRAIL expression on activated CD4 T cells in acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*, 213(1):33-39, 2010.
 Niessner A, Sato K, Chaikof EL, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM, Pathogen-sensing Plasmacytoid Dendritic Cells Stimulate Cytotoxic T-Cell Function in the Atherosclerotic Plaque through Interferon-γ. *Circulation*, 114(23):2482-9, 2006.
 Erbel C, Sato K, Merver FB, Kopecky SL., Frye RL., Goronzy JJ, Weyand CM, Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque. *Basic Res Cardiol*, 102(2):123-32, 2007.
 Gomita K, Sato K, Yoshida M, Hagiwara N, PSGL-1-expressing CD4 T cells induce endothelial cell apoptosis in perimenopausal women. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 19(3):227-236, 2012.
 An G, Wang H, Tang R, Yago T, McDaniel JM, McGee S, Huo Y, Xia L, P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. *Circulation*, 117(25):3227-37, 2008.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Keiko Endo, Atsushi Suzuki, Kayoko Sato, Tsuyoshi Shiga, Sudden cardiac arrest secondary to cardiac amyloidosis in a young woman with cryopyrin-associated periodic syndrome. *BMJ Case reports*, 1-5, 2015, 査読有, DOI:10.1136/bcr-2015-209468.
佐藤加代子, 女性の動脈硬化症の特徴: Atherosclerosis in women. 女性の循環器疾患を考える. *Heart View*, 19:20-25, 2015, 査読無.
佐藤加代子, 喜多村孝一, 鈴木敦, 萩原誠久, PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞の動脈硬化における役割. Annual Report of the Japan Research Promotion Society for Cardiovascular Disease, 28:11-15, 2015, 査読無.
Kayoko Sato, Helper T cell Diversity and Plasticity-Possible Role in Cardiovascular Disease. *Circulation Journal*, 78:2843-2844, 2014, 査読有, DOI:1.1253/circ.CJ-14-1164.

Fukushima N, Suzuki A, Fukushima K, Tanaka Y, Sato Y, Nitta K, Hagiwara N, Impact of the serum bone-specific alkaline phosphatase level at the initiation of hemodialysis therapy for end-stage renal disease on cardiovascular events. *IJC Metabolic & Endocrine*, 4: 58-62, 2014, 査読有.

Insufficient ascorbic acid intake during gestation induces abnormal cardiac dilation in fetal and neonatal SMP30/GNL knockout mice. Kishimoto Y, Kanai T, Sato K, Lee J, Jeong KY, Shimokado K, Maruyama N, Ishigami A, *Pediatric Research*, 73(5), 578-84, 2013, 査読有, DOI: 10.1038/pr.2013.22. PSGL-1 陽性 CD4 T 細胞が急性冠症候群の責任冠動脈で果たす役割. 佐藤加代子, 喜多村一孝, 福島 敬子, 萩原 誠久, 日本心臓血圧研究振興会(平成二十四年度研究業績集):27, 21-26, 2013, 査読無.

Suzuki A, Shiga T, Arai K, Shoda M, Reversible cardiomyopathy after radiofrequency ablation of 30-year persistent atrial tachycardia. *BMJ Case Rep*. Dec 10, bcr2013008727, 2013, 査読有, DOI:10.1136/bcr-2013-008727. Shiga T, Hashiguchi M, Naganuma M, Suzuki A, Hagiwara N, Contributing factors to the apparent clearance of bepridil in patients with paroxysmal or persistent atrial fibrillation: analysis using population pharmacokinetics. *Ther Drug Monit*, 35(3):367-73, 2013, 査読有, DOI: 10.1097/FTD.0b013e318286ec33.

Shiga T, Hashiguchi M, Nakamura K, Shimizu M, Shimizu K, Suzuki A, Mochizuki M, Hagiwara N, Lack of pharmacokinetic interaction between pilsicanide and rifampicin in healthy volunteers. *Japanese journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 44, 31-305, 2013, 査読有.

Kishimoto Y, Kanai T, Sato K, Lee J, Jeong KY, Shimokado K, Maruyama N, Ishigami A, Insufficient ascorbic acid intake during gestation induces abnormal cardiac dilation in fetal and neonatal SMP30/GNL knockout mice. *Pediatric Research*, 73(5), 578-84, 2013, 査読有, DOI: 10.1038/pr.2013.22.

Gomita K, Sato K, Yoshida M, Hagiwara N, PSGL-1-expressing CD4 T cells induce endothelial cell apoptosis in perimenopausal women. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*,

19(3):227-236, 2012, 査読有, DOI: 10.550/jat.9399.

[学会発表](計21件)

Yusuke Tanigaito, Kayoko Sato, Kitamura Kazutaka, Atsuko Futase, Keiko Fukushima, Kenta Uto, Nobuhisa Hagiwara, IL17 contribute to the atherosclerotic development and the initiation of chronic kidney disease (CKD). 2014 Scientific Session of American Heart Association, 2014/11/18, Chicago, USA.

Kitamura Kazutaka, Kayoko Sato, Keiko Endo, Atsuko Futase, Chieko Masuda, Kenta Uto, Nobuhisa Hagiwara, Atorvastatin improved the atherosclerotic renal dysfunction by the inhibition of inflammation in kidney. 第46回日本動脈硬化学会総会学術集会, 2014/7/10, 京王プラザホテル(東京都・新宿区).

二瀬敦子, 佐藤加代子, 喜多村一孝, 増田千恵子, 萩原誠久, DDP-4 阻害剤による動脈硬化進展と炎症抑制. 第46回日本動脈硬化学会総会学術集会, 2014/7/11, 京王プラザホテル(東京都・新宿区).

Kayoko Sato, The role of T cell in the atherosclerotic plaque development. 第36回日本血栓止血学会学術集会(招待講演), 2014/5/29, 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市).

Keiko Endo, Kayoko Sato, Kitamura Kazutaka, Keiko Fukushima, Kenta Uto, Nobuhisa Hagiwara, IL17 contribute to the atherosclerotic development and the initiation of chronic kidney disease (CKD) in ApoE deficient mouse. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014/4/15, 京都市勧業館みやこめっせ(京都府・京都市).

Kitamura Kazutaka, Kayoko Sato, Keiko Endo, Atsuko Futase, Chieko Masuda, Kenta Uto, Nobuhisa Hagiwara, Statin improved the atherosclerotic renal dysfunction. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014/4/14, 京都市勧業館みやこめっせ(京都府・京都市).

Kitamura Kitamura, Kayoko Sato, Fukushima Keiko, Futase Atsuko, Masuda Chieko, Nobuhisa Hagiwara, The Role of PSGL-1 on Leucocytes in Acute Coronary Syndrome and the Development of Atherosclerosis. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2014/3/23, 東京国際フォーラム(東京都・中央区).

佐藤加代子, 動脈硬化進展と粥腫不安定

化における接着分子と CD4+T 細胞サブセットの役割. 第 43 回日本新脈管作動物質学会(招待講演), 2014/2/15, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

KITAMURA Kazutaka, SATO Kayoko, GOMITA Keiko, HAGUWARA Nobuhisa, Role of PSGL-1 Expressing CD4 T Cells in Acute Coronary Syndrome. European Atherosclerosis Society Congress, 2013/6/3, Lyon, France.

喜多村一孝, 佐藤加代子, 遠藤景子, 鈴木敦, 萩原誠久, 動脈硬化進展における接着分子 PSGL-1 の役割. 第 45 回日本動脈硬化化学会総会学術集会, 2013/7/19, 京王プラザホテル(東京・新宿区).

Keiko Endo, Kayoko Sato, Suzuki Atsushi, Keiko Fukushima, Kitamura Kazutaka, Nobuhisa Hagiwara, IL17 and INF contribute to the atherosclerotic development and microalbuminuria with the dysfunction of podocytes. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2013/3/17, パシフィコ(神奈川県・横浜市).

Kazutaka Kitamura, Kayoko Sato, Keiko Gomita, Atsushi Suzuki, Nobuhisa Hagiwara, PSGL-1⁺CD4⁺ T cells Contribute Atherosclerotic Plaque Instability. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012/12/7, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

Kayoko Sato, PSGL-1⁺CD4⁺ T Cells induced Endothelial Cell Apoptosis in Perimenopausal Women with Low Estrogen. 第 44 回日本動脈硬化化学会総会学術集会(招待講演), 2012/7/20, ヒルトン福岡シーホーク(福岡県・福岡市).

Atsushi Suzuki, Kayoko Sato, Takashi Saito, Keiko Gomita, Keiko Uchida, Nobuhisa Hagiwara, CD4 T-Cells Contribute to the Microalbuminuria with the Dysfunction of Podocytes. 第 44 回日本動脈硬化化学会総会学術集会, 2012/7/19, ヒルトン福岡シーホーク(福岡県・福岡市).

佐藤加代子, 萩原誠久, エストロゲン低下に伴う CD4 T 細胞上の接着分子 PSGL-1 発現亢進と血管内皮機能障害. 第 16 回日本適応学会学術集会, 2012/6/9, ホテルサンルート有明(東京・有明).

鈴木敦, 佐藤加代子, 五味田敬子, 齋藤貴志, 内田啓子, 新田孝作, 萩原誠久, Th1 and Th17 T cells Contribute to the Microalbuminuria in ApoE Deficient Mice. 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会, 2012/4/13, みやこめっせ(京都府・京都市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 加代子 (SATO KAYOKO)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20246482

研究分担者

鈴木 敦 (SUZUKI ATSUSHI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00625626

研究分担者

沢辺 元司 (SAWABE MOTOJI)
東京医科歯科大学・その他の研究科・教授
研究者番号: 30196331

(2) 連携研究者

萩原 誠久 (HAGIWARA NOBUHISA)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00180802

(3) 研究協力者

喜多村 一孝 (KITAMURA KAZUTAKA)
斉藤 貴士 (SAITO TAKASHI)
遠藤 景子 (ENDO KEIKO)
二瀬 敦子 (FUTASE ATSUKO)
増田 知恵子 (MASUDA CHIEKO)