

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860601

研究課題名(和文) 動脈硬化性疾患における制御性T細胞の関与の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of regulatory T cells in atherosclerotic disease

研究代表者

佐々木 直人 (SASAKI, NAOTO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00514746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)は、病的な免疫応答を抑制することにより、動脈硬化性疾患において抑制的に働くことが示された。また、マウスにおいて、全身でTregの数を増やしたりその抑制能を増強させることにより、動脈硬化の進行は抑制され、一旦形成された動脈硬化病変は退縮し、大動脈瘤形成は抑制されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We provided direct evidence that regulatory T cells (Tregs) prevent atherosclerotic disease by dampening pathogenic immune responses. We also demonstrated that promotion of an endogenous regulatory immune response could be a possible therapeutic approach to prevent the development of atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm and induce regression of established atherosclerosis in mice.

研究分野：医歯薬学

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ってきた。動脈硬化病変には何らかの特異的抗原や因子が存在し、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。しかし、炎症・免疫反応に対して直接的に介入することによる治療は未だ臨床の現場では行われていない。T細胞の中には、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、自己免疫疾患をはじめとする様々な慢性炎症性疾患において病的な免疫応答を抑制することが明らかになったが、動脈硬化症においてもこの細胞集団が病変形成に抑制的に働くことが示唆されている。

我々は、動脈硬化症における炎症・免疫反応の関与の解明および、その制御による新規の動脈硬化治療法を開発を目指して研究を行ってきた。特に、免疫抑制性に働くTregおよび免疫寛容性樹状細胞に注目し、これらの誘導が動脈硬化病変形成抑制に関わることを示してきた(Sasaki N et al. *Circulation*. 2009, Takeda M et al. *ATVB*. 2010, Nakajima K et al. *ATVB*. 2011, Kita T et al. *Cardiovasc Res*. 2014, Kasahara K et al. *Journal of the AHA*. 2014)。さらに、適量の紫外線(UVB)照射により動脈硬化形成の抑制が得られることを発見し、その機序の一つとして、強い抑制能を有するTregが誘導され、T細胞の活性化が抑制されていることが考えられた。ヒトにおいても、末梢血液中のTregの減少と冠動脈疾患発症との関連性を見出し報告した(Emoto T et al. *Circ J*. 2014)。以上のように、Tregの誘導による新規動脈硬化治療法の可能性について示してきた。

最近の研究により、動脈硬化病変の形成だけでなく、病変の退縮にも炎症免疫機序が大きく関与していることが示唆されているが、Tregを含めたT細胞の動脈硬化退縮への関与については全く不明である。

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。Tregが大動脈瘤形成抑制に働く可能性が示唆されているが、その直接的な証明はなされていない。

2. 研究の目的

(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こと。

(2)皮膚免疫細胞の機能修飾を介した制御性T細胞の誘導による新規動脈硬化治療法を開発すること。

(3)動脈硬化病変退縮における制御性T細胞の役割を明らかにすること。

(4)大動脈瘤形成における制御性T細胞の役割を明らかにすること。

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マウスとアポリポ蛋白遺伝子E欠損(*ApoE*^{-/-})マウスもしくはLDL受容体遺伝子欠損(*Ldlr*^{-/-})マウスとを交配してDEREG/*ApoE*^{-/-}マウスおよび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。

(2)上記で作製したDEREG/*ApoE*^{-/-}マウスを用いて、UVB照射の実験を行い、動脈硬化抑制におけるTregの誘導の関与を明らかにする。また、共同研究により、我々はLang-DTRマウス(Langerin陽性樹状細胞特異的ジフテリアトキシンレセプターノックインマウス)を入手しており、*ApoE*^{-/-}マウスと交配して表皮のランゲルハンス細胞を特異的に除去できるようなLang-DTR/*ApoE*^{-/-}マウスを作製した。このマウスを用いてUVB照射の実験を行い、UVB照射によるTregの誘導および動脈硬化形成の抑制における表皮ランゲルハンス細胞の役割について検討を行った。リンパ組織および病変部における炎症・免疫細胞の評価については上記と同様に行った。

(3)抗CD3抗体は臓器移植後の急性拒絶反応に対して臨床応用されている抗体医薬であるが、エフェクターT細胞させて、Tregの割合を増加させることが知られている。*Ldlr*^{-/-}マウスに高脂肪食負荷を行い動脈硬化を一旦惹起させ(ベースライン群)、普通食への変更により脂質を減少させるのと同時に、抗CD3抗体もしくはコントロールとしてハムスターIgGを経静脈的に投与を行い、動脈硬化退縮が起こるかどうかにして検討を行

った。また、動脈硬化退縮における Treg の関与を示すために、抗 CD25 抗体の投与を行い Treg を除去した上で、抗 CD3 抗体投与を行い、動脈硬化退縮が得られるかについて検討した。リンパ組織および病変部における炎症・免疫細胞の評価については上記と同様に行った。

(4) 高脂肪食を負荷した *ApoE*^{-/-}マウスに、浸透圧ミニポンプを用いてアンジオテンシンの投与を行い、大動脈瘤を作成した。全身の Treg を増加させる目的で IL-2 (インターロイキン-2) / IL-2 抗体複合体の投与を、コントロール群としてリン酸緩衝生理食塩水の投与を行い、大動脈瘤の発症率、死亡率についての評価を行った。次に、DEREG/*ApoE*^{-/-}マウスを用いて、アンジオテンシン 投与により大動脈瘤を誘導し、Treg の減少により大動脈瘤形成が促進されるかどうかについて検討した。リンパ組織および病変部における炎症・免疫細胞の評価については上記と同様に行った。

4. 研究成果

(1) Treg の減少した DEREG/*ApoE*^{-/-}マウスでは、動脈硬化病変のサイズに変化を認めなかった。このマウスでは、エフェクター T 細胞の免疫応答の増強および血液中のコレステロール値の有意な低下を認め、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のではないかと推測される。

他の動脈硬化モデルマウス (*Ldlr*^{-/-})を用いて、これと DEREG マウスとを交配して DEREG/*Ldlr*^{-/-}マウスを作製した。このマウスでは、Treg の減少は血液中のコレステロール値を変化させることなく動脈硬化病変の形成を促進し、Treg は動脈硬化抑制に働くことが示された。

マウスのバックグラウンドの違いにより、Treg の減少は脂質代謝に異なる影響を与えることが明らかとなり、その機序について今後さらなる検討が必要である。

(2) *ApoE*^{-/-}マウスに UVB 照射を行うことにより、Foxp3 陽性 Treg の誘導、エフェクター T 細胞の免疫応答の抑制とともに有意な動脈硬化形成の抑制を認めた。Treg が減少した DEREG/*ApoE*^{-/-}マウスでは、UVB 照射による動脈硬化抑制効果は打ち消され、その抑制機序として Treg の誘導が必須であることが示唆された。

UVB が Treg を増加させる機序として、皮膚のランゲルハンス細胞の関与が示唆されており、この細胞を特異的に除去した Langerin-DTR/*ApoE*^{-/-}マウスでは、UVB 照射による Treg の増加および動脈硬化抑制効果は認めず、ランゲルハンス細胞は Treg の誘導および動脈硬化抑制に必須であることが示された。適量の UVB 照射は、皮膚から全身の

免疫調節に働き、動脈硬化予防的に作用した。

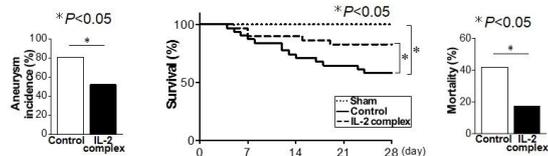
UVB 照射により皮膚免疫の修飾による Treg の誘導を介した動脈硬化予防という独創性のある予防・治療法の可能性を示すことができたが(論文投稿中)、実際にヒトにおいても同様の効果を認めるかどうかを慎重に検討し、臨床応用に結びつけたいと考えている。

(3) ハムスター IgG 投与を行ったコントロール群ではコレステロール値が正常値にまで下降していたが、普通食への変更前のベースライン群と比較して大動脈基部の動脈硬化巣の面積に変化を認めなかった。抗 CD3 抗体群ではベースライン群に比べて動脈硬化巣面積が 25%減少し、コントロール群と比べても 26%と有意な減少を認め、動脈硬化の退縮が起きたことが示された。コレステロール値の正常化とともに、抗 CD3 抗体投与を行うことにより、リンパ関連組織および動脈硬化巣内において活性化エフェクター T 細胞の数的もしくは機能的な抑制が得られ、Treg の相対的な増加を認めた。

抗 CD25 抗体の投与により Treg を除去すると、抗 CD3 抗体投与による動脈硬化退縮の効果は消失したことから、CD4 陽性 T 細胞の機能抑制に加え、Treg の増加が動脈硬化退縮において必須であることが示された。

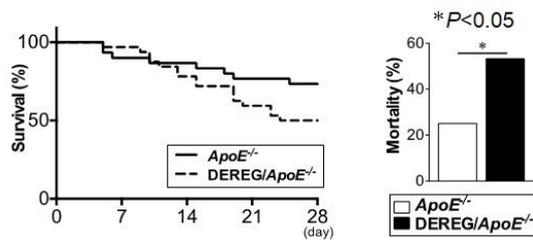
Treg の誘導は動脈硬化退縮療法の新規治療戦略となり得ると期待される。以上の研究成果については、原著論文として報告を行った(Kita T et al. *Cardiovasc Res.* 2014)。

(4) IL-2/IL-2 抗体複合体投与により、脾臓細胞や末梢リンパ節において、CD4 陽性 T 細胞数に占める Foxp3 陽性 Treg の割合は劇的に増加した。アンジオテンシン 投与により、IL-2/IL-2 抗体複合体投与群およびコントロール群ともに著明な収縮期血圧の上昇を認めしたが、両群における有意差は認めなかった。IL-2/IL-2 抗体複合体投与群(n=29)においては、コントロール群(n=31)と比較して、大動脈瘤の発症率、死亡率が有意に低下した(下図)。大動脈瘤病変部における炎症細胞の浸



潤について組織学的検討を行ったところ、IL-2/IL-2 抗体複合体投与群において、マクロファージの有意な減少および、Foxp3 陽性 Treg の有意な増加を認めた。

Foxp3 陽性 Treg が高度に減少した DEREG/*ApoE*^{-/-}マウス(n=30)では、コントロール群(n=32)と比較して血圧の有意な差は認めなかった。Treg の減少は、大動脈瘤発症率には影響を与えなかったが、有意に死亡率を増加させた(次ページ図)。組織学的検討を行ったところ、大動脈壁へのマクロファージの浸潤に関しては両群で差は認めなかった



が、DEREK/ApoE^{-/-}マウスにおいて CD4 陽性 T 細胞の浸潤が増加し、Foxp3 陽性 Treg は著明に減少していた。

今後、Treg による大動脈瘤形成抑制の詳細な分子機序を解明することにより、新規の大動脈瘤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 (Yodoi K et al. *Hypertension*. 2015)。

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)

Yodoi K, Yamashita T*, Sasaki N*, Kasahara K, Emoto T, Matsumoto T, Kita T, Sasaki Y, Mizoguchi T, Sparwasser T, Hirata K. (*corresponding authors, equal contribution) *Hypertension*. 65:889-895, 2015.(査読有り)

Sasaki N*, Yamashita T, Kasahara K, Takeda M, Hirata K. (*corresponding author) Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells as critical immune modulators in atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*. 21:1107-1117, 2015.(査読有り)

Emoto T, Sasaki N*, Yamashita T, Kasahara K, Yodoi K, Sasaki Y, Matsumoto T, Mizoguchi T, Hirata K. (*corresponding author) The regulatory / effector T cell ratio is reduced in coronary artery disease. *Circ J*. 78:2935-2941, 2014.(査読有り)

Kasahara K, Sasaki N*, Yamashita T*, Kita T, Yodoi K, Sasaki Y, Takeda M, Hirata K. (*corresponding authors, equal contribution) CD3 antibody and IL-2 complex combination therapy inhibits atherosclerosis by augmenting a regulatory immune response. *Journal of the American Heart Association*. 3:e000719, 2014.(査読有り)

Kita T, Yamashita T*, Sasaki N*, Kasahara K, Sasaki Y, Yodoi K, Takeda M, Nakajima K, Hirata K. (*corresponding authors, equal contribution) Regression of atherosclerosis with anti-CD3

antibody via augmenting a regulatory T cell response in mice. *Cardiovasc Res*. 102:107-117, 2014.(査読有り)

[学会発表](計 16 件)

江本 拓央、佐々木 直人 Regulatory T cells and CD4+CD28null T cells in coronary artery disease. 第 46 回日本動脈硬化学会総会、2014 年 7 月 10 日、京王プラザホテル(東京)

江本 拓央、佐々木 直人 Gut microbiota modulates coronary atherosclerosis. 第 46 回日本動脈硬化学会総会、2014 年 7 月 11 日、京王プラザホテル(東京)

Takuo Emoto, Naoto Sasaki. The effector/ regulatory T cell ratio is reduced in coronary artery disease. 第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 22 日、東京国際フォーラム(東京都)

Keiko Yodoi, Naoto Sasaki. Regulatory T cells play a protective role in angiotensin II-induced aortic aneurysm formation. 第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 21 日、東京国際フォーラム(東京都)

Kazuyuki Kasahara, Naoto Sasaki. Anti-CD3 antibody and interleukin-2 complex combination therapy inhibits atherosclerosis development by dramatically augmenting a regulatory immune response. 第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 23 日、東京国際フォーラム(東京都)

Naoto Sasaki. Regulation of Pathogenic Inflammatory Responses via Modulating Skin Immune System for Prevention of Atherosclerosis. 第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 23 日、東京国際フォーラム(東京都)

淀井 景子、佐々木 直人 アンジオテンシン 負荷腹部大動脈瘤マウスモデルにおける制御性 T 細胞の役割の検討、第 43 回日本心血管作動物質学会、2014 年 2 月 15 日、神戸国際会議場(兵庫県)

笠原 和之、佐々木 直人 抗 CD3 抗体と IL-2 複合体の併用療法は、アポ E 欠損マウスにおけるエフェクター T 細胞と制御性 T 細胞のバランスを変化させ、動脈硬化を抑制する、第 43 回日本心血管作動物質学会、2014 年 2 月 15 日、神戸国際会議場(兵庫県)

佐々木 直人 免疫制御による動脈硬化性疾患予防・治療戦略、第 43 回日本心血管作動物質学会、2014 年 2 月 15 日、神戸国際会議場(兵庫県)

Keiko Yodoi, Naoto Sasaki. In vivo expansion of regulatory T cells attenuates aortic aneurysm formation

in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice. 第 86 回米国心臓学会議、2013 年 11 月 20 日、ダラス (米国)

Kazuyuki Kasahara, Naoto Sasaki. A novel combination therapy with anti-CD3 antibody and IL-2 complexes against atherosclerosis targeting effector T cells and regulatory T cells. 第 86 回米国心臓学会議、2013 年 11 月 17 日、ダラス (米国)

Naoto Sasaki. Activation of skin dendritic cells controls atherogenesis in mice. 第 86 回米国心臓学会議、2013 年 11 月 17 日、ダラス (米国)

佐々木 義浩、佐々木 直人 Regression of atherosclerosis with anti-CD3 antibody via modulating the ratio of effector and regulatory T cells in mice. 第 45 回日本動脈硬化学会総会、2013 年 7 月 19 日、京王プラザホテル (東京都)

淀井 景子、佐々木 直人 The effects in vivo expansion of regulatory T cells on abdominal aortic aneurysm in the angiotensin II-induced murine model. 第 45 回日本動脈硬化学会総会、2013 年 7 月 19 日、京王プラザホテル (東京都)

笠原 和之、佐々木 直人 The balance between regulatory T cells and effector T cells is important for the control of atherosclerosis. 第 45 回日本動脈硬化学会総会、2013 年 7 月 19 日、京王プラザホテル (東京都)

佐々木 直人 Activation of skin dendritic cells controls atherogenesis in mice. 第 45 回日本動脈硬化学会総会、2013 年 7 月 19 日、京王プラザホテル (東京都)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
神戸大学大学院医学研究科 循環器内科学
分野
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/im1/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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし