

令和元年6月20日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09516

研究課題名(和文) 免疫寛容誘導による新規動脈硬化予防法の開発

研究課題名(英文) Development of novel methods for prevention of atherosclerosis through inducing immune-tolerance.

研究代表者

山下 智也 (Yamashita, Tomoya)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90437468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化を基盤に発症する心血管イベントは、現状のリスクコントロールでは十分に予防できない。動脈硬化の形成・進展における慢性炎症の重要性が注目され、治療標的としても注目されている。本研究では、皮膚に紫外線B波を照射すると、皮膚に免疫寛容性樹状細胞を誘導することで制御性T細胞が全身で増加させ、結果として皮膚から免疫寛容を誘導し、炎症を制御することでマウスの動脈硬化や動脈瘤が抑制できることを証明した。新規の炎症制御療法としての開発を進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紫外線を皮膚に照射する治療法は、皮膚疾患の治療法として臨床応用されている。本研究では、この紫外線照射治療をマウスではあるが動脈硬化の予防法として利用できるのではないかと考えて実施した。紫外線照射は、皮膚から免疫寛容を誘導し、制御性T細胞という炎症を制御する免疫担当細胞を増加させることで動脈硬化が予防できることが判明した。この新規治療法の開発を行って、臨床応用できれば、患者負担の少ない治療法となり、医学的にも社会的にも貢献度は大きい。

研究成果の概要(英文)： Clinical evidence demonstrated that it was impossible to prevent atherosclerotic cardiovascular events effectively by controlling the conventional coronary risk factors. Recently, chronic inflammation in atherogenesis was became the focus of attention not only as a cause of initiation and progression of atherosclerosis but also as a therapeutic target. In this research project, we demonstrated ultra violet B exposure systemically increased regulatory T cells through induction of tolerogenic dendritic cells in the skin, resulted in inducing immune tolerance, and inhibited atherosclerosis or aneurysm formation in mice. We would like to develop this method as a novel therapeutic strategy.

研究分野：循環器内科

キーワード：免疫寛容 動脈硬化 腸内細菌叢 紫外線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患の問題点と抗炎症療法の試み: 心筋梗塞や脳梗塞を代表とする動脈硬化性疾患は、日本では癌について死亡原因の第2位であり、高齢化に伴い重症の動脈硬化性疾患患者数は増加している。しかし、生活習慣病など危険因子のコントロールでは心血管イベントを必ずしも抑制できない。そこで、動脈硬化の炎症機転に注目した治療法の開発が進められており、欧米では一部臨床研究も始まっている。

申請者は、免疫細胞を標的にした動脈硬化の抗炎症療法や動脈硬化ワクチン治療を実施してきた。その後、免疫寛容の機序に着目し、経口投与薬剤による腸管からの制御性T細胞 (Treg; regulatory T cell) 誘導治療の動脈硬化抑制作用を報告した (*Circulation*.2009;120:1996-2005 *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.2010;30:2495-503)。Treg 数を劇的に増加させる方法を動脈瘤治療に応用し (*Hypertension*.2015;65:889-95)、Treg の免疫抑制能を高める薬剤の組み合わせにて動脈硬化が効果的に予防できることを報告した (*J Am Heart Assoc*.2014; 3:e000719)。ヒトにおいても、末梢血液中の Treg 比率の減少と冠動脈疾患との関連性を見出した (*Circ J*.2014;78:2935-41)。以上、申請者らは Treg 数増加による免疫寛容誘導にて動脈硬化性疾患が予防できる可能性を示した。

Treg は、その欠損が自己免疫疾患の発症につながることで発見され、生体内で過剰な免疫応答を抑制する T リンパ球である。免疫恒常性の維持を担う中心的細胞であり、がんやアレルギーの治療標的として研究が進められている。この Treg 誘導を介する免疫寛容誘導が、血管における不適切な過剰炎症反応の制御に利用できて、動脈硬化予防法となるのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動脈硬化予防のために、制御性T細胞(Treg)を利用した免疫寛容誘導法を確立し、臨床応用するための基盤を確立することである。

3. 研究の方法

本研究では、制御性 T 細胞(Treg)を増加・活性化して免疫寛容を誘導する動脈硬化予防法を開発し、臨床応用のための研究基盤を確立するために、以下の研究計画を進める。

- (1) 腸管と皮膚からの免疫寛容誘導の動脈硬化予防効果を評価するために、Treg を増加させる細菌投与・紫外線照射のマウス動脈硬化への影響を検討し、その作用機序を解明する。乳酸菌を動脈硬化モデル (アポリポ蛋白 E 遺伝子欠損マウス; apoE^{-/-}) マウスに投与して、それらの動脈硬化抑制効果を評価する。皮膚からの紫外線照射により、Treg の増加作用は報告されている (*J Immunol*. 2004;172:1036-43)。この紫外線照射 (UVB 5J/m², 1/week) にて動脈硬化抑制効果があるのかを apoE^{-/-} マウスにて検証し、Treg 誘導の機序を解明する。同じく紫外線照射をアンジオテンシン II 持続投与のマウス動脈瘤モデルに応用し、その抑制効果・予後改善効果を調査する。
- (2) Treg の機能に重要な CTLA-4 の動脈硬化における役割を検討するために、CTLA-4 過剰発現動脈硬化マウスの解析を実施する。ヒト CD2 プロモーターを用いた CTLA-4 過剰発現遺伝子組換え (CTLA-4-Tg) マウスと動脈硬化モデル apoE^{-/-} マウスを交配して CTLA-4-Tg/ apoE^{-/-} マウスを作製しており、T リンパ球の CTLA-4 過剰の存在が自身の細胞機能や他の免疫細胞に与える影響と動脈硬化病変抑制効果を同時に調査する。
- (3) 抗原特異的な Treg 誘導法を動脈硬化予防に応用するために、既報の“免疫寛容アジュバント”や“抗原特異的免疫寛容誘導法”と複数の抗原候補を使用してマウス動脈硬化抑制効果を検討する。

4. 研究成果

Treg の機能に重要な CTLA-4 の動脈硬化における役割を検討するために、CTLA-4 を過剰発現させた動脈硬化 apoE^{-/-} マウスの解析を行なうと、動脈硬化が抑制されることが分かった。免疫寛容の機序の一部に、特に Treg の CTLA-4 の増加が関連している報告もあり、少なくとも動脈硬化では、この機序は疾患の進展抑制に意味がある可能性を示唆する結果であった (発表論文 1)。

皮膚から免疫寛容を誘導する方法として、皮膚に紫外線を照射する方法を用いた。動脈硬化

apoE^{-/-}マウスの皮膚に紫外線を週に1回 5kJ/kg/m²にて照射するだけで、動脈硬化の形成が有意に抑制され、さらに同マウスにアンジオテンシン II を浸透圧ポンプで4週間投与を継続する動脈瘤モデルでも、動脈瘤が抑制できることが証明できた。機序としては、皮膚の免疫寛容性樹状細胞が誘導され、皮膚で誘導された制御性T細胞が血液を含めた全身で増加し、抗炎症的に作用することで、血管の炎症機転が重要な役割を担う動脈硬化ならびに動脈瘤が抑制できたと考えている(発表論文2,3)。

腸管からの免疫寛容の誘導を、動脈硬化に関連するヒートショックプロテイン HSP の経口投与にて抗原特異的に誘導することを試みたが、やはり抗原特異的な制御性T細胞の誘導は、現状では非常に困難であるという結果であった。

プロバイオティクスの1種である *Pediococcus acidilactici*(R037)には、経口投与によって免疫抑制の報告がある。この R037 菌を動脈硬化 apoE^{-/-}マウスに経口投与する実験を行なうと、腸管にて PD-1 の強発現した樹状細胞が増加し、結果として T 細胞の機能が抑制された。そして、動脈硬化が抑制されることが示された(発表論文4)。

冠動脈疾患患者の腸内細菌叢の調査から、患者で減少している *Bacteroides vulgatus* と *dorei* という2菌種を見出した。その2菌種を培養し、動脈硬化 apoE^{-/-}マウスに強制経口投与を10週間にわたり実施した。まだ、完全にはその機序までは解明できていないが、抗炎症作用が発揮されることで、動脈硬化が有意に抑制できることがわかった(発表論文5)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

- (1) Matsumoto T, Sasaki N, Yamashita T, Emoto T, Kasahara K, Mizoguchi T, Hayashi T, Yodoi K, Kitano N, Saito T, Yamaguchi T, Hirata K. Overexpression of CTLA-4 prevents atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36: 1141-51.
- (2) Hayashi T, Sasaki N, Yamashita T, Mizoguchi T, Emoto T, AminHZ, Yodoi K, Matsumoto T, Kasahara K, Yoshida N, Tabata T, Kitano N, Fukunaga A, Nishigori T, Rikitake Y, Hirata K. UVB Exposure Inhibits Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice by Expanding CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T cells. *J Am Heart Assoc.* 2017; 6: e007024.
- (3) 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. UVB exposure prevents atherosclerosis by regulating immunoinflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37: 66-74.
- (4) Mizoguchi T, Kasahara K, Yamashita T, Sasaki N, Yodoi K, Matsumoto T, Emoto T, Hayashi T, Kitano N, Yoshida N, Amin HZ, Hirata K. Oral administration of the lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* attenuates atherosclerosis in mice by inducing tolerogenic dendritic cells. *Heart Vessels.* 2017; 32: 768-76.
- (5) Yoshida N, Emoto T, Yamashita T, Watanabe H, Hayashi T, Tabata T, Hoshi N, Hatano N, Sasaki N, Mizoguchi T, Amin HZ, Hirota Y, Ogawa W, Yamada T, Hirata K. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis. *Circulation.* 2018; 138: 2486-98.
- (6) 溝口泰司、山下智也、平田健一、腸内細菌と動脈硬化 *Diabetes Frontier*・28・158-162・2017
- (7) 山下智也、平田健一、循環器疾患とマイクロバイオーム *化学療法の領域*・34・77-84・2018
- (8) 山下智也、平田健一、循環器疾患と腸内細菌 *医学のあゆみ*・264・88-93・2018
- (9) 山下智也、平田健一、腸内細菌叢と動脈硬化 *食と医療*・4・83-91・2018

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) 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・学術集会 2016

(2) Taiji Mizoguchi, Kazuyuki Kasahara, Tomoya Yamashita, Naoto Sasaki, Takuo Emoto, Takuya Matsumoto, Tomohiro Hayashi, Ken-ichi Hirata, Oral administration of the Lactic Acid Bacterium *Pediococcus acidilactici* attenuates atherosclerosis via inducing tolerogenic dendritic cells in mice 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2016

(3) 林 友鴻、佐々木直人、山下智也、江本拓央、溝口泰司、吉田尚史、田畑論子、Hilman Zulkifli Amin、平田健一、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

(4) 山下智也、平田健一、腸から動脈硬化を予防する～腸内細菌と心血管病との関連について～ 第 46 回日本心臓血管作動物質学会 2017

(5) Taiji Mizoguchi, Naoto Sasaki, Tomoya Yamashita, Hilman Amin, Naofumi Yoshida, Tomohiro Hayashi, Takuo Emoto, Ken-ichi Hirata, Ultraviolet B exposure improves survival after myocardial infarction in mice 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017

(6) 山下智也、平田健一、腸内細菌と冠動脈疾患 第 27 回日本サイトメトリー学会学術集会 2017

(7) 林 友鴻、佐々木直人、山下智也、溝口泰司、Hilman Zulkifli Amin、江本拓央、吉田尚史、田畑論子、平田健一、紫外線照射による免疫制御を介した腹部大動脈瘤の新規治療法 第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2017

(8) Tomoya Yamashita, Prevention of atherosclerosis via modulating the inflammatory process; Intestinal immunity and gut microbiota in atherosclerosis, The 6th International Congress on Lipid & Atherosclerosis 2017, Korea

(9) 吉田尚史、山下智也、江本拓央、渡邊日佳流、林 友鴻、田畑論子、小澤元希、山田拓司、平田健一、*Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* は腸内細菌の LPS 産生を制御し動脈硬化を抑制する 第 22 回腸内細菌学会 2018

(10) 林 友鴻、佐々木直人、山下智也、溝口泰司、江本拓央、Hilman Zulkifli Amin、淀井(眞弓)景子、松本卓也、笠原和之、吉田尚史、田畑論子、北野尚樹、福永 淳、錦織千佳子、力武良行、平田健一、紫外線 B 波照射は CD4 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞を増幅し、アンギオテンシン II 誘導性マウス大動脈瘤の形成を抑制する、第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018

(11) 吉田尚史、山下智也、江本拓央、渡邊日佳流、林 友鴻、田畑論子、佐々木直人、山田拓司、平田健一、*Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* は腸内細菌の LPS 産生を制御し動脈硬化を抑制する 第 66 回日本心臓病学会 2018

(12) 山下智也、腸内細菌叢と循環器疾患～性差からの考察を加えて～ 第 12 回日本性差医学・医療学会学術集会 2019

(13) Tomoya Yamashita, Naofumi Yoshida, Ken-ichi Hirata, Gut microbiome, novel therapeutic targets for preventing atherosclerotic cardiovascular diseases, 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：リポ多糖制御性腸内細菌及びその用途

発明者：山下智也

権利者：日東薬品工業株式会社

種類：

番号：PCT/JP2019/ 004763

出願年：2019

国内外の別： 日本

取得状況（計 件）

名称：発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐々木直人

ローマ字氏名： Naoto Sasaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。