

平成 30 年 10 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19156

研究課題名(和文)血管内皮特異的制御性T細胞とB細胞誘導による動脈硬化の制御法の開発

研究課題名(英文) Regulation of arterosclerosis through induction of endothelial antigen specific regulatory T cell and regulatory B cell

研究代表者

笠木 伸平 (KASAGI, SHIMPEI)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：80457051

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)：血管内皮抗原(HSP65)により誘導される動脈硬化モデルマウスにおいて、B細胞除去療法に加えて、HSP65を併用することで、抗原特異的なリンパ球の増殖能やサイトカイン(MCP-1やIL-6、TNF、IL-10など)産生能が低下した結果、動脈硬化における免疫反応が抑制され、結果、動脈硬化が抑制されることを発見した。そのメカニズムとして、HSP65抗原特異的な制御性T細胞と制御性B細胞が体内で誘導されていて、それらの細胞はマクロファージが産生するTGF- $\beta$ による体内に誘導されることが明らかになった。なお、B細胞除去療法単独あるいはHSP65単独投与では効果を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：In the HSP65 (endothelial antigen) derived arterosclerosis model mice, we found that combination therapies of HSP65 antigen and B cell depletion suppressed antigen specific lymphocyte proliferation and cytokine production such as MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10. Eventually, development of arterosclerosis was strongly suppressed by these combination therapies. HSP65 specific regulatory T cells and regulatory B cells were induced after combination therapies, which was triggered by TGF- $\beta$  produced by macrophages. B cell depletion alone or HSP65 antigen alone did not suppress arteriosclerosis.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 動脈硬化 抗原特異的免疫抑制療法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫疾患とは本来は異物を認識して排除する役割をもつ免疫機構が、自己の正常な組織に対しても攻撃を加えるようになった結果全身の臓器が障害される疾患である。本疾患に対してステロイドや免疫抑制剤による薬物療法が現在の治療の中心であるが、これらは、自己免疫異常のみならず、正常な感染免疫や腫瘍免疫をも抑制するため、感染症や悪性腫瘍の誘発等の副作用を有する。抗原特異的な免疫抑制療法(薬物療法)は、未だ確立されていないが、自己免疫異常を選択的に抑制し、感染免疫や腫瘍免疫には影響を与えにくいと考えられるため治療の副作用の軽減が期待される。

(2) 抗CD20抗体療法によりB細胞はアポトーシス死するが、アポトーシス死したB細胞を体内のマクロファージ(MΦ)や樹状細胞(DC)が貪食すると大量のTGFβ(抗炎症性サイトカインのひとつ)が産生放出されること、MΦやDCから産生されたTGFβにより抗炎症作用をもつ制御性T細胞が誘導されることがこれまでに報告されている。(Nature Medicine 2008 (14) 528-535, Sci Transl Med. 2014 Jun 18;6 (241): 241ra78)

(3) *In vitro*にてナイーブT細胞は抗原提示細胞による抗原提示、およびTGFβの存在下にて抗原特異的な制御性T細胞に分化する。(JEM 2003 (198) 1875-1886)

以上の研究背景を元に自己抗原特異的な制御性T細胞を*In vivo*で誘導する方法の仮説として、抗CD20抗体に続けて原因となる抗原を与えると、抗原特異的な免疫反応を抑制できると考えた。

(4) 動脈硬化モデルマウス(LDL受容体欠損態マウス)では免疫異常により、動脈硬化が進行する。その理由として、HSP<sub>65</sub>(血管内皮抗原)に対する異常免疫が惹起されることが分かっている。

## 2. 研究の目的

申請者らはこれまで、感染免疫に影響を与えずに、自己免疫異常のみを選択的に抑制する治療法(抗原選択的免疫抑制療法)を1型糖尿病モデルマウスを使用し確立した。動脈硬化は血管内皮の抗原に対する免疫反応が活性化することで起こると言われている。本研究では動脈硬化モデルマウスを用いて血管内皮抗原に伴う免疫異常のみを

選択的に抑制する治療法の確立および基盤の創生を目的とした。

## 3. 研究の方法

Step 1) LDL-R 欠損マウスに対して6週齢の時点で、HSP<sub>65</sub>+CFAで免疫し、動脈硬化の発症/進行を加速された。

Step 2) 8週齢の時点で、抗CD20抗体(250 μg/体)のみ、HSP<sub>65</sub>のみ(5 μg/マウス、腹腔内投与の隔日投与)、両方の治療のいずれかを行った。CD20抗体は単回投与、HSP<sub>65</sub>は2週間に渡り隔日投与を行った。

Step 3) マウスが16~20週齢に到達した時点で、マウスを sacrifice し、動脈硬化の評価を行った。この実験系において、抗体+自己抗原の併用療法で HSP<sub>65</sub> 特異的な免疫反応が抑制され動脈硬化の長期寛解が得られるかどうかについて検討を行った。週2回観察を行い、体重チェック、心不全により生命の維持が困難と考えられたマウスに対しては安楽死させ、脾臓と脾臓リンパ節を回収した。これらの細胞を *In vitro* で HSP<sub>65</sub> 抗原や TCR への非特異刺激(抗 CD3 抗体で刺激)で再刺激し、HSP<sub>65</sub> 特異的な免疫反応(細胞増殖能あるいは IFN-γ 産生能)を、それぞれ、<sup>3</sup>H(サイミジン取り込み試験)や ELISA 法などで評価し比較した。

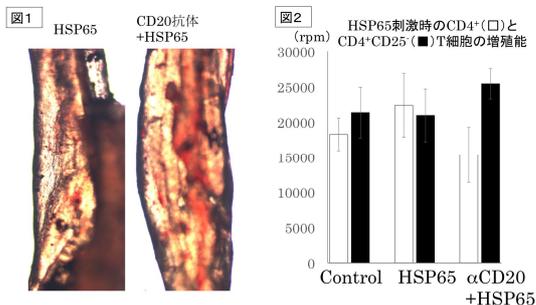
HSP<sub>65</sub> 特異的な CD4+CD25+制御性 T 細胞の増加の有無は、直接標識できる抗体がないため、評価が困難であるが、下記の方法で代用した。すなわち、同じマウスの脾臓から CD4+ T 細胞、CD4+CD25- T 細胞を磁気細胞分離装置とビーズを使って分離し、それぞれの分画から同数の細胞数を得て抗原提示細胞(マクロファージや樹状細胞)と抗原(HSP<sub>65</sub> 抗原あるいは非特異抗原)の存在下で培養する。この時、HSP<sub>65</sub> 特異的な CD4+CD25+制御性 T 細胞が脾臓で増加しているマウスにおいては、抗原提示細胞+HSP<sub>65</sub> 抗原存在下で刺激した CD4+ T 細胞の増殖能やサイトカイン産生能はコントロールと比べて有意に低下すると考えられるが、CD4+CD25+制御性 T 細胞を含まない CD4+CD25- T 細胞を抗原提示細胞+HSP<sub>65</sub> 抗原で刺激した場合には、コントロールと比べて差がなくなることが予想された。

## 4. 研究成果

血管内皮抗原(HSP<sub>65</sub>)により誘導される動脈硬化モデル(LDL-R 欠損)マウスにおいて、CD20 抗体に加えて、HSP<sub>65</sub> を併用することで、抗原特異的なリンパ球の増殖能やサイトカイン(MCP-1 や IL-6、TNFα、IL-10

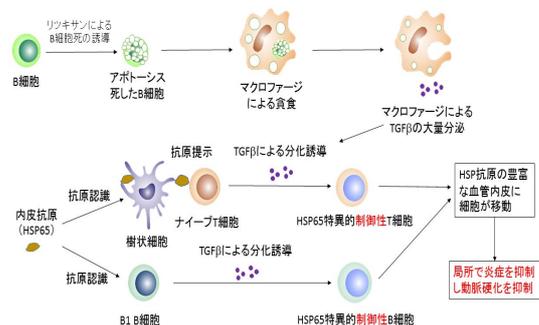
など)産生能が低下した結果、動脈硬化における免疫反応が抑制され、結果、動脈硬化が抑制されることを発見した。(図1:CD20抗体+HSP<sub>65</sub>により著明に血管内の血流は維持され、動脈硬化は抑制された。図2:CD25陽性制御性T細胞を除去した場合、除去しない場合と比較して著明に、抗原特異的なリンパ球の増殖反応が治療群において亢進したことから、治療群において、CD25陽性制御性T細胞が抗原特異的なリンパ球増殖反応の抑制に関与していることが分かった)

この他、CD20抗体+HSP<sub>65</sub>の治療は、HSP<sub>65</sub>抗原特異的な制御性T細胞を体内に誘導すること、それらの細胞はマクロファージが産生するTGF-βによる体内に誘導されることを明らかにした。なお、B細胞除去療法単独あるいはHSP<sub>65</sub>単独投与では動脈硬化の抑制効果を認めなかった。



#### <今後の課題や問題点について>

今回の研究では、動脈硬化モデルマウスを用いて、HSP<sub>65</sub>に特異的な制御性T細胞を選択的に誘導することができ、また、長期的な寛解を得ることができた。抗CD20抗体+GAD<sub>65</sub>併用療法により得られる長期的な寛解にはTGFβが関与していることまでは明らかにしたが、制御性T細胞やマクロファージなど、他の免疫細胞が必須なのかは未だ十分に明らかにはなっていない。そのため、今後の課題として検討を継続していく。以下、現時点で最も確からしい仮説を下に上げる。



#### 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)

- 1) Manipulating regulatory T cells: a promising strategy to treat autoimmunity. Zhang D, Tu E, Kasagi

- S. Zanvit P, Chen Q, Chen W. Immunotherapy. 2015;7(11):1201-11.
- 2) Antibiotics in neonatal life increase murine susceptibility to experimental psoriasis. Zanvit P, Konkel JE, Jiao X, Kasagi S, Zhang D, Wu R, Chia C, Ajami NJ, Smith DP, Petrosino JF, Abbatiello B, Nakatsukasa H, Chen Q, Belkaid Y, Chen ZJ, Chen W. Nat Commun. 2015 Sep 29;6:8424. doi: 10.1038/ncomms9424
- 3) In vivo-generated antigen-specific regulatory T cells treat autoimmunity without compromising antibacterial immune response. Kasagi S, Zhang P, Che L, Abbatiello B, Maruyama T, Nakatsukasa H, Zanvit P, Jin W, Konkel JE, Chen W. Sci Transl Med. 2014 Jun 18;6(241):241ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.3008895

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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(笠木 伸平)  
ローマ字(SHIMPEI KASAGI)  
所属(神戸大学)  
部局(医学部附属病院)  
職名(特定助教) 研究者番号: 80457051

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )