

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08042

研究課題名（和文）制御性T細胞による動脈硬化抑制機序の解明と治療応用

研究課題名（英文）Investigation of the mechanisms for the prevention of atherosclerosis by regulatory T cells and development of novel immunotherapies

研究代表者

佐々木 直人（Sasaki, Naoto）

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00514746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：動脈硬化性疾患の病態進展には、T細胞性免疫応答の異常による血管炎症が深く関与する。病態モデルマウスを用いて、動脈硬化性疾患の発症・進展機構と新規治療法を見出した。ケモカイン受容体C-C chemokine receptor 4 (CCR4)はT細胞の免疫応答を調節することで動脈硬化病変形成の抑制に働き、一方で、その遺伝子欠損により、腹部大動脈瘤の形成は抑制されることを見出した。発光ダイオードの技術を用いた紫外線B波（UVB）照射器を用いて、282 nmの波長のUVB照射により、炎症抑制性に働く制御性T細胞の免疫応答の増強を介して動脈硬化を抑制できることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国での心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患は、癌について死亡原因の第2位となっており、その発症機序の解明と有効な治療法・予防法の開発が求められている。動脈硬化が発症に関与する腹部大動脈瘤に対しては外科的治療が行われるが、合併症のリスクが高く、非侵襲的な薬物療法の開発が必要である。CCR4は成人T細胞白血病リンパ腫などの治療標的として注目されており、この分子の機能修飾による画期的な動脈硬化性疾患治療法の開発が期待できる。UVB療法は、経済的負担が少なく安全な治療法として皮膚科領域で臨床応用されており、動脈硬化性疾患に対する新規治療法として臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Aortic inflammation via dysregulation of T cell immune responses is critically involved in the development of atherosclerotic cardiovascular diseases. Using mouse models of atherosclerotic diseases, we identified underlying mechanisms and an immunomodulatory approach to limit these diseases. We demonstrated that C-C chemokine receptor 4 (CCR4) protects against atherosclerosis by modulating the T cell balance. On the other hand, we found that CCR4 deficiency protects against the development of abdominal aortic aneurysm. Using newly developed ultraviolet B (UVB)-light-emitting diode devices, we reported that 282 nm UVB irradiation reduces the development of atherosclerosis by augmenting Treg immune responses.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 大動脈瘤 炎症 免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化を基盤とした心血管疾患の病態進展において、炎症性免疫応答が重要な役割を果たすことが明らかになっている。申請者は、免疫応答の制御による新規動脈硬化治療法・予防法の開発を目指す中で、全身および動脈硬化病変部において制御性T細胞(Regulatory T cell:Treg)による抗炎症性免疫応答を増強することで動脈硬化性疾患の病態進展を抑制できることを示した。動脈硬化を効果的に抑制するためには、炎症を生じている血管とその関連リンパ組織においてTregを増加させる必要があると考えられるが、Tregの病変部への遊走機序については不明な点が多い。Tregはケモカイン受容体CCR4(C-C chemokine receptor 4)を介して炎症部位へ遊走し、自己免疫疾患やアレルギー疾患の病態抑制に関与することが報告されているが、動脈硬化の病態における役割は不明である。CCR4遺伝子欠損動脈硬化マウスを用いた予備検討において、TregはCCR4を介して動脈硬化病変周辺リンパ組織へ遊走し、病変形成抑制に関与する可能性を見出している。

動脈硬化を基盤として発症する腹部大動脈瘤は致死率の高い疾患であるが、その病態進展や破裂を抑制するような薬物治療は未だ確立されていない。病変が進行すれば外科的治療が行われるが、合併症のリスクが高く、非侵襲的な内科的治療法の開発が望まれている。腹部大動脈瘤の病態進展において、過剰な免疫応答により引き起こされる慢性炎症の関与が示唆されている。上記のようにCCR4はTregを含むT細胞に発現し、炎症性免疫応答に関与する可能性があるが、腹部大動脈瘤の病態形成におけるこの分子の役割は明らかではない。

動脈硬化や腹部大動脈瘤の病態形成におけるCCR4の役割が解明されれば、炎症性免疫応答の制御による画期的な動脈硬化性疾患治療法の開発に繋がると考えられる。

280 nm ~ 320 nmの波長のブロードバンド紫外線B波(UVB)療法や311 nm付近をピークとする波長のナローバンドUVB療法は、炎症性皮膚疾患に対する副作用の少ない安価な治療法として確立されている。私たちは、Tregを誘導することにより過剰な免疫応答を抑制する方法としてUVB照射に着目し、ブロードバンドUVB照射により動脈硬化病変や腹部大動脈瘤の形成を抑制できることを報告した(*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37:66-74, 2017, *J Am Heart Assoc.* 6(9):e007024, 2017)。予備検討により、Tregの誘導と動脈硬化抑制に有効なUVB波長の候補を見出している。動脈硬化の進展抑制に有効なUVB波長や照射線量、その抑制機序を明らかにすることで、副作用のリスクを最小限に減らした新規動脈硬化治療法の開発につながると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、CCR4遺伝子欠損動脈硬化マウスを用いて、動脈硬化とそれを基盤として発症する腹部大動脈瘤におけるCCR4の役割の解明を行う。炎症性免疫応答の制御による動脈硬化性疾患治療法確立の基盤となるような知見を得ることを目標とする。特定波長のUVBを照射できる照射器を用いて、動脈硬化抑制に有効な波長や照射線量、抑制機序を解明し、臨床応用の基盤となるような知見を得ることを目指す。分子機序に基づいた薬物療法と物理療法を用いたアプローチを組み合わせることで効果的に炎症を制御することによる、画期的な動脈硬化性疾患治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動脈硬化におけるCCR4の役割の解明

CCR4の欠損が動脈硬化および免疫系に与える影響を明らかにするために、*Ccr4*<sup>-/-</sup>マウス(CCR4遺伝子欠損マウス)と動脈硬化モデル*ApoE*<sup>-/-</sup>マウス(アポリポ蛋白E遺伝子欠損マウス)を交配して*Ccr4*<sup>-/-</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスを作成し、その表現型を解析した。大動脈基部と胸腹部大動脈において動脈硬化病変の定量評価を行い、大動脈基部動脈硬化病変の免疫細胞浸潤やCCR4のリガンドCCL17/CCL22の発現について免疫染色により評価した。末梢リンパ組織・傍大動脈リンパ節や胸腹部大動脈から免疫細胞を分離し、フローサイトメトリーを用いて免疫細胞の割合や活性化状態を評価した。Treg、レスポンダーT細胞と樹状細胞の共培養実験により、Tregの免疫抑制能力を評価した。*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスおよび*Ccr4*<sup>-/-</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスから単離したTregを*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスに細胞移入し、動脈硬化病変形成に与える影響を評価した。

#### (2) 腹部大動脈瘤におけるCCR4の役割の解明

上記で作成した6週齢雄の*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスおよび*Ccr4*<sup>-/-</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスに高脂肪食負荷を行い、12週齢より浸透圧ミニポンプを用いてアンジオテンシン(1000 ng/kg/min)もしくは生理食塩水を投与し、投与開始から4週間における腹部大動脈瘤の発症率および死亡率を評価した。16週齢までに死亡した全てのマウスについて解剖し、腹部大動脈瘤破裂の有無を確認した。16週齢に生存していたマウスについては、収縮期血圧を測定した後に安楽死させて大動脈瘤病変を摘出し、腹部大動脈瘤の発生率、大動脈瘤径、病変グレード、炎症性免疫細胞浸潤、弾性線維の破壊などを評価した。ポンプ植え込みから1週間後に脾臓およびリンパ節から免疫細胞を分離

し、フローサイトメトリーを用いて免疫細胞の割合や活性化状態を評価した。

### (3) 動脈硬化抑制に有効な UVB 波長の特定と抑制機序の解明

UVB の波長 280 nm ~ 320 nm のうち、282 nm、301 nm、312 nm の波長の UVB を照射できる発光ダイオード (LED) 照射器を作製した (名城大学理工学部 岩谷素顕教授、日機装株式会社との共同研究)。6 週齢雄の *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスに各波長の UVB を週に 1 回合計 6 回照射し、フローサイトメトリーを用いて皮膚所属リンパ節 (鼠径・腋窩リンパ節) および脾臓における Treg とエフェクター T 細胞の割合や機能を評価した。Treg とレスポンダー T 細胞の共培養実験により、Treg の免疫抑制能力を評価した。これらのマウスの皮膚を採取し、質量分析法を用いて脂質メディエーターの測定を行った。6 週齢雄の *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスにこれらの UVB を週に 1 回合計 14 回照射を行い、大動脈基部と胸腹部大動脈における動脈硬化病変を定量評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 動脈硬化における CCR4 の役割の解明

CCR4 遺伝子欠損マウスと動脈硬化モデル *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスを交配して作成した *Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスでは、大動脈への Treg の遊走が抑制され、炎症性 T helper type 1 (Th1) 細胞の浸潤増加と大動脈基部動脈硬化病変の形成促進を認めた。*Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスでは、コントロール *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスと比較して大動脈基部動脈硬化病変におけるマクロファージや T 細胞の浸潤は増加し、膠原線維は減少した。胸腹部大動脈における動脈硬化病変の形成については、両群間で有意差を認めなかった。コントロールマウスおよび *Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスの動脈硬化病変部およびリンパ節では CCL17/CCL22 の発現を認めたが、両群間に明らかな差を認めなかった。*Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスではコントロールマウスと比較して、脾臓および皮膚所属リンパ節において Th1 細胞の割合は増加し、炎症性免疫応答が亢進している可能性が示唆された。Treg を用いた共培養実験により、Treg は CCR4 を介して Th1 細胞の分化や増殖を制御する可能性を見出した。

*ApoE*<sup>-/-</sup> マウスおよび *Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウス由来の蛍光色素でラベルした Treg を *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスに細胞移入したところ、コントロール *ApoE*<sup>-/-</sup> マウス由来の Treg と比較して、*Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウス由来の Treg では大動脈への遊走が有意に抑制されていた。*ApoE*<sup>-/-</sup> マウスおよび *Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスから分離した Treg を *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスに細胞移入すると、生理食塩水を投与したコントロールマウスと比較して、大動脈基部動脈硬化病変の形成に明らかな影響を与えなかった。注目すべきことに、*Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスの Treg を移入したマウスの動脈硬化病変サイズは、*ApoE*<sup>-/-</sup> マウスの Treg を移入したマウスのもものと比較して高値であった。以上より、Treg は CCR4 を介して、Th1 細胞の機能や大動脈への Treg の遊走を制御することにより、動脈硬化の抑制に関与すると考えられた。

CCR4 は成人 T 細胞白血病リンパ腫などのがんの治療標的として注目されており、本研究成果は、この分子の機能修飾による画期的な動脈硬化性疾患治療法の開発に繋がることが期待できる。以上の研究成果について、責任著者として論文作成中である。

### (2) 腹部大動脈瘤における CCR4 の役割の解明

アンジオテンシン を投与した *Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスは、アンジオテンシン を投与したコントロール *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスと比較して、腹部大動脈瘤の発生率は有意に低かったが、両群間において死亡率の有意差を認めなかった。アンジオテンシン の投与開始 4 週間後において、コントロールマウスと *Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスのいずれにおいても収縮期血圧の著明な上昇を認めたが、両群間に有意差を認めなかった。腹部大動脈瘤病変のグレードについてスコア化したところ、コントロールマウスと比較して *Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスにおけるスコアは有意に低値であった。*Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスでは、コントロールマウスと比較して腹部大動脈の最大直径は有意に低値であった。*Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスでは、腹部大動脈瘤病変における弾性線維の破壊は軽減されており、病変のスコアは有意に低値であった。*Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスではコントロールマウスと比較して、マクロファージの浸潤範囲の減少が認められた。以上のことから、CCR4 遺伝子欠損により大動脈内への炎症細胞浸潤と弾性線維の破壊が抑制され、腹部大動脈瘤の形成や破裂の抑制に繋がったのではないかと考えられた。

動脈硬化と大動脈瘤の病態形成には共通する炎症性免疫応答が関与することが報告されており、研究当初の仮説としては、これらの疾患において CCR4 は類似した役割を果たすと考えていた。しかし、予想に反して、両疾患において CCR4 の役割は異なることが明らかになった。*Ccr4*<sup>-/-</sup> *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスのリンパ組織および大動脈では、ヘルパー T 細胞バランスの著明な変化を認め、腹部大動脈瘤形成抑制に関与している能性を考え、詳細な検討を進めている。本研究成果により、CCR4 を標的とした新規治療法の開発に繋がることが期待できる。

### (3) 動脈硬化抑制に有効な UVB 波長の特定と抑制機序の解明

282 nm UVB 照射により大動脈基部動脈硬化病変の形成は有意に抑制されたが、301 nm および 312 nm の UVB 照射は動脈硬化に影響を与えなかった。282 nm UVB を照射したマウスだけで、動脈硬化プラーク内のマクロファージや T 細胞の浸潤は減少した。胸腹部大動脈における動脈硬化病変の形成には、いずれの波長の UVB 照射も影響を与えなかった。

282 nm UVB を照射したマウスでは、脾臓および皮膚所属リンパ節においてエフェクターT細胞の割合に変化を認めなかったが、Treg の割合は増加した。282 nm のUVB を照射したマウスのTreg では、免疫抑制に関わる cytotoxic T lymphocyte antigen-4 や遊走に関わる CCR4 の発現が増加した。さらに、共培養実験により、このUVB 照射によるTreg の免疫抑制能力の増強が示された。抗炎症性脂質メディエーターは動脈硬化の抑制に作用することが報告されているため、282 nm UVB 照射による皮膚脂質メディエーター量の変化を解析した。282 nm UVB 照射により、炎症性脂質メディエーターである prostaglandin は減少し、抗炎症性作用を有する resolvin、protectin、maresin は増加した。

以上のように、282 nm UVB の皮膚への照射により、抗炎症性脂質メディエーターの増加や全身におけるTreg の増加および炎症抑制能の増強を介して炎症性免疫応答が抑制されることで、動脈硬化抑制効果が得られたのではないかと考えられた。私たちは、世界で初めて抗動脈硬化作用の強いUVB 波長を特定することができた。282 nm の波長のUVB は大気中で遮断され日光浴により代替することができないため、この波長のUVB 照射器を開発して治療応用できれば革新的な治療法になり得る。以上の研究成果について原著論文として報告した (Tanaka T et al. *J Am Heart Assoc.* 13(2):e031639, 2024 )。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka T, Sasaki N, Krisnanda A, Shinohara M, Amin HZ, Horibe S, Ito K, Iwaya M, Fukunaga A, Hirata KI, Rikitake Y.	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 Novel UV-B Phototherapy With a Light-Emitting Diode Device Prevents Atherosclerosis by Augmenting Regulatory T-Cell Responses in Mice.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc	6. 最初と最後の頁 e031639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.123.031639.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kasahara K, Sasaki N, Amin HZ, Tanaka T, Horibe S, Yamashita T, Hirata KI, Rikitake Y.	4. 巻 8(7)
2. 論文標題 Depletion of Foxp3+ regulatory T cells augments CD4+ T cell immune responses in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e09981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2022.e09981.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木直人、田中亨、Aga Krisnanda、篠原正和、福永淳、力武良行
2. 発表標題 特定波長の紫外線B波照射による動脈硬化抑制機序の解明
3. 学会等名 第45回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木直人、田中亨、力武良行
2. 発表標題 動脈硬化性疾患とがんにおけるT細胞免疫応答の役割の違い
3. 学会等名 第55回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤謙、佐々木直人、田中亨、Aga Krisnanda、堀部紗世、平田健一、力武良行
2. 発表標題 特定波長の紫外線B波による抗動脈硬化作用 アポリポ蛋白E遺伝子欠損マウスを用いた解析
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aga Krisnanda, Naoto Sasaki, Toru Tanaka, Ken Ito, Sayo Horibe, Yoshiyuki Rikitake
2. 発表標題 The specific wavelength of 312 nm UVB irradiation induces a less inflammatory plaque phenotype in atherosclerosis-prone mice.
3. 学会等名 第88回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伊藤謙、佐々木直人、田中亨、Aga Krisnanda、堀部紗世、平田健一、力武良行
2. 発表標題 特定波長の紫外線B波照射療法は動脈硬化モデルマウスにおいて抗炎症性免疫応答の増強により病変形成を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐々木直人、田中亨、福永淳、力武良行
2. 発表標題 動脈硬化抑制に有効な紫外線B波の波長の探索
3. 学会等名 第44回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木直人、力武良行
2. 発表標題 獲得免疫系による動脈硬化制御機構の解明と治療応用
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aga Krisnanda, Naoto Sasaki, Toru Tanaka, Sayo Horibe, Yoshiyuki Rikitake
2. 発表標題 Effects of specific wavelengths of ultraviolet B irradiation on immunoinflammatory responses and atherosclerosis progression.
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toru Tanaka, Naoto Sasaki, Hilman Zulkifli Amin, Ken-ichi Hirata, Yoshiyuki Rikitake
2. 発表標題 Identification of specific wavelengths of ultraviolet B for preventing atherosclerosis and their mechanisms of action.
3. 学会等名 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中亨、佐々木直人、Hilman Zulkifli Amin、力武良行
2. 発表標題 動脈硬化抑制に有効な紫外線B波の波長の特定とその機序の解明
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toru Tanaka, Naoto Sasaki, Hilman Zulkifli Amin, Yoshiyuki Rikitake
2. 発表標題 Development of a novel anti-inflammatory phototherapy against atherosclerosis.
3. 学会等名 第19回国際動脈硬化化学会議（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoto Sasaki, Yoshiyuki Rikitake
2. 発表標題 Modulation of T cell immune balance as an attractive strategy to treat atherosclerosis.
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aga Krisnanda、佐々木直人、田中亨、Hilman Zulkifli Amin、赤井瑞希、池内一真、石坂麻衣、伊藤謙、岡本拓朗、倉敷治央、田原由貴、野尻真那、堀部紗世、平田健一、力武良行
2. 発表標題 特定波長の紫外線B波が免疫反応および動脈硬化に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学薬科大学 医療薬学研究室 <a href="https://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty_member_list/medical_pharmaceutics.html">https://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty_member_list/medical_pharmaceutics.html</a>
---

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	力武 良行  (Rikitake Yoshiyuki)		
研究協力者	堀部 紗世  (Horibe Sayo)		
研究協力者	田中 亨  (Tanaka Toru)		
研究協力者	中山 隆志  (Nakayama Takashi)		
研究協力者	福永 淳  (Fukunaga Atsushi)		
研究協力者	錦織 千佳子  (Nishigori Chikako)		
研究協力者	岩谷 素顕  (Iwaya Motoaki)		

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------