

190. 高血圧・動脈硬化における獲得免疫の関与の解明

佐々木 直人

Key words : 動脈硬化, 高血圧, 大動脈瘤, 獲得免疫

神戸大学 大学院医学研究科
内科学講座 循環器内科学分野

緒 言

近年ますます増加してい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. 獲得免疫系の中心的役割を果たす T 細胞の中には, 炎症を引き起こすようなエフェクター T 細胞と, 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, このバランスが前者に傾くことにより, 動脈硬化の病態悪化に寄与することが明らかになった^{1,2)}. 我々は, 過剰な免疫応答を抑制するような細胞集団である 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およびその退縮の促進に関わることを示してきた³⁻⁸⁾. ヒトにおいても, 末梢血液中 Treg の割合の減少と冠動脈疾患発症との関連性を見出している⁹⁾. 以上のように, 獲得免疫系の制御により動脈硬化が治療・予防できることを示してきた.

免疫グロブリンスーパーファミリーに属する CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4) は, Treg および活性化されたエフェクター T 細胞において高発現し, いずれの細胞においても免疫抑制性に働き, Treg 側にバランスを傾けることが示唆されている. CTLA-4 欠損マウスは重篤な自己免疫疾患により死亡し, ヒトにおいても, *CTLA4* 遺伝子の異常により自己免疫疾患を発症することが報告されており, この分子は過剰な免疫応答の抑制において必須の役割を果たす. CTLA-4-免疫グロブリン融合蛋白 (CTLA-4 Ig) は, CTLA-4 分子と同様に, T 細胞の活性化を阻害することにより, 関節リウマチの病態を抑制する. 本研究は, 動脈硬化形成における CTLA-4 分子の役割を明らかにし, 新規動脈硬化治療法を開発することを目的とする.

高血圧は心血管疾患の重大な危険因子であり, 近年の治療法の進歩にもかかわらず, 未だその予防・治療については十分とは言えない. 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. これら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. 本研究において, これらの疾患において Treg の果たす役割について明らかにする.

方 法

1. 動脈硬化形成における CTLA-4 分子の役割の検討

ヒト CD2 プロモーターを用いた, マウス CTLA-4 の過剰発現マウスと *ApoE*^{-/-}マウス (アポリポ蛋白 E 遺伝子欠損マウス) を交配して CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスを作製し, リンパ球における CTLA-4 の細胞内・細胞外へのシグナルの増強により動脈硬化病変形成が抑制されるかどうかについて検討を行った. CTLA-4 の過剰発現による全身の免疫反応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数や活性化状態の評価については, フローサイトメトリーを用いて行った. リンパ組織由来の T 細胞や樹状細胞などの機能の評価については, *in vitro* の assay 系を用いて, フローサイトメトリーにより行った.

2. 高血圧および大動脈瘤形成における制御性 T 細胞の役割の検討

マウスにアンジオテンシン II の持続投与を行うことにより、血圧の上昇とともに腹部大動脈瘤を形成することが知られている。以下の方法を用いることにより、Foxp3 陽性 Treg が高血圧および大動脈瘤形成抑制に働くかどうかを検討した。

6 週齢雄の *ApoE*^{-/-}マウスに高脂肪食を 6 週間投与後、浸透圧ミニポンプを用いてアンジオテンシン II (1,000 ng/kg/min) の投与を行った。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。リンパ組織における免疫細胞数や活性化状態の評価についてはフローサイトメトリーを用いて行い、大動脈瘤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。ポンプ植え込み後 28 日目において、非観血的血圧測定を行った。

次に、ジフテリアトキシンの投与により特異的に Foxp3 陽性 Treg を減少させることができる DEREG (Depletion of regulatory T cell) マウスと *ApoE*^{-/-}マウスを交配し、DEREG/*ApoE*^{-/-}マウスを作製した。このマウスを用いて、アンジオテンシン II 投与により高血圧および大動脈瘤を誘導し、上記と同様の評価を行った。

結 果

1. 動脈硬化形成における CTLA-4 分子の役割の検討

16 週齢雌の CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスにおいては、大動脈基部の動脈硬化病変の面積は、コントロールのマウスに比較して有意な減少を認めた ($23.95 \pm 1.77 \times 10^4 \mu\text{m}^2$: コントロールマウス vs $17.80 \pm 1.65 \times 10^4 \mu\text{m}^2$: Tg マウス, 各群 n=19, p=0.0153)。フローサイトメトリーを用いた検討により、CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスのリンパ組織において、エフェクター T 細胞が著明に減少することを見出した。CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスの CD4 陽性 T 細胞からの IFN- γ の産生は、コントロールのマウスに比べて著明に減少していた。*in vitro* において、CTLA-4 を高発現した CD4 陽性 T 細胞は、通常の T 細胞と比較して、T 細胞受容体を介した刺激による増殖は有意に抑制されていた。また、CD4 陽性 T 細胞と CD11c 陽性樹状細胞を共培養すると、CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスの T 細胞は、樹状細胞における共刺激分子 CD80/CD86 の発現を有意に低下させることより、他の T 細胞への副刺激シグナルが入るのを抑制して、T 細胞の活性化を抑制することが明らかになった。

2. 高血圧および大動脈瘤形成における制御性 T 細胞の役割の検討

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 II 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たが、両群における有意差は認めなかった。注目すべきことに、IL-2/IL-2 抗体複合体投与群においては、コントロール群と比較して、大動脈瘤の発症率、死亡率が有意に低下した (図 1)。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。

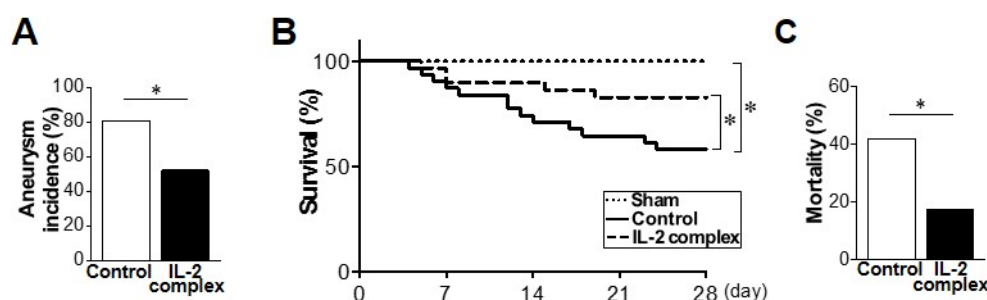


図1. Tregの増加による大動脈瘤の発症率・死亡率への影響.

IL-2/IL-2抗体複合体投与により Foxp3 陽性 Treg の数を増加させると、大動脈瘤の発症率・死亡率が有意に低下した。A) コントロール群および IL-2/IL-2 抗体複合体投与群における大動脈瘤の発症率。B) コントロール群 (n=31), IL-2/IL-2 抗体複合体投与群 (n=29), および Sham 群 (n=12) における大動脈瘤の生存曲線。C) コントロール群および IL-2/IL-2 抗体複合体投与群における大動脈瘤の死亡率。* $P < 0.05$. Kaplan-Meier 生存曲線は log-rank (Mantel-Cox) test を用いて、発症率・死亡率は chi-square test を用いて検定した。

Foxp3 陽性 Treg が高度に減少したマウスでは、コントロール群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 (図2)。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、DEREG/*ApoE*^{-/-}群において 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。

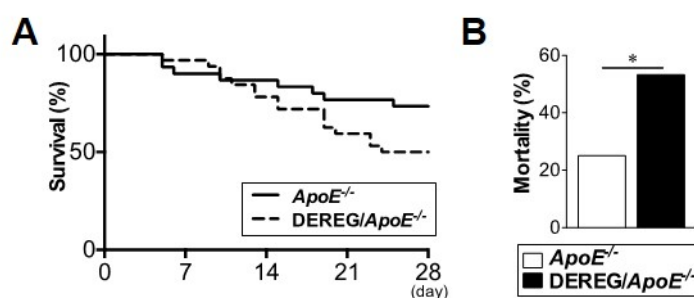


図2. Tregの減少による大動脈瘤の死亡率への影響.

Foxp3 陽性 Treg を特異的に減少させると、大動脈瘤の死亡率が有意に増加した。A) コントロール群 (*ApoE*^{-/-}; n=32) および Foxp3 陽性 Treg 減少群 (DEREG/*ApoE*^{-/-}; n=30) における大動脈瘤の生存曲線。B) コントロール群および Foxp3 陽性 Treg 減少群における大動脈瘤の死亡率。* $P < 0.05$. Kaplan-Meier 生存曲線は log-rank (Mantel-Cox) test を用いて、死亡率は chi-square test を用いて検定した。

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¹⁰⁾。

考 察

1. 動脈硬化形成における CTLA-4 分子の役割の検討

多くの研究成果にもかかわらず、エフェクター T 細胞と Treg のバランスを変えるような動脈硬化の治療法は、確立されていない。エフェクター T 細胞と Treg のバランスを後者に傾ける分子として、我々は免疫抑制性分子 CTLA-4 に注目した。本研究結果より、リンパ球における免疫抑制性分子 CTLA-4 の過剰発現は、動脈硬化抑制的に働くことが明らかになった。その動脈硬化抑制の分子機序としては、*in vitro* および *in vivo* で検討を行った結果、活性化 T 細胞

胞における細胞内への抑制シグナルによる機能・増殖の抑制，および細胞外への抑制シグナルによる抗原提示細胞（樹状細胞など）および T 細胞の活性化の抑制などが考えられた．本研究の結果より，CTLA-4 : CD80/CD86 の経路をターゲットとした新規動脈硬化治療法の開発につながると期待される．今後，CTLA-4 Ig（アバタセプト）の投与が行われている関節リウマチ患者において，心血管病の病態抑制が得られるかについて明らかにされることが望まれる．

2. 高血圧および大動脈瘤形成における制御性 T 細胞の役割の検討

国外のグループからは，アンジオテンシン II もしくはアルドステロン誘導性のマウス高血圧モデルにおいて，Treg を細胞移入することにより，有意な血圧上昇の抑制，血管内皮機能の改善，血管障害の抑制が示されている．IL-2 と抗 IL-2 抗体の複合体の投与は，効果的に Foxp3 陽性 Treg の数を増加させると報告されており，我々はこの確立された方法を用いて検討を行った．我々の実験系では，Foxp3 陽性 Treg の増加により有意な血圧上昇の抑制は見られなかったが，興味深いことに，大動脈瘤形成の有意な抑制を認めた．DEREG/*ApoE*^{-/-}マウスは，ジフテリアトキシンの投与により Foxp3 陽性 Treg を高度に減少させることができるが，数日のうちに Treg の数が元に戻ってしまう．そのために，Treg の減少により，有意な血圧上昇を認めなかった可能性も考えられる．今後，Treg の数を安定して減少させるようなプロトコルを検討する必要がある．本研究では，Treg が高血圧の病態抑制に関わることの証明はできなかったが，興味深いことに，大動脈瘤形成抑制に働くことが明らかになった．今後，その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が期待される．

共同研究者

本研究の共同研究者は，神戸大学大学院医学研究科内科学講座循環器内科学分野の山下智也，松本卓也，および淀井景子である．本研究にて使用された DEREG マウスは Institute of Infection Immunology, TWINCORE・Tim Sparwasser 博士より，CTLA-4-Tg マウスは独立行政法人理化学研究所・斎藤 隆博士より分与をして頂きました．深くお礼を申し上げます．最後に，本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます．

文 献

- 1) Sasaki, N., Yamashita, T., Takeda, M. & Hirata, K. : Regulatory T cells in atherogenesis. *J. Atheroscler. Thromb.*, **19** : 503-515, 2012.
- 2) Sasaki, N., Yamashita, T., Kasahara, K., Takeda, M. & Hirata, K. : Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells as critical immune modulators in atherogenesis. *Curr. Pharm. Des.*, **21** : 1107-1117, 2015.
- 3) Sasaki, N., Yamashita, T., Takeda, M., Shinohara, M., Nakajima, K., Tawa, H., Usui, T. & Hirata, K. : Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Circulation*, **120** : 1996-2005, 2009.
- 4) Takeda, M., Yamashita, T., Sasaki, N., Nakajima, K., Kita, T., Shinohara, M., Ishida, T. & Hirata, K. : Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30** : 2495-2503, 2010.
- 5) Nakajima, K., Yamashita, T., Kita, T., Takeda, M., Sasaki, N., Kasahara, K., Shinohara, M., Rikitake, Y., Ishida, T., Yokoyama, M. & Hirata, K. : Orally administered eicosapentaenoic acid induces rapid regression of atherosclerosis via modulating the phenotype of dendritic cells in Ldl receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31** : 1963-1972, 2011.
- 6) Takeda, M., Yamashita, T., Sasaki, N. & Hirata, K. : Dendritic cells in atherogenesis: Possible novel targets for prevention of atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.*, **19** : 953-961, 2012.
- 7) Kita, T., Yamashita, T., Sasaki, N., Kasahara, K., Sasaki, Y., Yodoi, K., Takeda, M., Nakajima, K. & Hirata, K. : Regression of atherosclerosis with anti-CD3 antibody via augmenting a regulatory T-cell response in mice. *Cardiovasc. Res.*, **102** : 107-117, 2014.
- 8) Kasahara, K., Sasaki, N., Yamashita, T., Kita, T., Yodoi, K., Sasaki, Y., Takeda, M. & Hirata, K. : CD3 antibody and IL-2 complex combination therapy inhibits atherosclerosis by augmenting a regulatory immune response. *J. Am. Heart Assoc.*, **3** : e000719, 2014.
- 9) Emoto, T., Sasaki, N., Yamashita, T., Kasahara, K., Yodoi, K., Sasaki, Y., Matsumoto, T., Mizoguchi, T. & Hirata, K. I. : Regulatory/effector T-cell ratio is reduced in coronary artery disease. *Circ. J.*, **78** : 2935-2941, 2014.
- 10) Yodoi, K., Yamashita, T., Sasaki, N., Kasahara, K., Emoto, T., Matsumoto, T., Kita, T., Sasaki, Y., Mizoguchi, T., Sparwasser, T. & Hirata, K. : Foxp3⁺ regulatory T cells play a protective role in angiotensin II-induced aortic aneurysm formation in mice. *Hypertension*, **65** : 889-895, 2015.