

## 164. 血管内皮抗原特異的免疫抑制療法は動脈硬化を抑制する

笠木 伸平

神戸大学 医学部附属病院 検査部

Key words : 血管内皮抗原特異的免疫抑制療法, 免疫寛容, 動脈硬化

### 緒言

動脈硬化は、致命的な合併症やその高い罹患率を背景とする医療経済学的な観点等の理由からその予防はわが国の大変重要な課題となっている。近年、動脈硬化は血管内皮障害から始まる血管内皮の慢性炎症であるという考えが一般的となりつつあり、その機序として、血管内皮抗原 (HSP65 etc) が抗原提示細胞により T 細胞に提示され、血管内皮抗原特異的な T 細胞を活性化させると考えられている。しかし、血管内皮抗原に対する免疫寛容の破綻がなぜ起こり、また、動脈硬化の進展にどう関与するのかは未だ機構は解明されていない。加えて、動脈硬化症に対する治療は、未だ提唱もされておらず、専らその予防 (動脈硬化の危険因子の排除) のみが臨床の場で行われているのが現状である。仮に動脈硬化症を既存の免疫抑制療法で加療した場合、抗原非特異的な免疫応答が抑制され、結果、免疫不全状態となり、自己抗原以外の抗原 (感染抗原や腫瘍抗原) に対する免疫応答の低下により生じる副作用が懸念される。本研究において、血管内皮抗原特異的な制御性 T 細胞のみを選択的に体内で誘導することで免疫不全を起こさずに動脈硬化の治癒や進展の予防できるのかどうかを検証したので結果をここに報告する。

### 方法

#### 1. HSP65/IFA で誘導される動脈硬化モデルマウスの確立

血管内皮抗原 (HSP65) と Incomplete Freund's adjuvant/IFA (免疫賦活剤) の投与により HSP65 に特異的に免疫反応が誘導させることで動脈硬化を進行させるモデルマウスの実験系を確立した。マウスは LDL-R KO マウスを使用し、通常食 (Non High Fat diet) で飼育した。10 週齢になった時点で HSP65 ペプチドと IFA の混合物 (エマルジョン) をマウスに皮下注射した。マウスが 22 週齢になった時点でマウスを安楽死させた。

#### 2. 動脈硬化モデルマウスの治療

マウスが 14 週齢に到達した時点でランダムに 5 つの群に無作為に分け、うち 4 つの群には以下の別々の治療を施した。すなわち、①無治療群 (Cont 群と表記)、②HSP65 ペプチド投与群 (HSP65 ペプチドのみ隔日で 6 回投与、HSP 群と表記)、③OVA ペプチド投与群 (OVA ペプチドのみ隔日で 6 回投与、OVA 群と表記)、④Del+HSP65 投与群 (抗 CD20 抗体 (250  $\mu$ g/匹) で B 細胞を除去したのに引き続き HSP65 ペプチドを隔日で 6 回投与した群、Del+HSP65 群と表記)、⑤Del+OVA 投与群 (抗 CD20 抗体 (250  $\mu$ g/匹) で B 細胞を除去したのに引き続き OVA ペプチドを隔日で 6 回投与した群、Del+OVA 群と表記) の 5 群を設定した。マウスが 18 週齢になった時点で再度 14 週齢で行った治療と同じ治療を繰り返し施行した。

#### 3. 動脈硬化モデルマウスの解析

22 週齢で安楽死させたマウスから、脾臓、大動脈を取り出し、それぞれの組織における IFN- $\gamma$  を産生する活性化 T 細胞の機能やそれを制御する制御性 T 細胞の機能をフローサイトメトリーで評価した。また、大動脈の動脈硬化の程度を評価するためにオイルレッド O で染色した。また、脾臓細胞を HSP65 抗原あるいは抗 CD3 抗体で 72 時間刺激し、脾臓細胞による IFN- $\gamma$  の産生能を培養液中の IFN- $\gamma$  濃度を測定することで評価した (ELISA 法)。

## 結果

### 1. Deletion+HSP65 併用療法の動脈硬化に与える影響について

Deletion+HSP65 投与群では他の 4 群と比較して有意に動脈硬化巣の範囲が少なかった (図 1)。

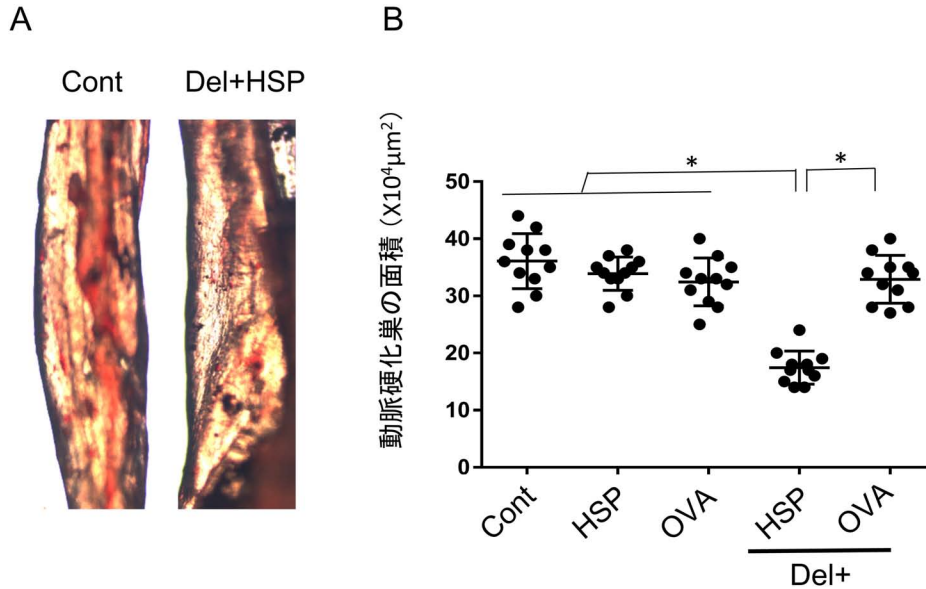


図 1. Del+HSP 療法は動脈硬化を抑制する

(A) Cont 群と Del+HSP 群のマウスから下行大動脈を取り出し、オイルレッド O で染色を行った。組織像を示す (×20) (B) 各群のマウスの下行大動脈の Cross section において、オイルレッド O で染色される部位を計測した。(P < 0.05、One-way Anova)

### 2. 脾臓と大動脈における CD4 陽性 T 細胞の機能評価

本解析はフローサイトメトリー法で行った。脾臓において、Del+HSP65 投与群と Del+OVA 投与群の 2 群では他の 3 群と比較して有意に Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の割合が増加していた (図 2A)。一方で IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞の割合に関しては 4 群間で差を認めなかった (図 2B)。興味深いことに Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞と IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞の比をとったところ、Del+HSP65 投与群では他の群と比較して有意に高かったことから、同群では、脾臓内に抗炎症優位の環境が構築されていると考えられた (図 2C)。さらに、同様の解析を血管内に浸潤している細胞を各マウスから抽出し、それらをプールして解析を行ったところ、脾臓と同様に Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞と IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞の比は、Del+HSP65 投与群では他の群と比較して有意に高かった (図 2D)。

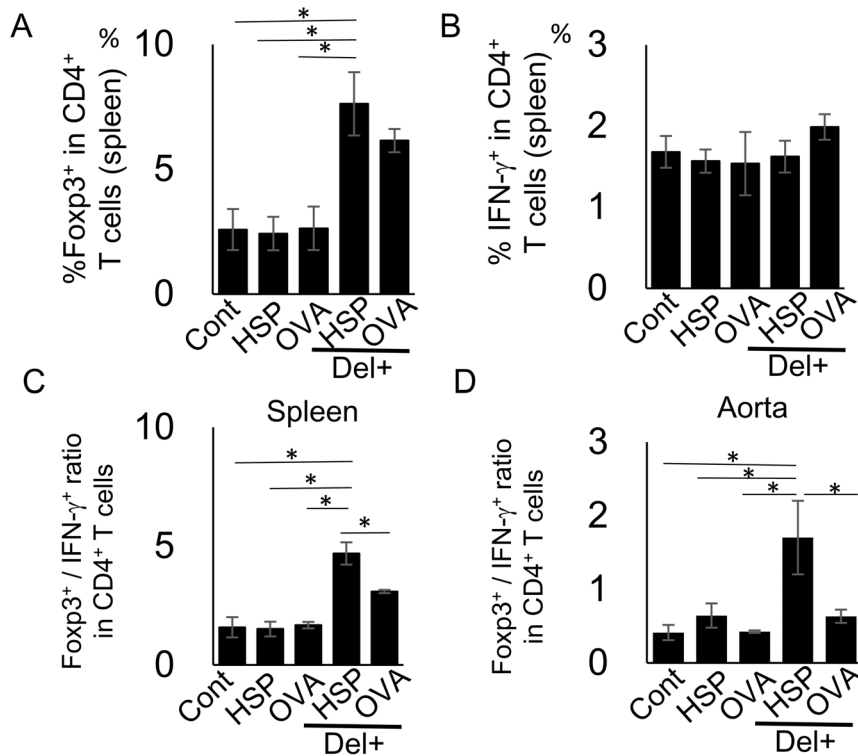


図2. Del+HSP 療法により脾臓および動脈において抗炎症優位な微小環境が構築される

(A、B) 22 週齢の各治療群のマウスから脾臓と動脈を摘出し、Foxp3 陽性制御性 T 細胞と IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞の割合を FACS で解析した。(C、D) 脾臓 (C) および、動脈硬化巣 (D) における CD4 陽性細胞の Foxp3 陽性 IFN- $\gamma$  産生細胞の比を示す。3 回の実験の代表的な図を示す。(\*P < 0.05, one-way Anova)

### 3. 脾細胞における抗原特異的な免疫反応

各マウスから得られた脾臓細胞を HSP65 あるいは抗 CD3 抗体で刺激し、脾臓細胞による IFN- $\gamma$  の産生を培養液中の IFN- $\gamma$  濃度を測定することで評価した。その結果、抗原 (HSP65) 特異的な脾臓細胞による IFN- $\gamma$  の産生能は、Del+HSP65 投与群では他の群と比較して有意に低かったが、抗 CD3 抗体 (抗原非特異的な) 刺激による脾臓細胞による IFN- $\gamma$  の産生能には差を認めなかった。以上のことから、HSP65 抗原に特異的な脾臓細胞による IFN- $\gamma$  の産生が、Del+HSP65 投与群では選択的に抑制されていると考えられた (図 3A-B)。

次に、その現象が Del+HSP65 投与群において HSP65 抗原特異的な制御性 T 細胞が誘導されていることに起因するものなのかどうかについて検討した。制御性 T 細胞を含まない CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞と、制御性 T 細胞を含む CD4<sup>+</sup>T 細胞を HSP65 で刺激した場合 (樹状細胞の存在下) に、Del+HSP65 投与群では前者が後者よりも著しく高かったが、Cont 群では、前者が後者よりもわずかに高いのみで Cont 群の前者と後者では有意差は認めなかった (図 3C)。

以上のことから、Del+HSP65 併用療法により、HSP65 で刺激して活性化する制御性 T 細胞 (HSP65 抗原に特異的な制御性 T 細胞) が誘導されたと考えられた。

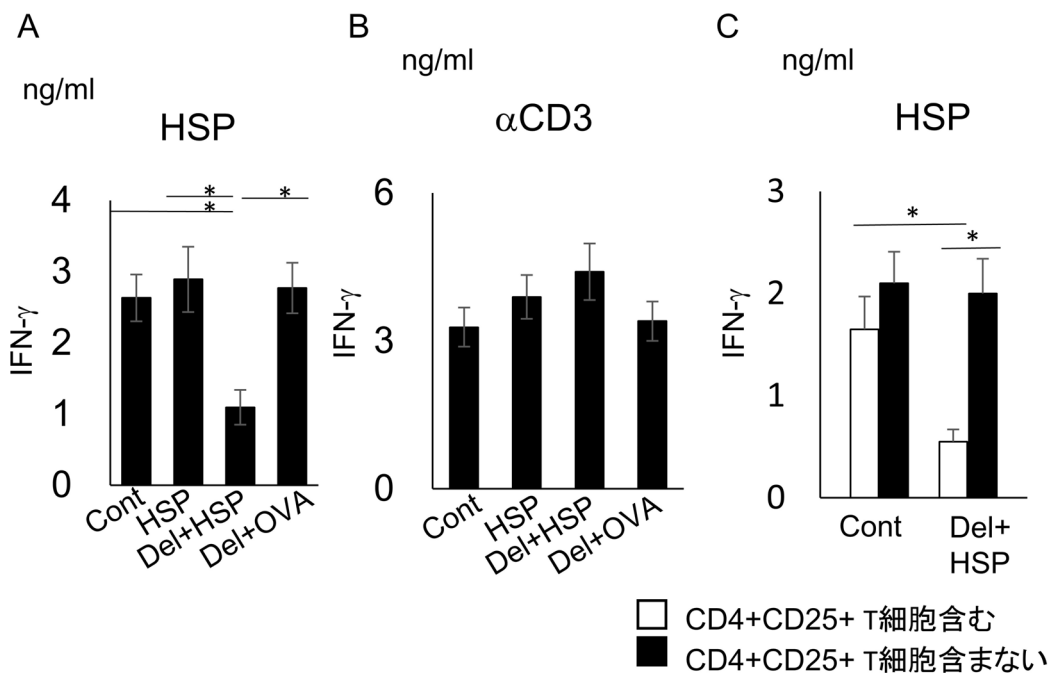


図3. Del+HSP 併用療法は HSP65 に特異的な免疫反応を選択的に抑制する

(A, B) 22 週齢の時点における各治療群のマウスから脾細胞を抽出し、(A) HSP65、(B) 抗 CD3 抗体 ( $\alpha$ CD3) で 72 時間培養刺激後に、培養液中の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA 法 (Mean  $\pm$  SD) で測定した。(C) 22 週齢の各治療群のマウスから脾臓 CD4 陽性 T 細胞 (□) と同数の CD4 陽性 CD25 陰性細胞 (■) を抽出し、樹状細胞と HSP65 抗原の存在下で 72 時間培養した。その後、培養液中の IFN- $\gamma$  濃度 (Mean  $\pm$  SD) を ELISA 法で測定した。(\*P < 0.05、図 3A; One-way Anova、図 3C; U-test)

## 考 察

本研究では、抗 CD20 抗体に引き続き HSP65 の併用投与することで、血管内皮抗原特異的な制御性 T 細胞のみを選択的に体内で誘導できること、また、動脈硬化の進展を遅らせることを発見した。しかしながら、その併用の治療がどのような機序で、血管内皮抗原特異的な制御性 T 細胞のみを選択的に体内で誘導し、動脈硬化の進展を遅らせるのかまでは明らかにできなかった。CD20 抗体と OVA の併用療法では同様の効果を得られなかったことから、抗 CD20 抗体の効能である B 細胞の体内からの除去では動脈硬化の進展は予防できないと考えられた。また、同様に HSP65 の単独投与では同様の効果を得られなかった。低用量の抗原を持続的に投与することで、その抗原に対する免疫反応が抑制される (免疫寛容の誘導) 治療法は脱感作療法として知られているが、HSP65 の単独投与では同様の効果を得られなかったことから、本併用療法の効能を説明する機序は少なくとも抗原の脱感作や B 細胞の除去ではないと考えられた。

これまでの我々の研究<sup>1)</sup> から、本併用療法の効能は以下のとおり説明できるのではないかと推測している。すなわち、抗 CD20 抗体の投与によりアポトーシスを誘導された B 細胞は、速やかに体内でマクロファージなどの貪食を専門とする白血球に貪食されることで、マクロファージが大量の TGF  $\beta$  を産生する<sup>2)</sup>。次に、新しく生まれてくる T 細胞は、大量の TGF  $\beta$  により、制御性 T 細胞に分化する傾向が強くなる<sup>3)</sup> だが、HSP65 の投与により、抗原提示細胞である体内の樹状細胞から HSP65 の提示も同時にうけるので、HSP65 を特異的に認識する制御性 T 細胞が選択的に分化されるのではないかと推測している (図 4)。この仮説が正しいのかを証明するためには、治療直後に大量の TGF  $\beta$  を中和すること、あるいは体内でマクロファージを除去してから治療を行うことで、治療効果が消失することを検討することが必要であり、今後の検討課題であると考えられる。

また、本当に血管内皮抗原特異的な制御性 T 細胞のみを選択的に体内で誘導しているのか、免疫不全を同時に誘導していないのかどうかは本研究では十分に検討できていない。In vitro の実験系では、HSP65 に対する免疫反応は抑制され、抗 CD3 抗体による非特異的な抗原刺激に対する免疫反応は治療により抑制されていなかったことは、血管内皮抗原特異的な免疫反応は抑制されても、他の抗原に対して特異的な免疫反応は抑制されていない可能性は高い。しかしながら免疫不全を誘導していないかどうかを証明するには、治療したマウスに対して、実際に感染を誘導し、感染症の罹患率や重篤度において他のマウスと比較して違いがないことを証明する必要がある。さらに、仮にこれらが証明されたとしても、臨床応用へのハードルは依然高いと考えている。HSP65 は Toll like receptor 4 (TLR4) を介して、炎症を誘導する危険性があるため<sup>4)</sup>、その用量や投与方法については、臨床応用の時点では問題になると推測される。

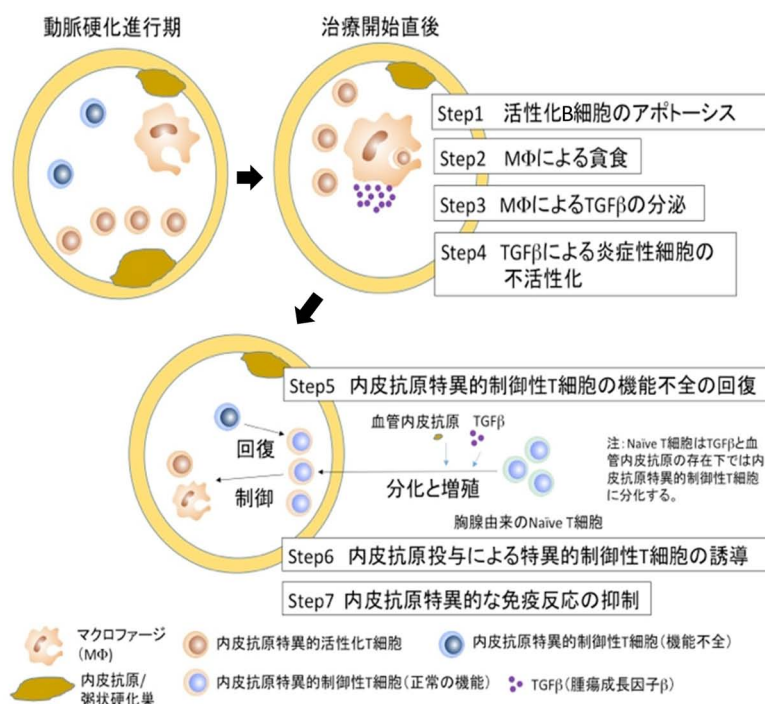


図 4. 血管内皮抗原特異的免疫抑制療法が動脈硬化を抑制する機序仮説

抗 CD20 抗体の投与によりアポトーシスを誘導された B 細胞 (Step1) は、速やかに体内でマクロファージなどに貪食されることで (Step2)、マクロファージが大量の TGFβ を産生する (Step3)。その結果、炎症細胞が不活性化し (Step4)、制御性 T 細胞の機能が回復する (Step5)。新しく生まれてくる T 細胞は、大量の TGFβ の存在下により、制御性 T 細胞に分化する傾向が強くなるが、HSP65 の投与により、抗原提示細胞である体内の樹状細胞から HSP65 の提示も同時にうけるので、HSP65 を特異的に認識する制御性 T 細胞が選択的に分化する (Step6-7)。

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただい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) Kasagi S, Zhang P, Che L, Abbatiello B, Maruyama T, Nakatsukasa H, Zanvit P, Jin W, Konkel JE, Chen W. In vivo-generated antigen-specific regulatory T cells treat autoimmunity without compromising antibacterial immune response. *Sci Transl Med.* 2014 Jun 18;6(241):241ra78. doi:10.1126/scitranslmed.3008895. PMID: 24944193
- 2) Perruche S, Zhang P, Liu Y, Saas P, Bluestone JA, Chen W. CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med.* 2008 May;14(5):528-35. doi: 10.1038/nm1749. Epub 2008 Apr 27. PMID: 18438416

- 3) Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1875-86. PMID: 14676299
- 4) Mycobacterial heat shock protein 65 enhances antigen cross-presentation in dendritic cells independent of Toll-like receptor 4 signaling. Chen K, Lu J, Wang L, Gan YH. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):260-6. Epub 2003 Nov 3. PMID: 14597728