

免疫系に着目した動脈硬化の発症・進展機序の解明および新規治療法の開発

佐々木直人

神戸薬科大学 医療薬学研究室

【研究の背景】

動脈硬化性疾患の病態進展において、過剰な免疫応答による慢性炎症が深く関与することが明らかになっている。申請者は、炎症性免疫応答の制御に着目した新規治療法・予防法の開発を目指して研究してきた中で、制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: Treg) が炎症を制御することで動脈硬化抑制に関わることを明らかにした¹⁻⁶⁾。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制御に関わることを報告されているが^{7, 8)}、動脈硬化の病態における役割は不明である。動脈硬化の病態形成における CCR4 の役割が解明されれば、Treg の制御による新規動脈硬化治療法の開発につながると考えられる。

申請者は、安全でかつ安価な Treg 誘導法を探索してきた中で、皮膚疾患の治療に用いられている紫外線 B 波 (UVB) に着目し、動脈硬化モデルマウスおよび大動脈瘤モデルマウスに UVB 照射を行い、Treg を誘導することで動脈硬化および大動脈瘤の形成を抑制できることを報告した^{6, 9)}。過度の UVB 暴露は発がんを引き起こす可能性があるが、動脈硬化の進展抑制に有効な UVB 波長や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。

【目 的】

- ①動脈硬化形成における CCR4 の役割を解明すること。
- ②動脈硬化抑制に有効な UVB 波長を特定し、その抑制機序を解明すること。

【方 法】

①動脈硬化形成における CCR4 の役割の解明

CCR4 の阻害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、特異的な阻害薬を用いて実験を行った。8 週齢雄の動脈硬化モデル *ApoE*^{-/-}マウス (アポリポ蛋白 E 遺伝子欠損マウス) に週 3 回 10 週間、DMSO に溶解した CCR4 阻害薬もしくはコントロールとして DMSO を腹腔内投与した。18 週齢で安楽死させて、大動脈基部付近に形成された動脈硬化病変の定量評価を行った。フローサイトメトリーを用いて、鼠径・腋窩リンパ節および傍大動脈リンパ節における Treg とエフェクター T 細胞の割合を評価した。

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*^{-/-}マウス (CCR4 遺伝子欠損マウス) と *ApoE*^{-/-}マウスを交配して *Ccr4*^{-/-}*ApoE*^{-/-}マウスを作製し、その表現型を解析した。

②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。6 週齢雄の *ApoE*^{-/-}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 細胞の割合を評価した。6 週齢雄の *ApoE*^{-/-}マウ

スにこれらの UVB を週に 1 回合計 14 回照射を行い、大動脈基部の動脈硬化病変を定量評価した。

【結 果】

①動脈硬化形成における CCR4 の役割の解明

ApoE^{-/-}マウスへの CCR4 阻害薬の投与により、大動脈基部の動脈硬化病変に変化を認めなかった。CCR4 阻害薬の投与により、鼠径・腋窩リンパ節における Treg およびエフェクター T 細胞の割合には変化を認めなかったが、傍大動脈リンパ節において Treg は有意に減少した。18 週齢雄と雌の *Ccr4*^{-/-}*ApoE*^{-/-}マウスにおいて、コントロールの *ApoE*^{-/-}マウスと比較して、大動脈基部の動脈硬化病変形成は有意に促進された。*Ccr4*^{-/-}*ApoE*^{-/-}マウスでは、鼠径・腋窩リンパ節における Treg の割合は有意に増加し、エフェクター T 細胞の割合も増加する傾向を認めたが、傍大動脈リンパ節においては Treg とエフェクター T 細胞ともに変化を認めなかった。

②動脈硬化抑制に有効な UVB 波長の特定と抑制機序の解明

皮膚所属リンパ節における Treg の割合は、282 nm および 301 nm の UVB 照射でのみ増加した。すべての波長の UVB 照射により、脾臓中の Treg の割合は増加した。興味深いことに、Treg の増加作用は波長の短い UVB において顕著であった。いずれの波長の UVB 照射においても、皮膚所属リンパ節と脾臓におけるエフェクター T 細胞の割合には変化を認めなかった。282 nm および 312 nm の UVB 照射により動脈硬化は有意に抑制されたが、301 nm の UVB 照射は動脈硬化に影響を与えなかった。

【考 察】

①動脈硬化形成における CCR4 の役割の解明

CCR4 阻害薬を用いた検討により、CCR4 は Treg の動脈硬化病変部位への遊走に関与することが明らかになったため、CCR4 の欠損により、病変部周囲の傍大動脈リンパ節における Treg の割合は減少すると予想した。しかし、予想に反して、*ApoE*^{-/-}*Ccr4*^{-/-}マウスの傍大動脈リンパ節における Treg の割合は、コントロールの *ApoE*^{-/-}マウスと比較して有意差を認めなかった。一方で、*ApoE*^{-/-}*Ccr4*^{-/-}マウスにおいて、動脈硬化病変の形成は促進された。本研究で用いた *ApoE*^{-/-}マウスは、動脈において高度な炎症所見を認めることが知られているが、*ApoE*^{-/-}*Ccr4*^{-/-}マウスでは、動脈への Treg の遊走が抑制されることで炎症が増強されている可能性がある。また、高度な炎症性変化を生じた動脈硬化病変部では、炎症を収束させるために Treg の遊走が促進されている可能性がある。これらのことより、*ApoE*^{-/-}*Ccr4*^{-/-}マウスにおいて、動脈硬化病変が形成される前段階では傍大動脈リンパ節における Treg は一旦減少し、病変の形成とともに Treg の集積が増加したのではないかと予想される。

②動脈硬化抑制に有効な UVB 波長の特定と抑制機序の解明

すべての波長の UVB 照射はエフェクター T 細胞に影響を与えなかったことより、Treg に特異的に作用すると考えられる。282 nm および 301 nm の UVB 照射では、皮膚所属リンパ節だけでなく脾臓においても Treg の増加を認めたことから、全身で Treg を増加させることができると考えられる。動脈硬化への抑制作用に関しては、282 nm の UVB 照射により病変形成は有意に抑制されたが、301 nm の UVB 照射では抑制されなかった。Treg の増加効果としては、282 nm の UVB のほうが顕著であったため、Treg の増加の程度と動脈硬化病変形成抑制作用との関連が示唆された。312 nm の UVB 照射に関しては、Treg の増加作用が最も弱いにもかかわらず、動脈硬化は有意に抑制された。以上のように、Treg の増加と動脈硬化抑制に有効な UVB 波長を見出したが、動脈硬化抑制機序については波長により異なる可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究において、Treg は CCR4 を介して動脈硬化病変部位へ遊走する可能性が示唆され、CCR4 は動脈硬化抑制に働くことが明らかになった。今後、動脈硬化抑制の詳細な分子機序を解明することにより、CCR4 を介する Treg の操作による新規動脈硬化治療法の開発につながると期待される。近年、動脈硬化性疾患に対する治療は医療経済を圧迫しているが、UVB 照射による治療は副作用および経済的負担の少ない治療法として期待される。病態抑制に有効な波長を特定し、詳細

な抑制機序を解明することで、臨床応用につながることを期待される。

【参考・引用文献】

1. 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* 2009;120:1996-2005.
2. 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* 2014;3:e000719.
3. 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* 2014;102:107-117.
4. Emoto T, Sasaki N, Yamashita T, Kasahara K, Yodoi K, Sasaki Y, Matsumoto T, Mizoguchi T, Hirata K. Regulatory/effector T-cell ratio is reduced in coronary artery disease. *Circ J* 2014;78:2935-2941.
5. 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* 2015;21:1107-1117.
6. 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 KI. UVB exposure prevents atherosclerosis by regulating immunoinflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:66-74.
7. Yuan Q, Bromley SK, Means TK, Jones KJ, Hayashi F, Bhan AK, Luster AD. CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 2007;204:1327-1334.
8. Faustino L, da Fonseca DM, Takenaka MC, Mirotti L, Florsheim EB, Guerreschi MG, Silva JS, Basso AS, Russo M. Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation. *J Immunol* 2013;190:2614-2621.
9. Hayashi T, Sasaki N, Yamashita T, Mizoguchi T, Emoto T, Amin HZ, Yodoi K, Matsumoto T, Kasahara K, Yoshida N, Tabata T, Kitano N, Fukunaga A, Nishigori C, Rikitake Y, Hirata KI. Ultraviolet B exposure inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice by expanding CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Am Heart Assoc* 2017;6.

【謝 辞】

本研究で使用された CCR4 阻害薬および *Ccr4*^{-/-}マウスは、近畿大学薬学部 化学療法学研究室 中山隆志博士より分与をして頂きました。紫外線 LED 照射器の作製には日機装技研株式会社に技術支援をいただき、実験を進めるにあたり、神戸大学大学院 医学研究科 皮膚科学講座 錦織千佳子博士および福永淳博士、名城大学理工学部 岩谷素顕博士にご指導いただきました。これらの共同研究者の方々に深くお礼を申し上げます。