

「免疫制御による心血管疾患治療法の開発」

神戸薬科大学 医療薬学研究室 佐々木 直人

1 研究の背景と目的

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、これら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。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りつつあり、炎症抑制性の免疫応答を増強させたり、炎症惹起性の免疫応答を抑制したりすることにより、その発症・進展を抑制できる可能性がある。

我々は、免疫応答の制御に着目した新規治療法・予防法を開発を目指して研究してきた (*Circulation*. 120:1996-2005, 2009, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30:2495-2503, 2010, *J Am Heart Assoc*. 3:e000719, 2014, *Cardiovasc Res*. 102:107-117, 2014, *Circ J*. 78:2935-2941, 2014, *Hypertension*. 65:889-895, 2015)。その過程で、過剰な免疫応答を抑制する機能を持つ制御性 T 細胞/Regulatory T cell (Treg) や、この細胞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 の波長の紫外線照射に着目し、動脈硬化や大動脈瘤形成に対するこれらの抑制作用を見出した (*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 37:66-74, 2017, *J Am Heart Assoc*. 6(9), 2017)。また、Treg および活性化された炎症性 T 細胞において高発現し、過剰な免疫応答の抑制に関わる CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4) 分子が、T 細胞の活性化を抑制することで動脈硬化抑制的に働くことを明らかにした (*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 36:1141-1151, 2016)。

動脈硬化を基盤として発症する心筋梗塞に対して適切なカテーテル治療および薬物治療を行っても、心筋リモデリングにより心不全を発症する症例も多く、より効果的な治療法・予防法が開発が望まれている。最近、心筋梗塞後の心不全の病態進展において炎症の関与が明らかにされつつあり、その病態抑制に Treg が関わることも示唆されているが、不明な点も多い。大動脈瘤の発症・進展には動脈硬化が関与し、病変が進行すると破裂による死亡率が高く致死的な疾患であるが、効果的な内科的治療法はない。その発症や進展において、動脈硬化と同様に生活習慣病や慢性炎症などの関与も明らかにされつつあるが、いまだ不明な点も多く、さらなる病態解明が望まれている。

本研究において、心筋梗塞後心不全の病態進展に対する UVB 照射の抑制効果・機序を明らかにして、新規治療法・予防法を開発を目指す。また、大動脈瘤形成における免疫抑制性分子 CTLA-4 の役割を明らかにして、新規治療標的となり得るかどうかを検討する。

2 研究方法・研究内容

(1) UVB 照射による心筋梗塞後の心不全抑制効果・機序の検討

8 週齢雄の野生型マウスを用いて、左前下行枝を結紮し心筋梗塞モデルを作製する。予備実験の結果より、冠動脈結紮術 2 週間前より術直後まで、週に 2 回の比較的少ない線量 (3 kJ/m²) の UVB 照射を行うプロトコールに決定した。以下について検討を行う。

- ・ UVB 照射群と非照射群において心筋梗塞作製後の 4 週間における死亡率を比較する。
- ・ 心筋梗塞作製より 4 週間後に、心臓超音波を用いて心機能の評価を行う。
- ・ 心筋梗塞作製より 4 週間後に、心筋組織を摘出してホルマリン固定標本作製し、心臓内腔のサイズを計測する。
- ・ 心筋梗塞作製より 4 日後に、フローサイトメトリーを用いてリンパ組織における Treg を含めた免疫細胞の数や活性化状態の評価を行う。

・心筋梗塞作製より4日もしくは7日後に心筋病変部を摘出し、リアルタイムPCRを用いてTreg関連分子及び炎症関連分子の発現を評価する。

(2) 大動脈瘤形成におけるCTLA-4分子の役割の検討

動脈硬化モデルである*Apoe*^{-/-}マウス（アポリポ蛋白E遺伝子欠損マウス）に植え込みポンプを用いてアンジオテンシンIIの持続投与を行い、腹部大動脈瘤を形成させる。先行研究において、CTLA-4-Tgマウスと*Apoe*^{-/-}マウスを交配してCTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスを作製している(*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36:1141-1151, 2016)。以下について検討を行う。

・6週齢雄のCTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスおよび*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（1000ng/kg/min）の投与を行い、アンジオテンシンII投与開始から4週間後における大動脈瘤の発症率、死亡率について評価する。コントロール群には生理食塩水の投与を行う。

・アンジオテンシンII投与開始から4週間後に大動脈瘤病変を摘出してホルマリン固定標本を作製し、大動脈瘤の径や病変のグレードを評価する。

・大動脈瘤病変部のマクロファージ、T細胞などの免疫細胞については、病変部の凍結切片を作製して免疫染色により評価する。

・アンジオテンシンII投与開始から1週間後に大動脈瘤病変からRNAを抽出し、リアルタイムPCRを用いて炎症関連分子の発現を評価する。

・アンジオテンシンII投与開始から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数や活性化状態の評価を行う。

3 研究成果

(1) UVB照射による心筋梗塞後の心不全抑制効果・機序の検討

UVB照射群と非照射群にて心筋梗塞後の死亡率を比較して、UVB照射により心破裂や心不全発症による死亡が抑制されるかどうかについて検討を行ったが、UVB照射により有意な死亡率の低下を認め、特に心不全による死亡が減少した。心筋梗塞を作製した後に4週間後まで生存したマウスにおいて、心臓超音波による心機能の評価を行ったところ、UVB照射による心機能低下の抑制を認めた。また、心筋組織の組織学的検討では、UVB照射群では心臓内腔の拡大の抑制を認めた。

心筋梗塞後4日目にフローサイトメトリーを用いて免疫細胞への影響を評価したところ、UVB照射を行ったマウスの皮膚および心臓所属リンパ節においてTregの著明な増加を認め、特にケモカイン受容体CCR4を高発現するTregを増加させることを見出した。心筋梗塞病変部において、心筋梗塞後4日目にUVB照射群でTregに特異的な転写因子であるFoxp3の発現上昇を認め、心筋梗塞後7日目には抗炎症性のM2マクロファージに関連する分子の有意な発現上昇を認めた。ケモカイン受容体CCR4は、Tregの炎症部位への遊走に関わることが知られており、炎症部位においてTregはM2マクロファージの誘導に関わることが報告されている。梗塞心筋において、CCR4のリガンドであるCCL17/CCL22の有意な発現上昇を認め、UVBにより誘導されるTregはCCR4-CCL17/22依存性に障害心筋へ遊走し、M2マクロファージの誘導を介して炎症を沈静化することで心不全の病態を改善させると予想された。以上の研究成果を原著論文として報告した（*Photomedicine and Photobiology*. in press）。

(2)大動脈瘤形成における CTLA-4 分子の役割の検討

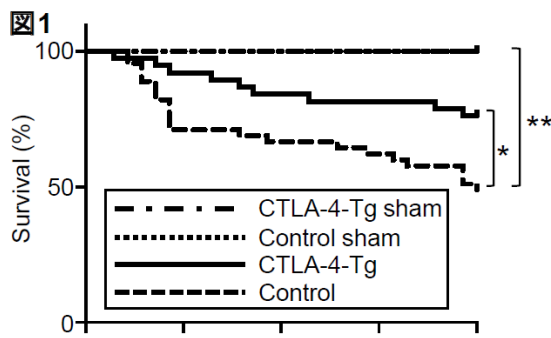


図1 CTLA-4の過剰発現による大動脈瘤による死亡率への影響。sham: 生理食塩水を投与したマウス。コントロール sham (n=5)、CTLA-4-Tg sham (n=5)、コントロール (n=40)、CTLA-4-Tg (n=35)。* $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

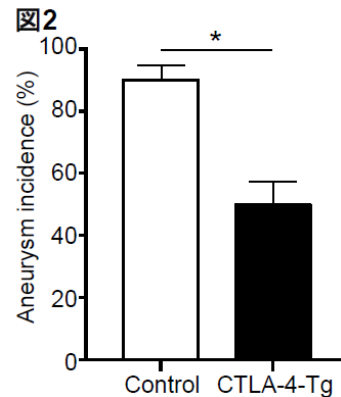


図2 CTLA-4の過剰発現による大動脈瘤の発生率への影響。コントロール (n=40)、CTLA-4-Tg (n=35)。* $P<0.05$ 。

CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスではコントロールの *Apoe*^{-/-}マウスと比較して大動脈瘤による死亡率 (図1)・発生率 (図2) とともに有意に低く、腹部大動脈瘤の最大径は低値であった。大動脈瘤病変の程度についてスコア化を行ったが、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスにおいてスコアは有意に低かった。両群間で体重や収縮期血圧に差は認めなかった。CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスにおいて、大動脈瘤病変部におけるマクロファージおよび T 細胞の浸潤の有意な抑制を認め、炎症関連分子の有意な発現低下を認めた。

アンジオテンシン II 投与開始から 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評価を行った。アンジオテンシン II 投与により、*Apoe*^{-/-}マウスの脾臓における CD44^{high}CD62L^{low} エフェクター T 細胞の有意な増加を認めたが、一方、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスの脾臓では、アンジオテンシン II 投与によりこの細胞集団の増加は

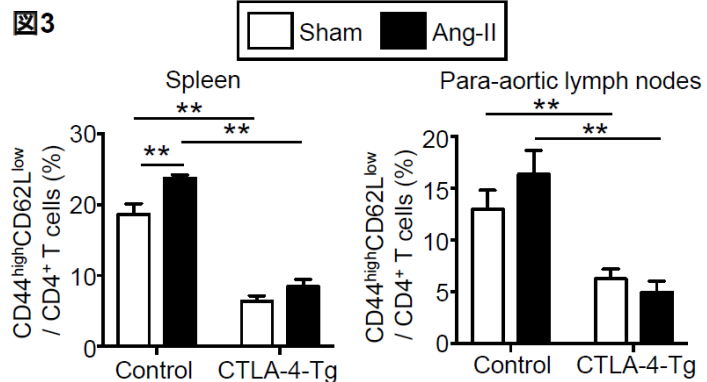


図3 アンジオテンシン II 投与および CTLA-4 過剰発現による、脾臓および傍大動脈リンパ節におけるエフェクター T 細胞の割合への影響。n=4~5。** $P<0.01$ 。

認めず、*Apoe*^{-/-}マウスと比べて有意な減少を認めた (図3)。いずれのマウスにおいても、アンジオテンシン II 投与により傍大動脈リンパ節における CD44^{high}CD62L^{low} エフェクター T 細胞の増加は認めなかったが、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスでは *Apoe*^{-/-}マウスと比較してこの細胞集団は有意に少なかった (図3)。さらに、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスおよび *Apoe*^{-/-}マウスの脾臓において、アンジオテンシン II 投与によりインターフェロン- γ およびインターロイキン-17 産生ヘルパー T 細胞の増加を認めたが、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスでは *Apoe*^{-/-}マウスと比較してこれらの細胞集団は有意に少なかった。以上のことから、CTLA-4 分子は T 細胞による炎症・免疫反応を制御することで、大動脈瘤形成の抑制に寄与すると考えられた。以上の研究成果を原著論文として報告した (*Sci Rep.* 9(1):8065, 2019)。

4 生活や産業への貢献および波及効果

UVB照射は、皮膚疾患治療の病状の改善に有効な治療法として確立されており、重篤な副作用は報告されていない。近年、動脈硬化性疾患や心筋梗塞後の心不全に対する治療は医療経済を圧迫しているが、UVB照射による治療は経済的負担の少ない治療法と期待される。今後、病態改善の詳細な機序や、病態改善に効果的なUVBの波長や照射条件を明らかにすることにより、動脈硬化性疾患への臨床応用の可能性がある。

大動脈瘤は病変が進行すれば、破裂による死亡を防ぐために外科的治療を行わざるを得ないが、高齢者では外科的治療の合併症のリスクが高く、非侵襲的な内科的治療法・予防法の開発が望まれている。CTLA-4 Ig (アバタセプト) は、CTLA-4と類似の作用を有し、関節リウマチの治療薬として既に臨床使用されているが、重篤な副作用の頻度は比較的低く、病態進展の抑制に有効であることが報告されている。本研究において、大動脈瘤の病態においてCTLA-4分子が保護的な役割を果たすことが明らかになり、CTLA-4 Igを用いた治療など、CTLA-4分子を標的とした新規治療法の開発につながることを期待される。

本研究において使用した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公益財団法人ひょうご科学技術協会に深く感謝申し上げます。