

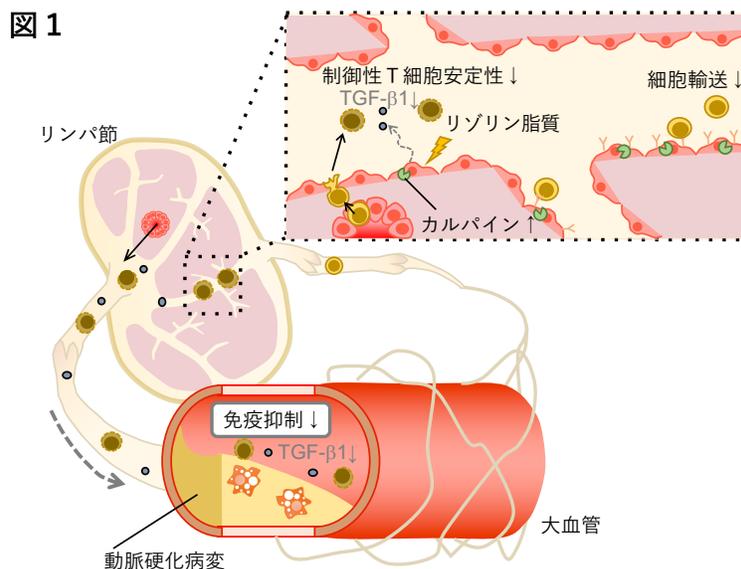
リンパ管壁のタンパク質分解が全身の免疫バランスに波及する—新たな血管保護の仕組みを解明—

ポイント

- ・脂質異常症の発症に伴い、リンパ管内皮細胞内のタンパク質分解系が亢進する。
- ・リンパ管内皮細胞内の過剰なタンパク質分解は、制御性T細胞の不安定化につながる。
- ・循環血中の制御性T細胞の不安定化は、動脈における炎症応答を促進し、これが動脈硬化症を増悪化する。

概要

昭和大学（東京都品川区／学長：久光正）の宮崎 拓郎 准教授（昭和大学医学部生化学講座）、宮崎 章 教授（同）を中心とした研究グループは、東京大学、愛知医科大学、ロンドン大学との共同研究により、細胞内プロテアーゼ「カルパイン」による過剰なタンパク質分解によりリンパ管に起因する免疫抑制が低下し、血管にて動脈硬化症が引き起こされる仕組みを世界で初めて明らかにしました（図1）。本研究成果は、2022年12月15日（米国東部標準時間）に米国心臓協会誌「Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology」のオンライン版に掲載されました。



背景

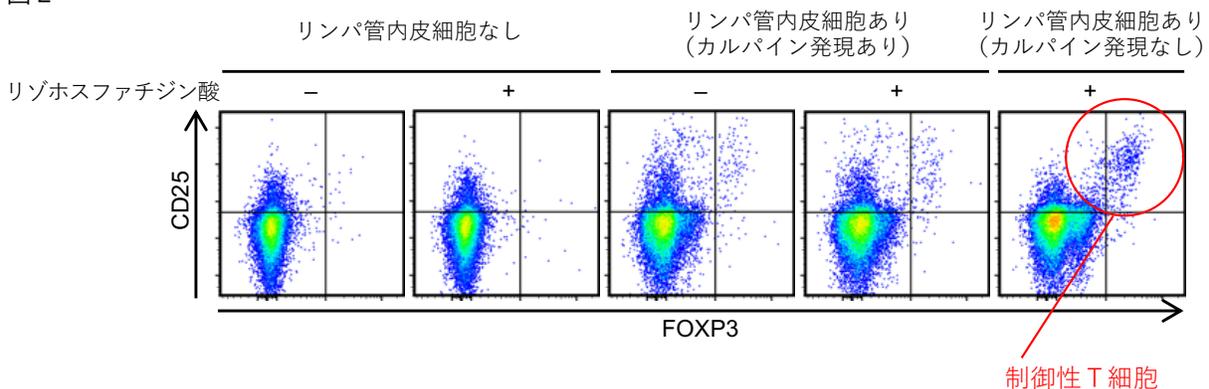
リンパ管は体液バランスの調節、免疫細胞の交通ならびに食物から摂取した脂質の運搬に重要な役割を担います。近年、脂質異常症^{*1}の存在下でリンパ管機能が低下し、これが主要な動脈において動脈硬化症の発症・進展に寄与するとの報告が相次いでいます⁽⁴⁾。実際、リンパ管機能不全は末梢から肝臓に至るコレステロール輸送（コレステロール逆転送）を低下させ、脂質異常症を増悪化します。また、動脈硬化病変外膜には微小リンパ管が存在し、これが病変内部のコレステロールの引き抜きやリンパ球の離脱に関わるとの報告もあります。一方、脂質異常症によりリンパ管自体にどのような機能異常が引き起こされるか、詳細は明らかになっていませんでした。

研究成果

リンパ管内皮細胞のカルパインはTGF- β 1を介する制御性T細胞安定化に拮抗する

リポミクス解析^{*2}により脂質異常症モデルマウスのリン脂質組成を網羅的に解析したところ、リンパ環境においてリゾホスファチジン酸^{*3}をはじめとする一部のリゾリン脂質の増加が検出されました。これらのリゾリン脂質を培養リンパ管内皮細胞に添加したところ、細胞内プロテアーゼ「カルパイン^{*4}」の活性化が検出されました。さらに、マウス脾臓より摘出したリンパ球とリンパ管内皮細胞を5日間共培養し、リンパ球の安定性を検討したところ、リゾホスファチジン酸の添加とカルパインの下方制御を同時に行った場合に制御性T細胞の安定性が最大になりました（図2）。リンパ管内皮細胞にて制御性T細胞安定化因子の発現を検討したところ、TGF- β 1^{*5}の発現が突出しており、これがリゾホスファチジン酸添加とカルパイン下方制御の同時処理によりさらに増加することが判明しました。上記の共培養系にTGF- β 1受容体阻害剤を添加したところ制御性T細胞保護作用が消失したため、同保護作用はリンパ管内皮細胞由来のTGF- β 1に起因すると考えられます。さらに検討をおこない、MEKK1^{*6}と呼ばれるTGF- β 1産生系路の一部がカルパインのターゲットとなることも判明しています。

図2



リンパ管内皮細胞におけるカルパインの制御異常は動脈硬化病変に促進的に働く

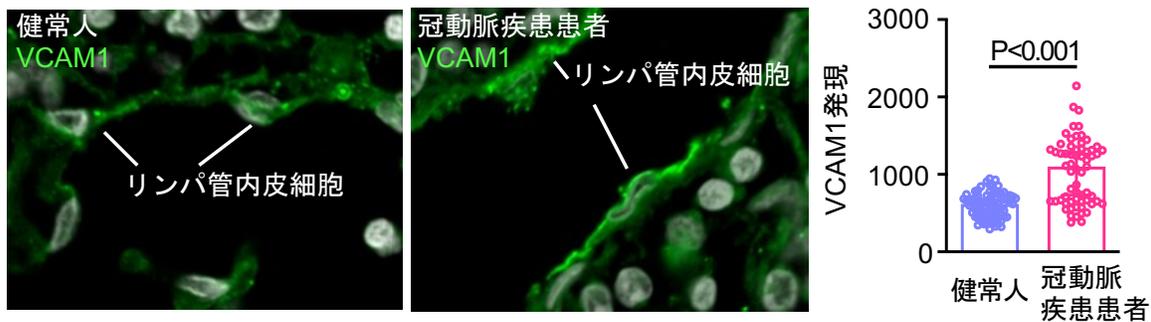
高コレステロール食を負荷した脂質異常症モデルマウスにおいて、リンパ管内皮細胞/骨髄細胞特異的にカルパインを下方制御したところ、大動脈における動脈硬化症を抑制し、TGF- β 1の血中濃度と血中制御性T細胞数の増加が認められました。一方、リポタンパク質コレステロールには影響が認められず、コレステロール逆転送系への寄与は殆どないと想定されました。動脈硬化病変を解析したところ、炎症促進性のM1型マクロファージがカルパイン欠損により大幅に減少しており、免疫抑制性のサイトカインであるIL-10やTGF- β 1の発現増加が検出されました。これらの現象は、骨髄細胞のカルパ

インのみを欠損させた骨髄キメラマウス⁷では再現されなかったことから、大部分リンパ管内皮細胞に起因すると考えられます。一方、TGF- β 1受容体阻害剤の投与は、リンパ管内皮細胞/骨髄細胞特異的カルパイン欠損マウスの抗動脈硬化作用や制御性T細胞安定化作用を消失させたため、これらの現象はTGF- β 1シグナルに起因すると考えられます。

リンパ管内皮細胞のカルパインは制御性T細胞の体内動態に影響する

脂質異常症の発症に伴い、マウス足裏から所属リンパ節へのリンパ球の輸送が低下することが明らかとなりました。この現象は、リンパ管内皮細胞/骨髄細胞特異的にカルパインを下方制御により解除されました。リンパ節にて遺伝子の網羅的発現解析をおこなったところ、カルパイン欠損により炎症性サイトカインIL-18および接着分子VCAM1の発現低下が検出されました。VCAM1はマウス脂質異常症モデルではリンパ管内皮細胞に強く発現しており、これは冠動脈疾患を有するヒトにおいても同様の傾向が認められました（図3）。培養リンパ管内皮細胞とリンパ球を共培養し、CCL19によって誘発されるケモタキシスを観察したところ、リンパ球の移動速度はリゾホスファチジン酸とIL-18を同時に添加することで減速しました。一方、この減速はリンパ管内皮細胞側のカルパインを下方制御することで解除されました。このリンパ球の減速はVCAM1の中和抗体でも解除されましたが、これはカルパインの下方制御と相加的・相乗的に作用しなかったため、VCAM1はカルパインのターゲット因子のひとつと想定されます。

図3



研究成果の意義

これまで脂質異常症によりリンパ管自体にどのような機能異常が引き起こされるか、詳細は明らかになっていませんでした。本研究により、脂質異常症におけるリンパ管内皮細胞の機能異常が末梢血中の制御性T細胞の安定化に拮抗し、少なくとも動脈の免疫抑制を低下させることが明らかとなりました。抗カルパイン薬はマウス動脈硬化症に有効であり⁽²⁾、ヒトでもアルツハイマー型認知症などでは創薬研究が実施されており⁽³⁾、今後上記薬剤が心血管代謝疾患にも応用されることが期待されます。

本研究への支援

本研究は日本学術振興会 科研費基盤 B (22H03520: 研究代表者 宮崎 拓郎)、科研費基盤 C (21K08585: 研究代表者 宮崎 章、19K08590: 研究代表者 宮崎 拓郎)、ブリストルマイヤーズスクイブ研究助成 (研究代表者 宮崎 拓郎)、personal chair grant from the British Heart Foundation (CH/11/3/29051: 大津 欣也)、鈴木謙三記念医科学応用研究財団研究助成 (研究代表者 宮崎 拓郎)、内藤記念科学振興財団研究助成 (研究代表者 宮崎 拓郎)、持田記念医学薬学振興財団研究助成 (研究代表者 宮崎 拓郎) の支援を受けて実施されました。

掲載論文について

【掲載誌】

米国心臓協会誌「Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology」

(DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.317781>)

(オンライン掲載 12 月 15 日 米国東部時間)

【掲載論文の英文表題と著者およびその和訳】

Hypercholesterolemic Dysregulation of Calpain in Lymphatic Endothelial Cells Interferes With Regulatory T-Cell Stability and Trafficking

Takuro Miyazaki*, Yoshitaka Taketomi, Takayoshi Higashi, Hirokazu Ohtaki, Takashi Takaki, Koji Ohnishi, Masahiro Hosonuma, Nozomu Kono, Risako Akasu, Shogo Haraguchi, Joo-Ri Kim-Kaneyama, Kinya Otsu, Hiroyuki Arai, Makoto Murakami, Akira Miyazaki (*Corresponding author)

脂質異常症に起因するリンパ管内皮細胞のカルパイン機能異常は制御性 T 細胞の安定性と体内動態に拮抗する

宮崎 拓郎*, 武富 芳隆, 東 鷹美, 大滝 博和, 高木 孝士, 大西 紘二, 細沼 雅弘, 河野 望, 赤須 里沙子, 原口 省吾, 金山 朱里, 大津 欣也, 新井 洋由, 村上 誠, 宮崎 章 (*Corresponding author)

注釈

- *1 生活習慣や遺伝的特徴が原因で、血中の高 LDL コレステロールや高中性脂肪または低 HDL コレステロールが持続する状態
- *2 質量分析計を用いた脂質の網羅的解析技法
- *3 細胞の増殖や遊走などに関わることが知られる多機能な生理活性リゾリン脂質の一種
- *4 主に細胞質に存在するカルシウム感受性プロテアーゼで、哺乳動物では 15 種類のアイソザイムが報告されているが、本研究ではカルパイン-1 およびカルパイン-2 を想定している
- *5 免疫細胞の維持だけでなく、組織の線維化など様々な生命現象に関わるサイトカインの一種
- *6 主に細胞の増殖や炎症系シグナルに関わるリン酸化酵素の一種
- *7 放射線により骨髄をブロックしたマウスにドナーから骨髄細胞を移植することで、骨髄細胞のみを遺伝子操作したマウス

参考文献

- (1) Miyazaki T, Miyazaki A. Hypercholesterolemia and Lymphatic Defects: The Chicken or the Egg? *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:701229. DOI: [10.3389/fcvm.2021.701229](https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.701229)
- (2) Miyazaki T et al. m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation.* 2011;124:2522-32. DOI: [10.1161/CIRCULATIONAHA.111.021675](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.021675)
- (3) Ono Y, Saido TC, Sorimachi H. Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15:854-876. DOI: [10.1038/nrd.2016.212](https://doi.org/10.1038/nrd.2016.212)