

解説

マクロファージに発現する嗅覚受容体と動脈硬化症

小檜山 康司

Key words: 血管マクロファージ, 嗅覚受容体, 動脈硬化症, インフラマソーム, IL-1

嗅覚は、匂いを知覚することで生存や繁殖、そして進化にも関与しており、極めて重要な五感の一つである。この匂いを感知するための中心的役割を担っているのが嗅覚受容体であり、ヒトでは約400種類、マウスでは1,000種類を超える嗅覚受容体を有し、1万種以上もの匂いを嗅ぎ分けることが可能とされている。嗅覚受容体は鼻腔内部の嗅上皮組織に存在する嗅神経細胞の繊毛を中心に発現しているため、鼻腔内に入ってきた匂い物質を感知することで、識別することができる。

一方で、嗅覚受容体の発現は嗅神経細胞に限局しておらず、精子や皮膚、そして腸管など様々な組織に発現していることが報告されており、匂いの知覚以外にも役割があることが示唆されてきた。本稿では、血管マクロファージに発現する異所的嗅覚受容体の動脈硬化症における役割を中心に解説する。

動脈硬化症は血管内で誘導される慢性炎症性疾患であり、動脈に血栓ができることで血液の供給が困難となり、心血管系疾患である虚血性心疾患や脳梗塞の原因となる¹⁾。リスクファクターとして、低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein: LDL) コレステロール、高血圧や糖尿病、喫煙、運動不足などが知られている。LDL コレステロール低下剤が対症療法薬として用いられ、心血管系疾患の発症率を著しく低下することに成功しているものの、炎症による心血管イベントの残

存リスク (residual inflammatory risk) は高いとされている²⁾。実際に、動脈硬化症関連疾患は世界における死因の原因第1位であり、2019年に虚血性心疾患で亡くなった人は死者全体の16%、脳梗塞は11%である。これらのことから、リスクファクターを標的とした対症療法に加え、炎症反応を標的とした新たな治療法ないし予防法の開発が急務であり、重要な課題である。

動脈硬化症は自己免疫疾患には含まれていないものの、免疫系の関与が数多く報告されており、特に炎症を標的とした薬剤の開発が進められている³⁾。炎症性サイトカインであるIL-1 β はコレステロールやカルシウム結晶により誘導され、動脈硬化症を促進することが以前より報告されていたことから、IL-1 β の中和抗体であるカナキヌマブを用いた臨床試験 (The Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study: CANTOS) が行われた。カナキヌマブは再発性心血管イベントを低下することに成功したことから、炎症を標的とした薬剤による一定の効果が示されたものの、強い抗炎症作用により致死的な感染症および敗血症が増えてしまった⁴⁾。

実験動物レベルでは動脈硬化症のワクチン開発研究も精力的に行われている。動脈硬化症モデルマウスを用いた研究においては、ワクチン抗原特異的な免疫寛容を誘導することで一定の効果が確認されているものの、多くの系で予防的にワクチ

Olfactory receptor and atherosclerosis

Kobiyama Kouji: 東京大学医科学研究所感染・免疫部門ワクチン科学分野 (〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1)

0370-9531/06/¥500/論文/JCOPY

ンを接種しており、動脈硬化症を治療するには至っていない³⁾。

I 動脈硬化症とマクロファージ

マクロファージの主な機能は貪食であり、自然免疫細胞として感染防御の第一線で働いている。マクロファージは多くの自然免疫受容体を細胞膜上、細胞質内、エンドソーム内に発現しており、様々な病原体の構成成分を認識することで自然免疫応答を誘導する。また、病原体を取り込んだマクロファージは病原体由来抗原を細胞表面に提示することで、獲得免疫応答を誘導し免疫記憶形成に貢献している⁵⁾。自然免疫受容体は病原体構成成分のみならず、自己由来の成分を認識することで、炎症反応を誘導することも報告されており、これが自己免疫疾患や非感染性の慢性炎症性疾患の発症に関与していることが示されている。

動脈硬化症発症においても、マクロファージの役割は非常に大きく、局所炎症性反応の維持に加えプラーク形成や血栓形成を促進している⁶⁾。血管内でマクロファージはリポタンパク質を取り込むことで泡沫細胞となり、これが血管内皮下に蓄積することで動脈硬化病変であるプラーク（病変部位）が形成される。これまで、マクロファージは炎症への関与から、炎症性の M1 マクロファージと抗炎症性の M2 マクロファージに分類されていた。M1 マクロファージは、自然免疫受容体による刺激により、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6 や TNF- α などを産生し、M2 マクロファージは IL-4 や IL-13 などのサイトカインにより、抗炎症性の IL-1 受容体アンタゴニストや IL-10 などを産生することが知られている。動脈硬化性プラークにおいては両方のマクロファージの存在が確認されているものの、M1 のほうが優位であるとの報告がされており、プラーク内はより炎症性が維持されていると考えられている。更に、ヒトの動脈硬化性プラーク内において、炎症性のマクロファージは破裂しやすい不安定プラーク内で多く観察され、M2 様のマクロファージは安定プラーク内で多く観察されている⁷⁾。しかしながら、M1・M2 の分類は過度に単純化されており、マクロファージの持つ多様な機能を説明する

ことは困難であった。近年、組織に特異的に存在するマクロファージが相次いで報告されており、それらは組織常在マクロファージ (tissue-resident macrophage) と呼ばれている。それぞれの組織において表現型および機能も多様であり、組織環境の多様性を反映していると考えられている。

血管内やプラーク内に存在するマクロファージに関しても、シングルセル RNA シークエンスや CyTOF (cytometry by time of flight) といった技術を用いることで、その多様性が示されている⁸⁾。これらのマクロファージの詳細な機能を明らかにすることで、マクロファージによる炎症を標的とした心血管系疾患の残存リスクを減らすための治療薬の開発へとつながると考えられ、精力的な研究が行われている。

II 嗅覚受容体

嗅覚受容体遺伝子は、1991 年にコロンビア大学の Linda Buck と Richard Axel によってラット嗅上皮組織から初めてクローニングされた、7 回膜貫通型の G タンパク質共役受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) である⁹⁾。1998 年には、嗅覚受容体が実際に匂い成分である揮発性の化学物質を認識していることが嗅電図 (electro-olfactogram) を用いて初めて示され¹⁰⁾、この嗅覚受容体の発見と、匂い認識の分子機構の解明に対して 2004 年にノーベル生理学・医学賞が授与されている。

多くの脊椎動物のゲノムのうち、少なくとも 4% もの割合が嗅覚受容体に費やされていることから、嗅覚系の重要性は明らかである。ヒトでは嗅覚受容体の総遺伝子数に比べ、機能的な嗅覚受容体の割合は 40% 未満と他の真核生物と比較して低く、他の五感を使用したコミュニケーションを行ってきたことが関係していると考えられている。

多くの脊椎動物にとって非常に重要な嗅覚および嗅覚受容体であるが、他の組織や細胞に“異所的 (ectopic)”に発現していることが相次いで報告され、近年その機能が明らかにされてきた。最初の異所的嗅覚受容体は 1992 年にイヌの精子に発現していることが確認され、受精のための走化性

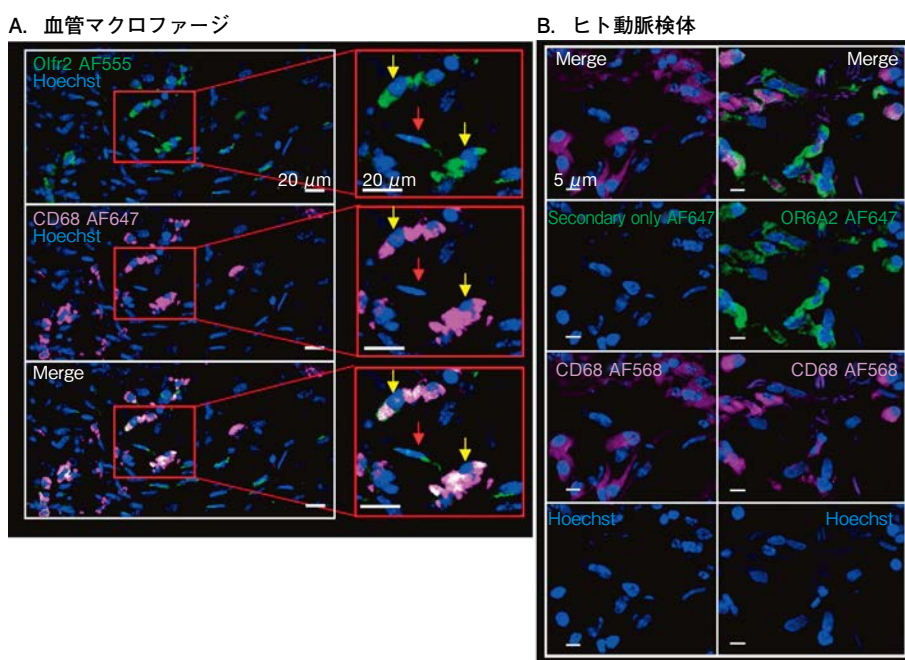


図 1 血管マクロファージに発現する異所性嗅覚受容体 (文献 19 より改変して引用)

- A. マウス血管マクロファージを用いて免疫染色を行った。マクロファージ (CD68 陽性) と嗅覚受容体である *Olfr2* が共局在していることが確認された。
- B. ヒト動脈検体を用いて免疫染色を行い、マクロファージ (CD68 陽性) に嗅覚受容体 (*OR6A2*) が共局在していることが確認された。

に参与しているのではないかと考えられていた¹¹⁾。2003 年には実際にヒト嗅覚受容体とブルゲオナル (*bourgeonal*) が走化性へ寄与している報告がされたが¹²⁾、嗅覚受容体ではなくイオンチャネルが重要であることが示された¹³⁾。1999 年には赤血球にも発現していることが明らかになり¹⁴⁾、更に白血球にも発現していることが示された¹⁵⁾。ほかにも、脂肪組織、気道、心臓、腎臓、肝臓、肺、前立腺、皮膚、筋肉に加え、心臓や舌など数多くの組織への発現が報告されている。これらの様々な臓器に発現している嗅覚受容体の機能探索研究により、現在は創傷治療、脱毛、肥満やがんの治療ないし診断への応用が試みられている¹⁶⁾。

Ⅲ 異所的嗅覚受容体の動脈硬化症への役割

2013 年にマクロファージに幾つもの嗅覚受容体が定常状態で発現していることがマイクロアレイによって明らかにされ、8つの嗅覚受容体は自然免疫受容体である Toll-like receptor (TLR) 4 の

リガンドであるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide; LPS) と IFN- γ との共刺激により、マクロファージ上での発現が上昇することが示された¹⁷⁾。更に、動脈硬化症モデルマウスである *Apoe* 欠損マウスにおいて、動脈に存在するマクロファージに嗅覚受容体遺伝子および下流のシグナル伝達分子が多く発現していることが見いだされた¹⁸⁾。そのなかで、筆者らは olfactory receptor 2 (*Olfr2*) に着目し、動脈硬化症への関与を明らかにすることを試みた¹⁹⁾。

まず、筆者らは高脂肪・高コレステロール飼料を与えたマウスから大動脈を回収し *Olfr2* の発現レベルを確認したところ、2週間後には著しく上昇していることを確認した。更に、共焦点顕微鏡とフローサイトメーターを用いて *Olfr2* のタンパク質レベルでの発現を確認したところ、約 30% の血管マクロファージが *Olfr2* を発現していることが明らかになった (図 1A)。

血管内皮細胞や平滑筋細胞においても、*Olfr2* の発現が確認されたものの、発現レベルに関して

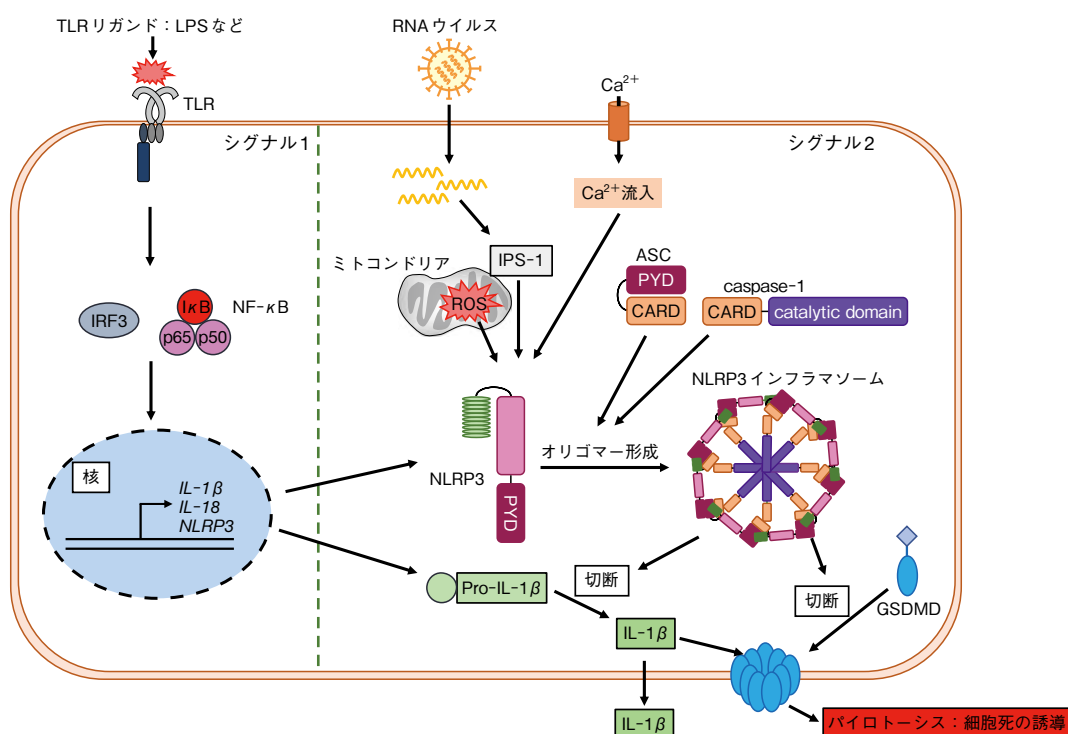


図 2 NLRP3 インフラマソームの活性化機序

インフラマソーム活性化のためには2つのシグナルが必要であり、シグナル1はTLRなどのリガンドによってIL-1 β やNLRP3の発現が誘導される。シグナル2であるNLRP3の活性化はRNAウイルス、Caイオンの流入、ミトコンドリアのROSの活性化など、様々な刺激によって誘導される。シグナル2の活性化により、NLRP3はASC、caspase-1と複合体となることでNLRP3インフラマソームを形成する。これにより、活性化されたcaspase-1がIL-1 β の前駆体を切断することでIL-1 β が活性型となり、細胞外に放出され炎症反応を誘導する。また、caspase-1はGSDMDを切断し、細胞膜に穴を形成しプログラム細胞死を誘導する。

PYD: pyrin domain, CARD: caspase recruitment domain, IPS-1: IFN- β promoter stimulator, ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, GSDMD: gasdermin D, NLRP3: NLR pyrin domain containing 3

はマクロファージに比べて低かった。ヒトにおける嗅覚受容体の発現を明らかにするために、マウス *Olf2* のヒト相同遺伝子である *OR6A2* に着目した。頸動脈内膜切除検体 (Biobank of Karolinska Endarterectomy; BiKE) データセット²⁰⁾ を用いて解析を行ったところ、*OR6A2* や下流のシグナル伝達分子が発現していることが確認され、マクロファージの含有量に比例して発現が高いことが示された。ヒト動脈検体においても、*OR6A2* がタンパク質レベルで血管マクロファージに発現していることが示され (図 1B)、ヒト単球から分化させたマクロファージにおいても *OR6A2* とシグナル伝達分子の発現が確認されたことから、ヒトにおいても異所的嗅覚受容体としての機能を有している可能性が示唆された。

次に、マクロファージにおける *Olf2* と *OR6A2* に関して発現制御や機能性の詳細を明らかにするために、*Olf2* のリガンドであるオクタナールとTLR4のリガンドであるLPSを用いたところ、LPS刺激に応じて *Olf2* の発現レベルの上昇が確認され、LPSにオクタナールを加えることでより *Olf2* の発現レベルが上昇していることが確認された。更にマクロファージに発現している *Olf2* の機能解析を行ったところ、LPSにオクタナールを加えることで、cAMPや細胞内カルシウムイオンが上昇していることが示され、オクタナールが *Olf2* に結合することで下流のシグナルが活性化されていることが示唆された。そしてこの活性化は *Olf2* を欠損させることで完全に消失することから、オクタナールが *Olf2* のアゴニストとして

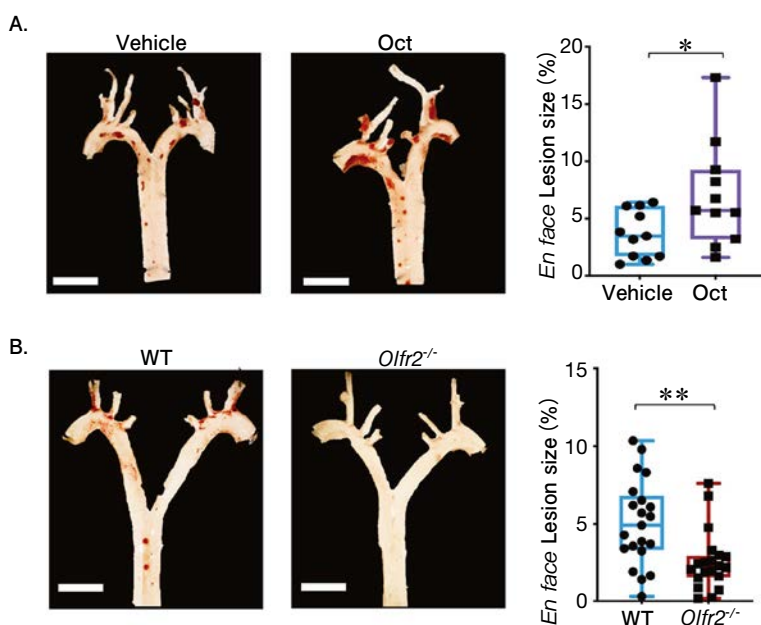


図 3 嗅覚受容体による動脈硬化症への関与 (文献 19 より改変して引用)

- A. 動脈硬化症モデルマウスである *ApoE* 欠損マウスに高脂肪・高コレステロール食を与え、4 週間後に 3 日ごとに嗅覚受容体のリガンドであるオクタナール (Oct) を接種した。高脂肪・高コレステロール食を与えてから、8 週間後にマウスの大動脈を回収し、ズダン IV で染色を行い、動脈硬化症病変部位を解析した。
- B. 動脈硬化症モデルマウスである *Ldlr* 欠損マウスに野生型 (WT) または *Olfr2* を欠損している骨髄を移植し、その後高コレステロール食を 12 週間与え、マウスの大動脈を回収し、ズダン IV で染色を行い、動脈硬化症病変部位を解析した。
- スケールバー：5 mm, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

働いていることが示唆された。

興味深いことに、LPS にオクタナールを加えると、炎症性サイトカインである IL-1 α や IL-1 β の産生が強く誘導されることが確認された。自然免疫の分野では IL-1 β はインフラマソームによって、IL-1 α は細胞死によって産生が制御されていることが示されている²¹⁾。インフラマソームは複数のタンパク質から成る複合体であり、タンパク質分解酵素である caspase-1 を活性化することで、IL-1 β や IL-18 の前駆体を切断し、これらのサイトカインを活性型へと成熟させる。更にインフラマソームはパイロトーシスと呼ばれる炎症性のプログラム細胞死を誘導する (図 2)。

このインフラマソームの活性化には 2 つのシグナルが別々に誘導されることが重要だとされている。1 つは TLR などを介した IL-1 β などのサイトカインの発現誘導であり、もう 1 つは NLRP3 などの自然免疫受容体を介したインフラマソームの形成である。2 つめのシグナルを活性化させる

分子は数多く知られており、ウイルス RNA やナノ粒子、そして活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) も NLRP3 を介してインフラマソーム形成の誘導、活性化させることが知られている²²⁾。実際に、オクタナールによりどのように IL-1 産生が誘導されているか検討したところ、マクロファージを LPS + オクタナールで処理することで、ROS の産生が向上し、また細胞死も誘導されていることが確認された。NLRP3 の欠損マクロファージでは、細胞死の誘導が抑制されると共に IL-1 の産生も抑制されたことから、オクタナールはインフラマソームを介した IL-1 産生を誘導していることが示された。また、*Olfr2* のアンタゴニストであるシトラールを用いることでも IL-1 の産生が抑制されたことから、オクタナールは *Olfr2* に対してアゴニストとして働き、ROS の産生を誘導することで NLRP3 インフラマソームを活性化していることが示唆された。

オクタナールは生体内で脂質過酸化反応によっ

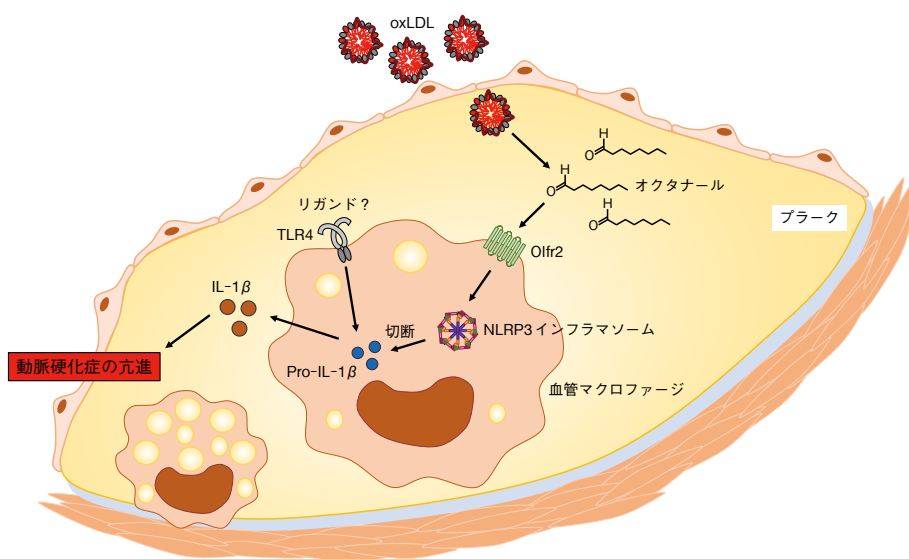


図 4 オクタナールによる嗅覚受容体を介した動脈硬化症誘導

酸化 LDL などに含まれているオクタナールがプラーク内などで増えることで、血管マクロファージに発現している Olf2 に結合しインフラマソームを活性化する。一方で、TLR などの刺激によって IL-1 β の前駆体が誘導され、活性化されたインフラマソームによって切断させることで活性型となり、強い炎症反応を誘導する。その結果、動脈硬化症が増悪・亢進する。

て産生され、実際に酸化 LDL (oxidized LDL ; oxLDL) にも含まれていることが既に報告されている²³⁾。マウスにおけるオクタナールの量を調べたところ、動脈硬化症モデルマウスにおいて通常の餌に比べて高脂肪・高コレステロール食を与えたマウスでは、血清中のオクタナールの濃度が上昇していることが確認された。更に筆者らは、オクタナールは主としてオレイン酸が由来であることを証明し、マウスの動脈でオクタナールが産生されることを確認した。ヒト血漿中にもマウスと同程度のオクタナールが含まれていることを見だし、オクタナールの濃度が総コレステロールやトリグリセリド、そして非 HDL コレステロールと正に相関していることが確認されたことから、オクタナールが脂質異常や動脈硬化症にも関連していることが示唆された。

最後にオクタナールの動脈硬化症への直接的関与を明らかにするために、動脈硬化症モデルマウスである *Apoe* 欠損マウス、*Ldlr* 欠損マウスを用いて検証を行った。動脈硬化症モデルマウスにオクタナールを 3 日ごとに腹腔内投与したところ、マウスの血漿中でオクタナールの濃度が上昇して

いることが確認され、更に TNF や IL-1 β などの炎症性サイトカインが誘導されていることが確認された。これらの反応に付随して、マウス大動脈における動脈硬化症病変部位が著しく増加していることを見いだした(図 3A)。一方で、血中コレステロールなどには変化はみられなかったため、オクタナールによる炎症反応の誘導により動脈硬化症が亢進していることが示唆された。

次に *Olf2* 欠損マウス由来骨髓細胞を移植した動脈硬化症モデルマウスを用いたところ、動脈硬化症病変が著しく減少していることが確認された(図 3B)。Olf2 のアンタゴニストであるシトラールを投与した際には、動脈硬化症病変が著しく減少したことから、血管マクロファージに発現している Olf2 はインフラマソームの活性化を介して炎症を制御し、動脈硬化症の発症および増悪に関与していることが示唆された(図 4)。

おわりに

嗅覚受容体は匂いの感知を担っている一方で、異所的嗅覚受容体の同定により、様々な組織で様々な機能を有していることが示されてきた。ま

た、マクロファージや他の免疫細胞も一見同じ細胞集団に見えても不均一であることが示され、異なる機能を有していることが明らかにされてきた。筆者らも嗅覚受容体である Olfr2 が血管マクロファージの約 30% に発現しており、炎症反応に起因する動脈硬化症に重要な役割を担っていることを見いだした。また、Olfr2 のアゴニストであるオクタナールがオレイン酸から血管内で産生され、炎症性サイトカインである IL-1 β 産生を誘導していることも見いだした。しかしながら、IL-1 β 産生にはオクタナールのみでは不十分であり、TLR などを介した自然免疫応答の活性化が必須である。このことは、オクタナールによる Olfr2 活性化以外にも、動脈硬化症関連炎症には他の因子による活性化が関与していることを示している。更に血管内でどのようにしてオクタナールが産生されているのか、詳細は明らかになっていない。また、Olfr2 以外にも様々な嗅覚受容体が血管マクロファージに発現していることから、他の嗅覚受容体が動脈硬化症に関与していることも考えられる。

一方で、Olfr2 の欠損やアンタゴニストを用いることで脂質への影響なしに動脈硬化症病変部位の減少が確認されたことから、炎症に起因する動脈硬化症に対して嗅覚受容体を標的とした新たな薬剤開発へとつながると考えられる。抗 IL-1 β 抗体のように全身性ではなく特異的に炎症反応を調整することで、過度な免疫抑制が抑えられると考えられ、今後の開発が期待される。

●文 献

- 1) Libby P, Ridker PM, Maseri A : *Circulation*. **105** : 1135-1143, 2002
- 2) Fan W, Philip S, Granowitz C et al : *Diabetes Care*. **42** : 2307-2314, 2019
- 3) Kobiyama K, Saigusa R, Ley K : *Curr Opin Immunol*. **59** : 15-24, 2019
- 4) Ridker PM, Everett BM, Thuren T et al : *N Engl J Med*. **377** : 1119-1131, 2017
- 5) Locati M, Curtale G, Mantovani A : *Annu Rev Pathol*. **15** : 123-147, 2020
- 6) Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA : *Nat Rev Immunol*. **13** : 709-721, 2013
- 7) Barrett TJ : *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **40** : 20-33, 2020
- 8) Winkels H, Ehinger E, Vassallo M et al : *Circ Res*. **122** : 1675-1688, 2018
- 9) Buck L, Axel R : *Cell*. **65** : 175-187, 1991
- 10) Zhao H, Ivic L, Otaki JM et al : *Science*. **279** : 237-242, 1998
- 11) Parmentier M, Libert F, Schurmans S et al : *Nature*. **355** : 453-455, 1992
- 12) Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A et al : *Science*. **299** : 2054-2058, 2003
- 13) Brenker C, Goodwin N, Weyand I et al : *EMBO J*. **31** : 1654-1665, 2012
- 14) Feingold EA, Penny LA, Nienhuis AW, Forget BG : *Genomics*. **61** : 15-23, 1999
- 15) Malki A, Fiedler J, Fricke K et al : *J Leukoc Biol*. **97** : 533-545, 2015
- 16) Lee SJ, Depoortere I, Hatt H : *Nat Rev Drug Discov*. **18** : 116-138, 2019
- 17) Li JJ, Tay HL, Plank M et al : *PLoS One*. **8** : e80148, 2013
- 18) McArdle S, Buscher K, Ghosheh Y et al : *Circ Res*. **125** : 1038-1051, 2019
- 19) Orecchioni M, Kobiyama K, Winkels H et al : *Science*. **375** : 214-221, 2022
- 20) Folkersen L, Persson J, Ekstrand J et al : *Mol Med*. **18** : 669-675, 2012
- 21) Chan AH, Schroder K : *J Exp Med*. **217** : e20190314, 2020
- 22) Man SM, Kanneganti TD : *Immunol Rev*. **265** : 6-21, 2015
- 23) Esterbauer H, Wäg G, Puhl H : *Br Med Bull*. **49** : 566-576, 1993

1) Libby P, Ridker PM, Maseri A : *Circulation*. **105** :