

Jan Nilsson, professor (jan.nilsson@medforsk.mas.lu.se)

Gunilla Nordin Fredrikson, docent; båda vid institutionen för medicin, kirurgi och ortopedi, Universitetssjukhuset MAS, Malmö, Lunds universitet

Vaccin kan skydda mot ateroskleros

Oxiderat LDL spelar huvudrollen i immunsvaret

|| Vår syn på sjukdomsmekanismerna vid utveckling av ateroskleros har förändrats mycket under senare år. Från att tidigare ha ansetts som huvudsakligen framkallad av passiv fettinlagring och muskelcellsproliferation betraktas ateroskleros idag som en degenerativ inflammatorisk sjukdom som involverar många olika delar av immunsystemet. Därför har ett allt större intresse kommit att riktas mot immunsystemet som ett möjligt mål för prevention och behandling av hjärt-kärlsjukdom och stroke.

Man kan tänka sig två olika sätt att påverka immunsystemet vid ateroskleros: immunsuppressiva läkemedel och immunisering.

Immunsuppressiva läkemedel och ateroskleros

De immunsuppressiva läkemedel som idag finns tillgängliga är

- antiinflammatoriska kortikosteroider,
- cytotoxiska läkemedel som azatioprin och cyklofosfamid,
- substanser isolerade från svampar och bakterier som hämmar T-cellsaktivering, t ex ciklosporin och rapamycin.

Immunsuppressiva läkemedel används i första hand för att förhindra akut avstötning av organ efter transplantation. Eftersom den mycket aggressiva ateroskleros som utvecklas i det transplanterade organets artärer är huvudsaklig orsak till sen avstötning, skulle det vara en fördel om dessa läkemedel också hämmade utvecklingen av transplantationsateroskleros.

Det finns också mycket som talar för att T-celler och andra delar av immunsystemet spelar en central roll i utvecklingen av transplantationsateroskleros. Djurstudier har visat att ciklosporin och rapamycin kan ha en hämmande effekt. Dock tyder det mesta på att den cytotoxiska effekten av immunsuppressiva läkemedel orsakar kärlskador, som snarare bidrar till utvecklingen av transplantationsateroskleros [1].

De flesta immunsuppressiva läkemedel har också försvagande effekter på viktiga kardiovaskulära riskfaktorer som LDL (low density lipoproteins)-kolesterol, blodtryck och diabetes. Nya studier har visat att stentar som behandlas med rapamycin kan minska risken för utveckling av restenos. Man har också i djurförsök funnit att kortikosteroider motverkar utvecklingen av ateroskleros.

De biverkningar som är förknippade med immunsuppressiva läkemedel gör dock att dessa medel generellt sett är

Sammanfattat



I takt med att förståelsen av den viktiga roll som inflammation och immunitet spelar vid utveckling av ateroskleros har ökat har immunsystemet blivit allt mer intressant som mål för prevention och behandling av ateroskleros.

Ansamling och oxidering av LDL-partiklar i kärlväggen ger upphov till inflammation, fibros och bildning av aterosklerotiska plack. Samtidigt aktiveras autoimmuna reaktioner mot oxiderat LDL, vilket tycks ha skyddande effekt.

De strukturer som dessa skyddande immunreaktioner riktas mot har nu börjat identifieras, vilket kan göra det möjligt att utveckla ett aterosklerosvaccin.

Se även medicinsk kommentar i detta nummer.

mindre lämpade för en mer allmän användning i prevention och behandling av ateroskleros [2].

Immunisering

Vacciner är förmodligen det viktigaste bidraget till ökad folkhälsa under det senaste århundradet och har på ett dramatiskt sätt minskat dödligheten i infektionssjukdomar. Under senare år har även försök gjorts att behandla icke-infektiösa, kroniska sjukdomar med hjälp av immunisering. Längst har man kommit inom cancerområdet där man studerat effekten av vacciner som baseras på tumörceller isolerade från patienter. Tumörcellernas immunitet har sedan ökat genom tillägg av adjuvans, som förstärker det immunologiska svaret.

De mycket goda resultat som uppnåtts vid passiv immunisering (antikroppsbehandling) mot tumörnekrosfaktor (TNF) vid reumatoid artrit visar på att immunisering också kan vara

en mycket effektiv behandling vid kroniskt inflammatoriska sjukdomar.

Det börjar nu även komma studier som talar för att immunisering skulle kunna användas för att motverka utveckling av ateroskleros. Det kan till och med vara så att ateroskleros lämpar sig särskilt väl för att behandlas med immunisering, eftersom sjukdomen involverar både immunsvaret som bidrar till plackutveckling, vilket skulle kunna hämmas med hjälp av toleransinduktion, och skyddande immunsvaret, som selektivt skulle kunna aktiveras.

Immunreaktioner vid ateroskleros

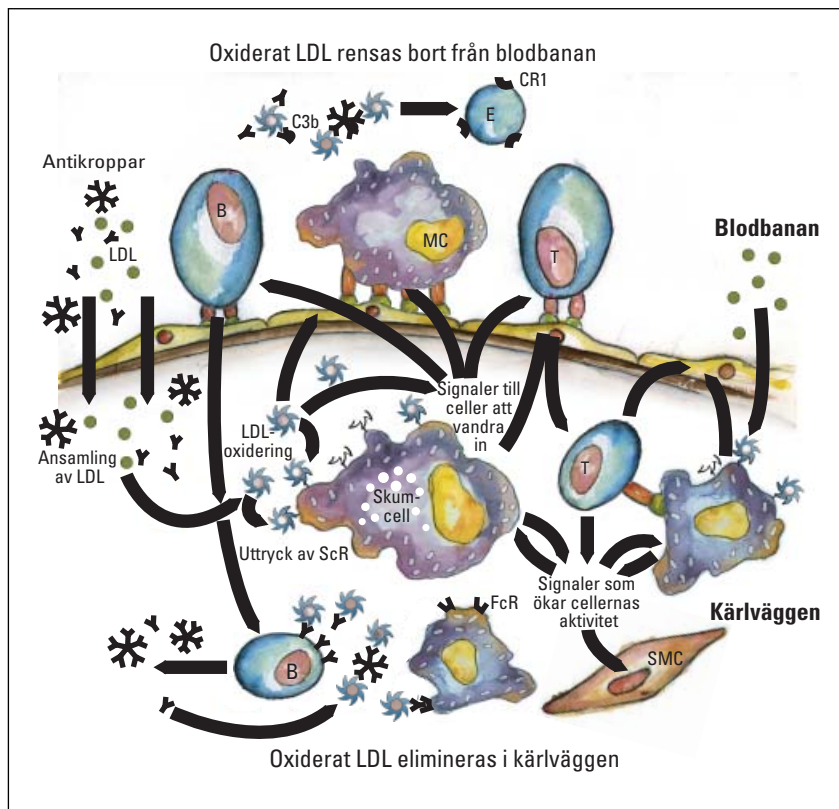
Ansamling, aggregering och oxidation av LDL i artärväggen spelar en central roll i utvecklingen av ateroskleros [3]. Oxidation av fosfolipider i LDL leder till frisättning av mycket reaktiva nedbrytningsprodukter som kan stimulera uttryck av adhesionsmolekyler på endotelceller. Dessa adhesionsmolekyler binder monocyter och T-celler som infiltrerar artärväggens intima (Figur 1). Monocyter omvandlas till makrofager som uttrycker s k scavenger- eller renhållningsreceptorer, som är en viktig del av den ospecifika medfödda immuniteten och som känner igen ett antal s k pathogen-associated molecular patterns (PAMP). PAMP finns på oxiderade lipoproteiner, apoptotiska celler och vissa mikroorganismer [4].

Oxiderat LDL som binds till dessa renhållningsreceptorer tas upp i makrofager, vilka omvandlas till s k skumceller. De oxiderade LDL-partiklarna bryts ned i makrofager, som sedan presenterar antigener från oxiderat LDL på cellytan tillsammans med MHC-klass II-molekyler. Dessa antigener känns igen av specifika CD4-positiva T-celler, vilka delar sig och utsöndrar cytokiner (Figur 1). Studier gjorda på T-celler som isolerats från humana aterosklerotiska plack har visat att en mycket stor del av dessa celler är specifika just för strukturer i oxiderat LDL [5].

Det finns två olika huvudtyper av CD4-positiva T-celler: T_H1 -celler som frisätter $INF-\gamma$ och T_H2 -celler som frisätter IL-4, IL-5 och IL-10. T_H1 - och T_H2 -celler har till stor del motsatta roller där T_H1 -celler bidrar till utveckling av inflammation, medan T_H2 -celler har en mer antiinflammatorisk effekt och stimulerar bildning av antikroppar. T_H1 - och T_H2 -celler kan också hämma varandra. Studier av cytokinuttryck i aterosklerotiska plack talar för att det är T_H1 -cellerna som dominerar, och försöksdjur som saknar T_H1 -specifika cytokiner, t ex $INF-\gamma$, får mindre ateroskleros.

Studier som utförts av Göran Hanssons forskargrupp på Karolinska institutet i Stockholm visar att möss som helt saknar funktionella T- och B-celler (apo E⁰/SCID-möss [severe combined immunodeficiency]) utvecklar betydligt mindre ateroskleros. Detta talar för att den sammanlagda effekten av adaptiv immunitet bidrar till aterosklerosutvecklingen.

Lite överraskande har andra studier från samma grupp vi-



Figur 1. Möjliga mekanismer för eliminering av oxiderat LDL (low density lipoproteins). Cirkulerande immunkomplex bestående av oxiderat LDL och antikroppar aktiverar komplement och därmed en bindning av fragment från komplementfaktor 3 (C3b) till komplexet. Detta kan resultera i eliminering av immunkomplexen från cirkulationen genom att de binds till komplementreceptor 1 (CR1) på erythrocyter (E). LDL-partiklar som tagit sig in i kärlväggens intima fastnar och oxideras till en högre grad. Därmed genereras proinflammatoriska lipider, som leder till uttryck av celladhesionsmolekyler på endotelcellerna och sekretion av kemokiner. Dessa faktorer ger upphov till adhesion och infiltration av monocyter (MC), T-lymfocyter (T) och eventuellt även B-lymfocyter (B) i intiman. Monocyter differentierar till makrofager, uppregrerar renhållnings(scavenger)-receptorer (ScR), internaliserar oxiderat LDL och blir till skumceller. Detta leder till presentation av peptidfragment från den oxiderade LDL-partikeln för antigenspecifika T-lymfocyter och produktion av proinflammatoriska cytokiner, såsom $INF-\gamma$, $TNF-\alpha$ och IL-1. Dessa stimulerar i sin tur endotelceller att uttrycka adhesionsmolekyler och glatta muskelceller (SMC) att vandra in i intiman. Aktiverade T-lymfocyter kan också stimulera B-lymfocyter att producera specifika antikroppar. Immunkomplex innehållande dessa antikroppar och oxiderat LDL binder till antikropsreceptorer (FcR) på makrofagen och kan därmed elimineras från kärlväggen.

sat att splenektomi, dvs borttagande av en stor del av de lagrade T- och B-cellerna, leder till mycket aggressiv aterosklerosutveckling. Det adaptiva immunsvaret har således en mycket komplex roll i utvecklingen av ateroskleros. När man i de senare studierna återförde mjältens B-celler skyddades djuren mot den ökade aterosklerosutvecklingen. Dessa resultat skulle kunna tala för att T_H2 -celler och det humoral immunsvaret skyddar mot aterosklerosutveckling, medan T_H1 -celler har motsatt effekt [6, 7].

Ytterligare ett sätt att studera betydelsen av det specifika immunsvaret är att immunisera försöksdjur med oxiderat LDL. Detta har visat sig resultera i ett partiellt skydd mot utveckling av ateroskleros, vilket pekar på den intressanta möjligheten att man skulle kunna framställa ett vaccin mot ateroskleros baserat på strukturer i oxiderat LDL [8, 9]. För att kunna arbeta vidare mot detta mål har det dock krävts att man först identifierar de strukturer i oxiderat LDL som ger upphov till specifika immunsvaret.

Denna kunskap börjar nu bli tillgänglig, vilket gör det

ANNONS

ANNONS

ANNONS

ANNONS

möjligt att fortsätta arbetet mot utvecklingen av ett oxiderat LDL-baserat vaccin.

Immunreaktioner mot peptidantigener och fosfolipider

Det är vanligast att adaptiva immunsvar är riktade mot peptidantigener. Endogena peptidsekvenser kan kännas igen av immunsystemet om de är tillräckligt förändrade, t ex genom bindning av reaktiva aldehyder. LDL innehåller bara ett permanent bundet protein, apo B-100. Detta 4 500 aminosyror långa protein ligger inbakat i LDL-partikelns fosfolipidmembran och innehåller bl a bindningsstället för LDL-receptorn. Då LDL oxideras bryts apo B-100 ned i små peptidfragment. Malondialdehyd (MDA) och andra aldehyder frisatta från oxiderade fosfolipider och kolesterolestrar binds till fria aminogrunder i peptidfragmenten. Det är troligt att dessa utgör en mycket stor del av de epitoper i oxiderat LDL som kännas igen av immunsystemet.

För att karakterisera immunsvaret mot aldehydmodifierade apo B-100-peptidfragment hos människa utvecklade vi ett bibliotek av 20 aminosyror långa polypeptider som motsvarade hela aminosyrasekvensen i humant apo B-100. Dessa peptider MDA-modifierades och fästes i botten på mikrotiterplattor för att ta fram ett motsvarande bibliotek av ELISA. Efter inkubering med plasma som tagits från friska individer respektive från patienter med manifesterad hjärt-kärlsjukdom identifierades bindning av antikroppar till varje MDA-modifierad peptidsekvens med hjälp av antihumana kanin-IgG och -IgM. Förekomst av antikroppar mot över 100 olika MDA-modifierade peptidsekvenser i apo B-100 kunde på detta sätt identifieras i human plasma [10]. Bindning av antikroppar till respektive MDA-peptidsekvens kunde hämmas genom tillsats av oxiderat LDL men inte av nativt LDL, vilket talar för att antigenerna var specifika för oxiderade LDL-partiklar. De flesta antikroppar som band var av IgM-typ, medan IgG-antikroppar mer sällan förekom.

Vi kunde sedan i kliniska studier visa att det fanns samband mellan höga nivåer av IgM mot MDA-apo B-100-peptidsekvenser och låga nivåer av oxiderat LDL i plasma [10]. Detta talar för att antikropparna verkar genom att avlägsna oxiderat LDL från cirkulationen (Figur 1). Det fanns också signifikanta samband mellan nivåerna av dessa antikroppar och graden av ateroskleros i karotisartären, mätt som intima-mediatjocklek med ultraljud. Detta skulle kunna tala för ett samband mellan sjukdomens utbredningsgrad och hur mycket antikroppar som produceras.

Vi undersökte sedan om immunsvaret mot dessa MDA-modifierade apo B-100-peptidfragment har samma skyddande effekt mot ateroskleros som det har mot intakt oxiderat LDL. Vi immuniserade därför aterosklerosbenägna apo E-knock-outmöss med några av de peptidfragment som ger upphov till antikroppsproduktion i människa. Immunisering med flera av dessa peptidfragment medförde hämning av aterosklerosutvecklingen med upp till 70 procent och ledde även till stabilisering av kvarvarande plack [11]. Den här effekten var kopplad till en markant ökning av specifika IgG-antikroppar men hade bara en marginell effekt på motsvarande IgM-nivåer.

Resultaten talar för att immunreaktionen mot aldehydmodifierade peptidfragment i apo B-100 spelar en viktig roll i sjukdomsprocessen och att en selektiv aktivering av dessa skulle kunna användas för att skydda mot utveckling av ateroskleros. Det är också intressant att notera att det vanligast förekommande immunsvaret mot dessa strukturer hos människa är IgM-medierat, medan djurförsök visar på att en aktivering av ett IgG-medierat immunsvar skulle vara mer skyddande. Det kan vara så att ett IgM-medierat immunsvar mot oxiderat LDL är mindre effektivt och att det skulle vara bättre om det även hos människa kunde styras mot IgG.

Ett annat sätt att identifiera de antigener som finns i oxiderat LDL har använts av Palinski och medarbetare, som tagit fram en panel med B-cellshybridom från apo E-knock-outmöss [12]. Vissa av dessa hybridomkloner frisatte antikroppar som kände igen strukturer i oxiderat LDL. Samtliga antikroppar var av IgM-typ och riktade mot oxiderade fosfolipider innehållande en fosforylkolingroup. Antikropparna bands också till en identisk epitop på ytan av apoptotiska celler och blockerade bindning av oxiderat LDL till renhållningsreceptorer [13]. Senare studier har visat att de gener som kodar för dessa antikroppars bindningsställen är identiska med de gener som kodar för s k T 15-anti-fosforylkolinantikroppar. Dessa skyddar mot flera vanliga infektioner, t ex med *Streptococcus pneumoniae* [14]. Upptäckten gjorde det möjligt att studera den funktionella betydelsen av immunreaktioner mot oxiderade fosfolipider genom att immunisera LDL-receptor-knock-outmöss med denna bakterie [15]. Behandlingen resulterade i en kraftig ökning av mängden oxiderat LDL-specifikt IgM i plasma och en hämning av aterosklerosutvecklingen. I motsats till immunsvaret mot MDA-modifierade apo B-100-antigener gav immunisering med fosfolipidantigener inte upphov till någon ökning av IgG, vilket talar för att ett adaptivt T-cellsberedande immunsvar inte aktiverats.

Vad finns det för risker med immunisering?

Vacciner har generellt sett mycket få biverkningar. Dock är erfarenheterna av att använda vacciner i behandling av icke-infektiösa sjukdomar ännu mycket begränsade. En fas 2-studie av ett amyloid-beta-peptidbaserat vaccin mot Alzheimers sjukdom fick för något år sedan avbrytas sedan 5 procent av de behandlade patienterna utvecklat tecken på inflammatorisk reaktion i CNS. Man tror att denna kan ha orsakats av det T_H1-aktiverade adjuvans som användes i studien.

Immunreaktioner mot strukturer i oxiderat LDL finns redan hos de flesta människor och borde i sig inte orsaka komplikationer. Det går dock inte att utesluta att immunsvar som initieras genom aktiv immunisering kan ha andra effekter. En möjlighet är t ex bildning av immunkomplex. Förekomst av antikroppar mot oxiderade fosfolipider (s k antifosfolipid-antikroppssyndrom) är kopplad till hög trombosbenägenhet. Huruvida immunisering mot epitoper i oxiderat LDL påverkar trombosrisken måste därför också studeras.

Det finns skäl att hoppas på att den ökade förståelsen av immunsystemets betydelse för aterosklerosutveckling leder till utveckling av nya behandlingsformer för hjärt-kärlsjukdom. Påvisandet av förekomst av en skyddande autoimmunitet mot strukturer i oxiderat LDL öppnar för möjligheten att selektivt förstärka dessa genom immunisering med relevanta antigener. Skulle det visa sig möjligt att på detta sätt utveckla ett aterosklerosvaccin är det dock troligt att det bara skulle ge ett partiellt skydd mot ateroskleros och fungera som ett komplement till redan befintliga terapier, t ex behandling med statiner.

*

Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Jan Nilsson har forskningsanslag från Bioinvent International AB.

Referenser

1. Ruygrok PN, Muller DW, Serruys PW. Rapamycin in cardiovascular medicine. *Intern Med J* 2003;33:103-9.
2. Miller LW. Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *Am J Transplant* 2002;2:807-18.
3. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 2001;104:503-16.
4. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002;111:927-30.
5. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize ox-

- dized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3893-7.
6. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 2002;8:1218-26.
 7. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91:281-91.
 8. Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:821-5.
 9. Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Calara F, Yano J, Cercek B, et al. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1074-9.
 10. Fredrikson GN, Hedblad B, Berglund G, Alm R, Ares M, Cercek B, et al. Identification of immune responses against aldehyde-modified peptide sequences in apoB associated with cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:872-8.
 11. Fredrikson GN, Söderberg I, Lindholm M, Dimayuga P, Chyu KY, Shah PK, et al. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:879-84.
 12. Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK, et al. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *J Clin Invest* 1996;98:800-14.
 13. Chang MK, Bergmark C, Laurila A, Horkko S, Han KH, Friedman P, et al. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6353-8.
 14. Shaw PX, Horkko S, Chang MK, Curtiss LK, Palinski W, Silverman GJ, et al. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity [see comments]. *J Clin Invest* 2000;105:1731-40.
 15. Binder CJ, Horkko S, Dewan A, Chang MK, Kieu EP, Goodyear CS, et al. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med* 2003;9:736-43.



= artikeln är referentgranskad