

Angiotensin (1-7) のヒト単球を介した抗炎症作用と、 Th1 細胞分化抑制効果

花城 里依¹⁾ 川邊 清一^{2)*} 池田 憲²⁾

¹⁾東邦大学大学院研究科内科学講座神経内科分野 (大森)

²⁾東邦大学医学部医学科内科学講座神経内科分野 (大森)

要約

背景: Angiotensin (Ang) (1-7) は新たに見出された生理活性物質で抗炎症作用があることが報告されているがヒト免疫細胞活性に関する研究はほとんどなされていない。今回我々は peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を用いて Ang (1-7) が免疫細胞に及ぼす影響を検証した。

方法: PBMC から単球, T 細胞を分離し Ang (1-7) 受容体 MAS mRNA の発現量を比較した。単球のみ, 単球とナイーブ Th (nTh) 細胞を共培養し Ang (1-7) により Th 細胞の割合やサイトカイン分泌が変化するかを検討した。

結果: MAS mRNA は単球で著明に発現していた。Ang (1-7) によって単球からの炎症性サイトカイン分泌が抑制され nTh 細胞から Th1 細胞への分化も抑制された。

結語: Ang (1-7) は単球を介する抗炎症作用を有することが考えられた。

東邦医学会誌 65(2): 88-97, 2018

索引用語: angiotensin (1-7), MAS, ヘルパー T 細胞, 単球, サイトカイン

緒 言

Renin-angiotensin-aldosterone (RAA) 系は血圧や体液中の電解質バランス, 交感神経の活性などの調整を行っている内分泌系の一つであり高血圧や動脈硬化, 脳卒中や心筋梗塞といった心血管イベントの発症に密接な関連が知られている^{1,2)}。RAA 系が活性化されると renin や angiotensin 変換酵素 (ACE) 1 などによって angiotensinogen が angiotensin (Ang) II に置換される。Ang II はその受容体である Ang II type 1 (AT1) 受容体を介した血管収縮能や血圧上昇能などを有する^{1,2)}。AT1 受容体拮抗薬 (ARB) は高血圧の治療薬として使用されており, また ARB は動脈硬化の進行を抑制する働きがあることが知られている³⁾。AT1 受容体に関連する高血圧性臓器障害は血行力学的な要素だけではなく免疫や炎症系が関与してい

ることが考えられている。Ang II 投与による高血圧モデルマウスを用いた実験では T 細胞欠損や免疫抑制剤を投与することで動脈硬化や高血圧性臓器障害が軽減することが報告されている^{4,5)}。AT1 受容体は直接的に免疫細胞に働きかけて experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) や全身性エリテマトーデスなどにおいて炎症を活性化させる作用があることも報告されている⁶⁻⁹⁾。さらに Ang II はマクロファージなど免疫細胞にも AT1 受容体を介して炎症性サイトカインの産生を亢進させる作用が知られている¹⁰⁾。

近年になって Ang II 以外の RAA 系の新たな活性物質として Ang (1-7) が発見され, その受容体である MAS はさまざまな臓器に発現していることがわかってきている⁷⁾。Ang (1-7) は ACE2 により Ang II から生成され, 血管平滑筋に作用して血管を拡張したり, 活性酸素産生の

1, 2) 〒143-8541 東京都大田区大森西 6-11-1

*Corresponding Author: tel: 03-3762-4151 内線77715

e-mail: kawabekiyokazu@med.toho-u.ac.jp

DOI: 10.14994/tohoigaku.2017-009

受付: 2017年11月6日, 受理: 2018年3月12日

東邦医学会雑誌 第65巻第2号, 2018年6月1日

ISSN 0040-8670, CODEN: TOIZAG

抑制, 血管内皮細胞の保護や動脈硬化の進行を抑制したりするなどといった Ang II とは対照的な機能を呈することが報告されている¹¹⁻¹³⁾. Ang (1-7) の受容体 MAS は7回膜貫通型受容体で皮膚癌の発癌遺伝子として発見され, 中枢神経や心血管系など様々な臓器に発現している¹⁴⁾. MAS 欠損マウスでは血圧が上昇し血管内皮障害が生じ¹⁵⁾, 心筋においてはカルシウムイオンの取り込みとも関連がある¹⁶⁾. MAS は NO やプロスタグランジンの分泌を促し血管内皮の機能を修復することも知られている¹⁷⁻¹⁹⁾. また, マウスの動脈硬化に伴う炎症を抑制し動脈硬化の進行を抑制させる²⁰⁾.

動脈硬化に関連した血管の炎症に対する Ang (1-7) の効果についてはこれまで報告があるが⁹⁻¹⁰⁾, 免疫細胞に対して Ang (1-7) が及ぼす影響についての報告は少ない^{21, 22)}. Ang II がマクロファージやマイクログリア細胞に作用して炎症を引き起こすことは知られているのに対して^{10, 23-26)} Ang (1-7) はマウスのマクロファージからの炎症性サイトカインの産生を抑制させ²²⁾, MAS をノックアウトしたマウスで EAE を発症させると臨床症状が悪化することなど²¹⁾ 少数の報告しかない. また, MAS ノックアウトマウスを用いた検討では Ang (1-7) はマクロファージを介してヘルパー T (Th) 細胞に影響が示唆されている²¹⁾. 前記のとおり RAA 系が脳卒中など心血管イベントと関連する免疫反応に関連があり, Ang II が直接的に免疫細胞に影響していることは知られているが, ヒトの免疫細胞に対する Ang (1-7) の直接的な効果については知られていない.

今回の研究ではヒト免疫細胞に対する Ang (1-7) の効果を調べるとともに, 単球を介してヘルパー T 細胞分化に対する影響があるのかについて培養細胞を用いて実験を行った.

材料と方法

1. 細胞と培地

市販のヒト peripheral blood mononuclear cell (PBMC) (Wako, 東京) を使用した. 培養液は RPMI1640 に fetal bovine serum (FBS) 10%, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 100 g/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin (全て Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を添加したものを使用した. 凍結されている PBMC は 37°C のホットバスで素早く溶解, 培養液で 2 回洗浄した後, 血球計算盤で生細胞数を計算し, 10^6 /mL になるように再度, 培養液に懸濁してそれぞれの実験に使用した. 5つのロットの PBMC を使用し PBMC 中の各細胞の割合を調べるために APC-抗 CD3 抗体, PerCP-抗 CD4 抗体, APC-Vio770-抗 CD8 抗体, FITC-抗 CD14 抗体, PE-Vio770-抗 CD19 抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) で染色し LSR

Fortessa X-20 Cell Analyzer (BD Pharmingen, USA) で測定した. それぞれの細胞の PBMC 中の割合はリンパ球 77.7-82.0%, 単球 7.4-16.3%, T 細胞 (CD3⁺細胞) 20.8-59.4%, B 細胞 (CD19⁺細胞) 5-20.1%, CD4⁺T 細胞 13-38%, CD8⁺T 細胞 5-10.6% (Fig. 1).

2. PBMC から単球, span T 細胞, ナイーブ ヘルパー T 細胞 (nTh 細胞) の分離

PBMC から単球分離するために 2×10^6 /mL の PBMC を 24well プレートに 1 mL ずつ播種, 2 時間 37°C, 5%CO₂ 下で培養した. その後, プレートに接着していない細胞を回収し, T 細胞もしくは nTh 細胞の分離に使用した. プレートは培養液で 2 回洗浄し, 接着している細胞を単球として実験に使用した. 単球の純度を調べるために抗 CD14-FITC 抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) で染色し LSR Fortessa X-20 Cell Analyzer (BD Pharmingen, USA) で測定した. 95% 以上が CD14⁺であることを確認した (Fig. 2A). T 細胞の分離にはヒト Pan T Cell アイソレーションキット, nTh 細胞の分離にはナイーブヒト CD4⁺T Cell アイソレーションキット II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を使用した. 分離方法はそれぞれのキットに付属したプロトコールに準じて行った. T 細胞の純度を調べるために抗 CD2-PE 抗体と抗 CD3-FITC 抗体, nTh 細胞の純度を調べるために抗 CD4-APC 抗体と抗 CD45RA-FITC 抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) で染色し LSR Fortessa X-20 Cell Analyzer (BD Pharmingen, USA) で測定した. Pan T cell アイソレーションキットで分離した細胞は 98% 以上が CD2⁺, CD4⁺, ナイーブヒト CD4⁺T cell アイソレーションキット II で分離した細胞は 98% 以上が CD45RA⁺, CD4⁺であることを確認して実験に使用した (Fig. 2B, 2C).

3. 細胞培養

分離した単球 0.5×10^5 /mL を 24 well プレートに 1 mL ずつ撒き lipopolysaccharide (LPS) を 1 μg/mL を加え, Ang (1-7) (共に Sigma-Aldrich, USA) の効果を見るために 5 nmol/mL を加えた細胞と加えなかった細胞でそれぞれ 7 日間培養した.

単球と nTh 細胞との共培養は, 単球を 0.4×10^5 /mL を 0.5 mL, nTh 細胞 2×10^5 /mL を 0.5 mL 撒き, 抗 CD3, 抗 CD8 抗体でコートされたビーズ 0.5×10^5 と LPS (1 μg/mL) を加え, Ang (1-7) (5 nmol/mL) を添加した細胞と添加しなかった細胞それぞれ 7 日間培養した. それぞれの培養細胞は 37°C, 5%CO₂ の条件下で培養を行った.

4. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

単球と pan T 細胞における MAS の mRNA 発現を比較するために qPCR を用いた. それぞれ 10^6 個の細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) を用いて total RNA を

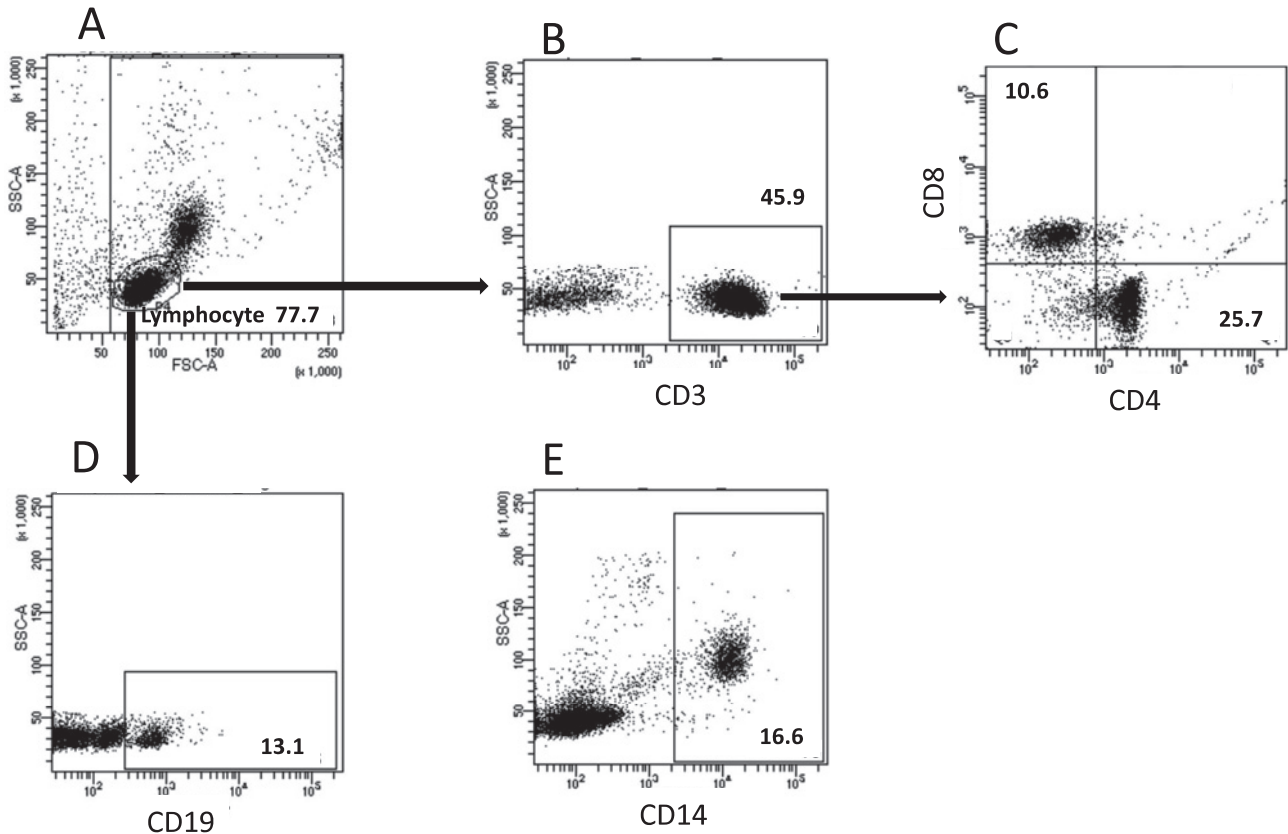


Fig. 1 Population of immune cells in peripheral blood mononuclear cell (PBMC). PBMCs were stained with APC-anti-CD3 antibody, PerCP-anti-CD4 antibody, APC-Vio770-anti-CD8 antibody, FITC-anti-CD14 antibody, PE-Vio770-anti-CD19 antibody. (A) These cells were further separated from debris via forward scatter (FSC) and side scatter (SSC). (B) CD3 had been used to define T cells. (C) The T cells were separated in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. (D) CD19 had been used to define B cells. (E) CD14 was selected to identify monocytes. CD, cluster of differentiation.

抽出した。200 ng の total RNA から High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA) と GeneAmpPCR system9700 (Applied Biosystems, USA) (25°C 10 分, 37°C 120 分, 85°C 5 分) を用いて cDNA を合成し, qPCR の template に用いた。qPCR は Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA) を使用し, MAS の検出には以下の primer を使用した (5'-GCCTGTCAGTCCTTTACCCC-3', 5'-CACAGAAGGGCACAGACCAA-3')。Normalization するための housekeeping gene としては β 2-microglobulin (B2MG) を用いることとし, primer は 5'-CTCCGTGGGCTTAGCTGTG-3', 5'-TTTGAGTACGCTGGATAGCCT-3' (以上ユーロフィンジェノミクス, 東京)。Template となる cDNA を 3 μ L (合成した cDNA の 3/100 量), 50 μ M の primer を 0.4 mL ずつ, Fast SYBR Green Master Mix 10 μ L, RNase free water とで反応溶液量を 20 μ L にし 7500Fast リアルタイム PCR システム (ABI, USA) で反応を行った (95°C 20 秒, 95°C 3 秒 60°C 30 秒を 40 サイクル)。PCR 産物の特異性を評価するために溶解曲線での解析を行った。データは 2^{-C_T}

法を用いて定量した。

5. Th1, Th2, Th17 細胞の測定

LPS と Ang (1-7) 刺激下で単球と nTh 細胞を 7 日間, 共培養した。nTh 細胞から Th1, Th2, Th17 細胞へ分化した細胞の割合を測定した。培養後の培養液中に 50 ng/mL phorbol myristate acetate (LC Laboratories, USA), 1 μ g/mL ionomycin (Enzo life sciences, USA) と GolgiStop (BD Pharmingen, USA) を加え 5 時間再刺激した。再刺激後の細胞は Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit を用いて染色した。染色はキットに付属するプロトコールに準じて行った。LSR Fortessa X-20 Cell Analyzer (BD Pharmingen, USA) で測定した。

6. 培養上清中のサイトカイン濃度の測定

培養上清中のインターロイキン(IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF (tumor necrosis factor), IFN (interferon) γ を測定するために Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 cytokine kit と Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Pharmingen, USA) を使用した。測

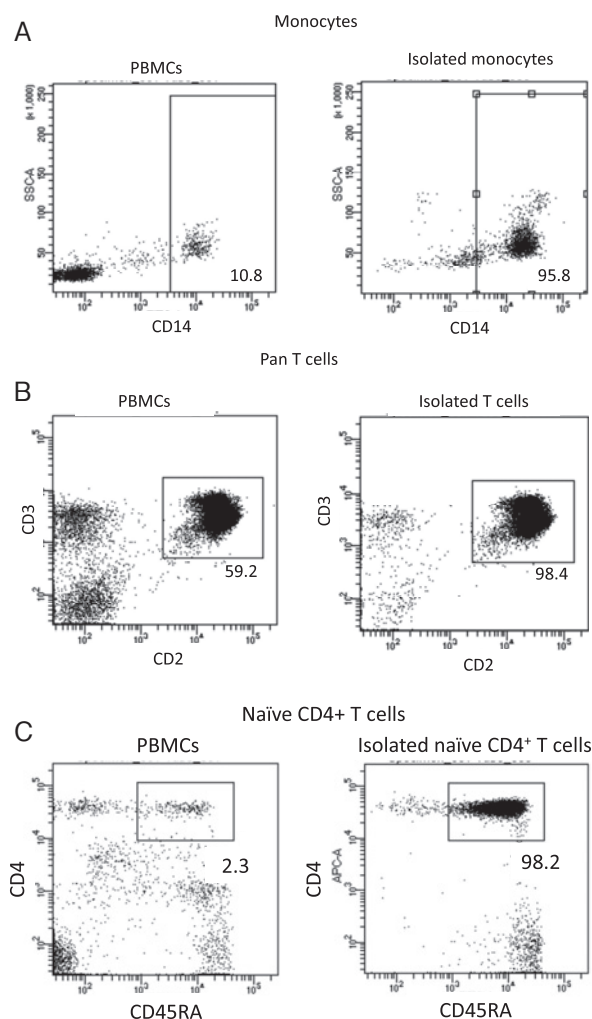


Fig. 2 Isolation of monocytes, T cells, and naïve helper T cells from peripheral blood mononuclear cell (PBMC). (A) The PBMCs and isolated monocytes (CD14⁺) were stained with anti-CD14-FITC antibody and analyzed by flow cytometry. (B) The PBMCs and isolated pan T cells (CD2⁺CD3⁺) were stained with anti-CD3-FITC antibody and anti-CD2-PE antibody and analyzed by flow cytometry. (C) The PBMCs and isolated naïve CD4⁺T cells (CD4⁺CD45RO⁺) were stained with anti-CD4-APC antibody and anti-CD45RO-FITC antibody and analyzed by flow cytometry.

定はキットに付属するプロトコールに準じて、LSR Fortessa X-20 Cell Analyzer (BD Pharmingen, USA) を用いて行い、データの解析はFCAP Array version 3.0 (BD Pharmingen, USA) で行った。

7. 統計学的手法

各実験は5回ずつ行った。統計学的な検定はDunnett's testを用い、p値が0.05以下で有意差ありとした。データは平均(mean)と平均からの標準誤差(SEM)を表示した。統計解析にはEasy R Ver. 1.36 (自治医科大学付属埼

玉医療センター, 埼玉)を使用した。

結果

1. 単球のMAS発現

過去の動物実験などの報告から単球やマクロファージにMASが発現していることが知られている^{21,22}。ヒトのPBMC, 単球, pan T細胞におけるMAS mRNA発現量を比較するためにqPCRを行った。単球に特異的にMASが高発現している一方, pan T細胞には発現がほとんどみられなかった (Fig. 3)。

2. Ang (1-7) は単球からの炎症性サイトカイン分泌を抑制する

LPS (1 µg/mL)で刺激をし, 24時間培養を行った。Ang (1-7) (5 nmol/mL)を添加した細胞と添加していない細胞上清中の炎症性サイトカインの濃度をCytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kitで測定し比較した。IL-6, IL-8, IL-12p70の培養液中の濃度はAng (1-7)を添加することで有意に低下した (Fig. 4)。

3. Ang (1-7) は単球を介してnTh細胞からTh1細胞への分化を抑制する

単球とnTh細胞を共培養しLPS (1 µg/mL)で刺激, Ang (1-7) (5 nmol/mL)を加えたものと加えなかったもので7日間培養した。培養後にTh1 (INFγ⁺細胞), Th2 (IL-4⁺細胞), Th17 (IL-17A⁺細胞)のCD4⁺細胞中の割合を比較した。Ang (1-7)を加えることでTh1細胞 (INFγ⁺細胞)の割合が減少していた (Fig. 5A)。5回の実験の結果を統計解析するとAng (1-7)を添加した細胞でTh1細胞の割合が有意に低下していた (Fig. 5B)。他の細胞の割合には変化がみられなかった。培養液中のサイトカインの濃度ではINFγ, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12p70の濃度がLPSのみ添加したものに比べてLPSにAng (1-7)を加えて培養した培養液で有意に減少していた (Fig. 5C)。

考察

今回の研究ではヒトPBMCやPBMCから分離した単球, nTh細胞などを用いてAng (1-7)の抗炎症作用について実験を行った。Ang (1-7)の受容体であるMASは単球に発現しており, LPS刺激によって産生される単球からのサイトカインのうちIL-6, IL-8, IL-12p70の産生がAng (1-7)によって抑制された。IL-12p70はnTh細胞からTh1細胞への分化に必要なサイトカインであり単球とnTh細胞を共培養した実験ではnTh細胞からTh1細胞への分化が抑えられていた。

これまでに, 動物実験による検証で, マクロファージや樹状細胞にMASが発現しており, Ang (1-7)-MAS経路には炎症を抑制する働きがあることが示唆されている^{21,22,27}。マウスのマクロファージを用いた研究ではLPS

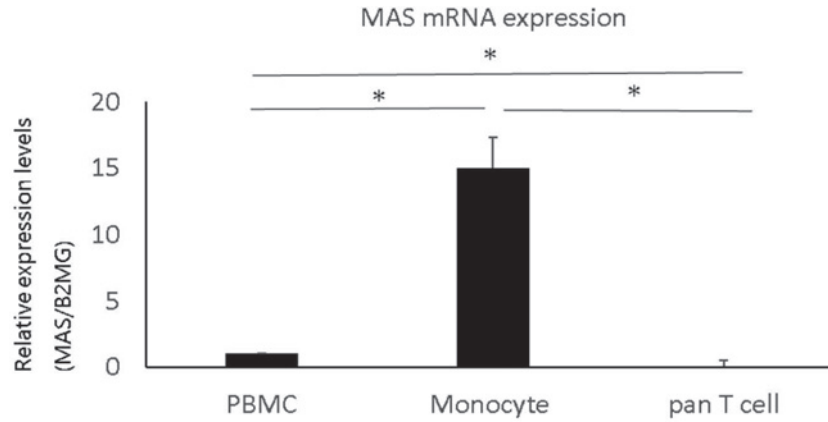


Fig. 3 MAS mRNA was dominantly expressed in monocytes. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC), monocyte, and T cell mRNA levels of MAS were measured by RT-qPCR. B2MG: β 2-microglobulin ($n=5$, $*p<0.05$, mean \pm SEM).

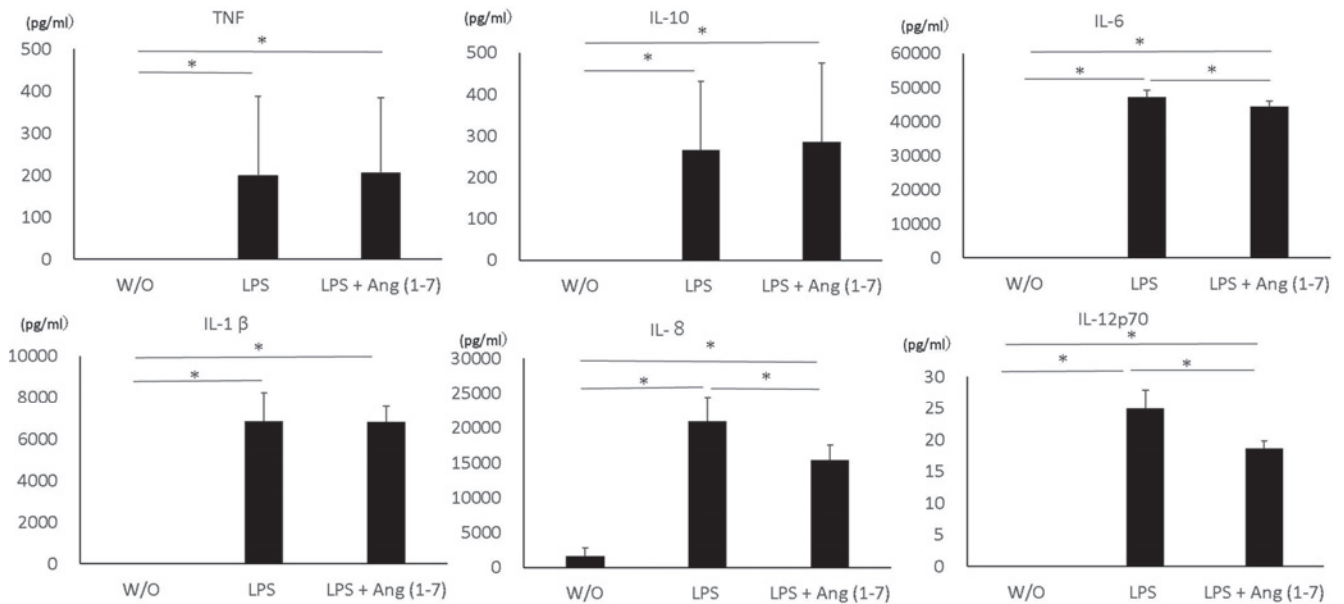


Fig. 4 Angiotensin (Ang) (1-7) repressed monocyte secretion of several inflammatory cytokines. Monocytes were stimulated with lipopolysaccharides (LPS) and Ang (1-7) for 7days. Cytokine concentrations in the culture media were measured by cytometric bead array. W/O, without LPS and Ang (1-7); CD, cluster of differentiation; IL, interleukin ($n=5$, $*p<0.05$, mean \pm SEM).

の刺激によりマクロファージでのMASの発現が増加し、LPS刺激後6時間でピークになることが報告されている²²⁾。MASノックアウトマウスにEAEを発症させた実験では病巣のマクロファージが増加し、症状が重症化する²¹⁾。今回の研究ではMASのmRNAがT細胞に比べて単球に有意に発現していることがわかった。LPSなどによる刺激でMAS mRNA発現量が変化するかについては検討してはいないが、Ang (1-7)の抗炎症作用は単球のMASを介していると考えられた。

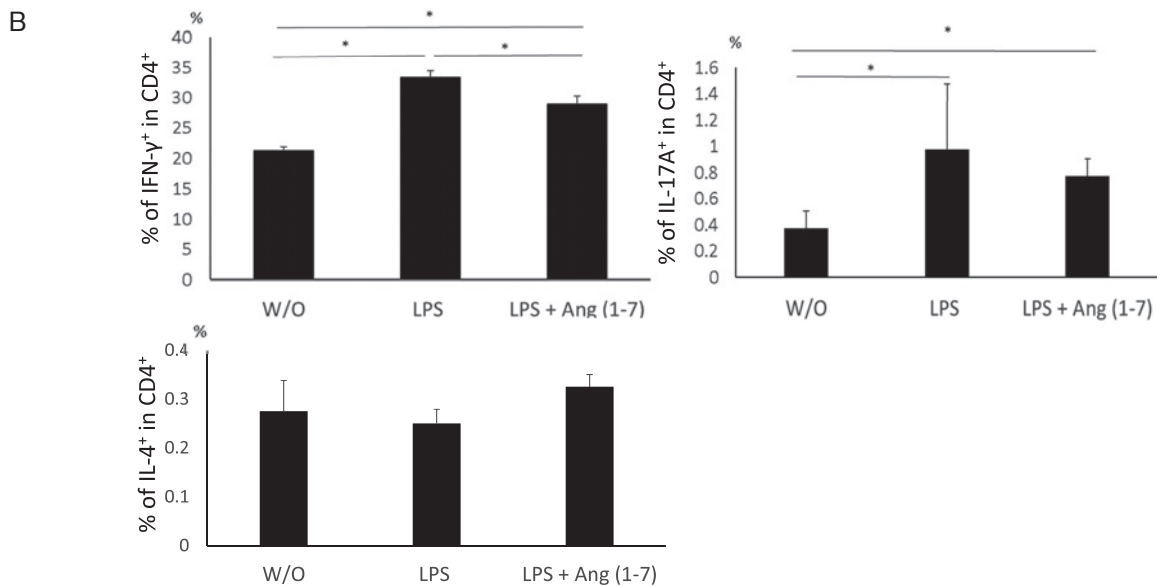
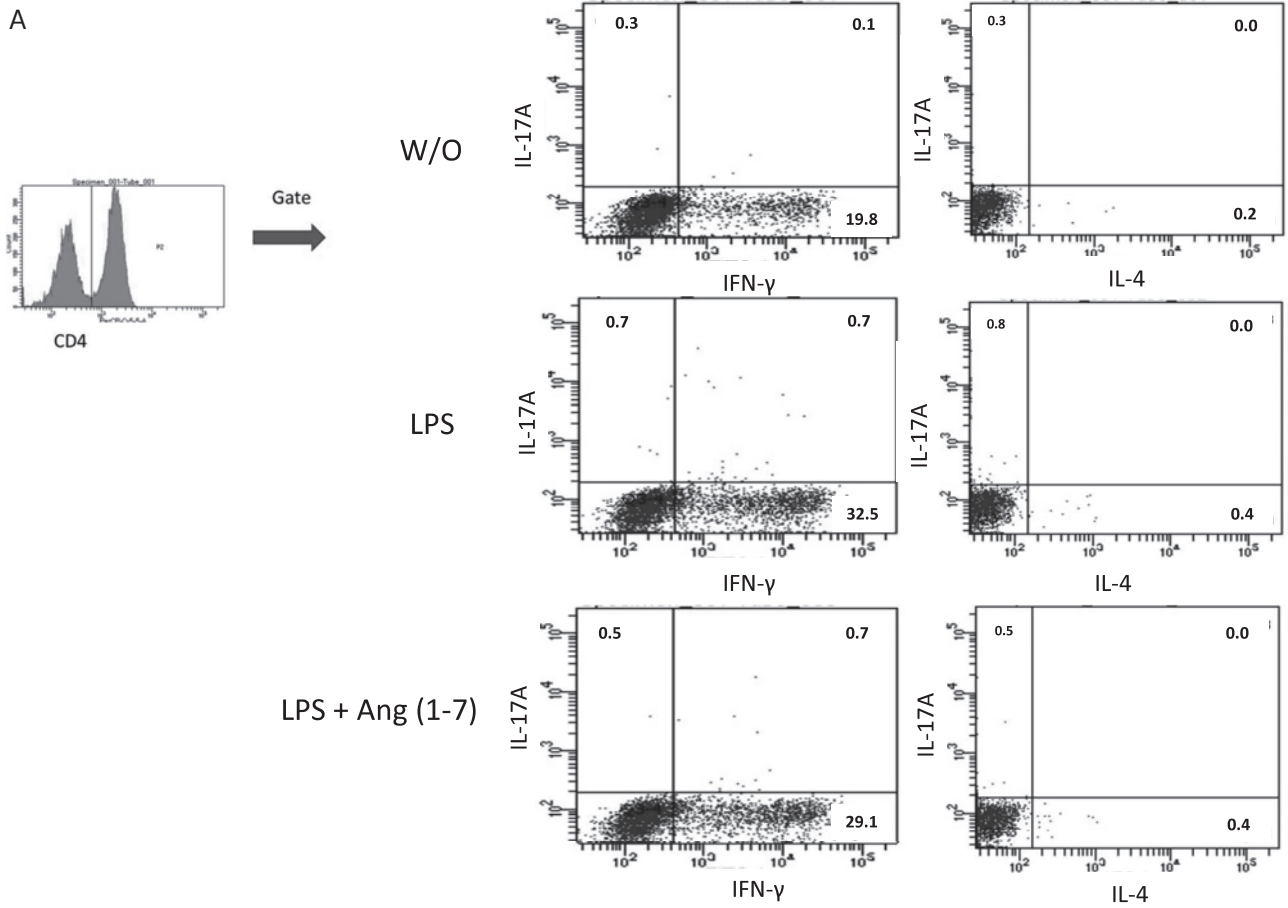
Ang (1-7)-MAS経路によるサイトカイン産生に対する

影響については、疾患モデル動物やヒトの検体などを用いた研究が進められており、多数の成果が報告されている²⁸⁻³³⁾。自己免疫性心筋炎動物モデルにAT1受容体拮抗薬によってACE2やAng (1-7)を増加させた研究ではTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6が減少し、炎症を抑える働きのあるIL-10が増加したとも報告されている^{34,35)}。MASノックアウトを用いたEAEモデルの実験ではIL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8が増加しこの作用はマクロファージを介していることが示されている²¹⁾。LPSで刺激したマウスのマクロファージではAng (1-7)によってTNF- α 、IL-6

が減少する²²⁾。今回の我々の実験では単球がマクロファージ分化していたかを確認してはいないが、これらの報告と矛盾せず、LPSで刺激した単球からのIL-6, IL-8, IL-12p70の産生がAng (1-7) によって抑制されていた。

Ang (1-7) の Th 細胞への報告は数が少ない。Hammer

らはマウスマクロファージと nTh 細胞との共培養した実験で、MAS ノックアウトマウス由来マクロファージと培養した nTh 細胞の方が、野生型マウス由来マクロファージと共培養したものより細胞分裂が促進されていたこと、また、MAS をノックアウトマウスで EAE を発症させる



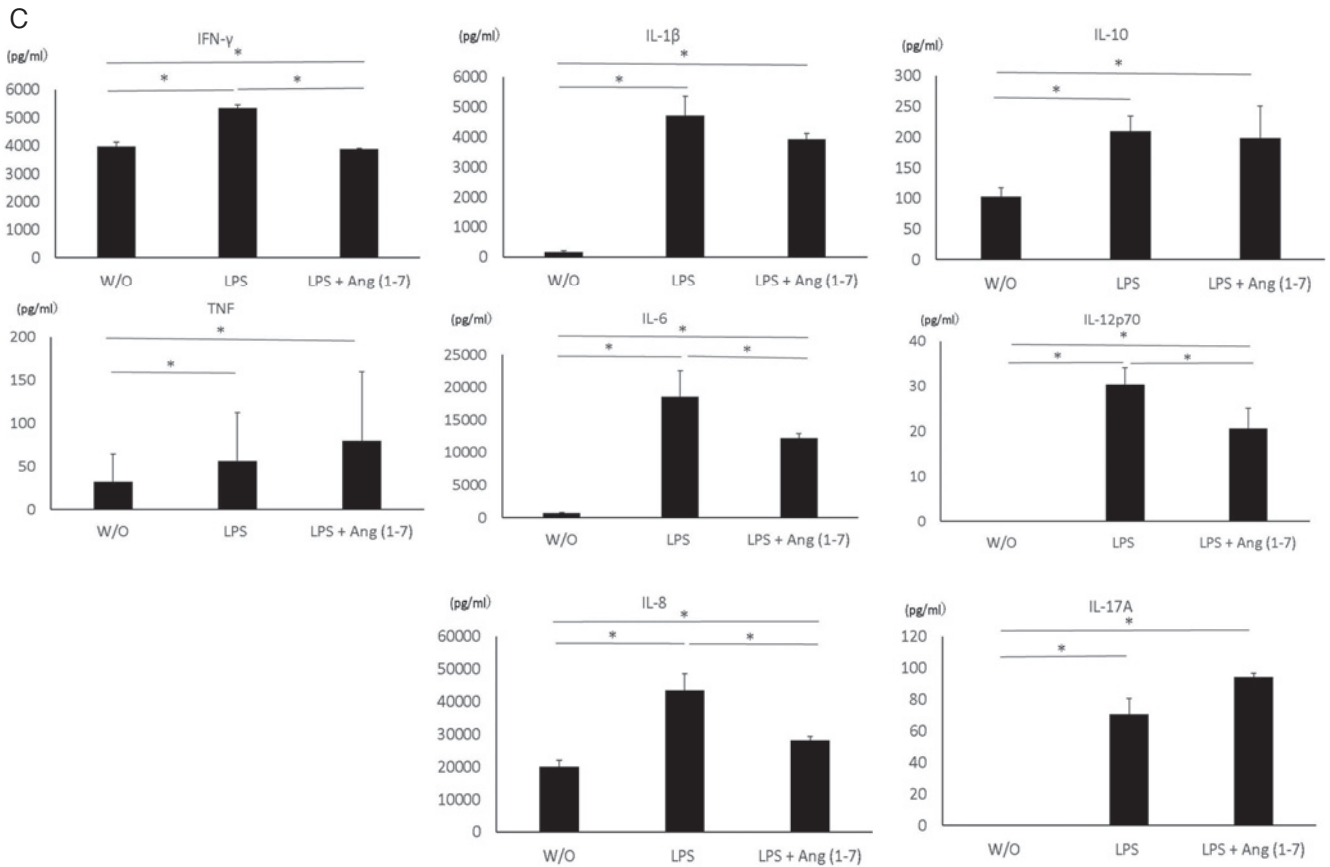


Fig. 5 Angiotensin (Ang) (1-7) suppressed differentiation of naïve helper T cells to type 1 helper T (Th1) cells by affecting monocyte activity. Naïve helper T (nTh) cells and monocytes were isolated from human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and co-cultured in media containing lipopolysaccharides (LPS) and Ang (1-7) for 7 days. (A) Flow cytometry analysis of CD4⁺T cell differentiation in stimulated cells. (B) Figures showing the percentage of interferon (IFN)- γ ⁺, (interleukin) IL-17A⁺, and IL-4⁺ cell in CD4⁺T cell populations. (C) Cytokine concentration in the culture media was measured by cytometric bead array. W/O, without LPS and Ang (1-7); CD, cluster of differentiation; IL, interleukin. ($n=5$ * $p<0.05$, mean \pm SEM).

と脾臓中の Th1 細胞数が上昇していたことを報告している²¹⁾。この作用はマクロファージにおける Ang (1-7)-MAS 経路が関与しているとされており、我々の検討では、単球からの、IL-12p70 などの nTh 細胞から Th1 細胞への分化に必要なサイトカインの産生が、Ang (1-7) によって減少し Th1 細胞への分化が抑制されたことが推察された。

今回の研究では Ang (1-7) による炎症性サイトカインの産生がどのような機序で起きたのかについては検討を行っていない。脳梗塞のモデルラットを用いた研究では Ang (1-7) が NF- κ B の活性化を抑制し脳梗塞に引き続き起こる脳梗塞巣中の炎症性サイトカインの量を抑えることが示唆されている³⁰⁾。脾臓の培養細胞 (AR42J 細胞) を用いた実験では Ang (1-7) により PI3K/AKT 経路の活性や eNOS が抑制され IL-6 や IL-8 の産生が抑制されたと報告されている³⁶⁾。ヒトマクロファージを用いた研究で LPS が Toll-like receptor (TLR) 4 に結合し NF- κ B や PI3K/AKT 経路を介して IL-12, IL-6 などサイトカインの分泌

を促進したと報告されており^{37,38)}、今回の実験では Ang (1-7) によるこれらのシグナル伝達に及ぼす影響についてはまだ実験を行っていないが同様の系を介している可能性が推察された。

結 語

ヒト免疫細胞に対する Ang (1-7) の作用に関する報告はこれまでになされていなかったが、今回の研究において Ang (1-7) は単球からの炎症性サイトカインの分泌を減少させ、さらに、nTh 細胞からの Th1 細胞への分化にも影響を与えることが示唆された。詳細な機序については検討できなかったものの、Ang (1-7) の有する抗炎症作用は炎症性疾患に対する新たな治療標的として有用であることが考えられた。

本論文を作成するにあたり、指導教官の東邦大学医学部内科学講座 (大森) 神経内科、岩崎泰雄教授から、丁寧かつ熱心なご指導を

賜りました。ここに感謝の意を表します。

又、本論文の修正にあたり多大なるご助言を賜りました東邦大学医学部研究推進室リサーチ・アドミニストレーター梶谷 宇先生に深謝いたします。

Conflicts of interest : 本稿作成に当たり、開示すべき conflict of interest (COI) は存在しない。

文 献

- 1) Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet*. 2007; 369: 1208-19.
- 2) Li J, Culman J, Hörtnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, et al. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J*. 2005; 19: 617-9.
- 3) Navalkar S, Parthasarathy S, Santanam N, Khan BV. Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37: 440-4.
- 4) Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007; 204: 2449-60.
- 5) Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK, Dechend R, Mervaala E, Hampich F, et al. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am J Pathol*. 2002; 161: 1679-93.
- 6) Platten M, Youssef S, Hur EM, Ho PP, Han MH, Lanz TV, et al. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 14948-53.
- 7) Stegbauer J, Lee DH, Seubert S, Ellrichmann G, Manzel A, Kvakan H, et al. Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 14942-7.
- 8) Esteban V, Ruperez M, Vita JR, López ES, Mezzano S, Plaza JJ, et al. Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NFkappaB pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int Suppl*. 2003; S33-8.
- 9) Mii A, Shimizu A, Masuda Y, Ishizaki M, Kawachi H, Iino Y, et al. Angiotensin II receptor blockade inhibits acute glomerular injuries with the alteration of receptor expression. *Lab Invest*. 2009; 89: 164-77.
- 10) Hammer A, Stegbauer J, Linker RA. Macrophages in neuroinflammation: role of the renin-angiotensin-system. *Pflugers Arch*. 2017; 469: 431-44.
- 11) Santos SH, Andrade JM. Angiotensin 1-7: a peptide for preventing and treating metabolic syndrome. *Peptides*. 2014; 59: 34-41.
- 12) Karnik SS, Singh KD, Tirupula K, Unal H. Significance of angiotensin 1-7 coupling with MAS1 receptor and other GPCRs to the renin-angiotensin system: IUPHAR Review 22. *Br J Pharmacol*. 2017; 174: 737-53.
- 13) Skiba DS, Nosalski R, Mikolajczyk TP, Siedlinski M, Rios FJ, Montezano AC, et al. Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1-7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2017; 174: 4055-69.
- 14) Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett*. 1995; 357: 27-32.
- 15) Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension*. 2008; 51: 574-80.
- 16) Gomes ER, Santos RA, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *Int J Hypertens*. 2012; 2012: 493129.
- 17) Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 1996; 27: 523-8.
- 18) Sampaio WO, Souza dos, Santos RA, Faria-Silva R, da Mata, Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 2007; 49: 185-92.
- 19) Potthoff SA, Föhling M, Clasen T, Mende S, Ishak B, Suvorava T, et al. Angiotensin-(1-7) modulates renal vascular resistance through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension*. 2014; 63: 265-72.
- 20) Stegbauer J, Potthoff SA, Quack I, Mergia E, Clasen T, Friedrich S, et al. Chronic treatment with angiotensin-(1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoproteinE-deficient mice. *Br J Pharmacol*. 2011; 163: 974-83.
- 21) Hammer A, Yang G, Friedrich J, Kovacs A, Lee DH, Grave K, et al. Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113: 14109-14.
- 22) Souza LL, Costa-Neto CM. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *J Cell Physiol*. 2012; 227: 2117-22.
- 23) Potteaux S, Tedgui A. Monocytes, macrophages and other inflammatory mediators of abdominal aortic aneurysm. *Curr Pharm Des*. 2015; 21: 4007-15.
- 24) Justin Rucker A, Crowley SD. The role of macrophages in hypertension and its complications. *Pflugers Arch*. 2017; 469: 419-30.
- 25) Montezano AC, Nguyen Dinh, Cat A, Rios FJ, Touyz RM. Angiotensin II and vascular injury. *Curr Hypertens Rep*. 2014; 16: 431.
- 26) Luft FC, Dechend R, Müller DN. Immune mechanisms in angiotensin II-induced target-organ damage. *Ann Med*. 2012; 44: S49-54.
- 27) Nie W, Yan H, Li S, Zhang Y, Yu F, Zhu W, et al. Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol*. 2009; 46: 355-61.
- 28) Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2013; 169: 477-92.
- 29) Giani JF, Burghi V, Veiras LC, Tomat A, Muñoz MC, Cao G, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates diabetic nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012; 302: F1606-15.
- 30) Jiang T, Gao L, Guo J, Lu J, Wang Y, Zhang Y. Suppressing inflammation by inhibiting the NF-kappaB pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol*. 2012; 167: 1520-32.
- 31) Agarwal D, Elks CM, Reed SD, Mariappan N, Majid DS, Francis J. Chronic exercise preserves renal structure and hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 16: 139-52.

- 32) Sriramula S, Cardinale JP, Lazartigues E, Francis J. ACE2 over-expression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res.* 2011; 92: 401-8.
- 33) Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y, Sriramula S, Francis J, Yuan L, et al. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179: 1048-54.
- 34) Sukumaran V, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Lakshmanan AP, Yamaguchi K, Ma M, et al. Olmesartan attenuates the development of heart failure after experimental autoimmune myocarditis in rats through the modulation of ANG 1-7 mas receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 351: 208-19.
- 35) Sukumaran V, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Lakshmanan AP, Yamaguchi K, Ma M, et al. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. *Life Sci.* 2012; 90: 289-300.
- 36) Wang J, Liu R, Qi H, Wang Y, Cui L, Wen Y, et al. The ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis protects against pancreatic cell damage in cell culture. *Pancreas.* 2015; 44: 266-72.
- 37) Zuniga MC, Raghuraman G, Hitchner E, Weyand C, Robinson W, Zhou W. PKC-epsilon and TLR4 synergistically regulate resistin-mediated inflammation in human macrophages. *Atherosclerosis.* 2017; 259: 51-9.
- 38) Park SY, Park DJ, Kim YH, Kim Y, Choi YW, Lee SJ Schisandra chinensis alpha-iso-cubebenol induces heme oxygenase-1 expression through PI3K/Akt and Nrf2 signaling and has anti-inflammatory activity in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11: 1907-15.

Angiotensin (1-7) Inhibits Human Monocyte Cytokine Production and Type 1 Helper T Cell Differentiation from Naïve T Cells

Sayori Hanashiro¹⁾ Kiyokazu Kawabe²⁾ and Ken Ikeda²⁾

¹⁾Division of Neurology, Department of Internal Medicine (Omori),
Toho University Graduate School of Medicine

²⁾Division of Neurology, Department of Internal Medicine (Omori),
Toho University School of Medicine

ABSTRACT

Background: Angiotensin (Ang) (1-7) is hydrolyzed from Ang II, causing the opposite effects of Ang II. Recent studies have shown that Ang (1-7) exerts an anti-inflammatory effect. However, there are few reports regarding the bioactivity of Ang (1-7) on human immune cells, and consequently, this is the focus of our investigations.

Methods: mRNA expression of MAS, an Ang (1-7) receptor, in human monocytes and T cells was quantified using quantitative polymerase chain reaction. Monocytes and naïve helper T (nTh) cells were stimulated by lipopolysaccharides and Ang (1-7). The cytokine concentrations in the culture media were determined, and the helper T (Th) cell populations were characterized.

Results: MAS mRNA levels were higher in monocytes compared with T cells. Ang (1-7) suppressed monocyte secretion of interleukin (IL)-6, IL-8, and IL-12p70 and Th1 cell differentiation from nTh cells.

Conclusion: Ang (1-7) exerts anti-inflammatory effects via monocytes in the human immune system. The Ang (1-7)-MAS axis is assumed to be a candidate therapeutic target for inflammatory and autoimmune diseases.

J Med Soc Toho 65 (2): 88–97, 2018

KEYWORDS: angiotensin (1-7), MAS, helper T cell, monocyte, cytokine