

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	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
作成者(著者)	花城, 里依
公開者	東邦大学
発行日	2019.03.13
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 65.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 藤岡俊樹 / タイトル: 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 / 著者: 花城里依、川邊清一、池田 憲 / 掲載誌: 東邦医学会雑誌 / 巻号・発行年等: 65(2): 88-97, 2018
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第915号
学位記番号	甲第628号
学位授与年月日	2019.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD79104696

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

花城里依より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 628 号

学位申請者 : はな しろ さ より
花 城 里 依

学位審査論文: 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

著 者 : 花城里依、川邊清一、池田 憲

公 表 誌 : 東邦医学会雑誌 65 (2) : 88-97, 2018

論文内容の要旨 :

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、心血管系イベントの発症に密接な関連が知られている。近年 angiotensin (Ang) II 以外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 は様々の臓器に発現していることがわかってきている。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、活性酸素産生の抑制、血管内皮細胞の保護や動脈硬化の進行を抑制するなどといった Ang II とは対照的な機能を呈することが報告されている。動脈硬化に関連する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、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く、特にヒトの免疫細胞に対する Ang (1-7) の直接的な効果は知られていない。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 (Th 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。

第一に、過去の動物実験などの報告で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ことから、ヒトの細胞でも同様に単球と T 細胞での MAS の mRNA 発現がされているかどうかを調べた。細胞は市販のヒト peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を使用し、PBMC から単球、リンパ球、ナイーブヘルパー T 細胞 (nTh 細胞) の分離を行った。単球と nTh 細胞における MAS の mRNA 発現量を比較するために qPCR を行い解析の結果、単球に特異的に MAS が高発現している一方、nTh 細胞には発現がほとんどみられなかった。

第二に、Ang (1-7) が単球からの炎症性サイトカインの分泌にどのような影響を与えるのかについて調べた。単球に LPS で刺激をし、Ang (1-7) の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 Cytometric Kit で測定し比較した。IL-6、IL-8、IL-12p70 の培養液液中の濃度は Ang (1-7) を添加する

ことで有意に低下した。

第三に、Ang (1-7) が単球を介して Th1、Th2、Th17 細胞にどのような影響を与えるかについて調べた。まず、単球と nTh 細胞を共培養し LPS で刺激し、Ang (1-7) の添加したものと添加しなかったもので 7 日間培養し、Th1 (IFN γ + 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。5 回の実験結果を統計解析し Ang (1-7) を添加した細胞で Th1 細胞 (IFN γ + 細胞) の割合が有意に減少していた。

今回ヒト 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、単球と nTh 細胞を共培養した実験では Th1 細胞への分化が抑えられた。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 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。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。Hammer らは、MAS ノックアウトを用いた EAE モデルの実験で 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。また、MAS ノックアウトマウスで EAE を発症させると脾臓中の Th1 細胞数が上昇していたことを報告しており、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いる。今回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かめてはいないが、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。また、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。

ただ、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。Wang らは、脾臓の培養細胞を用いた実験で、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しており、今回の実験でも同様の系を介している可能性が推察された。

ヒト免疫細胞に対する Ang (1-7) の効果に対する報告はあまりなく、今回の研究では Ang (1-7) は単球に対して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。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 628 号	氏 名	花 城 里 依
学位審査担当者	主 査	藤 岡 俊 樹
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	亀 田 秀 人
	副 査	南 木 敏 宏

学位審査論文の審査結果の要旨 :

高血圧や動脈硬化に深く関連している angiotensin (Ang) は、免疫機能や炎症の調整作用、神経再生などにも関わっている。Ang 系の阻害による免疫介在性神経疾患の治療の可能性に関する報告が相次いでいるが、著者らは、血管平滑筋や内皮に対して Ang と対照的な効果を有し、ヒトの多発性硬化症モデルの抑制効果が報告されているがヒト免疫細胞への効果は知られていなかった Ang の分解産物 Ang (1-7) に注目し、ヒト免疫細胞に対する Ang (1-7) の効果と、単球を介したヘルパーT細胞 (Th 細胞) 分化に対する影響を培養細胞を用いて検討した。まず Ang (1-7) の受容体である MAS がヒト免疫細胞でも発現しているか、市販のヒト末梢血単核球分画 (PBMC) から分離した単球、リンパ球、ナイーブヘルパーT細胞 (nTh 細胞) における MAS の mRNA 発現量を qPCR で検討し、単球に特異的に MAS が高発現していることを明らかにした。次に、LPS 刺激した単球の培養上清中のサイトカインを Ang (1-7) 添加の有無で比較したところ IL-6、IL-8、IL-12p70 濃度が Ang (1-7) 添加で有意に低下した。さらに、Ang (1-7) が単球を介して Th1、Th2、Th17 細胞に与える影響を検討したところ Ang (1-7) 添加で Th1 細胞 (IFN γ 陽性細胞) の割合が有意に減少していた。単球に多く発現していた MAS を介して Ang (1-7) が炎症性サイトカインの分泌抑制・Th1 細胞誘導抑制が生じていると結論し、炎症性疾患に対する新たな治療標的になる可能性を指摘した。

学位審査会は平成 31 年 1 月 22 日 20 : 00 から医学部ミーティングルームにて書面による事前審査 1 名を含む 5 名の審査委員の出席のもと開催された。申請者から、論文の背景と要旨の説明があり質疑応答がなされた。本研究と臨床面、特に神経疾患との関わり、MAS 欠損マウスでの実験モデルでの所見、単球とリンパ球の共培養実験の条件、LPS 刺激の至適条件、実際の FACS の生データなどについて多数の質問がなされたが、申請者は、本研究の限界を含め適切に返答し今後の研究の方向性を示した。

以上より、今回の研究は、Ang (1-7) がヒト単球に作用して炎症性サイトカインの分泌を減少させることを初めて示した貴重な研究であり、あらたな治療法開発にも繋がる可能性を秘めた本論文内容は学位授与に値するものであると審査委員全員が判断した。