



Ultraviolet B Exposure Inhibits Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice by Expanding CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells

Hayashi, Tomohiro

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7049号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007049>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Ultraviolet B Exposure Inhibits Angiotensin II-Induced Abdominal

Aortic Aneurysm Formation in Mice

by Expanding CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells

紫外線 B 波照射は CD4 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞を増幅し、アンギオテ

ンシン II 誘導性マウス大動脈瘤の形成を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

循環器内科学

指導教員：平田 健一教授

林 友鴻

【背景】

腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm: AAA) は動脈硬化の最終表現型の一つであり、破裂すると致死率が高い疾患である。しかし、効果的な予防法はなく、病変が進行すれば外科的治療 (人工血管置換術・ステントグラフト内挿術) を行い、破裂の予防が行われる。高齢者では外科的治療の合併症のリスクが高く、非侵襲的な内科的治療・予防法の開発が望まれている。

動脈瘤の病態において、動脈硬化性疾患に共通した慢性炎症の関与が示唆されており、CD4 陽性エフェクター T 細胞やマクロファージなどの炎症細胞が AAA の進展に深く関与することが知られている。我々は T 細胞の活性化を抑制する CD4 陽性 Foxp3 (forkhead box P3) 陽性の制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) がアンギオテンシン II 誘導性マウス大動脈瘤の進展に対して抑制的に働くことを報告した。

一方、紫外線 B 波 (ultraviolet B: UVB) 照射は過剰な免疫応答を抑制し、乾癬などヒトの皮膚疾患の病態改善に有効な治療法として確立されている。また、マウスの多発性硬化症や喘息モデルにおいて、UVB 照射は免疫応答を制御することにより病態形成を抑制することが報告されている。UVB 照射が全身の免疫応答に及ぼす作用の一つとして、UVB 照射により誘導される Treg が、エフェクター T 細胞を介する慢性炎症を抑制することが知られている。

【目的】

本研究の目的は、UVB 照射によるアンギオテンシン II 誘導性大動脈瘤の抑制効果およびその機序について明らかにすることである。

【方法】

我々は AAA モデルマウスを作製するために、動脈硬化モデルアポリポ蛋白 E 遺伝子欠損マウス (*Apoe*^{-/-}) に 6 週齢から高コレステロール食事負荷を行い、12 週齢から浸透圧ポンプによるアンギオテンシン II 持続皮下投与 (1000 ng/kg/min) を行った。10 週齢から UVB 照射 (週 1 回、5 KJ/m²/日) を行い、16 週齢にて生存率と大動脈の形態を評価した。同時に AAA 病変部標本を用いて、エラスチカ・ワンギーソン染色による弾性線維の評価を行い、抗 CD4・抗 Foxp3・抗 MOMA-2 抗体を用いた免疫染色により CD4 陽性 T 細胞・Treg・マクロファージの評価を行った。また、AAA 病変部における炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼのメッセンジャー RNA 発現を、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。

in vitro の実験では、フローサイトメトリーを用いて、皮膚流入領域リンパ節および脾臓、傍大動脈リンパ節における免疫細胞の評価を行った。

さらに、Foxp3 陽性 Treg を除去した状態で、UVB 照射が AAA 進展に及ぼす影響を検討するため、ジフテリトキシン投与により選択的に Foxp3 陽性 Treg を除去できる

DEREG (depletion of Tregs) /*Apoe*^{-/-}マウスを作製した。同マウスを用いて、ジフテリアトキシン投与下に、上記と同様のプロトコールを用いて生存率、大動脈の形態、炎症細胞の評価を行った。

【結果】

UVB 照射マウス (n=38) では、UVB 非照射マウス (n=42) と比較して AAA の発症が有意に抑制され (66% vs. 93%)、腹部大動脈最大径も低値であった。さらに、UVB 非照射マウスと比較して AAA 破裂による死亡率も有意に低かった (29% vs. 60%)。体重や収縮期血圧は UVB 照射による影響を受けず、25-ヒドロキシビタミン D および活性型である 1, 25-ジヒドロキシビタミン D の血中濃度も変化を認めなかった。一方、免疫組織化学染色にて評価したところ、AAA 病変部において、UVB 照射は CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの集積を有意に抑制した。また、リアルタイム PCR 法にて検討した結果、UVB 照射は AAA 病変部におけるインターフェロン- γ のメッセンジャー RNA の発現を有意に抑制し、その他の炎症性サイトカイン (インターロイキン-6、腫瘍壊死因子- α) およびマトリックスメタロプロテアーゼ (マトリックスメタロプロテアーゼ-2、マトリックスメタロプロテアーゼ-9) の発現も低下させる傾向を示した。以上より、UVB 照射が大動脈病変部への炎症細胞の集積を抑制することが示された。

続いて、AAA 病変での炎症抑制の分子機序を明らかにするため、フローサイトメトリーを用いて非病変部における免疫細胞の評価を行った。UVB 照射マウスでは皮膚流入領域リンパ節および脾臓において、CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg の有意な増加を認めた。さらに、UVB 照射により誘導された Treg においては、同細胞の活性化マーカーとして知られる anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 および CD103 の発現が上昇していたことから、UVB 照射により高い免疫抑制能を持つ活性化された Treg が増幅されることが分かった。

次に UVB 照射が T 細胞の免疫応答に及ぼす影響について検討した。脾臓細胞を用いた細胞内サイトカイン染色による検討を行った結果、UVB 照射はインターフェロン- γ ・インターロイキン-4・インターロイキン-17 産生ヘルパー T 細胞のいずれにも影響を及ぼさなかった。一方、傍大動脈リンパ節においては、UVB 照射により、エフェクター T 細胞の活性型である CD44^{hi}CD62L^{lo} 細胞の CD4 陽性細胞中に占める割合が有意に低下していた。

最後に、ジフテリアトキシン投与下の DEREG/*Apoe*^{-/-}マウスを用いて、Foxp3 陽性 Treg を全身性に選択的に除去した上で、UVB 照射が AAA 進展に及ぼす影響を検討した。同マウスにおいては、UVB 照射は、非照射時と比較して CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg を増幅させないことを確認した。また、同マウスでは、UVB 照射は AAA 破裂による死亡・AAA 発症率・腹部大動脈最大径のいずれに関しても抑制効果を示さず、AAA 病変部における CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの集積抑制といった抗炎症効果も認めな

かった。以上の実験結果から、UVB 照射による AAA 進展抑制の機序として、全身性の CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg の増幅が重要な役割を果たしていることが示唆された。

【考察】

UVB 照射は、アンジオテンシン II 誘導性マウス大動脈瘤に対して保護的に作用することを明らかにした。その分子機序として、UVB 照射が全身性に CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg を誘導し、傍大動脈リンパ節において活性型エフェクター T 細胞を減少させ、さらに AAA 組織内で CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの集積を低下させることが分かった。さらに、Foxp3 陽性 Treg を選択的に除去した *in vivo* の実験において、UVB 照射により増幅される CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg が、抗炎症および AAA 進展抑制に重要な役割を果たしていることを示した。

様々な疫学研究において、日光暴露と心血管疾患との関連が報告されている。日光暴露の低下により皮膚におけるビタミン D 合成が低下し、血中ビタミン D 濃度の低下が AAA を含む心血管疾患発症のリスク増大に寄与する可能性が示唆されている。しかし、本研究では、アンジオテンシン II 誘導性大動脈瘤モデルマウスにおいて、血液中の 25-ヒドロキシビタミン D および活性型 1, 25-ジヒドロキシビタミン D 濃度の上昇は認めず、UVB 照射の AAA 進展抑制効果は血液中のビタミン D 濃度に依存しないメカニズムが主体である。

AAA の進展と増悪には他の動脈硬化性疾患と共通して、ヘルパー T 細胞を介した血管の慢性炎症が深く関与することが知られているが、各疾患におけるヘルパー T 細胞各サブセットの役割に関しては異なる点が多い。一方、Treg/エフェクター T 細胞のバランスを Treg 側へシフトさせることは、過剰な免疫応答を抑制し、AAA および他の動脈硬化性疾患の各病態に対して保護的に作用することが以前より報告されている。我々の先行研究において、UVB 照射が上記バランスを Treg 側へシフトさせることで *Apoe*^{-/-}マウスの動脈硬化形成を抑制することを見出したが、本研究では AAA 形成に対しても UVB 照射が抑制的に作用することを明らかにした。

Treg を増幅させるような抗体薬の有効性が AAA モデルマウスで示されているが、臨床応用を考慮すると、副作用として不適切な免疫応答を引き起こすことも危惧される。また、臨床試験において、自己免疫性疾患や骨髄移植後の移植片対宿主病に対する Treg の細胞移植も試みられているが、純粋な Treg を大量に単離することは未だ技術的に困難であり課題も多い。既に皮膚科領域では、乾癬やアトピー性皮膚炎といった炎症性皮膚疾患に対する UVB 療法の有効性と安全性が確立しており、標準治療として使用されている。ヒト AAA における Treg の役割は不明な点も多く、今後の検討課題であるが、UVB を用いた光線療法をヒト AAA に対する非侵襲的かつ安全安価な新規予防・治療アプローチとして臨床応用できる可能性がある。

【結論】

UVB 照射は、アンギオテンシン II 誘導性マウス大動脈瘤モデルにおいて、AAA の形成および関連死亡を抑制することを明らかにした。その機序として、UVB 照射は CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg を全身性に増幅することで、過剰な炎症・免疫応答を抑制することが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2742 号	氏 名	林 友鴻
論文題目 Title of Dissertation	Ultraviolet B Exposure Inhibits Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice by Expanding CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells 紫外線 B 波照射は CD4 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞を増幅し、 アンギオテンシン II 誘導性マウス大動脈瘤の形成を抑制する		
審査委員 Examiner	主 査 森信 曉雄 Chief Examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner 副 査 文 地 紘 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

【背景】

腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm: AAA) は破裂すると致死率が高い疾患であり、非侵襲的な内科的治療・予防法の開発が望まれている。

動脈瘤の病態において、動脈硬化性疾患に共通した慢性炎症の関与が示唆されており、申請者は T 細胞の活性化を抑制する CD4 陽性 Foxp3 (forkhead box P3) 陽性の制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) がアンギオテンシン II 誘導性マウス大動脈瘤の進展に対して抑制的に働くことを報告した。

一方、紫外線 B 波 (ultraviolet B: UVB) 照射は過剰な免疫応答を抑制することが知られている。UVB 照射が全身の免疫応答に及ぼす作用の一つとして、UVB 照射により誘導される Treg が、エフェクター T 細胞を介する慢性炎症を抑制することが報告されている。

【目的】

本研究の目的は、UVB 照射によるアンギオテンシン II 誘導性大動脈瘤の抑制効果およびその機序について明らかにすることである。

【方法】

動脈硬化モデルアポリポ蛋白 E 遺伝子欠損マウス (*ApoE*^{-/-}) に 6 週齢から高コレステロール食事負荷を行い、12 週齢から浸透圧ポンプによるアンギオテンシン II 持続皮下投与 (1000 ng/kg/min) を行った。10 週齢から UVB 照射 (週 1 回、5 KJ/m²/日) を行い、16 週齢にて生存率と大動脈の形態を評価した。同時に AAA 病変部標本を用いて、エラスチカ・ワンギーソン染色による弾性線維の評価を行い、抗 CD4・抗 MOMA-2 抗体を用いた免疫染色により CD4 陽性 T 細胞・マクロファージの評価を行った。

in vitro の実験では、フローサイトメトリーを用いて、皮膚流入領域リンパ節および脾臓、傍大動脈リンパ節における免疫細胞の評価を行った。

さらに、ジフテリアトキシン投与により選択的に Foxp3 陽性 Treg を除去できる DEREG (depletion of Tregs) /*ApoE*^{-/-}マウスを作製した。同マウスを用いて、上記と同様のプロトコルを用いて生存率、大動脈の形態、炎症細胞の評価を行った。

【結果】

UVB 照射マウスでは、UVB 非照射マウスと比較して AAA の発症が有意に抑制され、腹部大動脈最大径も低値であった。また、AAA 病変部においては、UVB 照射は CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの集積を有意に抑制した。

続いて、フローサイトメトリーを用いて免疫細胞の評価を行った。UVB 照射マウスでは皮膚流入領域リンパ節および脾臓において、CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg の有意な増加を認めた。さらに、UVB 照射により誘導された Treg においては、同細胞の活性化マーカーとして知られる anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 の発現が上昇していた。一方、傍大動脈リンパ節においては、UVB 照射により、エフェクター T 細胞の活性化型である CD44^{high}CD62L^{low} 細胞の CD4 陽性細胞中に占める割合が有意に低下していた。

最後に、ジフテリアトキシン投与下の DREG/*ApoE*^{-/-}マウスを用いて、UVB 照射が AAA 進展に及ぼす影響を検討した。同マウスでは、UVB 照射は AAA 抑制効果を示さず、AAA 病変部における CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの集積抑制といった抗炎症効果も認めなかった。

【考察】

UVB 照射は、アンギオテンシン II 誘導性マウス大動脈瘤に対して保護的に作用することを明らかにした。その分子機序として、UVB 照射が全身性に CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg を誘導し、AAA 組織内で CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの集積を低下させることが分かった。さらに、Foxp3 陽性 Treg を選択的に除去した *in vivo* の実験において、UVB 照射により増幅される CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg が、抗炎症および AAA 進展抑制に重要な役割を果たしていることを示した。

Treg/エフェクター T 細胞のバランスを Treg 側へシフトさせることは、過剰な免疫応答を抑制し、AAA および他の動脈硬化性疾患の各病態に対して保護的に作用することが以前より報告されている。

既に皮膚科領域では、乾癬やアトピー性皮膚炎といった炎症性皮膚疾患に対する UVB 療法の有効性と安全性が確立しており、標準治療として使用されている。UVB を用いた光線療法をヒト AAA に対する非侵襲的かつ安全安価な新規予防・治療アプローチとして臨床応用できる可能性がある。

【結論】

UVB 照射は、アンギオテンシン II 誘導性マウス大動脈瘤モデルにおいて、AAA の形成および関連死亡を抑制することを明らかにした。その機序として、UVB 照射は CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg を全身性に増幅することで、過剰な炎症・免疫応答を抑制することが示唆された。

本研究は、新規大動脈瘤治療法開発のための基礎的検討を行ったものである。従来報告のない、紫外線 (UVB) 皮膚照射により制御性 T 細胞を大動脈瘤に誘導するという新たな技術を開発し、大動脈瘤の免疫治療についての重要な新知見を得たものとして価値ある集積である。よって博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。