



CTLA-4 Protects against Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice

Amin, Hilman Zulkifli

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2019-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7560号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007560>

※ 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。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

CTLA-4 Protects against Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice

共抑制分子 CTLA-4 はアンジオテンシンⅡ誘導性マウス腹部大動脈瘤の形成を抑
制する

Hilman Zulkifli Amin, Naoto Sasaki, Tomoya Yamashita, Taiji Mizoguchi, Tomohiro Hayashi,

Takuo Emoto, Takuya Matsumoto, Naofumi Yoshida, Tokiko Tabata, Sayo Horibe, Shoji

Kawauchi, Yoshiyuki Rikitake, Ken-Ichi Hirata

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)

HILMAN ZULKIFLI AMIN

【背景】

腹部大動脈瘤は致死率の高い疾患であるが、その病態進展や破裂を抑制するような薬物治療は未だ確立されていない。病変が進行すれば外科的治療が行われるが、合併症のリスクが高く、非侵襲的な内科的治療法の開発が望まれている。

腹部大動脈瘤の病態進展において、過剰な免疫応答により引き起こされる慢性炎症の関与が示唆されている。特に、獲得免疫応答において中心的な役割を果たす T 細胞がその病態進展に寄与することが明らかにされている。抗原提示細胞からの抗原提示と共刺激経路からの刺激により、T 細胞は活性化する。Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) は活性化した T 細胞に発現する抑制性分子であり、共刺激経路を阻害することにより T 細胞の活性化を抑制する。CTLA-4 は、自己免疫疾患や動脈硬化などの慢性炎症が関与する病態の抑制に関わることが報告されているが、腹部大動脈瘤の病態における役割は明らかではない。

【目的】

本研究の目的は、アンジオテンシンⅡにより誘導される腹部大動脈瘤の形成における CTLA-4 の役割を明らかにすることである。

【方法】

動脈硬化モデルであるアポリポ蛋白 E 遺伝子欠損マウス (*Apoe*^{-/-}マウス) とヒト CD2 プロモーターを用いたマウス CTLA-4 の過剰発現マウス (CTLA-4-Tg) とを交配して CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスを作製した。*Apoe*^{-/-}マウスおよび CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスにアンジオテンシンⅡを投与して腹部大動脈瘤を作製し、以下の検討を行った。

- ・6 週齢雄の *Apoe*^{-/-}マウスおよび CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスに高脂肪食負荷を行い、14 週齢より浸透圧ミニポンプを用いてアンジオテンシンⅡ (1000 ng/kg/min) を投与し、投与開始から 4 週間における腹部大動脈瘤の発症率および死亡率を評価した。
- ・アンジオテンシンⅡ投与開始から 4 週間後に腹部大動脈瘤病変を摘出し、その最大径や病変の程度を評価した。
- ・腹部大動脈瘤病変部凍結切片を作製し、免疫染色により炎症性免疫細胞を評価した。また、エラスチカ・ワンギーソン染色により血管弾性線維の破壊を評価した。
- ・アンジオテンシンⅡ投与開始から 1 週間後に腹部大動脈瘤病変から RNA を抽出し、リアルタイム PCR により炎症関連分子の遺伝子発現を評価した。
- ・アンジオテンシンⅡ投与開始から 1 週間後にリンパ組織から免疫細胞を分離し、フローサイトメトリーにより免疫細胞を評価した。

【結果】

CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスでは、コントロールの *ApoE*^{-/-}マウスと比較して腹部大動脈瘤の発症およびその破裂による死亡は有意に抑制され、その最大径は低値であった。CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスでは、腹部大動脈瘤病変における弾性線維の破壊は軽減されており、病変のスコアは有意に低値であった。さらに、大動脈瘤病変部のマクロファージおよび CD4 陽性 T 細胞の浸潤は有意に抑制され、炎症関連分子の遺伝子発現の低下を認めた。両群間における体重および収縮期血圧には有意差を認めなかった。

脾臓およびリンパ節から免疫細胞を分離し、フローサイトメトリーにより免疫細胞を評価した。アンジオテンシン II の投与は、*ApoE*^{-/-}マウスの脾臓における CD44^{hi}CD62L^{low} エフェクター T 細胞を増加させたが、CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスではこの細胞集団の増加は認めず、*ApoE*^{-/-}マウスと比べて有意に少なかった。傍大動脈リンパ節においても、CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスでは *ApoE*^{-/-}マウスと比較して CD44^{hi}CD62L^{low} エフェクター T 細胞は有意に少なかった。アンジオテンシン II の投与は、*ApoE*^{-/-}マウスの脾臓における炎症惹起性のインターフェロン- γ 産生 T 細胞を増加させたが、CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスではこの細胞集団の増加は認めず、*ApoE*^{-/-}マウスと比べて有意に少なかった。アンジオテンシン II の投与は *ApoE*^{-/-}マウスの脾臓の樹状細胞を活性化させたが、CTLA-4-Tg/*ApoE*^{-/-}マウスではその活性化は認めなかった。

以上の結果より、CTLA-4 分子は T 細胞および樹状細胞による炎症性免疫反応を制御することで、大動脈瘤形成の抑制に寄与すると考えられた。

【考察】

大動脈瘤の病態進展には炎症性免疫応答が関与するため、我々は免疫抑制性分子である CTLA-4 に注目し、その病態形成における役割について検討した。リンパ球特異的に CTLA-4 を過剰発現させた動脈硬化モデルマウスにおいて、アンジオテンシン II 誘導性の腹部大動脈瘤の発症およびその破裂による死亡が抑制されることを見出した。CTLA-4 の過剰発現は、T 細胞、樹状細胞およびマクロファージにより惹起される炎症性免疫応答を抑制することで血管弾性線維の破壊を軽減し、大動脈瘤の病態進展の抑制に寄与すると考えられた。

大動脈瘤の進行による破裂は死亡率が極めて高く、その抑制のためには外科的治療が行われるが、高齢者では手術に伴う合併症のリスクが高く、非侵襲的な内科的治療法の開発が望まれている。CTLA-4 Ig は CTLA-4 と類似の作用を有し、関節リウマチの治療薬として既に臨床使用されているが、重篤な副作用の頻度は低く、病態進展の抑制に有効である。本研究結果より、CTLA-4 分子は腹部大動脈瘤に対して保護的に作用することが明らかになり、CTLA-4 Ig を用いた治療など、CTLA-4 分子を標的とした新規治療法の開発につながる事が期待される。

【結論】

CTLA-4 は炎症性免疫応答を制御することにより、腹部大動脈瘤の形成および関連死亡の抑制に関与することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2904 号	氏 名	HILMAN ZULKIFLI AMIN
論 文 題 目 Title of Dissertation	CTLA-4 Protects against Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice 共抑制分子 CTLA-4 はアンジオテンシンⅡ誘導性マウス腹部大動脈瘤の形成 を抑制する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 森信 靖雄 Chief Examiner 副 査 古屋敷 智之 Vice-examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

【背景】

腹部大動脈瘤は致死率の高い疾患である。腹部大動脈瘤の病態進展において、過剰な免疫応答により引き起こされる慢性炎症の関与が示唆されている。特に、獲得免疫応答において中心的役割を果たすT細胞がその病態進展に寄与することが明らかにされている。抗原提示細胞からの抗原提示と共刺激経路からの刺激により、T細胞は活性化する。Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4)は活性化したT細胞に発現する抑制性分子であり、共刺激経路を阻害することによりT細胞の活性化を抑制する。CTLA-4は、自己免疫疾患や動脈硬化などの慢性炎症が関与する病態の抑制に関わることが報告されているが、腹部大動脈瘤の病態における役割は明らかではない。

【目的】

本研究の目的は、アンジオテンシンⅡにより誘導される腹部大動脈瘤の形成におけるCTLA-4の役割を明らかにすることである。

【方法】

動脈硬化モデルであるアポリポ蛋白E遺伝子欠損マウス (*Apoe*^{-/-}マウス) とヒトCD2プロモーターを用いたマウス CTLA-4 の過剰発現マウス (CTLA-4-Tg) とを交配してCTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスを作製した。*Apoe*^{-/-}マウスおよびCTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスにアンジオテンシンⅡを投与して腹部大動脈瘤を作製し、以下の検討を行った。

- ・6週齢雄の*Apoe*^{-/-}マウスおよびCTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスに高脂肪食負荷を行い、14週齢より浸透圧ミニポンプを用いてアンジオテンシンⅡ (1000 ng/kg/min) を投与し、投与開始から4週間における下記の項目を評価した。①腹部大動脈瘤の発症率および死亡率を評価した。②腹部大動脈瘤の最大径や病変の程度を評価した。③腹部大動脈瘤病変部凍結切片における炎症性免疫細胞と血管弾性線維の破壊を評価した。
- ・アンジオテンシンⅡ投与開始から1週間後に腹部大動脈瘤病変部からRNAを抽出し、リアルタイムPCRにより炎症関連分子の遺伝子発現を評価した。また、リンパ組織から免疫細胞を分離し、フローサイトメトリーにより免疫細胞を評価した。

【結果】

CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスでは、コントロールの*Apoe*^{-/-}マウスと比較して腹部大動脈瘤の発症およびその破裂による死亡は有意に抑制され、その最大径は低値であった。腹部大動脈瘤病変における弾性線維の破壊は軽減されており、病変のスコアは有意に低値であった。さらに、大動脈瘤病変部のマクロファージおよびCD4陽性T細胞の浸潤は有意に抑制され、炎症関連分子の遺伝子発現の低下を認めた。両群間における体重および収縮期血圧には有意差を認めなかった。

アンジオテンシンⅡの投与は、*Apoe*^{-/-}マウスの脾臓における CD44^{high}CD62L^{low} エフェクター-T 細胞を増加させたが、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスではこの細胞集団の増加は認めず、*Apoe*^{-/-}マウスと比べて有意に少なかった。傍大動脈リンパ節においても、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスでは *Apoe*^{-/-}マウスと比較して CD44^{high}CD62L^{low} エフェクター-T 細胞は有意に少なかった。アンジオテンシンⅡの投与は、*Apoe*^{-/-}マウスの脾臓における炎症惹起性のインターフェロン- γ 産生 T 細胞を増加させたが、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスではこの細胞集団の増加は認めず、*Apoe*^{-/-}マウスと比べて有意に少なかった。アンジオテンシンⅡの投与は *Apoe*^{-/-}マウスの脾臓の樹状細胞を活性化させたが、CTLA-4-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスではその活性化は認めなかった。

以上の結果より、CTLA-4 分子は T 細胞および樹状細胞による炎症性免疫反応を制御することで、大動脈瘤形成の抑制に寄与すると考えられた。

【考察】

CTLA-4 の過剰発現は、T 細胞、樹状細胞およびマクロファージにより惹起される炎症性免疫応答を抑制することで血管弾性線維の破壊を軽減し、大動脈瘤の病態進展の抑制に寄与すると考えられた。

大動脈瘤の進行による破裂は死亡率が極めて高く、その抑制のためには外科的治療が行われるが、高齢者では手術に伴う合併症のリスクが高く、非侵襲的な内科的治療法の開発が望まれている。CTLA-4 Ig は CTLA-4 と類似の作用を有し、関節リウマチの治療薬として既に臨床使用されているが、重篤な副作用の頻度は低く、病態進展の抑制に有効である。CTLA-4 Ig を用いた治療など、CTLA-4 分子を標的とした新規治療法の開発につながる事が期待される。

【結論】

CTLA-4 は炎症性免疫応答を抑制することにより、腹部大動脈瘤の形成および関連死亡の抑制に関わることが明らかになった。

本研究は、腹部大動脈瘤における CTLA-4 の役割を研究したものであるが、従来明らかでなかった、CTLA-4 による免疫抑制と大動脈瘤形成について重要な知見を得たものとして価値ある集積である。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。