

## 論文の内容の要旨

論文題目 Imbalance of T-Cell Subsets in Angiotensin II-  
Infused Hypertensive Rats with Kidney Injury

和 訳 アンジオテンシン II 投与高血圧腎障害ラットに  
おける T細胞サブセットのインバランス

氏 名 邵 菁

SHAO JING

### 【背景】

従来、レニン・アンジオテンシンシステム (RA 系) は高血圧症における研究の中心となってきた。このシステムは、血圧及び水、電解質の平衡など、様々な腎機能を調節する際に重大な役割を果たしている。RA 系の障害は、高血圧症、腎不全、及び鬱血心不全の病態生理学に深く関わっている。アンジオテンシン II (Ang II) によって引き起こされる細胞機能変化のほとんどは、Ang II がアンジオテンシン II (Ang II) 1 型受容体 (腎臓中の主要な Ang II 受容体) に作用することによるものである。Ang II が血圧、イオン輸送に影響を及ぼし、成長因子として働くことも、大部分は AT1 受容体による作用として説明でき、この受容体の機能を阻害することは様々な腎症において効果的であることが明らかにされている。従来、RA 系を阻害することによる腎保護作用の機序として、血行動態への影響、糸球体のバリアー機能の改善などが注目されてきた。一方、最近では心筋炎、移植臓器の慢性拒絶反応及び抗基底膜腎炎などの研究により、Ang II の免疫系への作用が認識されてきている。特に AT1 受容体がマクロファージと T 細胞に存在すること、Nataraj らによる最近の研究における RA 系による calcineurin-依存性の T 細胞の免疫応答の調節などが示されたことから、Ang II の免疫調節作用として T 細胞に対する直接的な影響が注目を集めている。

活性化された T 細胞は、間質性腎炎、糸球体腎炎を始めとする様々な腎障害を引き起こすが、このような病態におけるヘルパーT (Th) 細胞の応答は、Th1 と Th2 に大別される。Th1 細胞は、主に interleukin-2 (IL-2) 及び  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN) を主に分泌する。一方、Th2 細胞は、主に interleukin-4 (IL-4)、interleukin-5 (IL-5) 及び interleukin-10 (IL-10) を分泌するとされている。Fernandez-Castelo らは *in vitro* の研究で、Ang II 刺激によってヒトリンパ球のバランスが Th1 優位となることを報告している。本研究の目的は、Ang II 持続投与腎障害モデルを用い、生体内での T 細胞サブセットのバランスが Ang II によって変化を受けるかどうかを調べ、更にアンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (ARB) が腎障害及び Ang II により引き起こされた T 細胞のインバランスを改善するかどうかを検討することである。

#### 【材料と方法及び結果】

Ang II 持続投与尿細管間質腎症モデルは、ミニポンプによってアンジオテンシン II を 2 週間皮下投与 (435 ng/kg/min) することにより惹起した。実験動物は、以下の 5 群を作成した。I 群：高用量 ARB olmesartan (10 mg/kg/day) 投与 Ang II ラット (n=8)；II 群：低用量 ARB olmesartan (1mg/kg/day) 投与 Ang II ラット (n=8)；III 群：Ang II ラット (n=8)；IV 群：非特異血管拡張薬 hydralazine (15 mg/kg/day) 投与 Ang II ラット (n=8)；V 群：vehicle 投与ラット (n=8)。7 及び 14 日後に、血圧、血液尿素窒素 (BUN)、蛋白尿を測定し、また組織学的解析などを行った。実験に用いたラットはすべて、Ang II 投与開始前に血圧、BUN、尿蛋白いずれも正常であることを確認した。血圧は、Ang II 投与で著しく上昇した。Hydralazine、低用量 olmesartan 及び高用量 olmesartan は、7 病日目及び 14 病日目の血圧を有意に低下させた。Ang II 投与ラットは、7 病日及び 14 病日に蛋白尿を発症したが、高用量 olmesartan は蛋白尿を著明に減少させた。Ang II 投与は、BUN レベルのわずかな増加を引き起こした。高用量 olmesartan は様々な異常を最も有効に是正した。

第 14 病日において、ラットを屠殺し、sieving 法により脾臓細胞を分離し、カラムによって T 細胞を精製し、これを初代培養し PMA 及び ionomycin、monensin によって刺激した。培養上清を 48 時間後に回収し、ELISA キットによりサイトカイン含有量を定量したところ、III 群の Ang II ラットにおいて Ang II の 2 週間投与による Th1 型サイトカイン ( $\gamma$ -IFN) の増加が認められた。この変化は、高用量 olmesartan 投与 (I 群) 治療によって正常化していた。対照的に、Th2 型サイトカイン (IL-4) は III 群ラットにて減少していたが、I 群の高用量 olmesartan 投与により正常値まで戻っていた。このような  $\gamma$ -IFN 及び IL-4 の変

化は、IV 群 hydralazine 投与ラットによっては III 群と比べ特に違いはみられなかった。更に、Ang II を正常ラットの T 細胞の培地に加えたところ、ELISA アッセイにより  $\gamma$ -IFN 濃度の増加と IL-4 濃度の減少が観察された。

同様に、単離したばかりの I、III、V 群ラットの T 細胞を ELISPOT プレートで 48 時間培養し、 $\gamma$ -IFN 分泌 T 細胞に対応するスポットを、解剖用顕微鏡で数えた。 $\gamma$ -IFN 分泌 T 細胞数は、Ang II 刺激によって増加していたが、I 群高用量 olmesartan では正常レベルに戻っていた。

第 14 病日において、各群ラットの脾臓と腎臓の RNA を抽出し、 $\gamma$ -IFN と IL-4 の mRNA 量について、リアルタイム定量 PCR にて検討したが、いずれの結果も ELISA アッセイのデータを裏付けるものであった。

腎病変の組織学的分析は、様々な抗体を用いた avidin-biotin 間接免疫組織染色により行った。尿細管間質 (TI) の障害は PAS、 $\alpha$ -SMA、JG-12 染色によって評価した。また、TI 細胞の DNA 断片化によるアポトーシスと、代償的な増殖は TUNEL、PCNA 染色によって検出した。マクロファージ及び CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 細胞の TI 領域への浸潤は、ED1、OX35、G28 免疫染色により検討した。Ang II ラットと比べて、olmesartan 投与を受けたラットの腎組織において、尿細管間質の障害、TI 細胞のアポトーシス及び代償的な増殖の増加、マクロファージ及び T 細胞浸潤の著明な改善が認められた。

#### 【考察】

本研究では、Th 細胞サブセットのインバランスに対する Ang II の影響を明らかにすると共に、Ang II を介した高血圧性尿細管間質障害モデルについて検討した。ELISA 法及び定量的 PCR 分析の両方により、Ang II 投与ラットにおける Th1 型サイトカイン ( $\gamma$ -IFN) の増加と Th2 型サイトカイン (IL-4) の減少を実証することができた。免疫系に及ぼす Ang II の直接的な作用は最近注目される分野となっている。当該研究におけるモデル動物中のサイトカイン・プロフィールは、従来 *in vitro* の研究で示された Ang II による Th1 優位反応が、生体内でも起こり得ることを明らかにした。

マクロファージを含む単核食細胞は、炎症において中心的な役割を果たしている。免疫系の T 細胞は、この機能を直接調節する。本研究は、T 細胞とマクロファージの尿細管間質障害への関与を示している。マクロファージは、Th1 型サイトカイン ( $\gamma$ -IFN) により活性化され、最終的に組織を破壊する。本研究では、Ang II 投与ラットの尿細管間質障害部位における ED1<sup>+</sup>単核細胞や CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 細胞の浸潤が、 $\gamma$ -IFN の増加と有意な相関性を示した。更に、マクロファージと T 細胞の浸潤は、AT1 受容体の阻害によって抑制され、T 細胞バランスの回復と

平行していた。以上の結果は、このモデルにおける Ang II-Th1-マクロファージの関与を強く示唆している。

このモデルにおいて、Ang II が引き起こした Th サブセットのインバランスが間接的なものであるか、あるいは AT1 受容体特異的なものであるかどうかを判断するために、私たちは olmesartan (ARB) を使用した。高用量 olmesartan は Ang II によって引き起こされた TI の障害を著しく改善し、TI の形態学変化の改善は、 $\alpha$ -SMA の *de novo* expression の抑制を伴っていた。また、傍尿細管毛細管の喪失や、TI 細胞のアポトーシス及び代償的な増殖など尿細管障害を反映するマーカーも、高用量 olmesartan 投与によって減少していた。一方、hydralazine は血圧調節作用を示したものの、蛋白尿及び他の症状に対してはあまり改善作用を示さなかった。この結果、ARB による本モデルの病態改善の機序は、少なくとも部分的には Ang II 特異的かつ血圧非依存性であることが示唆された。

本研究では、培養 T 細胞のサイトカイン産生に対する Ang II の直接刺激作用が示され、また、olmesartan による Ang II 作用の抑制が示された。Ang II は、病態を発症している生体において、naïve T 細胞を活性化 T 細胞に分化させる役割をする可能性があると考えられた。ELISPOT アッセイによって明らかにされた  $\gamma$ -IFN 分泌 T 細胞数の増加は、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 細胞の TI 局所への浸潤の増加と一致していた。これは、Ang II が T 細胞を直接活性化し、病原性の Th1 型サイトカインを産生し、器官障害を引き起こしている可能性を示すものと考えられた。更に、AT1 受容体を介して Ang II が引き起こしたサイトカイン・プロファイルの変化を確認し、olmesartan 投与によって  $\gamma$ -IFN 及び IL-4 の発現プロファイルが正常に戻ったことは、本モデルの高血圧性尿細管間質障害の病因に Ang II が直接的に免疫細胞に作用した結果である可能性を強く示唆した。

結論として、本研究では、T 細胞バランスの調節に対する Ang II の直接的な役割を検討した。Th 細胞サブセットのインバランスは、Ang II 持続投与によって引き起こされた高血圧性尿細管間質障害に関連していた。ARB の有益な影響のうちのいくつかはその免疫調節反応によって説明されると考えられた。今後、ヒト T 細胞サブセットのインバランスにおける ARB の役割と Ang II の免疫系に果たす役割の詳細なメカニズムの解明が、高血圧に関連する腎疾患の治療に貢献することが期待される。