

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名

兵頭 徹也



論文題目

「制御性 T 細胞の集積による肉芽組織形成と血管新生促進  
における mPGES-1 の役割」

指導教授承認印

武田 啓



# 制御性 T 細胞の集積による肉芽組織形成と

## 血管新生促進における mPGES-1 の役割

氏 名 兵頭 徹也

### [背景]

血管新生(angiogenesis)とは既存の血管から新しく血管が形成される過程のことである。血管新生は発生、炎症、腫瘍増殖だけでなく、創傷や胃潰瘍などの組織修復にも関与する。この血管新生は様々な内因性の因子により制御されているが、プロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub> を含むプロスタグランジン (PG) はその一つである。PG はシクロオキシゲナーゼ (COX) (COX-1 または COX-2) とそれぞれの合成酵素により合成される。我々は血管新生が COX-2 によって誘導され、選択的 COX-2 阻害剤の投与により抑制されることを報告した。さらに COX-2 誘導血管新生は血管内皮増殖因子 (VEGF) 発現と関連している。膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素-1 (mPGES-1) は、炎症状態において PGE<sub>2</sub> の合成を特異的に触媒する酵素である。mPGES-1 欠損マウスでは肉芽形成と血管新生が減弱し、さらにマウスの胃潰瘍治癒時の血管新生に関与していることから、mPGES-1 由来の PGE<sub>2</sub> が生体内での血管新生を媒介することが示唆される。

一方、制御性 T 細胞 (Treg) は、免疫寛容と組織の恒常性に関与する抗炎症性作用を示す T 細胞のサブセットとして知られ、CD4 と CD25 [インターロイキン (IL) -2 サイトカイン受容体] の表面マーカーと転写因子 Forkhead box protein 3 (Foxp3) を発現するという特徴がある。Treg 欠損マウスでは皮膚創傷の閉鎖が遅れ、COX 阻害薬である aspirin は、皮下移植されたスポンジ組織における血管新生と肉芽形成を抑制し、肉芽組織における Foxp3+ Treg 細胞集積を減少させる。

### [目的]

これらの結果から、創傷誘導血管新生と肉芽組織形成促進には mPGES-1 による Treg 集積が関与するのではないかという仮説をたて、その可能性を検証するために血管新生を定量的に評価するスポンジ移植モデルを用いて、本研究を計画した。

### ⑤組織学および免疫組織化学

組織検体はヘマトキシリン・エオジン (H&E) で染色するか、免疫組織化学のために処理した。後者は切片を抗 CD31 抗体 (ウサギポリクローナル; Abcam, Cambridge, MA, USA)、トランスフォーミング成長因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )

(Abcam)、及び Foxp3 (eBioscience) で染色した。免疫反応性シグナルは 3,3'-ジアミノベンジジンで検出し、標本はメイヤーのヘマトキシリンまたはメチルグリーンで対比染色を行った。顕微鏡 (Biozero BZ-700 Series; Keyence, 大阪、日本) を用いて H&E または免疫染色された切片の画像を撮影した。CD31 抗体で染色した個々の微小血管を 5 か所の高倍率視野 (400 倍) で数え、微小血管密度 (MVD) は観察面積あたりの微小血管数 (血管数/視野) として表した。

### ⑥免疫蛍光分析

切片をウサギ抗マウス mPGES-1 モノクローナル抗体 (Abcam)、ラット抗マウス CD68 抗体 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)、ウサギ抗マウス TGF- $\beta$  ポリクローナル抗体 (Abcam)、ヤギ抗マウス VEGF ポリクローナル抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、またはラット抗マウス Foxp3 (eBioscience) を用いて 4°C で一晩インキュベートした。その後、切片を二次抗体の混合液で室温にて 1 時間インキュベートした。Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-rat IgG, Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG, および Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG は Molecular Probes (Eugene, OR, USA) から入手した。画像の撮影には蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-700; Keyence, 大阪、日本) を用いた。標識後、高倍率 5 視野 (倍率 400 倍) を無作為に選択し陽性細胞数を数えた。

### ⑦定量的リアルタイム RT-PCR

mPGES-1、CD31、VEGF、TGF- $\beta$ 、Foxp3、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) をコードする転写物をリアルタイム RT-PCR 分析により定量化した。定量 PCR の増幅には TB Green Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus; タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を使用した。遺伝子特異的プライマーは GenBank のデータを基に Primer 3 ソフトウェアを用いて設計した。プライマーの配列は以下の通りである。mPGES-1 は 5' -AGGATGCGCTGAAACGTGGAG-3' (センス) および 5' -CCGAGGAA-GAGGAAA GGATAG-3' (アンチセンス)。CD31 については 5' -ACTTCTGAACTCC AACAGCGA-3' (センス) 及び 5' -CCATGTTCTG GGGTCTTTAT-30 (アンチセンス); VEGF については 5' -GAGAGGCCGAAGTCCTTT-3' (センス) 及び 5' -TTGGAACCGGCATCTTTATC-3' (アンチセンス)。TGF- $\beta$  については 5' -AACAAATTCCTGGCGTTACCTT-3' (センス) 及び 5' -

TGTATTCCGTCTCCTTGTTTC-3' (アンチセンス); Foxp3 については 5' -  
AGTGCCTGTCCTCAATGTC-3' (センス) 及び 5' -AGGCCA  
GCATAGGTGCAAG-3' (アンチセンス) であった。GAPDH は 5' -ACATCA  
AGAAGGTGGTGAAGC-3' (センス) および 5' -AAGGTGGAAGA  
GTGGAGTTG-3' (アンチセンス) であった。データは GAPDH の発現量に対して  
正規化した。

#### ⑧酵素結合免疫吸着法(ELISA)

滲出液はスポンジ肉芽組織の重量を測定した後、1ml シリンジでサンプリングし  
た。滲出液中の TGF- $\beta$  濃度は、ELISA キット (R&D 社製) を用いて測定した。

#### ⑨統計解析

全ての結果は平均値±標準偏差 (SD) で表し、GraphPad Prism ソフトウェアバ  
ージョン 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) にて統計解析を行った。デ  
ータは両側スチューデントの t 検定を用いて独立した 2 群間で比較し、一元配置分  
散分析に続いてテューキーの事後検定を用いて複数群間で比較した。p 値<0.05 を  
統計的に有意とした。グラフでは、有意性をアスタリスクで示した。\*p<0.05,  
\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, and \*\*\*\*p<0.0001。

#### [研究結果]

##### ①mPGES-1<sup>-/-</sup>マウスにおける肉芽形成の抑制

スポンジ移植後 14 日目に WT ではスポンジ周囲に厚い肉芽組織が形成されたが、  
mPGES-1<sup>-/-</sup>では薄い肉芽組織が観察された。7、14 日目の WT のスポンジ重量は、  
mPGES-1<sup>-/-</sup>のそれより有意に重かった。肉芽形成は組織学的検査で評価し、肉芽組  
織面積は WT より mPGES-1<sup>-/-</sup>で少なかった。肉芽組織中の mPGES-1 mRNA 発現  
は WT では移植後に増加したが、mPGES-1<sup>-/-</sup>では予想通り発現は消失していた。  
mPGES-1 発現を免疫組織染色で解析すると、肉芽組織内に mPGES-1<sup>+</sup>で炎症様細  
胞が多数集積した。

蛍光免疫二重染色をすると、CD68<sup>+</sup>細胞に mPGES-1 が発現し、マクロファージ  
が mPGES-1 を発現していた。mPGES-1 は Foxp3 とは共局在せず、また Foxp3<sup>+</sup>  
細胞は CD68<sup>+</sup>細胞に比べて減少していた。

##### ②mPGES-1<sup>-/-</sup>マウスにおける血管新生抑制と Treg<sup>+</sup>細胞集積抑制

肉芽形成に血管新生が必要なことから CD31 (内皮細胞マーカー) の発現を検討  
した。RT-PCR 解析の結果、14 日目の CD31 および VEGF mRNA レベルは WT よ  
りも mPGES-1<sup>-/-</sup>で低かった。また血管新生を CD31 免疫染色による血管内腔形成

の定量化により評価すると、CD31+血管数（血管密度）はWTよりもmPGES-1-/-で減少した。

Foxp3 mRNA レベルはWTで7、14日目に発現が増加し、mPGES-1-/-よりも高かった。免疫染色解析では、Foxp3+細胞数はWTがmPGES-1-/-よりも多かった。また肉芽組織のTGF- $\beta$  mRNA レベルの測定および免疫組織学的評価をしたところ、WTに比べmPGES-1-/-で低かった。mPGES-1-/-のスポンジ滲出液中のTGF- $\beta$ 濃度は、WTのそれと比較して低かった。免疫染色ではTGF- $\beta$ またはVEGFの発現がFoxp3+細胞と共局在した。また肉芽組織中のFoxp3+/TGF- $\beta$ +およびFoxp3+/VEGF+細胞数は、WTよりもmPGES-1-/-で少なかった。

### ③Treg 細胞数低下による血管新生および肉芽形成抑制

抗CD25または抗FR4抗体を用いてWTおよびmPGES-1-/-のTregを枯渇させることにより、Tregが肉芽形成および血管新生に寄与するかどうかを検討した。WTに抗CD25または抗FR4抗体を投与すると、コントロール群と比較して14日目のスポンジ重量が減少した。しかしmPGES-1-/-のスポンジ重量には、コントロール群との間に有意差はなかった。CD31 mRNA レベルおよび血管密度によって示される血管新生は、抗CD25または抗FR4抗体投与群WTにおいて、コントロール群と比較して減弱された。肉芽組織におけるFoxp3 mRNA レベル及びFoxp3+細胞数は、抗CD25または抗FR4抗体投与群WTにおいて、コントロール群と比較して低かった。これらは抗CD25または抗FR4抗体投与群WTにおけるTGF- $\beta$ 及びVEGF mRNA レベルの低下と関連していた。抗CD25または抗FR4抗体投与群とコントロール群の間では、mPGES-1-/-のスポンジ重量、Treg集積、血管新生、及びTGF- $\beta$ とVEGFの発現に有意差はなかった。

### ④PGE2 投与による肉芽組織の血管新生亢進とTreg 集積

mPGES-1によって産生されるPGE2が肉芽組織の血管新生とTregの集積に寄与しているかどうかを検討した。WTおよびmPGES-1-/-のスポンジにPGE2を局所投与したところ、vehicle投与時と比較してスポンジ重量、CD31 mRNA 発現および血管密度で測定した血管新生、Treg集積、肉芽組織およびFoxp3+ TregにおけるTGF- $\beta$ およびVEGF発現レベルの上昇が見られた。

### [結論]

我々のデータはmPGES-1由来のPGE2が、Tregを肉芽組織に動員しTGF- $\beta$ とVEGFを産生することにより創傷における血管新生を促進し肉芽形成を引き起こすことを示している。mPGES-1の誘導は皮膚創傷における血管新生を促進させる戦略となりうる可能性がある。