

学位論文題名

Effects of interleukin-17A on atherosclerosis formation and plaque characteristics

(インターロイキン-17Aが動脈硬化巣形成およびその性状に及ぼす影響の検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】近年、食生活の欧米化や人口の高齢化に伴い、高血圧、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病の患者数が増加している。生活習慣病が原因と考えられる脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患による死亡率は年々増加しており、日本では癌に次ぐ死因となっている。従って、動脈硬化の発症機序を明らかにし、より効果的な治療法を開発することは重要な研究課題の一つである。

動脈硬化は主に血管壁への変性したコレステロールの蓄積により形成される。その病態には泡沫化マクロファージや活性化T細胞などの細胞浸潤や、それらにより産生されたサイトカインなどによる炎症の存在が深く関与していることが明らかにされてきている。まさに動脈硬化症は、慢性炎症性疾患の1つであると言える。

Interleukin-17A (IL-17A) は、主にTh17細胞から産生される炎症性サイトカインである。多発性硬化症や関節リウマチなどの自己免疫疾患は、従来Th1細胞がその疾患の進展に重要であると考えられていたが、近年、IL-17A欠損マウスでコラーゲン誘導性関節リウマチ (CIA) や、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) が抑制されることや、Interferon- γ (IFN- γ) 欠損マウスでEAEやCIAの病態が悪化することなどから、Th17細胞が多くの自己免疫疾患の発症に主要な役割を果たしていることがわかってきた。

動脈硬化の病態においても炎症が重要な働きを持つことと、冠動脈アテローム性動脈硬化患者の病変部に浸潤したT細胞が、IL-17AとIFN- γ を共に産生することが報告されていることから、本研究では広範に用いられている動脈硬化自然発症モデルであるapolipoprotein E欠損 (ApoE KO) マウスとIL-17欠損マウスのダブルノックアウトマウス (ApoE/IL-17A dKO) を作成し、動脈硬化の進展におけるIL-17Aの役割について検討を行った。

【材料と方法】IL-17A KO マウスをApoE KO マウス (共にC57BL/6 バックグラウンド) と交配し、ApoE/IL-17A dKO マウスを作成した。動脈硬化を発症させるために、angiotensin II (AII) を持続投与することで血圧を上昇させ、全身性の炎症を誘導し、動脈硬化および動脈瘤を発症させるAII持続投与モデルと、マウスに高脂肪食 (high fat diet, HFD) を給餌し、血中のコレステロール値を上昇させることで顕著なアテローム形成を示す動脈硬化を発症させるHFDモデルを用いた。AII持続投与モデルでは16~18週齢、体重27~33gのApoE KO マウスの背部皮下に浸透圧ポンプを植え込み、AII (1.6 μ g/kg/min) を4週間持続投与した。HFDモデルでは、6~8週齢の雄のApoE/IL-17A dKO マウスおよびコントロールであるApoE KO マウスに高脂肪食を8または16週間与えた。摘出した大動脈は、脂肪染色であるOil red O染色を用いて動脈硬化病変部を染色した。HFDモデルにおいて、大動脈基部はOil red O染色およびマクロファージのマーカーであるMOMA2と血管平滑筋細胞のマーカーである α -smooth muscle actin

(α -SMA) の免疫組織化学染色により、病変部の性状を解析した。また、血清を採取し、血中コレステロール値を測定した。更に、脾臓から CD4⁺ T 細胞を magnetic-activated cell sorting (MACS) 法で分離し、phorbol 12-myristate 13-acetate/ ionomycin を添加した 10%FCS/ RPMI 培地で 72 時間培養した後、ELISA 法により培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。さらに、6~8 週齢の雄の ApoE KO マウスに 12 週間 HFD を給餌し、その間、週 2 回リコンビナント IL-17A を投与し (2 μ g/mouse) 、病変の形成にどのような影響が見られるか検討した。

【結果】AII 持続投与モデルにおいて、ApoE KO マウスと比較して ApoE/ IL-17A dKO マウスにおける腹部大動脈瘤の形成が亢進する傾向が見られた。HFD モデルでは、HFD を 8 または 16 週間与えた ApoE/ IL-17A dKO マウスにおいて、大動脈病変部面積が ApoE KO マウスに比べていずれも有意に増加していた (8 週; 16.1% vs. 6.8%, $p < 0.005$, $n = 23, 22$ 16 週; 21.2% vs. 33.7%, $p < 0.001$, $n = 24, 34$)。また、高脂肪食を 8 週間与えた ApoE/ IL-17A dKO マウスにおいて、大動脈基部における病変部面積が ApoE KO マウスに比べて有意に増加し (14001.6 μ m² vs. 8809.7 μ m², $p < 0.05$, $n = 14, 7$)、さらに病変部面積に対する MOMA2 陽性の面積の割合は増加し、 α -SMA の割合は減少していた。一方、HFD を与えたマウスの血中コレステロール値は各群間で差は認められなかった。また、HFD を給餌した ApoE KO マウスにおいて、CD4⁺ T 細胞培養上清中の IL-17A 濃度が普通食の ApoE KO マウスに比べ増加していた。更に、8 週間 HFD を与えた ApoE/ IL-17A dKO マウスにおいて、ApoE KO マウスと比較して脾臓 CD4⁺ T 細胞の培養上清中の IFN- γ 濃度が増加し、IL-5 の濃度は低下していた。最後に、IL-17A を投与した ApoE KO および ApoE/ IL-17A dKO マウスにおいて、IL-17A 非投与群に比べて大動脈病変部面積の割合が減少していた。

【考察】HFD モデルにおいて IL-17A の欠損で動脈硬化の病変形成が促進し、病変部の性状はマクロファージが多く、平滑筋細胞が少ない脆弱なものになっていたことから、IL-17A は動脈硬化に対し保護的に作用すると考えられた。IL-17A の欠損による血中コレステロールへの影響がなかったことから、動脈硬化の増悪化は脂質代謝異常の促進によるものではないと考えられた。ApoE/ IL-17A dKO マウスの脾臓 CD4⁺ T 細胞において、動脈硬化の進展、増悪化を促進させる IFN- γ (Th1 サイトカイン) の産生が増加していたことから、IL-17A の欠損による動脈硬化の悪化には主に IFN- γ が関与しているものと考えられる。また、ApoE/ IL-17A dKO マウスの脾臓 CD4⁺ T 細胞において、抗動脈硬化作用があると報告されている Th2 サイトカインの IL-5 が減少したことも、動脈硬化を促進させた一因であると考えられる。更に、ApoE KO および ApoE/ IL-17A dKO マウスに IL-17A を投与することにより病変部の形成が抑制されたことから、IL-17A は活性化 T 細胞からの IFN- γ の産生を抑制する一方、IL-5 の産生を促進することで、動脈硬化の発症・進展に抑制的に作用すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	清野	研一郎
副査	教授	西村	孝司
副査	教授	上出	利光
副査	准教授	松本	美佐子

学位論文題名

Effects of interleukin-17A on atherosclerosis formation and plaque characteristics

(インターロイキン-17Aが動脈硬化巣形成およびその性状に及ぼす影響の検討)

学位論文において、申請者は、高脂肪食による動脈硬化の発症・進展において interleukin-17A (IL-17A)が主に interferon- γ (IFN- γ)や interleukin-5(IL-5)を介して保護的に作用することを示唆した。

申請者は、はじめに動脈硬化モデルマウスである apolipoprotein-E 欠損マウス(ApoE KO マウス)と IL-17A 欠損マウスを交配し、ApoE/ IL-17A 二重欠損(dKO)マウスを作成した。angiotensin II を投与し、高血圧による動脈硬化の発症を誘導した場合には、IL-17A の欠損による影響はほとんど見られないことを示唆した。しかし、高脂肪食による高脂血症の促進により誘導される動脈硬化において IL-17A の欠損により有意に動脈硬化が悪化することを示した。次いで、大動脈基部において免疫化学染色によりプラークの性状を解析した結果、IL-17A の欠損によりマクロファージの集積が亢進し、fibrous cap の形成が抑制された脆弱なプラークが形成されることを示唆した。また、IL-17A の欠損により、脾臓 CD4⁺ T 細胞において動脈硬化に対し促進的に作用する IFN- γ の産生が亢進し、保護的に作用する IL-5 の産生が減少していることを示唆した。次いで、マクロファージの泡沫化を抑制することで動脈硬化に対し保護的に作用する anti-MDA-LDL IgG₁ 抗体価が、ApoE/ IL-17A dKO マウスにおいて減少することを示唆した。さらに、ApoE KO マウスおよび ApoE/ IL-17A dKO マウスに IL-17A を投与することにより、プラークの形成が抑制されることを示した。これらの結果より、IL-17A は脾臓 CD4⁺ T 細胞からの IFN- γ の産生や IL-5 の産生などを制御することにより、動脈硬化の発症・進展において保護的に作用することを示唆した。また、動脈硬化における IL-17A の作用について相反する報告がなされている点について考察を行い、それぞれの実験系における問題点や、動脈硬化の進行段階によって IL-17A の作用が変化する可能性について示唆した。口頭発表の後、副査の松本准教授より、1) ApoE KO マウスと ApoE/ IL-17A dKO マウスでは、動脈硬化の発症時期に差があるか、2) IL-17F は IL-17A と共通の受容体を認識するなど、働き

が類似していると言われているが、IL-17A の欠損による IL-17F への影響はあるかについて、質問がなされた。次に、副査の西村孝司教授から、1) 申請者は脾臓におけるサイトカインの産生について検討しているが、精製した CD4⁺ T 細胞を用いているか、2) IL-17A の標的は T 細胞のみか、3) IL-17A は IFN- γ を介して動脈硬化の形成に影響を与えていることを示唆しているが、IFN- γ の阻害抗体の投与実験は行ったか、4) CD8⁺ T 細胞と動脈硬化の関係はどのようになっているか、5) IL-17A/ IFN- γ double producer 細胞はどのような機能を果たすと考えられるか、6) 動脈硬化において、Tc17 細胞の関与はあるかについて質問がなされた。次に、副査の上出教授から 1) IL-17A の標的細胞について、2) rat-anti-mouse-IFN- γ 中和抗体の投与実験について、control 抗体投与群と比較して差が見られなかった理由について、3) 動脈硬化の形成はどの時期から始まるかについて質問がなされた。最後に、主査の清野教授から、1) マウスにおける動脈硬化と、ヒトでの動脈硬化は同じと見て良いのか、2) マウスでは脾臓を用いてサイトカインの産生を見ているが、ヒトでは末梢血を用いることが多いと思われるが、他にヒトではどのような細胞を用いた報告があるか、3) 大動脈基部において他の免疫細胞の免疫化学染色を行ったか、4) サイトカインや免疫細胞を標的とした動脈硬化の治療は進んでいるかについて質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は、自己の研究結果および文献を引用した考察に基づき、概ね妥当な回答を行った。

本研究は、主に高脂血症により誘導される動脈硬化の進展において、IL-17A が IFN- γ などのサイトカインバランスを制御することにより、動脈硬化に対し保護的に作用することを示唆するものである。また、本研究結果は、英文科学雑誌 *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* に掲載されている。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。