

## 論文の内容の要旨

論文題目 Syk 欠失マウスにおける動脈硬化と炎症

氏名 津久井 大輔

動脈硬化症では脂質異常症のみならず炎症が重要な役割を果たしている。HMG-CoA 還元酵素阻害薬による LDL コレステロール低下は心血管性イベントを大きく低下させるが、完全に消失することではなく残余リスクと呼ばれる種々の因子が考えられ、その 1 つとして炎症が挙げられている。動脈硬化症の発症・形成においても白血球の動員・遊走・浸潤、炎症性サイトカインやケモカインの産生等の炎症性病態が深く関与している。複数の臨床試験から動脈硬化進展と血液における炎症反応の関連が示され、HMG-CoA 還元酵素阻害薬に関しても血清脂質の改善に加えて抗炎症作用がその重要な機序であることが示唆されていた。さらに近年、ヒトを対象にした臨床試験において抗 IL-1 $\beta$  モノクローナル抗体によって心血管系イベントの抑制効果が報告された。

そこで、我々は動脈硬化症における炎症を検討するにあたり、炎症細胞浸潤における rolling や細胞接着、細胞運動性やインフラマソーム活性化と IL-1 $\beta$  産生に関わることが報告されているなど、動脈硬化の様々な点で関与すると推定される Spleen tyrosin kinase (Syk) に注目して検討を行うこととした。Syk 阻害薬は様々な疾患で臨床応用されているが動脈硬化症ではヒトを対象にした動脈硬化症や心血管系イベント抑制に関する臨床試験はなく、マウスにおける Syk 阻害薬による動脈硬化抑制の報告に限られる。Syk 阻害薬を用いた動脈硬化に関する報告では、動脈硬化巣や動脈硬化巣内のマクロファージの減少、細胞運動性の低下、酸化 LDL 貪食能低下、骨髄由来マクロファージへの分化抑制など Syk が動脈硬化促進的に作用する報告が多い。その一方で、IL-1 $\beta$  を始めとした炎症性サイトカイン産生については Syk 阻害薬や Syk 遺伝子欠失骨髄マクロファージを用いて Syk が促進的、抑制的に作用するとした双方の報告があり議論が分かれている。また、Syk 阻害薬についてはプロテインキナーゼが高い構造的相同性を有しているため本来とは異なる標的分子に作用する off-target 効果が考えられる。そこで、本研究では Syk が動脈硬化に及ぼす影響を検討するにあたり、Syk 遺伝子欠失マウスを用いて Syk 遺伝子欠失マウスによる動脈硬化抑制、マクロファージにおける細胞運動性、泡沫細胞化やコレステロール結晶形成、IL-1 $\beta$  産生に注目して検討した。

### (方法)

1. Syk<sup>flox/flox</sup>Rosa26CreER<sup>(T2)/+</sup>LDLR<sup>-/-</sup>マウスを作製し、生後 7-8 週で tamoxifen 4 mg 3 日間連続経口投与を行い Syk 遺伝子を欠失させた。その後、生後 8 週より高脂肪食を 16 週間投与することで動脈硬化を惹起し、生後 24 週でマウスを心臓および大動脈を摘出し

た。心臓については凍結切片を作製、大動脈洞における動脈硬化病変の体積を算出した。大動脈に関しては、大動脈起始部から腎動脈分岐部までの動脈硬化病変の面積を求めた。これらに関して、 $Syk^{+/+}$ 群、 $Syk^{+/del}$ 群、 $Syk^{del/del}$ 群で比較した。また、生後 24 週における体重および脂質プロファイルについても同様に比較を行った。

2. 骨髄由来マクロファージ (BMDM) の細胞運動性を Wound scratch assay を用いて細胞フリーゾーンに浸潤した細胞数および細胞の移動距離を測定し  $Syk^{+/+}$ 群および  $Syk^{del/del}$ 群で比較した。
3. BMDM のケモカイン依存遊走への影響を Transwell migration assay を用いて CCL2 刺激下において  $Syk^{+/+}$ 群および  $Syk^{del/del}$ 群で比較した。
4.  $Syk^{+/+}$ 群および  $Syk^{del/del}$ 群 BMDM を酸化 LDL 50  $\mu\text{g/ml}$  投与下で 24 時間培養後、Oil red O 染色を施行し泡沫細胞化の割合を算出、また Nile red 染色後にフローサイトメーターで平均蛍光強度を測定することで取り込まれた脂質を算出し、比較した。
5.  $Syk^{+/+}$ 群および  $Syk^{del/del}$ 群由来 BMDM を酸化 LDL 50  $\mu\text{g/ml}$  投与下で 1, 3, 14 日培養し、偏光顕微鏡により細胞内コレステロール結晶形成を観察、比較した。
6.  $Syk^{+/+}$ 群および  $Syk^{del/del}$ 群 BMDM を酸化 LDL, LPS, コレステロール結晶, ATP, Nigericin で刺激し、培養上清中の IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  を ELISA で測定した。
7.  $Syk^{+/+}$ 群および  $Syk^{del/del}$ 群 BMDM を LPS で刺激後の pro-IL-1 $\beta$  の発現を RT-PCR, 細胞溶解液中 pro-IL-1 $\beta$  の発現を ELISA で測定し比較した。
8.  $Syk^{+/+}$ 群、 $Syk^{+/del}$ 群および  $Syk^{del/del}$ 群のマウス腹腔内にコレステロール結晶 2 mg 投与し、6 時間後に腹腔内に浸潤した好中球および炎症性単球+腹腔内マクロファージをフローサイトメーターで測定、比較した。

#### (結果)

1.  $Syk$  遺伝子欠失による動脈硬化惹起 LDLR $^{-/-}$ マウスにおける動脈硬化の抑制効果  
 $Syk$  遺伝子欠失は体重や血清脂質値に影響を与えず、大動脈洞および大動脈における動脈硬化病変を抑制した。
2.  $Syk$  遺伝子欠失によるマクロファージの細胞運動性への影響  
細胞フリーゾーンに浸潤した細胞数および細胞の移動距離は共に  $Syk^{del/del}$ 群で有意に低下していた。
3.  $Syk$  遺伝子欠失によるマクロファージのケモカイン依存遊走への影響  
CCL2 100 ng/ml で刺激 3 時間後に移動した細胞数を測定したところ、 $Syk^{del/del}$ 群で有意に減少していた。
4.  $Syk$  遺伝子欠失による酸化 LDL の貪食に対する影響  
 $Syk^{+/+}$ 群と  $Syk^{del/del}$ 群で泡沫細胞化に有意な差はみられなかったが、取り込まれた脂質量は  $Syk^{del/del}$ 群で低下していた。

5. Syk 遺伝子欠失の細胞内コレステロール結晶形成に対する影響  
Syk<sup>+/+</sup>群と Syk<sup>del/del</sup>群で細胞内コレステロール結晶の形成に有意な差は認めなかった。
6. Syk 遺伝子欠失による BMDM における IL-1 $\beta$  産生への影響  
IL-1 $\beta$  産生は Signal 1 および Signal 2 と呼ばれる 2 種の刺激によって制御されている。Signal 1 は LPS 等により TLR4 等の受容体を介して NF- $\kappa$ B が活性化され、IL-1 $\beta$  の前駆体である pro-IL-1 $\beta$  や NLRP3 の産生を促す刺激である。Signal 2 はコレステロール結晶, ATP, Nigericin 等によって NLRP3 インフラマソームの活性化が起こり pro-IL-1 $\beta$  を IL-1 $\beta$  へと変換する刺激である。LPS 1, 10, 100 ng/ml で 24 時間刺激した後, 酸化 LDL で 6 時間, さらに ATP で 1 時間刺激を加えたところ, 培養上清で IL-1 $\beta$  の産生を認めた。同条件で Syk<sup>+/+</sup>群および Syk<sup>del/del</sup>群を比較したところ, 予想と反して Syk<sup>del/del</sup>群で IL-1 $\beta$  産生が有意に上昇していた。さらに, LPS 20 ng/ml およびコレステロール結晶または ATP, Nigericin で刺激したところ, 同様に Syk<sup>del/del</sup>群で IL-1 $\beta$  産生が有意に上昇していた。LPS 刺激, NF- $\kappa$ B 活性化により産生される TNF- $\alpha$  についても同様に Syk<sup>del/del</sup>群で有意に上昇していた。
7. Syk 遺伝子欠失による BMDM における pro-IL-1 $\beta$  産生への影響  
LPS 刺激のみで IL-1 $\beta$  産生が認められ, かつ Signal 2 として強力な刺激である ATP や Nigericin でも同様に差がみられたことから, Syk が Signal 1 に影響していると考え, LPS 20 ng/ml 刺激後に, pro-IL-1 $\beta$  の遺伝子発現および細胞溶解液中タンパク量を評価したところ, いずれも Syk 遺伝子欠失群で有意に上昇していた。
8. Syk 遺伝子欠失マウスにおけるコレステロール結晶腹腔内投与による炎症細胞浸潤への影響  
好中球数は Syk<sup>del/del</sup>群で増加傾向はみられるものの有意な差はみられなかったが, 炎症性単球+腹腔内マクロファージに関しては Syk<sup>del/del</sup>群において有意な増加がみられた。

#### (考察)

本研究において, Syk 遺伝子欠失により大動脈洞と大動脈壁における動脈硬化抑制が認められた。またその機序として, Syk 遺伝子欠失マクロファージにおける細胞運動性低下および酸化 LDL 貪食の低下が示された。一方で, Syk 阻害薬を用いた多くの既報と異なり Syk 遺伝子欠失マクロファージの IL-1 $\beta$  産生については抑制されず, むしろ促進する可能性が示された。細胞運動性, 酸化 LDL 貪食, IL- $\beta$  産生などの動脈硬化に関与する機能の変化において Syk がどのように作用しているかについては今後さらなる検討を要する。