

氏 名	中 村 潤
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 549 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	川崎病様血管炎マウスモデルにおける IL-10 遺伝子導入による血管炎抑制およびその病態解明
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 寺 井 千 尋 (委 員) 教 授 大 槻 マミ太郎 教 授 山 形 崇 倫

論文内容の要旨

1 研究目的

川崎病は中型サイズの動脈、特に冠動脈に炎症が生じる汎血管炎であり、その発症の分子機構および治療法は確立されていない。川崎病発症因子の候補として考えられている *Candida albicans* (*C. albicans*) の培養上清から得られる可溶性多糖成分 (CAWS : *C. albicans* water soluble fraction) をマウスに投与することにより、大動脈起始部や冠動脈に血管炎を生じさせ、川崎病様の血管炎を誘導できることが報告された (CAWS 血管炎モデル)。しかし、一部の系統のマウスでは、血管炎発症に抵抗性を示し、CAWS 投与後の血漿 IL-10 濃度や大動脈の IL-10 mRNA 発現が上昇していた。このことから、IL-10 が血管炎発症に抑制的に働いている可能性が示された。CAWS は C 型レクチン受容体である Dectin-2 のリガンドと考えられており、Dectin-2 を介しての炎症惹起が本血管炎の中心機構と予想されている。しかし、CAWS による血管炎惹起、および IL-10 による血管炎抑制の詳細な分子機序は未だ解明されていない。そこで、*in vivo* においては CAWS 血管炎モデルを用いて、*in vitro* においてはマクロファージなどの培養細胞を用いて、川崎病における炎症惹起機構を解明し、IL-10 が新規治療法として有効か検討することを目的とした。

2 研究方法

in vivo 実験として、CAWS 血管炎マウスモデルを作製 (24 時間モデル、4 週モデル、8 週モデル) し、心臓超音波検査、血液・心臓のサンプリングを行なった。そして心機能などの表現系解析、大動脈起始部や冠動脈の組織学的評価、遺伝子発現解析を行なった。また、アデノ随伴ウイルス (AAV: Adeno-associated virus) ベクターを用いて IL-10 遺伝子を導入し、IL-10 によるそれらの抑制効果を検討した。

in vitro 実験として、マウスマクロファージ様株化細胞、脾細胞、腹腔マクロファージ、骨髄由来樹状細胞 (BMDCs)、骨髄由来マクロファージ (BMDMs) に対する CAWS 刺激を加え、サイトカイン・ケモカインなどの産生、それらの遺伝子発現の解析を行った。また、IL-10 の添加による効果も解析した。最近、CAWS 血管炎モデルにおいて、GM-CSF が重要な役割を果たすと報告されたため、BMDMs を GM-CSF と CAWS で共刺激実験を行い、サイトカイン・ケモカイン産生解析と細胞内シグナルを解析し、IL-10 によるそれらの抑制効果を検討した。

3 研究成果

CAWS 血管炎 4 週および 8 週モデルにおいて、心機能低下や左室内腔の拡大、大動脈弁閉鎖不全による逆流が観察された。組織学的解析では、大動脈弁周囲および冠動脈にマクロファージや好中球を主体とする炎症細胞の浸潤、および線維化を認めた。また、同部位における炎症性サイトカイン、ケモカイン、線維化マーカーの発現上昇も確認された。AAV ベクターを用いた IL-10 遺伝子導入を行い、CAWS 血管炎誘導を行ったところ、IL-10 遺伝子導入群ではコントロール群 (GFP 遺伝子導入) と比較して、心機能などの生理学的所見の増悪が抑制されると同時に、マクロファージを主とする炎症細胞浸潤や血管の線維化がほぼ完全に抑制された。さらに、炎症性サイトカイン、ケモカイン、線維化マーカーの発現上昇も抑制された。浸潤細胞のより詳細な解析を行ったところ、Dectin-2⁺CD11b⁺ マクロファージが浸潤していることが明らかとなり、IL-10 遺伝子導入群ではこの細胞の浸潤は抑制された。

次に、CAWS 血管炎惹起の機序を解明するために、*in vitro* で培養細胞に CAWS 刺激を加える実験を行なった。浸潤細胞の主体がマクロファージと考えられたため、マウスマクロファージ様株化細胞 J774、脾細胞、腹腔マクロファージ、BMDMs に対し CAWS 刺激を加えたが、予想に反して炎症性サイトカインの産生は見られず、一方で BMDCs に CAWS 刺激を加えたところ、炎症性サイトカインの産生が確認された。早期 (CAWS 投与数時間から数日) の GM-CSF 発現が血管炎発症に関与するという報告があったことや、CAWS 刺激によりサイトカイン産生が確認された BMDCs は、その作製過程において GM-CSF を添加することが必須であることから、GM-CSF が細胞の CAWS 感受性に何らかの影響を与えている可能性を考えた。そこで、BMDMs を GM-CSF と CAWS で共刺激を行なったところ、炎症性サイトカインの産生が確認され、Dectin-2 の発現も上昇した。次に、IL-10 による効果を検討したところ、炎症性サイトカインの産生が抑制されたが、Dectin-2 の発現は抑制されなかった。さらに Dectin-2 の下流のシグナル分子と考えられている分子を解析したところ、IL-10 は CAWS 刺激による ERK1/2 のリン酸化を抑制するが、Syk のリン酸化は抑制しなかった。

この機序を *in vivo* で検証するために、CAWS 早期モデル (CAWS 投与 6 時間、24 時間) を作製し、IL-10 遺伝子導入による効果を検討した。その結果、CAWS 投与マウスの心臓では炎症性サイトカインの発現上昇とともに GM-CSF や Dectin-2 の発現が上昇した。IL-10 遺伝子導入により炎症性サイトカイン発現上昇が抑制されたが、GM-CSF や Dectin-2 の発現は抑制されなかった。

以上の結果から、GM-CSF によりマクロファージでの Dectin-2 発現が誘導され、それによって CAWS への感受性が上昇して血管炎が惹起されるというメカニズムが明らかとなった。さらに、IL-10 が CAWS 血管炎の有望な治療標的となりうることが示された。

4 考察

川崎病を含め、血管炎は未だその原因や発症メカニズムが解明されていない疾患群である。本研究では、川崎病動物モデルの CAWS 血管炎モデルを用い、AAV による IL-10 遺伝子導入が血管炎とそれによって生じる心機能低下を抑制できることを示した。また、Dectin-2⁺CD11b⁺ マクロファージが血管炎部位に浸潤していること、心臓での GM-CSF の発現上昇とそれによる Dectin-2 発現誘導がマクロファージによる CAWS 誘導性炎症の惹起に関与すること、IL-10 が Dectin-2 の下流の ERK1/2 に作用し炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。

IVIG や抗 TNF- α 製剤投与によっても冠動脈瘤形成を抑制できない症例も存在することから、今回

示された IL-10 の血管炎抑制作用により、IL-10 が新たな治療標的の一つの有力な選択肢になりうると考えられた。一方、本モデルにおける IL-10 の抗炎症作用のより詳細な作用機序解析や、血管炎が大動脈起始部や冠動脈に限局している理由の検証も残された課題である。

5 結論

本研究で、AAV を用いた IL-10 遺伝子導入が川崎病様 CAWS 血管炎モデルの血管炎および線維化を抑制できること、GM-CSF によるマクロファージの Dectin-2 発現上昇が CAWS 血管炎誘導に重要であることを明らかにした。本研究結果より、既存の治療法で効果のない川崎病症例において、新規治療法として IL-10 の投与が有望であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

川崎病の動物モデルとして *C. albicans* 菌体の培養上清から得られる水溶性の多糖成分 (*C. albicans* water soluble fraction : CAWS) をマウスに投与する CAWS 血管炎モデル系において、IL-10 の役割が重要と考え、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた IL-10 遺伝子 (AAV-IL-10) 導入により CAWS 血管炎を抑制できるかを検討し、CAWS 血管炎を誘導する細胞や炎症性サイトカイン等の因子を解析した研究である。本研究は、①AAV ベクターによる IL-10 遺伝子の発現、②CAWS 血管炎モデルへの IL-10 大量発現による血管炎抑制、③血管炎抑制の心エコーによる機能評価、④心血管病理組織における血管炎抑制の評価、⑤同部位への浸潤細胞の解析、⑥同モデル心血管におけるサイトカイン mRNA 発現の解析、⑦浸潤細胞の Dectin-2 発現細胞の解析、⑧浸潤が想定される各種細胞における CAWS 反応性と IL-10 の効果の解析、⑨CAWS 刺激マクロファージにおける炎症性サイトカイン産生とシグナル伝達の解析、⑩CAWS 血管炎早期の炎症性サイトカイン、GM-CSF、Dectin-2 発現の解析、など膨大な量の実験により CAWS 血管炎モデルの病態の解明を試みた。

しかし CAWS 血管炎モデルでは動脈瘤の形成がない、カンジダが川崎病の病因に関連するというエビデンスが脆弱である、本実験では IL-10 が CAWS 投与前に通常ではみられない高レベルで発現している、など実際の川崎病の解析・治療への応用という面では無理がみられるという意見もあった。

一方、川崎病の解明に直結するかはともかく、本研究が CAWS 血管炎モデルにおける病態をかなりの点まで解明していること、申請者の取り組んだ段階的に展開する膨大な量の研究とその成果は学位授与に十分値すると考えられた。

論文中の図の解説が不十分であるなど委員から指摘された部分が修正され、本論文を全員一致で合格と判定した。

最終試験の結果の要旨

研究内容のプレゼンテーションにおいて、まず川崎病の一般的な説明の後に、その動物モデル、特に CAWS 血管炎モデルの意義、同モデルにおいて IL-10 が発症を抑える可能性のあることが解説された。その後研究内容の説明がされた。スライド図表は概ね明瞭でわかりやすく、説明も過不足無く行っていた。

質疑応答においては、いまだに川崎病の病因、発症メカニズムが不明で、解明されていない点が多いため、委員の質問に答えられる報告がないという回答が多くなったが、申請者自身は川崎病あるいはその

動物モデルに対する十分な知識があることが窺われた。

本研究においては、CAWS 投与前に IL10 が高発現しており、実際の臨床においては発症後の投与を行うことになるので、そのような臨床に即した実験が必要でないかとの質問には、今後そのような実験の実施を検討するとの回答であった。

本領域における十分な知識を有しており、論文の内容とあわせて試験委員全員一致で合格と判定した。