

表 題 敗血症性急性腎傷害における血管内皮機能の関連性:soluble thrombomodulin の役割

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 方山 真朱

担当指導教員氏名 布宮 伸 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系
麻酔・救急・集中治療医学
集中治療医学

2019 年 1 月 10 日申請の学位論文

<目次>

| | |
|--------------------------------------------------------------|----|
| 略語一覧..... | 1 |
| 1 序言..... | 3 |
| 2 研究目的..... | 5 |
| 3 研究方法..... | 6 |
| 3.1 マウス..... | 6 |
| 3.2 抗体..... | 7 |
| 3.3 マウス処置..... | 8 |
| 3.3.1 解剖の手順、およびサンプルの採取..... | 8 |
| 3.3.2 骨髄移植細胞の調整と骨髄移植..... | 9 |
| 3.4 病理学的ならびに免疫組織学的解析..... | 9 |
| 3.4.1 Hematoxylin-Eosin (HE)染色..... | 9 |
| 3.4.2 Elastica van Gieson (EVG)染色..... | 10 |
| 3.4.3 大動脈炎の重症度の解析..... | 11 |
| 3.4.4 免疫組織染色による炎症細胞のプロファイリング解析..... | 11 |
| 3.4.5 蛍光免疫組織染色..... | 12 |
| 3.5 RNA 抽出及び qRT-PCR による遺伝子発現解析..... | 12 |
| 3.6 大動脈細胞単離と IL-25 添加培養..... | 13 |
| 3.7 統計学的解析..... | 14 |
| 4 研究成果..... | 15 |
| 4.1 <i>Il1rn</i> ^{-/-} マウス大動脈炎の病理組織学的・免疫組織学的評価..... | 15 |
| 4.2 IL-25 の大動脈炎発症への関与..... | 19 |
| 4.3 大動脈炎の遺伝子発現変化の比較..... | 21 |
| 4.4 大動脈炎での IL-25 と IL-17RB 産生細胞の同定..... | 22 |
| 4.5 免疫細胞への IL-25 の作用解析..... | 23 |
| 5 考察..... | 25 |
| 6 結論..... | 32 |
| 7 謝辞..... | 33 |
| 8 引用文献..... | 34 |

略語一覧

(アルファベット順)

| | |
|--------|-------------------------------------------------------|
| AcP | accessory protein |
| BALB/c | BALB/cNcr マウス |
| BMT | bone marrow cell transfer |
| CD | cluster differentiation |
| CANTOS | canakinumab antiinflammatory thrombosis outcome study |
| Cre | causes recombination |
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid |
| CHCC | Chapel Hill Consensus Conference |
| DAB | deaminobenzidine |
| DAMPs | damage-associated molecular patterns |
| DC | dendritic cell |
| EVG | Elastica van Gieson |
| GCA | giant cell arteritis |
| GC | glucocorticoid |
| GFP | green fluorescent protein |
| HE | hematoxylin-eosin |
| HRP | horseradish peroxidase |
| hs-CRP | high sensitive C-reactive protein |
| IFN | interferon |
| IL | interleukin |
| ILC | innate lymphoid cell |

| | |
|--------|----------------------------------------|
| loxP | locus of crossing over |
| LVV | large vessel vasculitis |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MTX | methotrexate |
| NKT | natural killer T |
| O.C.T. | optimal cutting temperature |
| PAMPs | pathogen-associated molecular patterns |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cell |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PBT | tween20 / PBS |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PD-1 | programmed death cell-1 |
| PD-L1 | programmed death cell-ligand 1 |
| PFA | paraformaldehyde |
| RCT | randomized controlled trial |
| Ra | receptor antagonist |
| SPF | specific pathogen-free |
| TAK | Takayasu arteritis |
| TCZ | tocilizumab |
| Th | T helper |
| TNF | tumor necrosis factor |

1 序言

厚生労働省の報告では、本邦における 2017 年度の死亡原因は、悪性新生物が最も多く、ついで心疾患 (15.2 %)、脳血管疾患 (8.2 %)であった(図 1)。心疾患及び脳血管疾患のうち、虚血性心疾患 (36.5 %) 及び脳梗塞 (57.8 %) が占めており、これらは主に動脈硬化の進行が原因である。動脈硬化は、血管に慢性的な炎症を認めた状態であり、その発症と病態形成には自然免疫 (innate immunity) と適応免疫 (adaptive immunity) の複雑な相互作用が関与している。

1) 。

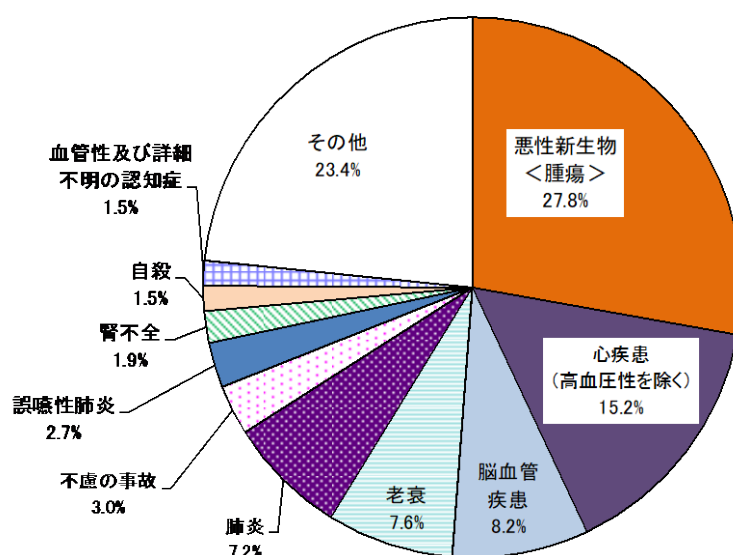


図 1: 主な死因別死亡数の割合 (2017 年度厚生労働統計人口動態調査より)

動脈硬化とは病態が異なる血管疾患に、全身の様々な血管そのものに炎症が起こる疾患を総称して血管炎症候群と呼称される²⁻⁴⁾。血管炎症候群の疾患概念は、1866 年に Kussmaul と Maier らが全身の筋痛、しびれ、蛋白尿を呈した症例を結節性動脈周囲炎と報告したことから始まる⁵⁾。本邦では 1908 年に高安右人

が、特異な眼底所見を呈した症例を報告し⁶⁾、後にこの疾患は大動脈炎であることが分かり、高安動脈炎と呼称されるようになった。また、1967 年には川崎らが冠動脈に炎症を起こす疾患として川崎病を報告した⁷⁾。1994 年に Chapel Hill Consensus Conference 1994: (CHCC1944)で、血管炎の定義や罹患部位による分類法が提唱され、その後の血管炎に関する研究の進歩に伴い、2013 年に改訂版 CHCC2012 が発表された。

CHCC2012 に準ずると、血管炎の中で大動脈とその主要分枝 (冠動脈・頸動脈・椎骨動脈・鎖骨下動脈など)が罹患する疾患を大型血管炎 (large vessel vasculitis: LVV)と分類し、高安動脈炎 (Takayasu arteritis: TAK)と巨細胞性動脈炎 (giant cell arteritis: GCA)が含まれる⁸⁾。いずれも難治性自己免疫疾患で、好発年齢や GCA に合併するリウマチ性多発筋痛症の違いを除けば臨床像や病理学的所見は似通っている⁹⁾。TAK 及び CGA は、血管内膜の肥厚と内腔の狭小化による臓器虚血や、外膜の肥厚による大動脈拡張病変と随伴する大動脈閉鎖不全症や大動脈瘤及び大動脈解離などを合併し、致命的結果をもたらす¹⁰⁾。基本となる薬物治療は、ステロイド (glucocorticoids: GCs)であるが、長期間の全身投与による副作用出現や¹¹⁾、GC 漸減時の再燃などの問題があるため、免疫抑制剤 (methotrexate: MTX)を併用することがあるが、未だ再発率が高く、寛解維持療法は十分ではない¹²⁻¹⁷⁾。

本研究では、大動脈炎の発症機構の解析をするために大動脈炎モデルマウスとして、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) 欠損マウスを用いた。IL-1 には、異なる遺伝子からなる 3 つの分子 IL-1 α 、IL-1 β 及び IL-1Ra が存在し、IL-1 α と IL-1 β はアゴニストとして、IL-1Ra は特異的なアンタゴニストとして作用する。一方、IL-1 受容体のファミリーには、IL-1 受容体 1 型 (IL-1R I)と IL-1 受容体 2 型 (IL-1R

Ⅱ)及びIL-1 受容体補助タンパク質 (IL-1RAcP)の3つのファミリー分子が存在する。IL-1 α とIL-1 β はIL-1RⅠ/IL-1RAcP 受容体と結合してIL-6やTNF- α とよく似た生理作用を発揮するが、IL-1RaはアンタゴニストとしてIL-1 α とIL-1 β の生理作用を阻害する分子と考えられている。また、IL-1RⅡ/IL-1RAcP 受容体は、IL-1リガンドと結合するがシグナル伝達を行わない(デコイ受容体)。したがって、IL-1Ra遺伝子欠損マウス(*Il1rn*^{-/-}マウス)では、IL-1の生理作用が抑制されないことに起因して大動脈炎を自然発症する¹⁸⁾。また、その発症はT細胞依存的であり、TNF- α が発症及び病態形成に関わることが明らかにされている。一方で、IL-17Aは*Il1rn*^{-/-}マウスの大動脈炎の発症には必須ではないが、病態形成に重要であり、IL-6は発症及び病態形成にどちらにも必須ではないことが報告されている¹⁹⁾。

2 研究目的

今回、この*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈の炎症部位において、IL-17ファミリーであるIL-25(IL-17E)の遺伝子発現が亢進していることを発見した。IL-25は、主に上皮細胞やTuft細胞の他、Th2細胞やマスト細胞で発現が確認されている²⁰⁻²⁴⁾。IL-25の受容体は、IL-17受容体ファミリーであるIL-17RAとIL-17RBの2量体で構成されており、主に上皮細胞に発現しているが、マクロファージ、肥満細胞、好塩基球、好酸球、T細胞(特にTh2細胞やTh9細胞)、NKT細胞やグループ2自然リンパ球(group 2 innate lymphoid cell: ILC2)など多くの免疫細胞でも発現が確認されている^{25, 26)}。IL-25は、このような細胞から2型(Th2型)サイトカインの産生を誘導し、2型(Th2型)免疫応答、特に寄生虫に対する感染防御に関わるだけで

なく、その制御の異常は喘息などアレルギー疾患の発症に関わる²⁶⁻²⁹⁾。また、IL-25 による 2 型サイトカインである IL-13 の産生促進効果は、多発性硬化症のマウスモデル(実験的脳脊髄炎)で Th17 細胞の分化を阻害し、3 型 (Th17 型) 免疫応答を抑制することで発症を抑える働きがあることが知られている^{26, 30)}。一方で、アレルギー性皮膚炎の一つである接触皮膚炎と自己免疫疾患である乾癬のマウスモデル(イミキモド誘導性皮膚炎)において IL-25 は 3 型免疫応答の活性化に関わることも報告されている。接触皮膚炎ではケラチノサイトや肥満細胞から産生される IL-25 が真皮樹状細胞から IL-1 β の産生を誘導し、Th17 細胞からの IL-17A 産生を促進する³¹⁾。また、イミキモド誘導性皮膚炎では、皮膚の $\gamma\delta$ T 細胞から産生される IL-17A がケラチノサイトからの IL-25 産生を誘導し、その IL-25 がケラチノサイトの増殖を誘導する³²⁾。Il1rn^{-/-}マウスの大動脈炎の病態形成に IL-17A が関わっており、その炎症部位において IL-25 遺伝子発現の亢進が認められているという背景から、3 型免疫応答依存的な Il1rn^{-/-}マウスの大動脈炎の病態形成に IL-25 が何らかの関与を持っていることが示唆されたが、その詳細については報告がされていない。そこで本研究で、3 型免疫応答依存的な Il1rn^{-/-}マウスの大動脈炎の病態形成における IL-25 の役割を解析した。

3 研究方法

3.1 マウス

4-16 週齢の BALB/cNcr 背景の野生型マウスは、日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。BALB/cNcr 背景の Il1rn^{-/-}マウス³³⁾及び Il25^{-/-}マウス³⁴⁾は、岩倉洋一郎博士(東京東京理科大学)及び須藤一博士(順天堂大学)より供与いただい

た。 $Il25^{-/-}Il1rn^{-/-}$ マウスは、 $Il1rn^{-/-}$ マウスと $Il25^{-/-}$ マウスの交配により作成した。中江進博士(東京大学医科学研究所)らが作成した BALB/cNcr 背景の $Il1rn^{gfp/gfp}$ マウス(IL-1RN 遺伝子を EGFP 遺伝子で置換し、IL-1RN の代わりに EGFP が発現するマウス)(未発表)は日本 SLC から入手した。マウスは、東京大学医科学研究所実験動物実験施設動物センター内の specific pathogen-free (SPF)環境下で、通常固形飼料を与えて飼育した。動物実験プロトコルは、東京大学医科学研究所 動物実験委員会「自己免疫性血管炎の発症機構の解明」(倫理委員会承認番号:A16-23)、「遺伝子改変マウスの作成」(倫理委員会承認番号:A16-30)にて承認を得た。全ての実験は、倫理・安全ガイドラインに従って行った。後述する一連の実験は、これら雌雄マウスの週齢をそろえて行った。

3.2 抗体

本研究で使用した未標識、ビオチン標識、HRP 標識ないし蛍光標識抗体の種類及び入手先を表1に示した。

| 表1 抗体リスト | | | | | |
|---------------------|---------|----------|----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| 抗体名 | 種類 | クローン名 | アイソタイプ | 標識 | 入手先 |
| 抗マウスCD3 | ポリクローナル | | Rabbit IgG | なし | Abcam plc. |
| 抗マウスCD4 | モノクローナル | D7D2Z | Rabbit IgG | なし | Cell Signaling Technology, U.S. |
| 抗マウスCD8 | モノクローナル | D4W2Z | Rabbit IgG | なし | Cell Signaling Technology, U.S. |
| 抗CD11c | モノクローナル | D3V1E | Rabbit IgG | なし | Cell Signaling Technology, U.S. |
| 抗CD45R | モノクローナル | RA3-6B2 | Rat IgG2a, κ | なし | BD Pharmingen™ |
| 抗CD86 | モノクローナル | GL-1 | Rat IgG2a, κ | なし | Abcam plc. |
| 抗GFP | ポリクローナル | | Chicken IgY | なし | Abcam plc. |
| 抗GL3 | モノクローナル | GL3 | Armenian Hamster IgG | なし | Biolegend, U.S. |
| 抗IL-1β/IL-1F2 | ポリクローナル | | Goat IgG | なし | R&D Systems, U.S. |
| 抗IL-17/IL-17A | モノクローナル | 50104 | Rat IgG2a | なし | R&D Systems, U.S. |
| 抗IL-17E/IL-25 | ポリクローナル | | Goat IgG | なし | R&D Systems, U.S. |
| 抗IL-17RB | ポリクローナル | | Goat IgG | ビオチン | R&D Systems, U.S. |
| 抗Ly-6G/6C | モノクローナル | NIMP-R14 | Rat IgG2b | なし | Abcam plc. |
| 抗Mac-2 (Galectin-3) | モノクローナル | M3/38 | Rat IgG2a | なし | Cedarlane, Canada |
| 抗Mannose Receptor | ポリクローナル | | Rabbit IgG | なし | Abcam plc. |
| 抗TNF-α | ポリクローナル | | Goat IgG | なし | R&D Systems, U.S. |
| 抗Trypsinase | モノクローナル | EPR8476 | Rabbit IgG | なし | Abcam plc. |
| 抗ヤギIgG | ポリクローナル | | Donkey IgG | Alexa Fluor®488 | Abcam plc. |
| 抗ラットIgG | ポリクローナル | | Donkey IgG | Alexa Fluor®488 | Abcam plc. |
| 抗チキンIgY | ポリクローナル | | Goat IgG | Alexa Fluor®488 | Abcam plc. |
| 抗ラットIgG | ポリクローナル | | Donkey IgG | Alexa Fluor®594 | Abcam plc. |
| 抗ウサギIgG | ポリクローナル | | Donkey IgG | Alexa Fluor®594 | Abcam plc. |
| 抗ハムスターIgG | ポリクローナル | | Goat IgG | Alexa Fluor®594 | Thermo Fisher Scientific, U.S. |
| 抗ヤギIgG | ポリクローナル | | Donkey IgG | Alexa Fluor®647 | Abcam plc. |
| 抗ラットIgG | ポリクローナル | | Goat IgG | Polymer-HRP | Nichirei bioscience inc. |
| 抗ウサギIgG | ポリクローナル | | Goat IgG | Polymer-HRP | Dako, Tokyo, Japan |
| 抗ハムスターIgG | ポリクローナル | | | Polymer-HRP | Golden bridge international, U.S. |

3.3 マウス処置

3.3.1 解剖の手順、およびサンプルの採取

マウスは、麻酔器を使用して 100 %酸素・イソフルラン (ファイザー, Tokyo, Japan)吸入で鎮静を行った。刺激に反応しないことを確認し、心採血の後、腹部と前胸部を切開・胸腔を解放し、腹部大動脈を切開後に左心室より冷 phosphate buffer saline (PBS)を注入して脱血した。凍結組織切片に使用する心臓は、心尖部側を短軸方向にトリミングし、optimal cutting temperature (O.C.T.)コンパウンド (SakuraFinetech, Tokyo, Japan)を満たしたモールド内に沈め、液体窒素で冷却したイソペンタンで急速凍結させた。RNA に使用する大動脈は、上行大動脈から

下行大動脈まで切除し、冷 PBS 内で周囲脂肪組織を除去して、液体窒素で凍結した。

3.3.2 骨髄移植細胞の調整と骨髄移植

ドナーマウスは、5-6 週齢を使用し、麻酔瓶内でセボフルレン (ファイザー, Tokyo, Japan)吸入により安楽死させた。マウスの脛骨と大腿骨および骨盤を採取し、冷 PBS 内に浸漬した。周囲結合組織をキムワイプで除去し、24 G と 26 G 針を使用して骨髄細胞を 70 μm 径のセルストレーナー (Greiner Bio-One, U.S.)を用いて調製した。Red blood cell lysing buffer (Sigma-Aldrich, U.S.)を室温 5 分間反応させ赤血球を除去後、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)で希釈し、遠心後に細胞数を計測した。マウス一匹当たりに移植する骨髄細胞数は、 2.0×10^7 細胞で 0.15 ml PBS に懸濁し、調製した。

レシピエントマウスは、4 週齢のマウスを使用し、計 7.5 Gy の X 線を照射した。麻酔器でイソフルレンによる全身麻酔で鎮静し、眼窩注射で移植した。眼窩注射後に、0.4 %オキシブプロカイン塩酸塩 (参天製薬, Osaka, Japan)を点眼して表面麻酔をした。骨髄移植後 1 週間は、補水瓶 250 ml にテトラサイクリン塩酸塩カプセル (ポーラファルマ, Tokyo, Japan)250 mg を溶解し与えた。

3.4 病理学的ならびに免疫組織学的解析

3.4.1 Hematoxylin-Eosin (HE)染色

クリオスタット (Leica, Germany)を使用して、大動脈弁位の横断面で 7 μm 厚の

薄切切片を作製し、MAS コートスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan)に貼付した。薄切切片は、室温 30 分間風乾後に 4 % paraformaldehyde (PFA)を使用して室温 10 分で固定した。Hematoxylin-Eosin (HE)染色は、室温 10 分間 PBS で洗浄後に蒸留水で置換後に、マイヤーヘマトキシリン溶液を室温 1 分間反応させ、流水で 30 分間色出しをした。3 分間 1 %エオシン Y 液 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を反応させ、70 %エタノール (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)で分別し、100 %エタノールで脱水、キシレン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)で透徹を行い、マリノール (Muto pure chemicals, Tokyo, Japan)を使用して封入した。

3.4.2 Elatica van Gieson (EVG)染色

3.4.1 と同様に凍結切片を固定した後、1 %塩酸 70 %エタノール 1 分間反応させ、前田変法レゾルシン・フクシン液に 60 分間浸漬した。100 %エタノールで分別し、流水洗浄後にワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)に 5 分間浸漬した。1 %塩酸 70 %エタノールで分別し、流水 10 分間で色出しを行った。ワンギーソン液 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)に 10 分間浸漬し、1 秒水洗後に素早くイソプロパノール (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)で脱水、キシレンで透徹し、マリノール (Muto pure chemicals, Tokyo, Japan)を使用して封入した。

3.4.3 大動脈炎の重症度の解析

全ての組織標本は、オールインワン蛍光顕微鏡; BZ-X700 と解析アプリケーション (KEYENCE, Osaka, Japan)を使用して観察・解析した。

大動脈炎は、①最も炎症が強い部位での炎症細胞の大動脈壁深達度と②大動脈の断面積、③大動脈炎の発症率の 3 項目で評価した。①は 4 段階で評価し、以下の通りにスコアリングを行った。0=炎症細胞の浸潤がない、1=炎症細胞はわずかで内膜もしくは外膜に浸潤している、2=炎症細胞が中膜の弾性線維を破壊して浸潤している、3=炎症細胞が大動脈壁全層にわたり、びまん性に浸潤している。①・②は 12 週齢のマウスで評価した。③は、4、8、12、16 週齢のマウスで評価した。

3.4.4 免疫組織染色による炎症細胞のプロファイリング解析

3.4.1 と同様の方法で凍結切片を固定した後に、Blocking One Histo (Nacaltesque, Kyoto, Japan)を使用して室温 10 分で非特異的反応を低減し、5 分間 0.1 % Tween20 / PBS (PBT)による透過処理を行った後、一次抗体で 4 °C一晩反応させた。0.1 %PBT で 1 回、PBS で 2 回、各 5 分間洗浄後、内因性ペルオキシダーゼを失活させるために、0.3 %過酸化水素水と 0.1 %アジ化ナトリウムを室温 10 分間反応させた。PBS で洗浄後に一次抗体の動物種に合わせて、HRP 標識ポリマー試薬を室温 30 分間反応させた (表 1)。

0.1 %PBT で 1 回、PBS で 2 回、各 5 分間洗浄後、ImmPACT™ DAB (Vector Laboratories, U.S.)を使用して発色させ、蒸留水で反応を停止させた。対比染色

は、マイヤーヘマトキシリン溶液で室温 1 分間染色し、マリノール (Muto pure chemicals, Tokyo, Japan)を使用して封入した。一切片での発色 (茶色)した細胞を数えた。

3.4.5 蛍光免疫組織染色

3.4.4と同様の方法で、一次抗体で 4 °C一晩反応させ、0.1 %PBT で 1 回、PBS で 2 回、各 5 分間洗浄後に動物種に合わせて、各種 Alexa Fluor®で標識した二次抗体を使用して室温 30 分間反応させた。核は、NucBlue Fixed Cell Stain Ready Probes reagent (Thermo Fisher Scientific, U.S.)を使用して染色した。0.1 %PBT で 1 回、PBS で 2 回、各 5 分間洗浄後に、Dako Fluorescence mounting medium (Dako, Tokyo, Japan)で封入した。

3.5 RNA 抽出及び qRT-PCR による遺伝子発現解析

3.3.1 で回収した凍結大動脈を、パワーマッシャー II とバイオマッシャー II (nippi, Tokyo, Japan)で粉碎し、NucleoSpin RNA Plus (Takara, Shiga, Japan)で全 RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を使用して全 RNA から cDNA を作成した。qPCR は、SYBR Premix Dimer Eraser (Takara, Shiga, Japan)を使用して、CFX384 Touch Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Canada)で解析した。*Irf25* mRNA は、PCR 産物を NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Takara, Shiga, Japan)で精製し、再度 qPCR を行った。定量解析は、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法により解析し、*Gapdh* mRNA 発現レベル

で標準補正化した。本研究で使用したプライマーの配列は表 2 に示した。

表2 プライマー配列

| 遺伝子 | Forward (5'-3') | Reverse (5'-3') |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| <i>Gapdh</i> | CCCACTCTTCCACCTTCGATG | AGGTCCACCACCCTGTTGCT |
| <i>Egfp</i> | CAGCTCGCCGACCACTACC | TTACTTGTACAGCTCGTCCATG |
| <i>Ifng</i> | GAAGTGGCAAAGGATGGTGA | TGTGGGTTGTTGACCTCAAAC |
| <i>Il1b</i> | CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG | GATCCACACTCTCCAGCTGCA |
| <i>Il1rn</i> | GCTCATTGCTGGGTACTTACAA | CCAGACTTGGCACAAGACAGG |
| <i>Il4</i> | TCCAAGGTGCTTCGCATATTTT | CAGCTTATCGATGAATCCAGGC |
| <i>Il6</i> | GAGGATACCACTCCCAACAGACC | AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA |
| <i>Il13</i> | GGCAGCAGCTTGAGCACATT | GGCATAGGCAGCAAACCATG |
| <i>Il17a</i> | CCGCAATGAAGACCCTGATAGAT | AGAATTCATGTGGTGGTCCAGC |
| <i>Il17e (Il25)</i> | AAGTGGAGCTCTGCATCTGT | CGATTCAAGTCCCTGTCCAA |
| <i>Il17rb</i> | GGCTGCCTAAACCACGTAATG | CCCGTTGAATGAGAATCGTGT |
| <i>Il23</i> | GGTGGCATCGAGAACTGTGA | GCTGTCTGGAGTACTGTGCATCTG |
| <i>Tnfa</i> | GCCTCCCTCTCATCAGTTCT | CACTTGGTGGTTTGCTACGA |

3.6 大動脈細胞単離と IL-25 添加培養

3.3.1 と同様に採取した大動脈を、HBSS で溶解した 1 mg/ml の type II コラゲナーゼ (Worthington Biochemical Corporation, U.S.)、4.5 単位のエラスターゼ (Worthington Biochemical Corporation, U.S.)、30 µg/ml の DNase I (Sigma Aldrich) に浸漬し、37 °C、60 rpm、1 時間酵素反応で細胞を単離し、10 匹分の大動脈細胞を集めて、40 µm のセルストレイナーを通過させた。細胞を 10%FBS RPMI に溶解し、100 ng/ml のマウスリコンビナント IL-25 (R&D Systems, U.S.) で 37 °C、5 %CO₂、6 時間培養した。細胞回収し、サイトスピンを使用して MAS コーティングスライドグラスに細胞を接着させ、30 分間乾風後に phosflow (BD bioscience) で室温 15 分間固定し、Blocking One Histo (Nacalai, Japan) で室温 10 分間ブロッキング処理し、0.1 %PBT 5 分で膜透過処理を行い一次抗体で 4 °C 一晩反応させた。3.4.3 と同様に二次抗体以降の反応、操作を行い、BZ-X710 顕微鏡を用いて IL-25 添加群と未添加群で比較した。

3.7 統計学的解析

全ての正規分布する値に関しては **t** 検定を用い、非正規分布には **Mann-Whitney** の **U** 検定を用いて検討した。大動脈炎の発症率に関しては **Fisher** の正確確率検定を用いて解析を行った。有意差は、**p** 値 **0.05** 未満を*もしくは†、**p** 値 **0.01** 未満を**もしくは††、**p** 値 **0.001** 未満を***もしくは†††とした。

4 研究成果

4.1 *Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎の病理組織学的・免疫組織学的評価

既に報告にあるように^{18, 19, 35)}、大動脈炎の HE 染色と EVG 染色の組織像は、*vasa vasorum* 周囲の外膜でリンパ球や単核球の浸潤から、中膜弾性線維を破壊する多核巨細胞や好中球浸潤など、多彩な組織像が認められた。炎症の程度が強い個体では、新生血管の内膜肥厚や線維性組織に置換された外膜の肥厚が見られた (図 2A, B)。

マウス大動脈の浸潤細胞は、CD3 陽性 T 細胞、CD11c 陽性樹状細胞 (dendritic cells; DCs)、Mac-2 (Galectin-3)陽性マクロファージ、Gr-1 陽性好中球が主体であった。T 細胞は、CD8 陽性 T 細胞と GL3 陽性 $\gamma \delta$ T 細胞が優位であった(図 2C)。

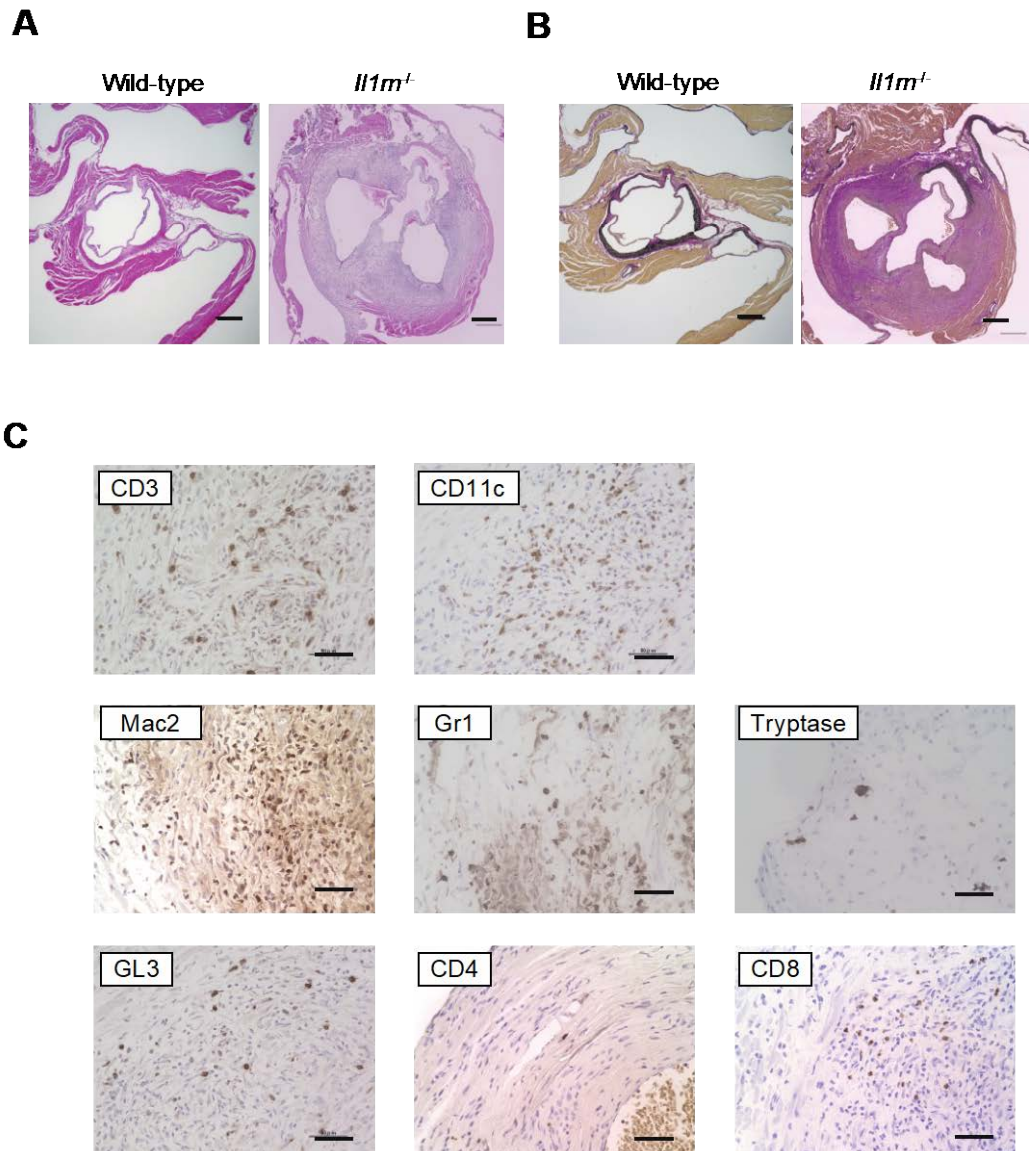


図 2: *Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎の典型的病理組織像と炎症細胞

(A): マウス大動脈 HE 染色 (12 週齢、スケールバー; 300 μm)

左: 野生型マウス 右: *Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎

(B): マウス大動脈 EVG 染色 (12 週齢、スケールバー; 300 μm)

左: 野生型マウス 右: *Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎

(C): マウス大動脈炎免疫組織学的染色 (12 週齢、スケールバー; 20 μm)

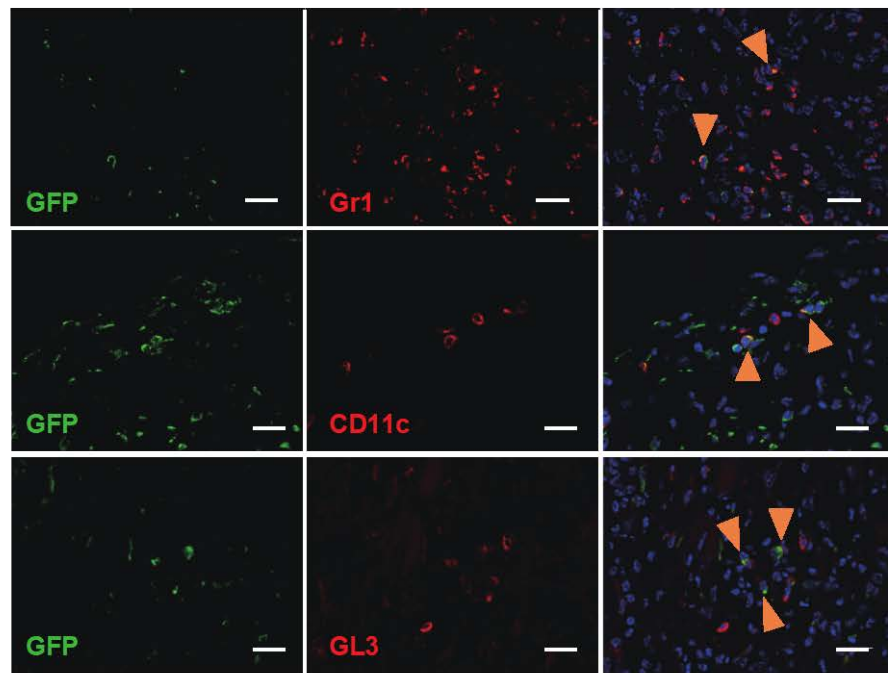
上段左から CD3 陽性 T 細胞、CD11c 陽性 DCs

中段左から Mac-2 陽性マクロファージ、Gr-1 陽性好中球、Tryptase 陽性肥満細胞

下段左から GL3 陽性 γ δ T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞

Il1rn^{-/-}マウス大動脈炎での IL-1Ra と IL-1 β の発現細胞を同定するため、蛍光二重染色を行った。IL-1Ra は、GFP レポーターマウスを使用し、凍結切片で GFP の発現を観察したが、GFP の発色が弱かったため、抗 GFP 抗体を使用して蛍光免疫染色を行った。GFP 発現細胞は、CD11c 陽性 DCs、Gr-1 陽性好中球、GL3 陽性 γ δ T 細胞であった (図 3A)。尚、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、Mac-2 陽性マクロファージは GFP を発現していなかった (図示せず)。同様に IL-1 β 産生細胞を蛍光二重染色で評価した。CD11c 陽性 DCs、Gr-1 陽性好中球、Mac-2 陽性マクロファージが IL-1 β 産生細胞であった (図 3B)。CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、GL3 陽性 γ δ T 細胞では IL-1 β の発現は認められなかった (図示せず)。

A



B

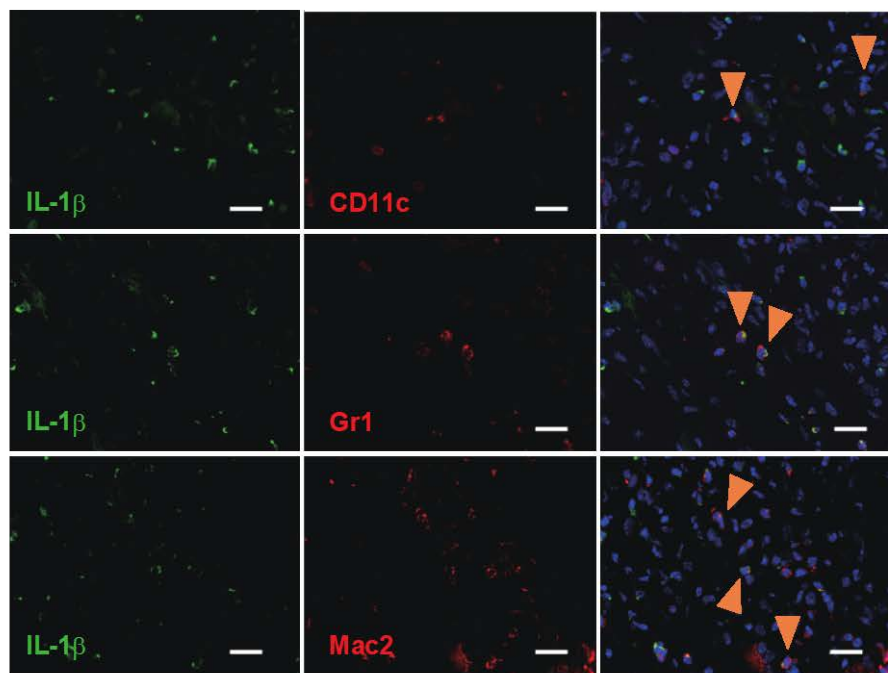


図 3: *Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎の IL-1Ra と IL-1β 発現細胞 (12 週齢、スケールバー; 20 μm)
 (A): 左より緑; GFP (IL-1Ra)、赤; 炎症細胞 (上段 Gr-1 陽性好中球、中段 CD11cDCs、下段 GL3 陽性 γ δ T 細胞)、黄色: 重ね合わせ
 (B): 左より緑; IL-1β、赤; 炎症細胞 (上段 CD11cDCs、中段 Gr-1 陽性好中球、下段 Mac-2 陽性マクロファージ)、黄色: 重ね合わせ (矢印)

4.2 IL-25 の大動脈炎発症への関与

大動脈炎を自然発症する *Il1rn*^{-/-}マウスは、リンパ球および IL-1 と TNF- α を欠損すると大動脈炎を発症しないことが分かっており、IL-17A を欠損すると大動脈炎の発症は抑制されないが、炎症の程度が緩和されることが報告されている^{19, 35})。IL-25 は、IL-17A が関与する疾患ごとに、抑制もしくは増悪する両面性をもっている。^{25, 30, 31, 36})今回我々は、*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈では野生型マウスと *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス(陰性コントロール)を比較して *Il25* mRNA の発現が著明に亢進していることが分かった(図 4A)。これらのことから、IL-25 が大動脈炎発症に関与していることが示唆された。次に、*Il1rn*^{-/-}マウスと *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスで血管炎の発症率を比較した。12 週齢から 16 週齢にかけて *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは血管炎の発症が抑制された(図 4B)。また、大動脈炎の重症度を炎症細胞の血管壁への浸潤度と血管径で比較した。*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは炎症細胞の浸潤および血管径ともに抑えられた(図 4C, D)。さらに、炎症細胞の種類ごと細胞数を比較したところ、*Il1rn*^{-/-}マウスでは CD3 陽性 T 細胞、CD11c 陽性 DCs が増加し、Tryptase 陽性肥満細胞は同程度であった(図 4E)。これらの結果から、IL-25 は大動脈炎の発症と増悪に関与することが示唆された。

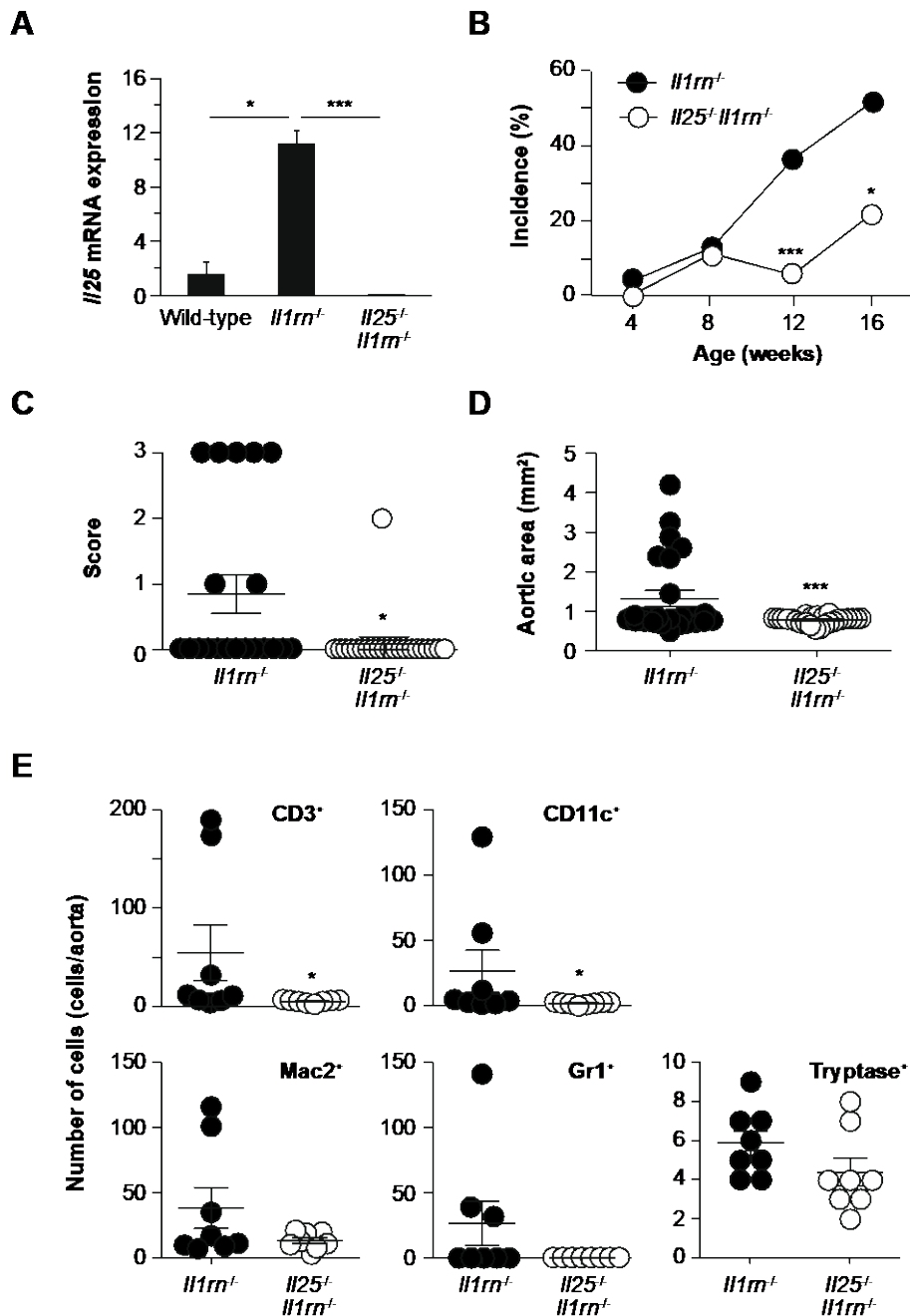


図 4: *Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎での IL-25 の関与

(A): 大動脈 IL-25 mRNA 発現レベル; 左から野生型マウス (n=8)、*Il1rn*^{-/-}マウス (n=10)、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス(n=8)

(B): 大動脈炎の発症率; 黒丸 *Il1rn*^{-/-}マウス、白丸 *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス (各週齢 n=40-50)

(C): 大動脈炎のスコアリング; 左から *Il1rn*^{-/-}マウス、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス

(D): 大動脈径; 左 *Il1rn*^{-/-}マウス、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス

(E): 大動脈炎での炎症細胞数; 上段左から CD3 陽性 T 細胞、CD11c 陽性 DCs、下段左から Mac-2 陽性マクロファージ、Gr-1 陽性好中球、Tryptase 陽性肥満細胞

有意差検定は、野生型マウスもしくは *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスと比較して、p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***)

4.3 大動脈炎の遺伝子発現変化の比較

Il1rn^{-/-}マウス大動脈では、野生型マウスと比較して *Ifng* mRNA の発現は変化がなく、*Il4* mRNA の発現が低下していた。*Il17a* と *Il17rb*、特に *Tnfa* mRNA 発現は著明に上昇していたが、*Il23p19* と *Il6* mRNA の発現は変化が認められなかった(図 5)。一方、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈では、野生型マウスと比較して *Il4* と *Il13* mRNA の発現の低下が見られたが、その他の炎症関連の遺伝子発現に差は認められなかった(図 5)。次に、*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈と *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈を比較すると、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈では、*Il6*、*Il17a*、*Il17rb*、*Tnfa* mRNA の発現が低下し、*Ifng*、*Il4*、*Il13*、*Il23p19* mRNA の発現に差は認められなかった(図 5)。これらの結果から、既報にあるように *Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎の病態に関連した遺伝子は *Il17a*、*Tnfa* mRNA が重要であることが示唆された。

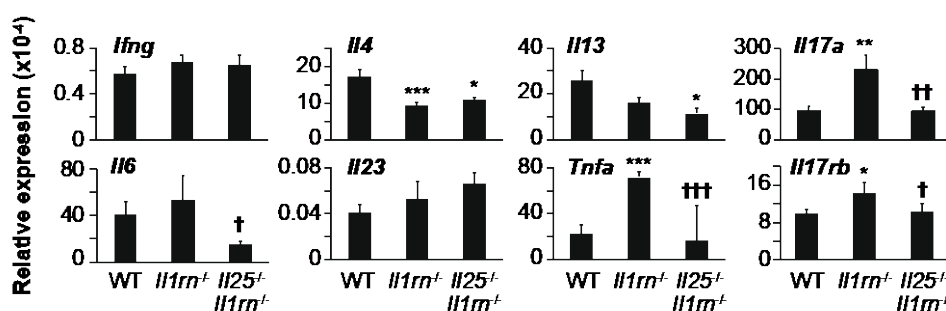


図 5: *Il1rn*^{-/-}マウス大動脈の遺伝子発現変化

1、2、3 型サイトカイン・炎症関連遺伝子、*Il17rb* mRNA の発現レベル (*Gapdh* mRNA で補正)

野生型マウス (n=8)、*Il1rn*^{-/-}マウス (n=8)、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス (n=8)

有意差検定は、野生型マウスと比較して p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***)

Il25^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスと比較して p < 0.05 (†), p < 0.01 (††), p < 0.001 (†††)

4.4 大動脈炎での IL-25 と IL-17RB 産生細胞の同定

4.2(図 4A)と 4.3(図 5)で *Il1rn*^{-/-}マウスは、野生型マウスと比較して *Il25*、*Il17rb* mRNA の発現が上昇していたことを示した。次に、蛍光免疫染色で IL-25 と IL-17RB 発現細胞の同定を行った。IL-17RB 発現細胞は、CD11c 陽性 DCs、Mac-2 陽性マクロファージ、B220 陽性 B 細胞、GL3 陽性 $\gamma \delta$ T 細胞、B220 \cdot CD11c 陽性形質細胞様 DCs (plasmacytoid DCs: pDCs)であったが、どの細胞群も全て IL-17RB 陽性ではなく、一部の細胞で IL-17RB の発現が見られた (図 6)。IL-25 は、蛍光免疫染色で発現細胞を同定することができなかった。

Il1rn^{-/-}マウス大動脈炎の発症に関わる IL-25 の産生細胞が、血球細胞由来か非血球細胞由来かを評価するために骨髄移植を行った。*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス由来の骨髄細胞を移植した *Il1rn*^{-/-}マウスでは、*Il1rn*^{-/-}マウス由来の骨髄細胞を移植した *Il1rn*^{-/-}マウスと同程度の大動脈炎発症率であった。一方、*Il1rn*^{-/-}マウス由来の骨髄細胞を移植した *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス由来の骨髄細胞を移植した *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスと同様に発症率が減少した (図 7)。これらの結果から、非血球細胞由来の IL-25 が大動脈炎の発症に重要であることが示唆された。

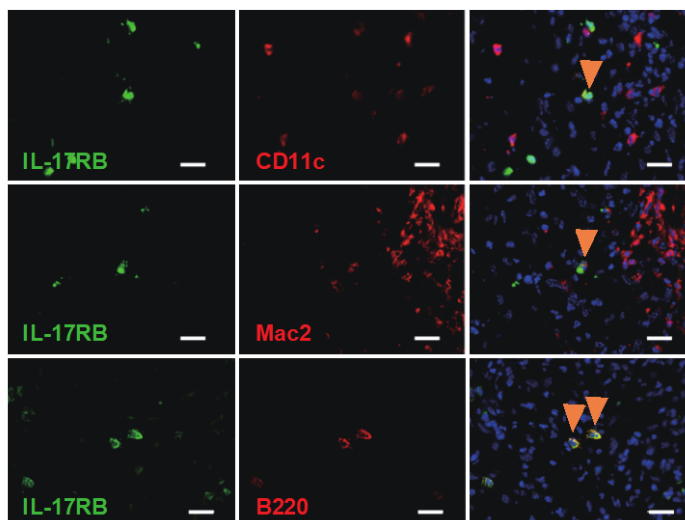


図 6: IL-17RB 発現細胞 (12 週齢、スケールバー:20 μ m)
左より緑;IL-17RB 陽性細胞、赤:炎症細胞(上段 CD11c 陽性細胞、中段 Mac-2 陽性細胞、下段 B220 陽性細胞)、黄色:重ね合わせ(矢印)

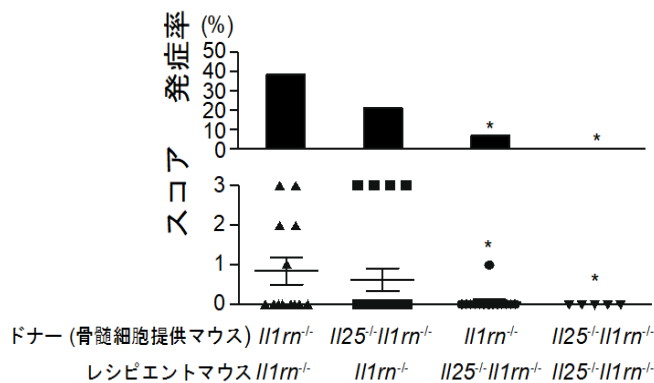


図 7: 骨髄移植後の大動脈炎発症率と重症度

上段: 発症率、下段: 重症度

*Il1rn^{-/-}*マウスに *Il1rn^{-/-}*骨髄細胞 (n=13)か *Il25^{-/-}Il1rn^{-/-}*骨髄細胞 (n=19)を移植

*Il25^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスに *Il1rn^{-/-}*骨髄細胞 (n=14)か *Il25^{-/-}Il1rn^{-/-}*骨髄細胞 (n=5)を移植

有意差検定は、*Il1rn^{-/-}*マウスに *Il1rn^{-/-}*骨髄細胞移植群と比較して、 $p < 0.05$ (*)

4.5 免疫細胞への IL-25 の作用解析

4.4(図 6)で CD11c 陽性 DCs、Mac-2 陽性マクロファージ、B220 陽性 B 細胞、GL3 陽性 $\gamma \delta$ T 細胞で IL-17RB が発現していることが分かったが、それぞれ骨髄細胞誘導 DCs、骨髄細胞誘導マクロファージ、脾臓由来 B220 陽性 B 細胞、脾臓由来 GL3 陽性 $\gamma \delta$ T 細胞を得て、in vitro で IL-25 刺激を加えた。図 3B で、CD11c 陽性 DCs および Mac-2 陽性マクロファージで IL-1 β が発現していたが、骨髄細胞誘導 DCs と骨髄細胞誘導 M0, M2 マクロファージから IL-1 β の産生は見られなかった (図示せず)。また、B 細胞からも IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生は認められなかった。 $\gamma \delta$ T 細胞では、IL-23 の刺激で IL-17A の産生が誘導されるが³⁷⁾、IL-25 の単独の刺激で IL-17A の産生は見られず、IL-23 と IL-25 の共培養で IL-17A 誘導作用の増強は認められなかった(図示せず)。

骨髄細胞誘導 DCs・マクロファージ、脾臓由来 B 細胞・ $\gamma \delta$ T 細胞では *Il17rb*

mRNA の発現を認めないが、*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈の免疫細胞では IL-17RB が発現していると考え、*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈を酵素処理で単離し、IL-25 との共培養を行い、蛍光免疫染色で評価した。IL-25 刺激した CD11c 陽性 DCs で、IL-1 β の産が促進された。また、Mac2 陽性マクロファージで TNF- α の産生が促進された (図 8)。

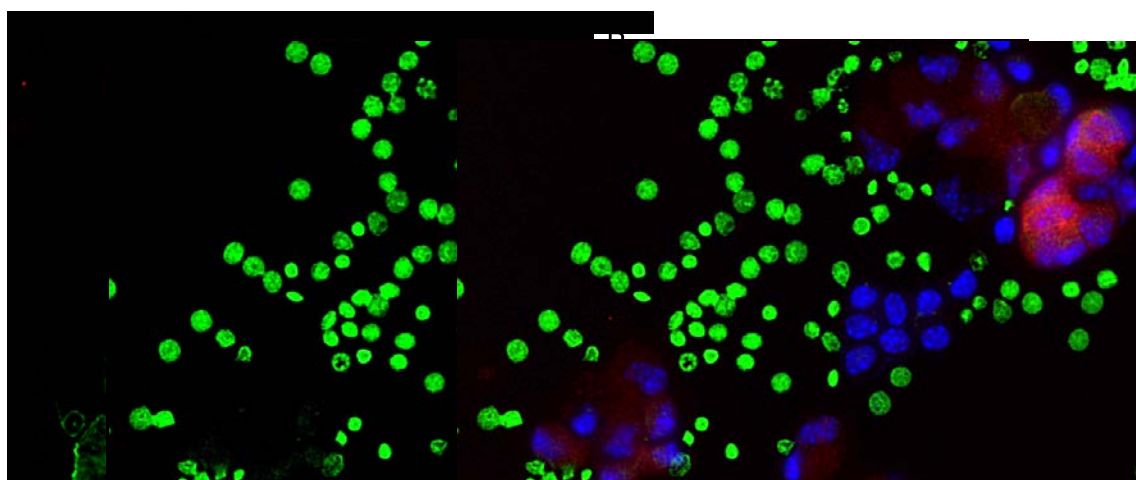


図 8: IL-25 による CD11c 陽性細胞の IL-1 β 産生誘導、Mac-2 陽性細胞の TNF- α 産生誘導

上段: 溶媒のみ、下段: リコンビナントマウス IL-25 で培養

A: 左より緑; IL-1 β 陽性細胞、赤; CD11c 陽性細胞、黄; 重ね合わせ

B: 左より緑; TNF- α 陽性細胞、赤; Mac2 陽性細胞、黄; 重ね合わせ

5 考察

本研究では、①*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎で、炎症の主体は T 細胞 (γ δ T 細胞・CD8 陽性 T 細胞)、DCs、マクロファージ、好中球である、②IL-1Ra 産生細胞は好中球・DCs・ γ δ T 細胞であり、IL-1 β 産生細胞は DCs・好中球・マクロファージである、③*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈で、*Il25* mRNA の発現が亢進し、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは *Il1rn*^{-/-}マウスと比較して血管炎の発症率の低下、重症度スコアの低下、血管径が小さく、炎症細胞数 (T 細胞・DCs)が少ない、④*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈では野生型マウスと比較して、*Tnfa*, *Il-17a*, *Il-17rb* mRNA が亢進、*Il4* mRNA が減弱し、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは *Il1rn*^{-/-}マウスと比較して *Tnfa*, *Il6*, *Il17a*, *Il17rb* の発現が低下している、⑤IL-17RB 発現細胞は、DCs・マクロファージ・B 細胞・ γ δ T 細胞である、⑥骨髓移植実験から非血球細胞由来の IL-25 が血管炎の発症に関与している、⑦In vitro で IL-25 は大動脈 DCs から IL-1 β の産生を促し、大動脈マクロファージから TNF- α の産生を促す、以上の 7 項目を明らかにした。

近年、IL-25 が 2 型免疫応答以外に 3 型免疫応答の促進および抑制する役割が明らかになってきているが³⁰⁻³²⁾、血管炎症候群においてはその働きが分かっていない。今回、病態形成に IL-17A が関わっている *Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎で¹⁹⁾、*Il25* mRNA の発現が亢進していることから(図 4A)、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスを用いて 3 型免疫応答との関係を含めた IL-25 の大動脈炎への役割を検証した。

Il1rn^{-/-}マウス大動脈炎の病理組織像は、HE 染色で vasa vasorum 周囲の外膜でリンパ球や単核球の浸潤から、中膜弾性線維を破壊する多核巨細胞や好中球浸潤を認めた。免疫組織染色では CD3 陽性 T 細胞 (GL3 陽性 γ δ T 細胞、CD8

陽性 T 細胞)、Gr1 陽性好中球、Mac2 陽性マクロファージ、CD11c 陽性 DCs が炎症細胞の主体であることが分かった(図 2A)。また、リモデリングの所見としては、新生血管の内膜肥厚や線維性組織に置換された外膜の肥厚などが認められた(図 2B)。TAK 及び CGA の病理像は、全層性の多彩な炎症細胞浸潤(好中球、CD4 陽性 T 細胞、マクロファージ、 γ δ T 細胞、DCs など)と、中膜平滑筋細胞の壊死・弾性線維の破壊、線維化による内膜の肥厚と内腔の狭小化、そして外膜の肥厚による血管径の拡大などの血管リモデリングを呈することから¹⁰⁾、*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎の病理組織像と共通した所見が多いことが確認された。これら大型大動脈炎は、その炎症増悪に Th17 細胞から産生される IL-17A が重要とされている^{38, 39)}。*Il1rn*^{-/-}マウスでは炎症部位で CD4 陽性 T 細胞は増加しているが、 γ δ T 細胞がより優位に増加していた。 γ δ T 細胞由来の IL-17A は、皮膚や呼吸器・消化管の細菌防御機構や関節リウマチなどの自己免疫疾患で中心的な役割をしております⁴⁰⁾、*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈炎においても IL-17A が炎症増悪の中心的存在であることから¹⁹⁾、Th17 細胞だけでなく γ δ T 細胞が産生する IL-17A が炎症部位の病態形成に重要であると推測された。

次に、*Il1rn*^{-/-}マウスが大動脈炎・関節炎・皮膚炎など様々な炎症疾患を発症する主要因となる IL-1 β とそれを競合的に阻害する IL-1Ra の産生細胞を同定した。大動脈炎で IL-1 β 産生細胞は、CD11c 陽性 DCs・Gr1 陽性好中球・Mac2 陽性マクロファージであった(図 3B)。また IL-1 を競合的に阻害する IL-1Ra 産生細胞は GFP レポーターマウス (*Il1rn^{gfp/gfp}* マウス)を使用することで、Gr1 陽性好中球・CD11c 陽性 DCs・GL3 陽性 γ δ T 細胞であることが同定された(図 3A)。IL-1 フア

ミリー分子の一つである IL-1 β は、自然免疫を担う単球・マクロファージ・DCs・好中球の細胞内で IL-1 β 前駆体が切断されることで活性体になることが知られている^{41, 42})。これら免疫細胞内では、病原微生物による感染に伴い細菌およびウイルス放出される PAMPs や組織損傷や破壊に伴い細胞から放出される DAMPs によりインフラマソームが活性化し、その活性化インフラマソームがカスパーゼ 1 を活性化することで IL-1 β 前駆体を切断して成熟 IL-1 β となる^{43, 44})。また、好中球に限り、インフラマソーム非依存的な経路が存在する。好中球は、proteinase 3(PR3) や好中球エラスターゼ・カテプシン G・グランザイム A などの酵素でも IL-1 β を成熟させる^{45, 46})。成熟した IL-1 β は、好中球や炎症性単球などの自然免疫を活性化するだけでなく、IL-6 と共に Th17 細胞の分化誘導や IL-23 と共に Th17 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞からの IL-17A 産生増幅などの作用を発揮する^{37, 47, 48})。今回示したマクロファージ・DCs・好中球は、大動脈の炎症部位に遊走され炎症局所において IL-1 β を産生し、Th17 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞の分化活性を誘導することで、より一層炎症を惹起していると考えられる。

上記 IL-1 β の生理活性を競合的に阻害する IL-1Ra は、炎症部位において主に単球や上皮細胞からの分泌が知られている⁴⁹)。最近では小腸環境のホメオスタシスを維持するために、恒常的に好酸球から IL-1Ra が産生され、IL-1 β 作用を阻害することで Th17 細胞の分化を抑制していることが報告されている⁵⁰)。大動脈においても、これら IL-1Ra 産生細胞が IL-1 β とのバランスの中で、その生理活性を阻害し、恒常性保っていると考えられる。

次に、IL-17A と同じ IL-17 ファミリー分子である IL-25 と大動脈炎の関連を評価

した。その結果、*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈では野生型マウスと比較して *Il25* mRNA の発現の亢進しており、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは発症率・炎症スコア・免疫細胞数など炎症に関連した項目が *Il1rn*^{-/-}マウスと比較して抑制されていることが示された(図 4A-E)。以上より IL-25 は、大動脈炎の発症と増悪に関与していることが認められた。

さらに、各マウス大動脈の炎症に関連した代表的な遺伝子発現解析を行った。既報では *Tnfa*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは大動脈炎を発症せず、*Il17a*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは大動脈炎の炎症が抑えられるが^{19, 35)}、*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈では *Il17a*、*Tnfa* mRNA の発現が著明に亢進していることから、IL-17A と TNF- α が大動脈炎の発症と増悪に強く関わっていることが裏付けされた。

IL-25 は、様々な細胞に働きかけ type 2 サイトカインを誘導することが知られているが^{27, 28)}、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈において *Il4* と *Il13* mRNA の発現が野生型マウスと比較して低下しており、IL-25 が欠損することで Th2 細胞や ILC2 を介した type2 サイトカインの産生が抑えられると考えられる。一方、*Il1rn*^{-/-}マウス大動脈で *Il4* mRNA の発現が低下している理由は、炎症の場において Th17 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞が産生する IL-17A を主体とした 3 型免疫応答が優位となることで、相対的に 2 型免疫応答が抑えられると考えられる。また、*Ifna*、*Il23p19* mRNA 発現に関しては、*Il1rn*^{-/-}マウスと *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスで差が見られなかった (図 5)。*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスの *Il6*、*Il17a*、*Tnfa* mRNA 発現は、*Il1rn*^{-/-}マウスと比較して著明に低下しており (図 5)、IL-25 の欠損がこれら炎症性サイトカインを直接もしくは間接的に誘導していることが予想された。*Il1rn*^{-/-}マウスでは、IL-25 受容体を構成す

る IL-17RB の遺伝子 *Il17rb* mRNA 発現が野生型マウスと比較して上昇していた (図 5)。IL17RB の発現細胞は、免疫染色で CD11c 陽性 DCs、Mac-2 陽性マクロファージ、B220 陽性 B 細胞、GL3 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が同定できたが(図 6)、IL-25 のタンパク発現は同定できなかった。骨髓移植実験でレシピエントが *Il25^{-/-}Il17rb^{-/-}* マウスでは大動脈炎発症率の低下とスコアが低いことから、非血球細胞由来の IL-25 産生が大動脈炎の発症に関わっていることが示唆された(図 7)。しかし、*In vitro* では IL-1 β や TNF- α などのサイトカインで大動脈組織での *Il25* mRNA の遺伝子発現の誘導を示せなかった(図示せず)。イミキモド誘導乾癬モデルマウスでは、イミキモドによる刺激後 1 時間でケラチノサイトでの *Il25* mRNA の発現がピークとなる。また、イミキモドの刺激を継続することで IL-25 発現が持続する⁵¹⁾。本研究では、大動脈組織細胞での *Il25* mRNA 発現の誘導を証明することはできなかったが、現在報告されている他組織での *Il25* mRNA の発現時間は非常に短いことから、大動脈においても何らかのトリガーにより短期間で IL-25 が産生され、それを誘因として大動脈炎の発症が促される可能性が考えられる。

上記免疫染色で同定した IL-17RB 発現細胞を、骨髓から DCs・M0 および M2 マクロファージを誘導し、脾臓から B 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞を選別し、それぞれ *Il17rb* mRNA の遺伝子発現を確認したが、全て発現が見られなかった。尚、M2 マクロファージを対象とした理由は、ヒト末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMC)から誘導された M2 マクロファージで、IL-17RB の発現が見られ、IL-25 の刺激で TNF- α と IL-6 の産生が誘導されたためである⁵²⁾。次に大動脈組織に存在する上記細胞で IL-17RB が発現していると仮説を立て、大動脈細胞を酵

素処理で単離し、in vitro で IL-25 と共培養した結果、溶媒のみと比較して DCs から IL-1 β が、マクロファージから TNF- α の産生促進を示した(図 8)。

以上の研究成果より、何らかの因子により大動脈非血球細胞から IL-25 が誘導され、DCs やマクロファージを介して IL-1 β および TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を促進し、大動脈炎の発症に影響を与えることが予想された。また、IL-1 β により γ δ T 細胞や Th17 細胞を主体とする 3 型免疫反応が惹起され、炎症を増悪すると考えられる。

近年、本研究テーマである大型大動脈炎に対して、GC 治療抵抗例や副作用出現例では、炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤の投与による治療成果が報告されている。血清 IL-6 は TAK 及び GCA の病勢を反映した良いバイオマーカーであり^{38, 53-55})、TAK の病態形成には Th1 型サイトカイン (IFN γ) や Th9 型サイトカイン (IL-9)、Th17 型サイトカイン (IL-17A) などが関与している⁵⁶⁻⁵⁸)。GCA の病態形成にはそれら Th1 型、Th9 型、Th17 型サイトカインに加えて IL-21 や IL-22 などが関わっている⁵⁹⁻⁶³)。現在、主に 2 系統の生物学的製剤 (TNF 阻害薬・ヒト化抗 IL-6 受容体抗体) のランダム化比較試験が報告されており、ヒト化抗 IL-6 受容体抗体である tocilizumab (TCZ) は GCA に対して寛解率の向上と GC 減量あるいは中止が可能であった^{64, 65})。また、難治性 TAK ではプラセボコントロール群と比較して再発を抑えることができた⁶⁶)。一方、TNF 阻害薬は TAK では寛解誘導率が有効であったが、GCA での有効性は証明されず、再燃においてはまだ明確な結論はでていない⁶⁷⁻⁷¹)。これら薬物治療に加えて、外科的治療介入は臓器血流障害や動脈瘤の破裂予防目的に行われる⁷²)。

他の循環器疾患領域でも生物学的製剤治療の成果として、心筋梗塞既往例のある炎症反応持続患者例 (**hs-CRP** 高値)で、抗炎症作用を目的とした完全ヒト型抗 **IL-1 β** モノクローナル抗体である **canakinumab** が血管イベント再発を予防する良好な結果が得られている^{73, 74)}。また、悪性腫瘍の領域では、これまでの免疫治療とは全く異なる機序として、免疫チェックポイント (**Programmed death cell-1 ; PD-1/ Programmed death cell- Ligand 1; PD-L1**)をターゲットとした阻害薬が脚光を浴びている⁷⁵⁾。**GCA** 患者例でも、血管壁に存在するこの **PD-L1** 発現樹状細胞の発現が低下していることが報告されている。活性化した **PD-1** 発現 **T** 細胞が **IFN- γ** や **IL-17A**・**IL-21** などの炎症性サイトカインを過剰産生し、炎症を惹起しリモデリングを起こすと考えられており^{4, 59)}、今後循環器疾患領域でも臨床試験が進んでいくことが予想される。

本研究より、**IL-25** が大動脈発症を促進する重要な要素であることが分かった。これにより、大動脈炎発症例や再発例に対して **IL-25** を標的とした新たな生物学的製剤による治療戦略の可能性が期待される。

6 結論

本研究では自己免疫性大動脈炎モデルマウスである *Il1rn*^{-/-}マウスを使用して、病態機序の解明を行った。病理組織学的な所見からは、リンパ球、DCs、マクロファージ、好中球を中心とした炎症細胞の浸潤を認めた。また、定量的PCRからIL-25の発現の亢進が見られたことから、IL-25を欠損させたマウスとの比較検討を行った。IL-25を欠損させた *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは、大動脈炎の発症率が低下しており、IL-25が大動脈炎発症を惹起する役割があることが示唆された。実際に、*Il1rn*^{-/-}マウスでは *Tnfa*、*Il17a* などの炎症関連サイトカインの遺伝子発現が亢進しているのに対して、*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは *Tnfa*、*Il6*、*Il17a* 抑制されており、これらを誘導していることが示唆された。そして、骨髄移植実験と *in vitro* の実験より、組織由来の細胞(非血球系細胞)から産生される IL-25 が、DCs とマクロファージに作用して IL-1 β と TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を促進することで、大動脈炎発症に重要な役割を果たしていることを示した。

本研究で得られた知見は、大動脈炎患者の治療に貢献するものと考えられた。

7 謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の機会を与えて下さいました自治医科大学総合医学 2・心臓血管外科分野 山口敦司教授に深く感謝致します。

本研究の遂行に当たり、素晴らしい研究環境を与えて頂くとともに、直接のご指導・ご助言を賜りました東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センターシステムズバイオロジー研究分野 中江進准教授に深く御礼申し上げます。

日頃から実験および解析結果について議論をして頂き、数々のご指導を賜りました東京大学医科学研究所 山口幸子技術専門員、東京医科大学皮膚科学分野 沼田貴史先生には心より御礼申し上げます。

本研究の様々な過程で、ご指導・ご鞭撻を賜りました自治医科大学総合医学 2 心臓血管外科分野 木村直行准教授には心より感謝致します。

8 引用文献

1. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis. *Immunity*. 47: 621-634, 2017
2. Brack A, Geisler A, Martinez-Taboada VM, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Giant cell vasculitis is a T cell-dependent disease. *Mol Med*. 3: 530-543, 1997
3. Weyand CM, Goronzy JJ. Immune mechanisms in medium and large-vessel vasculitis. *Nat Rev Rheumatol*. 9: 731-740, 2013
4. Ma D, Zheng B, Suzuki T, Zhang R, Jiang C, Bai D, Yin W, Yang Z, Zhang X, Hou L, Zhan H, Wen JK. Inhibition of KLF5-Myo9b-RhoA pathway-mediated podosome formation in macrophages ameliorates abdominal aortic aneurysm. *Circ Res*. 120: 799-815, 2017
5. Kussmaul A MR. Ueber eine bisher nicht beschriebene eigentümliche arterienerkrankung (periarteritis nodosa), die mit morbus brightii und rapid fortschreitender allgemeiner mukellähmung einhergeh. *Dtsch Arch Klin Med*: 484-518, 1866
6. 高安右人. 奇異ナル網膜中心血管ノ変化ノ一例. *日眼会誌*. 12: 554-555, 1908
7. 川崎富作. 指趾の特異的落屑を伴う小児の急性熱性皮膚粘膜リンパ腺症候群. *アレルギー*. 16: 178-222, 1967
8. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, Flores-Suarez LF, Gross WL, Guillevin L, Hagen EC, Hoffman GS, Jayne DR,

- Kallenberg CG, Lamprecht P, Langford CA, Luqmani RA, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Ozen S, Pusey CD, Rasmussen N, Rees AJ, Scott DG, Specks U, Stone JH, Takahashi K, Watts RA. 2012 revised international Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum.* 65: 1-11, 2013
9. Keser G, Aksu K. Diagnosis and differential diagnosis of large-vessel vasculitides. *Rheumatol Int.* 39: 169-185, 2019
 10. Stone JR, Bruneval P, Angelini A, Bartoloni G, Basso C, Batoroeva L, Buja LM, Butany J, d'Amati G, Fallon JT, Gittenberger-de Groot AC, Gouveia RH, Halushka MK, Kelly KL, Kholova I, Leone O, Litovsky SH, Maleszewski JJ, Miller DV, Mitchell RN, Preston SD, Pucci A, Radio SJ, Rodriguez ER, Sheppard MN, Suvarna SK, Tan CD, Thiene G, van der Wal AC, Veinot JP. Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association for European Cardiovascular Pathology: I. Inflammatory diseases. *Cardiovasc Pathol.* 24: 267-278, 2015
 11. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 96: 23-43, 2002
 12. Mazlumzadeh M, Hunder GG, Easley KA, Calamia KT, Matteson EL, Griffing WL, Younge BR, Weyand CM, Goronzy JJ. Treatment of giant cell arteritis using induction therapy with high-dose glucocorticoids: a double-blind, placebo-controlled, randomized prospective clinical trial. *Arthritis Rheum.* 54: 3310-3318, 2006
 13. Mukhtyar C, Guillevin L, Cid MC, Dasgupta B, de Groot K, Gross W,

- Hauser T, Hellmich B, Jayne D, Kallenberg CG, Merkel PA, Raspe H, Salvarani C, Scott DG, Stegeman C, Watts R, Westman K, Witter J, Yazici H, Luqmani R, European Vasculitis Study G. EULAR recommendations for the management of large vessel vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 68: 318-323, 2009
14. Hoffman GS, Leavitt RY, Kerr GS, Rottem M, Sneller MC, Fauci AS. Treatment of glucocorticoid-resistant or relapsing Takayasu arteritis with methotrexate. *Arthritis Rheum.* 37: 578-582, 1994
 15. Mahr AD, Jover JA, Spiera RF, Hernandez-Garcia C, Fernandez-Gutierrez B, Lavalley MP, Merkel PA. Adjunctive methotrexate for treatment of giant cell arteritis: an individual patient data meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 56: 2789-2797, 2007
 16. Ohgashi H, Tamura N, Ebana Y, Harigai M, Maejima Y, Ashikaga T, Isobe M. Effects of immunosuppressive and biological agents on refractory Takayasu arteritis patients unresponsive to glucocorticoid treatment. *J Cardiol.* 69: 774-778, 2017
 17. de Boysson H, Daumas A, Vautier M, Parienti JJ, Liozon E, Lambert M, Samson M, Ebbo M, Dumont A, Sultan A, Bonnotte B, Manrique A, Bienvenu B, Saadoun D, Aouba A. Large-vessel involvement and aortic dilation in giant-cell arteritis. A multicenter study of 549 patients. *Autoimmun Rev.* 17: 391-398, 2018
 18. Nicklin MJ, Hughes DE, Barton JL, Ure JM, Duff GW. Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. *J Exp Med.* 191: 303-312, 2000

19. Ishigame H, Nakajima A, Saijo S, Komiyama Y, Nambu A, Matsuki T, Nakae S, Horai R, Kakuta S, Iwakura Y. The role of TNF α and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Ernst Schering Res Found Workshop*: 129-153, 2006
20. Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Korner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *J Immunol*. 189: 3641-3652, 2012
21. Kohanski MA, Workman AD, Patel NN, Hung LY, Shtraks JP, Chen B, Blasetti M, Doghramji L, Kennedy DW, Adappa ND, Palmer JN, Herbert DR, Cohen NA. Solitary chemosensory cells are a primary epithelial source of IL-25 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 142: 460-469.e467, 2018
22. von Moltke J, Ji M, Liang HE, Locksley RM. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*. 529: 221-225, 2016
23. Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood*. 101: 3594-3596, 2003
24. Valizadeh A, Khosravi A, Zadeh LJ, Parizad EG. Role of IL-25 in immunity. *J Clin Diagn Res*. 9: Oe01-04, 2015

25. Zaph C, Du Y, Saenz SA, Nair MG, Perrigoue JG, Taylor BC, Troy AE, Kobuley DE, Kastelein RA, Cua DJ, Yu Y, Artis D. Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. *J Exp Med*. 205: 2191-2198, 2008
26. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 10: 225-235, 2010
27. Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 21: 413-423, 2010
28. Klose CS, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol*. 17: 765-774, 2016
29. Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev*. 226: 172-190, 2008
30. Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, Blumenschein WM, McClanahan T, Brombacher F, Hurst SD, Kastelein RA, Cua DJ. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 204: 161-170, 2007
31. Suto H, Nambu A, Morita H, Yamaguchi S, Numata T, Yoshizaki T, Shimura E, Arae K, Asada Y, Motomura K, Kaneko M, Abe T, Matsuda A, Iwakura Y, Okumura K, Saito H, Matsumoto K, Sudo K, Nakae S. IL-25 enhances TH17 cell-mediated contact dermatitis by promoting IL-1 β production by dermal dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 142: 1500-1509.e1510, 2018

32. Xu M, Lu H, Lee YH, Wu Y, Liu K, Shi Y, An H, Zhang J, Wang X, Lai Y, Dong C. An interleukin-25-mediated autoregulatory circuit in keratinocytes plays a pivotal role in psoriatic skin inflammation. *Immunity*. 48: 787-798 e784, 2018
33. Horai R, Isoda K, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M, Iwakura Y. Production of mice deficient in genes for interleukin IL-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med*. 187: 1463-1475, 1998
34. Ishii A, Oboki K, Nambu A, Morita H, Ohno T, Kajiwarra N, Arae K, Sudo H, Okumura K, Saito H, Nakae S. Development of IL-17-mediated delayed-type hypersensitivity is not affected by down-regulation of IL-25 expression. *Allergol Int*. 59: 399-408, 2010
35. Matsuki T, Isoda K, Horai R, Nakajima A, Aizawa Y, Suzuki K, Ohsuzu F, Iwakura Y. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the development of T cell-dependent aortitis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation*. 112: 1323-1331, 2005
36. Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu H-B, Cyster JG. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*. 20: 441-453, 2004
37. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 31: 331-341, 2009

38. Savioli B, Abdulahad WH, Brouwer E, Kallenberg CGM, de Souza AWS. Are cytokines and chemokines suitable biomarkers for Takayasu arteritis? *Autoimmun Rev.* 16: 1071-1078, 2017
39. Espigol-Frigole G, Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Segarra M, Garcia-Martinez A, Prieto-Gonzalez S, Hernandez-Rodriguez J, Grau JM, Rahman MU, Cid MC. Increased IL-17A expression in temporal artery lesions is a predictor of sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 72: 1481-1487, 2013
40. Ness-Schwickerath KJ, Morita CT. Regulation and function of IL-17A- and IL-22-producing gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci.* 68: 2371-2390, 2011
41. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature.* 370: 270-275, 1994
42. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 356: 768-774, 1992
43. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science.* 327: 296-300, 2010
44. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA.

- Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood*. 113: 2324-2335, 2009
45. Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, Leimer AH, Cheronis J. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor α and IL-1 β from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 6261-6266, 1999
 46. Irmeler M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R, Tschopp J. Granzyme A is an interleukin 1 β -converting enzyme. *J Exp Med*. 181: 1917-1922, 1995
 47. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 30: 576-587, 2009
 48. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 8: 942-949, 2007
 49. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 10: 89-102, 2010
 50. Sugawara R, Lee E-J, Jang MS, Jeun E-J, Hong C-P, Kim J-H, Park A, Yun CH, Hong S-W, Kim Y-M, Seoh J-Y, Jung Y, Surh CD, Miyasaka M, Yang B-G, Jang MH. Small intestinal eosinophils regulate Th17 cells by producing IL-1 receptor antagonist. 213: 555-567, 2016

51. Senra L, Mylonas A, Kavanagh RD, Fallon PG, Conrad C, Borowczyk-Michalowska J, Wrobel LJ, Kaya G, Yawalkar N, Boehncke WH, Brembilla NC. IL-17E (IL-25) enhances innate immune responses during skin inflammation. *J Invest Dermatol*, 2019 in press
52. Senra L, Stalder R, Alvarez Martinez D, Chizzolini C, Boehncke WH, Brembilla NC. Keratinocyte-derived IL-17E contributes to inflammation in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 136: 1970-1980, 2016
53. Dasgupta B, Panayi GS. Interleukin-6 in serum of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Br J Rheumatol*. 29: 456-458, 1990
54. Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sanchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ, Queralt C, Grau JM, Urbano-Marquez A, Palacin A, Colomer D, Cid MC. Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)*. 43: 294-301, 2004
55. Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 36: 1286-1294, 1993
56. Mekinian A, Comarmond C, Resche-Rigon M, Mirault T, Kahn JE, Lambert M, Sibilia J, Neel A, Cohen P, Hie M, Berthier S, Marie I, Lavigne C, Anne Vandenhende M, Muller G, Amoura Z, Devilliers H, Abad S, Hamidou M, Guillevin L, Dhote R, Godeau B, Messas E, Cacoub P, Fain O, Saadoun

- D, French Takayasu N. Efficacy of biological-targeted treatments in Takayasu arteritis: multicenter, retrospective study of 49 patients. *Circulation*. 132: 1693-1700, 2015
57. Alberts-Grill N, Engelbertsen D, Bu D, Foks A, Grabie N, Herter JM, Kuperwaser F, Chen T, Destefano G, Jarolim P, Lichtman AH. Dendritic cell KLF2 expression regulates T cell activation and proatherogenic immune responses. *J Immunol*. 197: 4651-4662, 2016
 58. Misra DP, Chaurasia S, Misra R. Increased circulating Th17 cells, serum IL-17A, and IL-23 in Takayasu arteritis. *Autoimmune Dis*. 2016: 7841718, 2016
 59. Watanabe R, Zhang H, Berry G, Goronzy JJ, Weyand CM. Immune checkpoint dysfunction in large and medium vessel vasculitis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 312: H1052-H1059, 2017
 60. Terrier B, Geri G, Chaara W, Allenbach Y, Rosenzweig M, Costedoat-Chalumeau N, Fouret P, Musset L, Benveniste O, Six A, Klatzmann D, Saadoun D, Cacoub P. Interleukin-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 64: 2001-2011, 2012
 61. Ciccio F, Rizzo A, Ferrante A, Guggino G, Croci S, Cavazza A, Salvarani C, Triolo G. New insights into the pathogenesis of giant cell arteritis. *Autoimmun Rev*. 16: 675-683, 2017
 62. Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ, Weyand CM. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation*. 121: 906-915, 2010
 63. Zerbini A, Muratore F, Boiardi L, Ciccio F, Bonacini M, Belloni L, Cavazza A, Cimino L, Moramarco A, Alessandro R, Rizzo A, Parmeggiani M,

- Salvarani C, Croci S. Increased expression of interleukin-22 in patients with giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)*. 57: 64-72, 2018
64. Villiger PM, Adler S, Kuchen S, Wermelinger F, Dan D, Fiege V, Bütikofer L, Seitz M, Reichenbach S. Tocilizumab for induction and maintenance of remission in giant cell arteritis: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 387: 1921-1927, 2016
65. Stone JH, Tuckwell K, Dimonaco S, Klearman M, Aringer M, Blockmans D, Brouwer E, Cid MC, Dasgupta B, Rech J, Salvarani C, Schett G, Schulze-Koops H, Spiera R, Unizony SH, Collinson N. Trial of tocilizumab in giant-cell arteritis. *N Engl J Med*. 377: 317-328, 2017
66. Nakaoka Y, Isobe M, Takei S, Tanaka Y, Ishii T, Yokota S, Nomura A, Yoshida S, Nishimoto N. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with refractory Takayasu arteritis: results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial in Japan (the TAKT study). *Ann Rheum Dis*. 77: 348-354, 2018
67. Hoffman GS, Cid MC, Rendt-Zagar KE, Merkel PA, Weyand CM, Stone JH, Salvarani C, Xu W, Visvanathan S, Rahman MU. Infliximab for maintenance of glucocorticosteroid-induced remission of giant cell arteritis: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 146: 621-630, 2007
68. Martinez-Taboada VM, Rodriguez-Valverde V, Carreno L, Lopez-Longo J, Figueroa M, Belzunegui J, Mola EM, Bonilla G. A double-blind placebo controlled trial of etanercept in patients with giant cell arteritis and corticosteroid side effects. *Ann Rheum Dis*. 67: 625-630, 2008
69. Comarmond C, Plaisier E, Dahan K, Mirault T, Emmerich J, Amoura Z,

- Cacoub P, Saadoun D. Anti TNF-alpha in refractory Takayasu's arteritis: cases series and review of the literature. *Autoimmun Rev.* 11: 678-684, 2012
70. Clifford A, Hoffman GS. Recent advances in the medical management of Takayasu arteritis: an update on use of biologic therapies. *Curr Opin Rheumatol.* 26: 7-15, 2014
 71. McGee HM, Schmidt BA, Booth CJ, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA, Horsley V. IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin. *J Invest Dermatol.* 133: 1321-1329, 2013
 72. Miyata T, Sato O, Koyama H, Shigematsu H, Tada Y. Long-term survival after surgical treatment of patients with Takayasu's arteritis. *Circulation.* 108: 1474-1480, 2003
 73. Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, Libby P, Thuren T, Glynn RJ, Group CT. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet.* 391: 319-328, 2018
 74. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* 377: 1119-1131,

2017

75. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity*. 48: 434-452, 2018