

論文内容の要旨

論文提出者氏名 山本 啓太

論文題目

Augmented neutrophil extracellular traps formation promotes atherosclerosis development in socially defeated *apoE*^{-/-} mice

論文内容の要旨

うつ病は心血管疾患のリスク増加と強く関連しており、心血管疾患患者は健常人よりもうつ病を発症する可能性が高く、うつ病と急性冠症候群を合併した患者は、全死亡率および心臓死率が有意に高い為、うつ病は心血管疾患の独立した危険因子とされている。さらに、うつ病の有病率は青年期に増加しており、アテローム性動脈硬化症の促進や心血管疾患の早期発症につながる可能性がある。うつ病の適切なスクリーニングおよび治療介入は、心血管疾患を予防するために強く支持されている。しかし、うつ病と心血管疾患発症との因果関係は知られていない。本研究では、うつ病が動脈硬化に及ぼす影響に関して、反復する社会的敗北 (RSD, Repeated Social Defeat) を動脈硬化モデルマウスであるアポプロテイン E 欠損 (*apoE*-KO) マウスに与え、うつ病様モデルを用いて検討した。

8-10 週齢の雄の *apoE*-KO マウスを共有のケージに攻撃的な CD-1 マウスを入れ、連続 10 日間の RSD に暴露させた後に、6 週間にわたり高コレステロール食負荷をかけ、行動評価および動脈硬化形成の評価を解析した。Social interaction ratio および Immobility time は、HCD 負荷前後で社会的回避行動を示すように有意に変化した。RSD マウス群は大動脈起始部および全大動脈壁のオイルレッド O 染色によって求めた % プラーク面積が対照マウス群に比して有意に増加を認めた。平均血圧や脂質プロファイルは両群で同等であった。

RSD の暴露は交感神経系を介して、 β 3 アドレナリン受容体を活性化し骨髄のホメオスタシスを調整し、末梢循環への骨髄細胞を動員させることが報告されている。骨髄前駆細胞や末梢血単核球についてフローサイトメトリー法を用いて解析したが、両群で同様であ

った。一方で、末梢血好中球分画は RSD 群で有意に増加していた為、好中球増加が動脈硬化促進に関与することが示唆された。

近年、好中球の新たなタイプの細胞死である NETosis による好中球細胞外トラップ (NETs) の形成が、血管炎症およびアテローム性動脈硬化症の発症に関与していると報告されている。さらに、注目すべきは未成熟な好中球の亜集団である骨髄由来サブプレッサー細胞 (MDSC) が、活性酸素種 (ROS) に依存して NETs を形成する傾向あることが示されている。

そこで、NETs の発現マーカーであるシトルリン化ヒストン H3 (Cit-H3) およびミエロペルオキシダーゼ (MPO) を用いて、大動脈起始部領域の蛍光免疫染色を行ったところ、好中球の発現マーカーである Ly6G との共陽性領域が RSD マウス群で有意に増加していた。さらに、NETs 形成を分解する酵素である DNase I を投与することで、全大動脈壁の % プラーク面積は有意に減少し、動脈硬化形成抑制効果が認められた為、RSD 暴露による動脈硬化形成促進に NETs 形成が重要な役割を果たすことが示唆された。

続いて、フローサイトメトリー法を用いて HCD 負荷後の両群の MDSC を解析したところ、RSD 群において末梢血中の多形核骨髄由来サブプレッサー細胞 (PMN-MDSC) の割合が著明に増加していた。さらに、Real-time PCR 法を用いて Nox2 遺伝子の発現を測定したところ、RSD マウス群の PMN-MDSC では発現が増加していた。また、ホルボール 12-ミリストート 13-アセテート (PMA) による PMN-MDSC へ刺激による ROS 産生について DCFDA を用いてフローサイトメトリー法で測定したところ、RSD マウス群で有意に増加しており、NADPH オキシダーゼ活性に由来する ROS 産生の増加を示した。さらに、骨髄中の PMN-MDSC に対し、PMA 刺激による NETs 形成についてフローサイトメトリー法を用いて解析したところ、HCD 負荷前には両群で有意差は認めなかったが、HCD 負荷後には RSD 群で有意に増強されていた。

本研究の結果より、RSD の暴露がプラーク内での NETs 形成を増強することによって、アテローム性動脈硬化症を促進することが判明した。我々は、NETosis がうつ病に関連する心血管疾患の予防につながる潜在的な治療標的であると考えた。