京都大学	博士（医学）	氏　名	三岡　仁和
論文題目	Interleukin 18 stimulates release of soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (sLOX-1) （インターロイキン１８は可溶型 LOX-1 の放出を刺激する）		

（論文内容の要旨）

目的：動脈硬化の成因である酸化 LDL の受容体の一つである Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)はヒト動脈硬化プラークの平滑筋細胞および内皮細胞で強く発現され、酸化 LDL によるアポトーシスやマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の発現に関与し、動脈硬化プラークの不安定化に作用すると考えられている。一方、膜表面に発現された LOX-1 の一部が何らかのプロテアーゼにより切断されて生じる可溶型 LOX-1 (sLOX-1)が存在する。急性冠症候群患者(ACS)において血清中の sLOX-1 はトロポニン T などよりも早期に上昇を認め、ACS における超早期マーカーとして有用であることから、sLOX-1 の切断機構の解明が重要である。催炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン 18 (IL-18)の血中濃度は同様に ACS にて高値を認めると報告され、動脈硬化プラークにおいて IL-18 受容体とともにその強い発現が認められる。また、ADAM10 は種々の膜蛋白の細胞表面からの切断に関与することが知られる。以上より、IL-18 が LOX-1 の切断を促進し、その過程に ADAM10 が関与するとの仮説の下に、培養細胞実験およびマウスを用いた動物実験にて検討した。方法：293T 細胞に LOX-1 cDNA を含むベクターを感染させ、IL-18 濃度を 0～100ng/ml に変化させた培地にて培養し、約１５分間インキュベートした後に培地および細胞溶解液を回収した。回収した培地は部分精製した後に、細胞溶解液とともに抗 LOX-1 モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットにて解析した。また ADAM10 cDNA、ADAM10 siRNA、コントロールベクターを感染させた 293T 細胞を、同様に IL-18 濃度を変化させた培地にて培養し、回収された培地および細胞溶解液をウェスタンブロットにて解析した。更に、より生理的条件に近いと考えされる培養ウシ大動脈内皮細胞を TNF α 刺激にて LOX-1 の発現を増強させた後に、同様に IL-18 を含む培地ににて培養し培地中の LOX-1 をウェスタンブロットにて解析した。精製培地中の sLOX-1 の量と細胞溶解液中の LOX-1 の量の比を LOX-1 の切断活性として定量した。また血管内皮にヒト LOX-1 を血管壁で強発現させたトランスジェニックマウスを作成し、免疫組織学的に大動脈の血管内皮及び平滑筋細胞にヒト LOX-1 が発現していることを確認した。このトランスジェニックマウスに腹腔内にリコンビナント-マウス IL-18(2 μ g)を注射し、血清中のヒト sLOX-1 を ELISA にて測定し、対照として生理食塩水を注射したマウスと比較した。結果：IL-18 刺激は濃度および時間依存的に LOX-1 切断を促進した。ADAM10 cDNA を感染させることにより ADAM10 は強発現され、IL-18 刺激を加えなくても LOX-1 切断は増強された。RNA 干渉による ADAM10 発現の抑制は、IL-18 刺激による LOX-1 切断を有意に抑制した。ウシ大動脈内皮細胞においても IL-18 は LOX-1 の切断を増強した。トランスジェニックマウスの血中 sLOX-1 は IL-18 の腹腔内注射により、コントロールに比べ有意に上昇を認めた。結論：IL-18 は ACS における sLOX-1 の放出を促進する因子の一つであり、ADAM10 がその過程に関与している可能性が考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

動脈硬化プラークの不安定に関与すると考えられる酸化LDL受容体 Lectin-like oxidized LDL receptor-1(LOX-1)は、その一部が何らかのプロテアーゼにより細胞表面から切断され可溶型 LOX-1(sLOX-1)となるが、その血中濃度は急性冠症候群(ACS)の超急性期から上昇する。一方、催炎症性サイトカイン、インターロイキン18(IL-18)とその受容体は、動脈硬化病変で強く発現され、ACSの急性期にはIL-18の血中濃度が上昇する。そこで、IL-18がsLOX-1の切断を促進する可能性を培養細胞およびモデル動物にて検証した。IL-18の刺激は、LOX-1を強発現する培養細胞および培養血管内皮細胞にてsLOX-1の切断を増加させた。これらの細胞でADAM10を強発現させるとsLOX-1の切断は増加し、RNA干渉にてADAM10の発現を減少させるとIL-18刺激によるsLOX-1の切断は抑制された。さらに、血管内皮および平滑筋細胞でヒトLOX-1を強発現するトランスジェニックマウスの腹腔内にマウスIL-18を投与すると、ヒトsLOX-1の血中濃度が有意に上昇した。以上よりIL-18はsLOX-1の放出を促進する因子の一つであり、ADAM10はその過程に関与することが示された。

以上の研究はACSの超急性期診断のバイオマーカーと考えられる　sLOX-1の細胞表面からの切断メカニズムの解明に寄与し、さらに今後のsLOX-1の幅広い臨床応用にも貢献するものと考えられる。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成20年7月2日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降