



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mast cells as immune regulators in atherosclerosis

Kritikou, E.

Citation

Kritikou, E. (2017, December 12). *Mast cells as immune regulators in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/59479>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/59479>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Dutch summary

Nederlandse samenvatting

Slagaderverkalking oftewel atherosclerose is de belangrijkste onderliggende oorzaak van acute cardiovasculaire syndromen zoals een hartinfarct of beroerte¹. Hart- en vaatziekten waren in 2014 verantwoordelijk voor 1 op de 3 doden onder volwassenen in de Verenigde Staten, waarbij gemiddeld 1 sterfgeval per 40 seconden te betreuren viel². In Europa zijn hart- en vaatziekten verantwoordelijk voor 45% van alle doden volgens de huidige statistieken van 2017³. Hoewel het aantal doden door kanker de afgelopen jaren sterk gestegen is, is de mortaliteit door hart- en vaatziekten vandaag de dag hoger dan het aantal doden door kanker en chronische luchtwegaandoeningen bij elkaar¹. Daarom is het onderzoek naar nieuwe therapeutische strategieën, die de ontwikkeling van atherosclerose vanaf een vroeg stadium tegengaan, noodzakelijk.

De ontwikkeling van een atherosclerotische plaque is een chronisch proces, dat voortkomt uit een verstoorde lipidenhuishouding en dysfunctie van het immuunsysteem⁴. De mestcel is een cel behorende tot dit immuunsysteem, die beschreven is betrokken te zijn bij de progressie van atherosclerose in zowel muizen als mensen⁵. Het aantal mestcellen, dat aanwezig is plaques in de halsslagader van patiënten, bleek een voorspellende waarde te hebben voor het krijgen van een toekomstige acute cardiovasculaire aandoening, en was ook geassocieerd met de aanwezigheid van intraplaque bloedingen, een karakteristiek van plaque instabiliteit⁶. Activatie van de mestcel in de plaque kan leiden tot plaque destabilisatie⁷, wat de kans op het krijgen van bijvoorbeeld een hartinfarct kan verhogen. De exacte mechanismen, die kunnen leiden tot mestcelactivatie in de plaque, zijn tot op heden echter niet tot in detail onderzocht.

In dit proefschrift hebben we de bijdrage van mestcellen aan de ontwikkeling van zowel experimentele als humane atherosclerose onderzocht.

In **hoofdstuk 3** hebben we de therapeutische potentie van de LPA₁₋₃ receptor antagonist Ki15425, een stof die de activatie van mestcellen door lysosofatidaat (lysophosphatidic acid, LPA) kan remmen, onderzocht⁸. In **hoofdstukken 4 en 5** is de tot op heden onbekende bijdrage van mestcel-gemedieerde antigen presentatie aan atherosclerose bekeken. In **hoofdstuk 6** hebben we bepaald in welke mate mestcellen aanwezig zijn in humane atherosclerotische plaques, en daarnaast de functie van de mestcel in deze plaques onderzocht om de mogelijke translatie van onze *in vivo* data naar de patient in kaart te brengen. Tenslotte is in **hoofdstuk 7** de bijdrage van de mestcel aan atherosclerotische plaque regressie onderzocht.

Modulatie van de immuunrespons in atherosclerose door mestcellen

Het onderzoek naar de bijdrage van de mestcel aan de pathologie van atherosclerose heeft de laatste jaren in toenemende mate aandacht gekregen. Activatie van mestcellen kan nadelige effecten hebben bij verschillende immuun-gerelateerde ziekten zoals allergie⁹ or reumatoïde artritis¹⁰, en het is ook noodzakelijk om de exacte bijdrage van deze cel aan de ontwikkeling van atherosclerose te onderzoeken.

Hoofdstuk 2 van dit proefschrift geeft een algemeen overzicht van de effecten van de mestcel op hart- en vaatziekten. De effecten van de mestcel op de ontwikkeling van atherosclerose zijn de afgelopen 20 jaar onderzocht en dit onderzoek hebben we in dit hoofdstuk samengevat. Er is echter nog niet veel bekend over de effecten van de mestcel op ander cardiovasculaire pathologieën. In dit hoofdstuk hebben we ook studies naar de bijdrage van de mestcel aan dieet-geïnduceerde obesitas beschreven. Mestcellen kunnen infiltreren in het vetweefsel, en daar een bijdrage leveren aan adipogenese en obesitas. Recentelijk is echter aangetoond dat mestcellen door de secretie van leptine ook zouden kunnen beschermen tegen obesitas en diabetes, wat de tweeledige rol van de mestcel illustreert¹³. Dit werd nog eens bevestigd door een artikel waarin is beschreven dat mestcellen de vorming van bruin vet¹⁴, een type vet dat betrokken is bij onze temperatuurhuishouding¹⁵, kan bevorderen. Deze verschillende functies van de mestcel zijn ook van belang bij bijvoorbeeld een hartinfarct. Mestcellen zijn eerder aangetoond betrokken te zijn bij plaqueruptuur¹⁶, en ook in een recent artikel bleek de mestcel in verhoogde aantallen aanwezig in patiënten met zowel stabiele als instabiele plaques in de kransslagader, en in patiënten die zijn getroffen door een hartinfarct¹⁷. Mestcellen hebben daar echter niet alleen nadelige effecten, aangezien deze cellen ook van belang zijn bij de vorming van nieuwe bloedvaten, en bij het genezen van het myocardium na een acuut infarct^{18,19}. Zeer recentelijk is zelfs aangetoond dat mestcellen uit het vetweefsel kunnen communiceren met cardiomyocyten, en daarmee de contractiliteit van de cardiomyocyten en de hartfunctie kunnen bevorderen²⁰.

Mestcellen kunnen effecten hebben op de snelheid van het hartritme, wat uitermate van belang kan zijn bij aritmieën, zoals we ook beschrijven in het tweede hoofdstuk. Mestcellen zijn een aantal jaren geleden beschreven bij atriumfibrilleren²¹, en verschillende hartritmestoornissen, en met name atriumfibrilleren, zijn geassocieerd met atherosclerose^{1,22}. Aritmie in relatie tot het immuunsysteem is tot op heden nog niet tot in detail onderzocht. Hoewel de mestcel ook onder gezonde omstandigheden al aanwezig is in het hart²³, lijkt de bijdrage van de mestcel bij het ontstaan van hartritmestoornissen ongunstig^{24,25}. Naast mestcellen kunnen ook macrofagen het hartritme beïnvloeden²⁶. Mestcellen kunnen een interactie aangaan met macrofagen in cardiovasculaire aandoeningen zoals atherosclerose²⁷ en bij de vorming van een

aneurysma²⁸. Hoewel dit geen causaal verband bewijst, zou het zeer interessant zijn om de mogelijke interactie tussen weefselmacrofagen en mestcellen in het hart in hartritmestoornissen te onderzoeken.

Omdat mestcellen zeer verschillende effecten op het omliggende weefsel kunnen hebben, en omdat atherosclerose de onderliggende pathologie is van het merendeel van de hart- en vaatziekten, hebben wij als doel gesteld de bijdrage van de mestcel aan experimentele atherosclerose en de effecten op de ontstekingsreactie te onderzoeken.

In **hoofdstuk 3** hebben we de remming van LPA-gemedieerde mestcelactivatie²⁹ op de ontwikkeling van atherosclerose onderzocht. LPA is een bioactief lipide, dat accumuleert in de atherosclerotische plaque, waar het bij kan dragen aan de progressie van atherosclerose^{30,31}. LPA bindt aan specifieke LPA_{1/3} receptoren³², die zich op verscheidene immuuncellen³³ waaronder de mestcel^{29,34} bevinden. Daarom hebben we in deze studie de effecten van LPA geremd door de LPA_{1/3} receptoren te blokkeren met de chemische stof Ki16425. LPA_{1/3} blokkade bleek een significant effect te hebben op de systemische immuunrespons en resulteerde in een 40% remming van plaquevorming, wat veroorzaakt werd door een verminderde hoeveelheid macrofagen in de plaque. Het beschermende effect van Ki16425 kwam door een verstoring van de CCR2-CCL2 interactie, maar we zagen ook een toename in de hoeveelheid anti-inflammatoire monocytten en regulatoire T cellen. Daarnaast observeerden we ook een lichte daling in de circulerende LDL cholesterol niveaus. Over het geheel bekeken lijkt de blokkade van LPA_{1/3} een interessante therapeutische methode om de progressie van atherosclerose te remmen. Onze data laten zien dat blokkade van LPA_{1/3} niet alleen een verschuiving van een pro- naar een anti-inflammatoire respons kan induceren en plaqueprogressie kan verminderen, maar ook de cholesterolniveaus kan reguleren. We konden in deze studie echter geen effecten op mestcellen aantonen. Desalniettemin zijn er nog steeds aanwijzingen dat LPA de mestcel kan beïnvloeden. Er zijn bijvoorbeeld andere LPA receptoren die door de mestcel tot expressie worden gebracht, die niet geblokkeerd werden in deze studie³⁵. Daarnaast werden de effecten van LPA op mestcellen met name waargenomen in vergevorderde atherosclerose²⁹, een stadium dat we in deze studie niet bekeken hebben. Het gunstige effect dat wij hebben waargenomen op de verworven immuniteit suggereert dat blokkade van LPA_{1/3} ook voor een langere periode effectief zou kunnen zijn. Het zou daarom zeer interessant zijn om deze de effecten van deze stof in een langdurige studie te bekijken. De toename in het aantal regulatoire T cellen geeft daarnaast nog eens een extra aanleiding om LPA_{1/3} blokkade nader te onderzoeken, bijvoorbeeld in plaque regressie, aangezien ook deze cellen een aantrekkelijk therapeutisch aangrijpingspunt zijn^{36,37}.

De betrokkenheid van de verworven immuunrespons, en voornamelijk de bijdrage van de T cellen, in atherosclerose is welbekend³⁸. CD4⁺ T cellen, en met name

de T_{H1} cellen, zijn in grote getalen aanwezig in de atherosclerotische plaque³⁹. In **hoofdstuk 4** bediscussiëren we een nieuw gevonden interactie tussen mestcellen en $CD4^+$ T cellen in atherosclerose. Wetende dat mestcellen kunnen communiceren met T cellen in andere ontstekingsziekten^{40,41}, en gebaseerd om nieuwe studies waarbij de antigen presenterende functie van mestcellen wordt beschreven^{42,43}, hebben wij onderzocht of mestcellen een interactie aangaan met $CD4^+$ T cellen in atherosclerose. We beschrijven in dit hoofdstuk dat mestcellen de antigen presenterende capaciteit kunnen verhogen gedurende hyperlipidemie door de MHC-II expressie in zowel experimentele atherosclerose als in humane plaques te verhogen. Hierdoor kunnen mestcellen direct antigenen presenteren aan $CD4^+$ T cellen, die dan onder invloed van een hoog vet dieet differentiëren naar een pro-atherogeen T_{H1} subtype. Dit is interessant omdat mestcellen in allergie voornamelijk een T_{H2} respons bevorderen⁴⁴. Mestcellen lijken daarom verschillende effecten te kunnen hebben op T cellen, afhankelijk van de ontsteking in het lokale milieu. Atherosclerose, als T_{H1} gemedieerde ziekte, zorgt waarschijnlijk voor presentatie van antigenen, die de T_{H1} subset beïnvloeden. In allergieën daarentegen lijken mestcellen een T_{H2} respons te bevorderen. Het zou daarom interessant zijn om te onderzoeken of deze mestcel- $CD4^+$ T cel interactie resulteert in antilichaamproductie door B cellen. Daarnaast kunnen we bekijken of specifieke depletie van MHC-II op de mestcel de progressie van atherosclerose *in vivo* kan beïnvloeden. Daarbij weten we nog niet welke antigenen via MHC-II gepresenteerd worden door mestcellen aan $CD4^+$ T-cellen in atherosclerose. In de toekomst zou het interessant kunnen zijn om MHC-II epitopen op mestcellen te screenen voor lipiden-specifieke antigenen, en daarnaast weten we nog niet via welk mechanisme antigenen door de mestcellen worden opgenomen uit de omgeving. Een laatste cruciale vraag is of mestcellen lipiden kunnen opnemen en opslaan als zogenaamde “foam-cellen”. Er zijn tot op heden geen aanwijzingen dat mestcellen klassieke opnamereceptoren hebben voor lipiden zoals het geval bij macrofagen en dendritische cellen, maar deze mestcellen zouden lipiden mogelijk kunnen opnemen via andere mechanismen, en vervolgens opslaan als neutrale lipiden.

In **hoofdstuk 5** hebben we de interactie tussen mestcellen en het verworven immuunsysteem in atherosclerose verder onderzocht door mestceldeficiënte muizen te repopuleren met $CD1d$ deficiënte of controle mestcellen. In deze studie hebben we een directe interactie tussen mestcellen en de NKT cel populatie gevonden via $CD1d$ -gemedieerde presentatie van lipiden. Verrassend genoeg zagen we in deze studie een beschermend effect van mestcellen in atherosclerose. Dit was een onverwachte bevinding aangezien NKT cellen, die in deze studie verminderd geactiveerd bleken, in de literatuur als pro-atherogeen worden aangeduid, voornamelijk via presentatie van lipiden door $CD1d$ ⁴⁵. NKT cellen kunnen echter zowel als activator als als remmer van de immuunrespons functioneren, afhankelijk van het glycolipide dat aan deze cellen

gepresenteerd wordt^{46,47}. Het is zelfs aangetoond dat NKT cellen CD4⁺ T cellen in atherosclerose kunnen remmen op een soortgelijk manier als wij in deze studie hebben geobserveerd⁴⁸. Daarnaast kunnen NKT cellen een beschermende rol spelen in auto-immuunziekten zoals obesitas⁴⁹ en reumatoïde artritis⁵⁰, waarbij ook mestcellen een rol kunnen spelen. Antigen presentatie via CD1d op mestcellen lijkt daarom, in tegenstelling tot de klassieke presentatie van lipide antigenen via CD1d op antigen presenterende cellen die atherosclerose bevorderen^{51,52}, beschermend te werken. Hoewel het interessant is dat mestcellen ook in deze studie de CD4⁺ T_{H1} cel respons beïnvloeden, alhoewel indirect, lijkt deze interactie sterk afhankelijk van de stimulans, en is er meer onderzoek nodig om de exacte bijdrage van deze mechanismen in atherosclerose te bevestigen.

De antigeen presenterende capaciteit van humane mestcellen genoemd in hoofdstuk 4 was een onderdeel van een algemene karakterisatie van humane mestcellen zoals beschreven in **hoofdstuk 6**. Hoewel de mestcel de enige immuuncel is waarvan de correlatie met toekomstige cardiovasculaire events is beschreven⁶, is het activatiemechanisme van de mestcellen in de vergevorderde atherosclerotische plaque nog niet tot in detail bekend. In deze studie hebben we mestcellen uit 22 arteriën, verkregen van endarterectomie operaties (carotis en femoralis), geïsoleerd en gekarakteriseerd middels flow cytometry. We hebben met de verkregen flow cytometry data bestaande immunohistochemische data bevestigd, waarin is beschreven dat de mestcellen verschillende proteasen kunnen bevatten⁵³. De mestcellen bleken heterogene hoeveelheden chymase en tryptase te produceren. Van belang was dat een groot aantal mestcellen in de plaque geactiveerd bleek, gebaseerd op de expressie van CD63 als marker voor mestcelactivatie⁵⁴. Van deze geactiveerde mestcellen was de meerderheid gesensitiseerd met IgE, wat aangeeft dat dit een belangrijk mestcelactivatie mechanisme kan zijn in atherosclerose. Dit is niet verrassend, aangezien mestcellen bekend staan om de klassieke degranulatie via antigen-gesensitiseerde IgE binding op Fcε-receptoren⁵⁵, zoals bijvoorbeeld in allergieën. Dit zou ook kunnen verklaren waarom serum IgE niveaus positief correleren met de aanwezigheid van coronary artery disease (CAD)⁵⁶, wat ook geassocieerd is met de aanwezigheid van mestcellen^{6,17}. Er was daarnaast ook een kleinere fractie mestcellen, die was geactiveerd via mechanismen anders dan via IgE, wat aangeeft dat er meerdere mechanismen zijn waardoor mestcellen kunnen worden geactiveerd in de atherosclerotische plaque. Verschillende *in vivo* studies beschrijven dat mestcellen in hart- en vaatziekten kunnen worden geactiveerd via bijvoorbeeld TLRs⁵⁷, complement receptoren⁵⁷ of neuropeptide receptoren⁵⁸. Tot op heden hebben we echter nog geen indicatie voor de bijdrage van deze alternatieve activatiemechanismen aan humane atherosclerotische plaque destabilisatie. De nadelige effecten echter die mestcellen kunnen hebben op plaquestabiliteit, zoals het induceren van intraplaque bloedingen⁵⁹, geven het belang aan van deze cellen in plaque

destabilisatie, en onderstrepen de potentie van therapieën die op mestcellen kunnen aangrijpen.

In **hoofdstuk 7** hebben we de therapeutische capaciteit van mestcellen in atherosclerotische plaque regressie onderzocht. In deze studie hebben mestcellen conditioneel gedepleteerd in de muizen, die al atherosclerose hadden ontwikkelend. Tegelijkertijd is ook het dieet gewisseld van een hoog vet dieet naar normaal knaagvoer. Met deze experimentele opzet hebben we geen effecten van mestceldepletie op de plaquegrootte waargenomen, wat aangeeft dat depletie van mestcellen op het moment dat er al een ontstekingsproces gaande is, geen bijdrage levert aan het reduceren van een bestaande atherosclerotische plaque. In deze studie bleek het aantal neutrofielen in de plaque wel sterk verlaagd na depletie van mestcellen, wat verklaard kan worden door de afwezigheid van chemotactische stoffen die een mestcel kan uitscheiden. Mestcellen kunnen door het uitscheiden van chemokines bij voorkeur neutrofielen naar de plaque recruter⁶⁰. Ook bleek het collageengehalte in de plaque verlaagd door mestceldepletie, en dit was onverwacht aangezien mestcellen middels het uitscheiden van chymase⁶¹ collageen in de plaque kunnen afbreken. Tryptase kan aan de andere kant collageensynthese induceren, zoals is gebleken in een nierfibrose model⁶², wat de complexiteit van deze mestcellen in ziekteprocessen illustreert. Dit maakt mede duidelijk dat de mestcel geen celtype is wat eenduidig pro-inflammatoir is in hart- en vaatziekten en de functie van deze cel dient in detail per specifiek ziektebeeld te worden onderzocht. De data gegeneert in dit proefschrift illustreren dat we, in de zoektocht naar nieuwe therapeutische strategieën, niet enkel naar depletie of complete remming van mestcellen zouden moeten te kijken, aangezien de mestcel niet enkel nadelige effecten laat zien, maar ook als fine-tuner van de lokale immuunrespons kan optreden.

Op dit moment worden atherosclerose met name farmacologisch behandeld middels statines⁶³, die ontwikkeld zijn als geneesmiddel om het non-HDL cholesterol te verlagen. Statines bleken echter ook ontstekingsremmend te werken, en dit resulteerde in atherosclerotische plaque stabilisatie⁶³. Een nieuwe aanpak voor het verlagen van LDL is recentelijk in de praktijk gebracht. De expressie van het levereiwit PCSK9 kan door middel van antilichaamtherapie verlaagd worden, wat uiteindelijk leidt tot een 50% verlaging van circulerende LDL niveaus, wat een zeer veelbelovende uitkomst is⁶⁵. Het is tot op heden nog niet mogelijk om een bestaande atherosclerotische plaque te verminderen (plaque regressie)⁶⁴. De lange-termijn effecten van deze therapie zijn nog niet bekend, maar wellicht zou regressie mogelijk zijn. Het induceren van plaque regressie zou een therapeutische doorbraak zijn, en het huidige onderzoek richt zich dan ook op het bereiken van plaque regressie. In dierexperimentele modellen worden bijvoorbeeld het stimuleren van reverse cholesterol transport door het antagoneren van specifieke micro-RNAs⁶⁶, of het remmen van immuunmechanismen in combinatie

met lipidenverlaging onderzocht^{67,68}. Het zou ook interessant kunnen zijn om LPA_{1/3} blokkade in de context van regressie te bestuderen.

Tenslotte heeft ongeveer twee maanden geleden de grote CANTOS trial, waarin remming van het proinflammatoire cytokine IL-1 β door het antilichaam canakinumab is onderzocht, het klinische eindpunt bereikt⁶⁹. Patienten behandeld met canakinumab hadden een significante verlaging in het risico op het krijgen van een secundair cardiovasculair event⁷⁰. Dit anti-inflammatoire geneesmiddel betekent een wetenschappelijke doorbraak, vergelijkbaar met de ontdekking van de statines, die de weg vrij maakt voor de ontwikkeling van nieuwe ontstekingsremmende geneesmiddelen tegen hart- en vaatziekten.