

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 高 橋 将 成

学 位 論 文 題 名

Studies on the Role of Natural Killer T Cells on Cardiac Hypertrophy and Failure in Mice due to Chronic Pressure Overload in Mice

(慢性圧負荷によるマウスの心肥大および心不全におけるインバリアントナチュラルキラーT細胞の役割に関する研究)

【背景と目的】 心肥大は心不全の代表的な予後予測因子である。圧負荷に対して初期には代償性に求心性心肥大が生じ、心室壁へのストレスを正常化させ、左室のポンプ機能を維持しようとする。しかし、過剰な圧負荷が持続すると代償機構は破綻し、心筋の拡張および収縮機能が障害され、病的な心肥大と心リモデリングが起こる。炎症は心リモデリングの重要な分子生物学的因子の一つであり、インターロイキン6 (IL-6) や腫瘍性壊死因子 α (TNF- α) は、心肥大や心不全の進展に重要な役割を担っている。一方、慢性炎症は病的な心肥大から心不全へと移行する過程で保護的に働くことも報告されており、心臓における炎症が心不全において両方向性の役割を果たしている事を示唆している。

Invariant natural killer T (iNKT) 細胞は、NK マーカーである NK1.1 と可変性の無い T 細胞受容体 (マウスでは V α 14J α 18) を発現する T 細胞であり、CD1d で提示された糖脂質抗原を認識する。代表的リガンドである α -galactosylceramide (α GC) は iNKT 細胞を活性化させ、大量の T-helper type 1 (T_H1)、T_H2 サイトカインおよびケモカインを産生して獲得免疫反応を形成することから iNKT 細胞は自然免疫と獲得免疫の架け橋として機能し、組織炎症を統制していると考えられている。様々な動物モデルにおいて、iNKT 細胞は保護的な役割が報告されており、その作用は、T_H2 サイトカインの産生に依存していた。したがって、iNKT は心肥大や心不全の進展においても保護的に作用することが期待されるが、心肥大、心不全進展における iNKT 細胞の役割を検討した報告は皆無である。

本研究では、圧負荷により生じた心肥大、心不全における iNKT 細胞の病態生理学的な役割について検討した。

【対象と方法】 雄の野生型 C57BL/6J マウス (WT) および J α 18 遺伝子をノックアウトさせた J α 18^{-/-}マウス (KO) を使用した。マウス圧負荷心不全モデル作成の代表的な手術である大動脈縮窄手術 (TAC) 及び Sham 手術をマウスに施行した。実験は、以下の4セクションに分けて行った。①WT を用いて TAC 後の iNKT 細胞受容体の V α 14J α 18 遺伝子の定量的リアルタイム PCR による経時的変化を観察した。②圧負荷心不全モデルにおける iNKT 細胞欠損の影響を検討し、WT+Sham, KO+Sham, WT+TAC, KO+TAC の4群で解析した。まず、5週後の検討を行い、生存率と組織重量、心エコー、血行動態変化を観察した。次に、2週後の検討を行い、組織重量、心エコー、血行動態変化、組織学的解析、リアルタイム PCR、フローサイトメトリー、免疫プロット法、免疫組織染色での評価を行った。③圧負荷心不全モデルにおける iNKT 細胞活性化の影響を検討し、 α GC (1回 0.1 μ g/g) もしくは PBS を、術後第1, 4, 8, 11, 14病日に腹腔内投与の上 Sham+PBS, Sham+ α GC, TAC+PBS, TAC+ α GC の4群で5週後の生存率と組織重量、心エコー、血行動態変化を解析した。④圧負荷心不全モデルにおける IL-10 受容体抗体 (IL-10RAb) 投与の効果を検討し、IL-10RAb (100 μ g/マウス/回) もしくは PBS を術後第1, 4, 7, 10, 13病日に腹腔内投与の上、TAC+IL-10RAb, TAC+PBS の2群で2週後の生存率と組織重量、心エコー、血行動態変化を観察した。

【結果】 マウス正常心筋の定量リアルタイム PCR 及びフローサイトメトリーで iNKT 細胞の存在を証明し、TAC 手術2週後の心筋で iNKT 細胞の発現が増加していることを定量的

リアルタイム PCR 及びフローサイトメトリーで確認した。iNKT 細胞を欠損させることにより、WT+TAC と比較して、KO+TAC では WT+TAC と比較して 5 週後の生存率は低下した。また、心重量、左室重量、及び肺重量は増加し、左室内径が増加し、左室収縮率が低下し、左室拡張末期圧は上昇した。2 週後では、KO+TAC は WT+TAC と比較して、心重量、左室重量、肺重量は増加し、左室内腔が拡大し、左室内径短縮率が低下した。心筋細胞断面積、間質線維化率は KO+TAC で WT+TAC に比較して増大し、MMP-2, pro-MMP2 活性化の増大を伴っていた。定量的リアルタイム PCR において WT+TAC では、IL-10 の遺伝子発現が増加したが、KO マウスでは、減少した。免疫ブロット法では、KO マウスで、ERK1/2 のリン酸化は WT マウスと比較して有意に増加し、KO+TAC では更に増加した。TAC 手術後に、iNKT 細胞を活性化させると、生存率に有意差が無かったが、TAC+PBS に比較して TAC+ α GC では、心重量、左室重量、肺重量の増加、左室内腔の拡大、左室拡張末期圧の上昇ならびに左室内腔短縮率の低下は有意に抑制された。TAC+IL-10RAb と TAC+PBS の間で、生存率、組織重量、心エコーならびに血行動態に有意差が無かった。

【考察】本研究では、マウス心筋における iNKT 細胞の存在が明らかにされた。TAC 手術後の心筋で iNKT 細胞が増加することが示された。また、iNKT 細胞を欠損させると、TAC 手術後の死亡率、左室リモデリング、および左室収縮能が悪化し、組織レベルでも心筋細胞肥大と心筋間質線維化が増大した。さらに、KO では IL-10 遺伝子発現が減少し、ERK タンパクのリン酸化が増加した。一方、 α GC で iNKT 細胞を活性化させると、TAC 手術後の心重量、肺重量の増加および左室収縮末期圧の上昇が抑制された。

iNKT 細胞は、自己免疫性疾患や炎症性疾患などにおいて保護的な役割を果たしている。一方で、iNKT 細胞は、動脈硬化の血管壁の炎症や耐糖能異常での脂肪組織の炎症を活性化させることから iNKT 細胞は様々な疾患の組織炎症で、保護的および攻撃的の両方向性の役割を担っていると考えられる。iNKT 細胞の保護的な役割は T_H1 から T_H2 サイトカイン産生優位へシフトさせることや、IL-10 等の抗炎症サイトカインを優位に産生させることによって説明される。本研究では、TAC 手術後の iNKT 細胞数の変化に伴って、IL-10 の遺伝子発現が WT+TAC で増加し、KO+TAC で低下した。TAC 手術後に IL-10RAb を投与し IL-10 の作用を中和させたが、TAC+PBS と TAC+IL-10RAb の間に死亡率および心エコー、血行動態、および組織重量データに有意差はなかった。TNF- α は炎症性サイトカインとして作用し、心毒性と左室機能障害を導く一方で、心不全の進展に保護的な役割をする報告もある。実際、TNF 受容体抗体や TNF 抗体を心不全患者に投与した臨床研究では、有効性は確認されなかった。一方では、IL-10 と TNF- α の比が心機能低下と関連する報告があり、本研究で遺伝子発現量から求めた IL-10/TNF- α 比は、KO+TAC で WT+TAC に比較して有意に低下していた。これらの知見は、心不全進展に慢性炎症に関わる機序は、単一のサイトカインでなく、サイトカインネットワークの調節に焦点を当てるべきであることを示唆し、iNKT 細胞は、自然免疫反応と獲得免疫反応を繋ぐ架け橋として作用して圧負荷心不全におけるサイトカインネットワークの上流の調節因子として働いている可能性がある。

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) シグナルカスケードは、主に ERK 経路、p38 経路、JNK 経路の 3 種類のカスケードが存在する。特に、MEK1-ERK1/2 経路の活性化によって心肥大が引き起こされ、この経路の抑制によって間質の線維化と心機能障害が抑制される。本研究では、KO の心筋では、WT と比較して ERK1/2 のリン酸化が有意に増加し、KO+TAC においてさらに増加した。これらは、ERK 経路が KO における TAC 後の心筋細胞肥大と間質の線維化の増悪の調節因子の一つである可能性を示唆している。

【結論】iNKT 細胞は TAC 手術の圧負荷心不全進展に対して保護的な役割を果たし、心不全における炎症の機序において iNKT 細胞が重要な役割を果たしていることを明らかにした。従って、圧負荷心不全において iNKT 細胞を活性化させる治療法が期待される。今後の研究課題として心不全における iNKT 細胞のより詳細な病態生理学的機序や生物学的特徴を解明していく必要がある。