

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 齋 藤 晶 理

学位論文題名

Elucidating the Mechanisms of Chronic Inflammation Focusing on Natural Killer T Cells
(ナチュラルキラーT細胞に着目した慢性炎症の遷延機序の解明)

【背景と目的】 インバリアントナチュラルキラーT (iNKT) 細胞は、NK 細胞と T 細胞の受容体を同時に発現する T 細胞亜群である。樹状細胞 (DC) などの抗原提示細胞上に発現する MHC クラス I 様分子である CD1d 分子によって、 α -galactosylceramide (α GC) などの糖脂質抗原が iNKT 細胞を刺激すると、iNKT 細胞は即座に大量の interferon (IFN)- γ あるいは interleukin (IL)-4 を分泌して T-helper type 1 (Th1) および Th2 型免疫応答を誘導し、獲得免疫反応を形成する。したがって、iNKT 細胞は自然免疫と獲得免疫の架け橋として機能し、組織炎症を制御していると考えられる。

DC は、種々の抗原に対する免疫反応の起源および調整に関わる抗原提示細胞である。サイトカインやケミカルメディエーターなどの細胞外刺激や病原体関連分子パターンにより、DC は T 細胞を活性化し、Th1 あるいは Th2 型の免疫応答を惹起する。また DC は、CD1d 分子を介して iNKT 細胞を活性化する主要な抗原提示細胞である。 α GC に曝露された DC (α GC/DC) をマウスへ注入すると、 α GC を単独で注入した場合と比較し、iNKT 細胞からの IFN- γ の産生がさらに亢進する。一方、iNKT 細胞は、DC などの抗原提示細胞と協調して働き、炎症部位が IL-4 優位 Th2 型免疫応答の場合は iNKT 細胞が抗原提示細胞によって刺激されると IFN- γ を分泌して Th1 型免疫応答へと誘導する一方、IFN- γ 優位 Th1 型免疫応答の場合は IL-4 を分泌して Th2 型免疫応答へと誘導する。すなわち、iNKT 細胞を中心とした negative regulation が存在することが報告されている。

近年、動脈硬化やメタボリックシンドロームの発症・進展において、血管や脂肪組織での慢性炎症が重要であることが注目されているが、炎症が遷延する機序については未だ明らかではない。そこで、慢性炎症の遷延、ひいては心血管病の発症・進展において iNKT 細胞の果たす役割の解明を目指し、本研究を立案した。

本研究では①高脂血症モデルマウスでは iNKT 細胞がアナジーに陥っているかどうか、②negative regulation が iNKT 細胞アナジーによって破綻しているかどうか、③ α GC による iNKT 細胞活性化が腹部大動脈瘤の進展に影響を与えるかどうか、④ヒト由来 α GC/DC の有用性について、を検討した。

【方法と結果】 ①BALB/c マウスおよび BALB/c 背景高脂血症自然発症 BALB/c.KOR/Stm Slc-APoE^{Shl} (C.SHL) マウスの脾細胞中の iNKT 細胞の数をフローサイトメトリー法で解析し、*in vitro* で α GC (100 ng/mL) を用いて刺激することでサイトカイン産生能を評価した。その結果、各群で脾細胞中の iNKT 細胞の割合に変化はなかったが、BALB/c マウスに比べて C.SHL マウスで培養上清中の IFN- γ (8054 \pm 983 対 720 \pm 302 pg/mL, P <0.05) および IL-4 (187 \pm 27 対 60 \pm 6 pg/mL, P <0.05) 濃度は低下しアナジーに陥っているものと考えられた。②BALB/c マウスから分離・誘導した DC を IL-4 あるいは IFN- γ の存在下、あるいはサイ

トカイン非存在下に α GC と反応させ BALB/c マウスまたは C.SHL マウスの脾臓に直視下で注入し、血清サイトカイン濃度を検討した。その結果、いずれの DC を用いた場合も血清 IFN- γ および IL-4 値に有意な差はなく、negative regulation を証明するには至らなかった。③レプチン欠損 *ob/ob* マウスに皮下浸透圧ミニポンプを用いてアンジオテンシン II (AngII; 1000 ng/kg/min) または PBS を 4 週間持続投与した。それぞれの処置を行ったマウスをさらに 2 群に分け、 α GC (0.1 μ g/g 体重) (AngII- α GC 群および PBS- α GC 群) または PBS (AngII-PBS 群および PBS-PBS 群) を週 2 回腹腔内投与した。4 週間後の体重は各群間で差はなく、AngII 持続投与により収縮期圧、非 HDL コレステロール値は上昇したが、 α GC の投与はこれらに影響を与えなかった。腹部大動脈最大径は PBS-PBS 群に比べて AngII-PBS 群で有意に上昇 (833 \pm 69 対 1726 \pm 288 μ m, P <0.01) し、この上昇は AngII- α GC 群で有意に抑制された (1241 \pm 247 μ m, P <0.01 対 AngII-PBS)。大動脈組織から分離した単核球のフローサイトメトリー解析によると、PBS-PBS 群に比べて PBS- α GC 群および AngII-PBS 群で有意に iNKT 細胞は増加した。F4/80 陽性マクロファージおよび CD3 陽性 T リンパ球は AngII-PBS 群で増加し、この増加は AngII- α GC 群で有意に抑制された。AngII または PBS 投与 1 週間後の遺伝子解析では、Arginase-1 や Retnla (M2 マクロファージマーカー) の発現は AngII-PBS 群と PBS-PBS 群で同等であったが、AngII- α GC 群で有意に亢進していた。④ヒト末梢血からアフエレーシスを用いて単核球を分離し、GM-CSF および IL-2 存在下で 6 日間培養した後に α GC を添加して α GC/DC を作製した。ヒト α GC/DC をマウスに静注すると血清 IFN- γ , TNF- α , IL-4 値は DC 単体を静注した場合に比べ有意に上昇し、ヒト α GC/DC はマウス iNKT 細胞の活性化作用を有した。

【考察】①本研究では BALB/c 背景高脂血症自然発症マウスにおいて iNKT 細胞がアナジーに陥っていることを示したが、iNKT 細胞と DC を中心とした negative regulation を示すことができず、iNKT 細胞がアナジー状態にあることで negative regulation が破綻し慢性炎症が遷延するという仮説を証明するには至らなかった。この原因としては先行実験とはマウスの種がことなることや遺伝子改変ではなく自然発症 ApoE 欠損マウスを用いた点、DC のソースが異なる点などが考えられた。② α GC による iNKT 細胞の活性化により血管壁へのマクロファージや T リンパ球の浸潤を抑制し、AngII 誘発性大動脈瘤形成を抑制し、さらに瘤形成早期において M2 マクロファージの浸潤を認めた。M2 マクロファージは組織のリモデリング過程において炎症の消退に重要な役割を果たしており、血管組織における慢性炎症を抑制している可能性があるものと考えられた。IL-10 が AngII 誘発性腹部大動脈瘤の抑制に関与しているとの報告がある一方で、我々は α GC による iNKT 細胞活性化の結果産生される IL-10 が心筋リモデリングの抑制に重要な働きをしていることを明らかにしている。iNKT 細胞活性化による大動脈瘤抑制過程においても、IL-10 が重要な役割を担っている可能性が十分に考えられ、この点についてはさらなる検討が必要と思われた。③我々は今までに、心筋梗塞後心不全マウスモデルや心筋虚血再灌流障害モデルにおいて iNKT 細胞の活性化が Th1/Th2 バランスの Th2 へのシフトが作用機序として考えられることを明らかにしている。このような結果は α GC による iNKT 細胞の活性化が新たな心血管病治療の介入点となる可能性を示している。 α GC 単体投与による iNKT 細胞の活性化は一過性であり、生体投与により肝障害を引き起こすために臨床応用に至っていないが、 α GC/DC を用いることでこの点を克服できる可能性がある。 α GC/DC の心血管病治療への臨床応用を目指す上で必須である非臨床研究の遂行にあたり、今回の結果は非常に重要な意味を持つものと考えられた。

【結論】本研究では、 α GC による iNKT 細胞の活性化が慢性炎症を制御することで心血管病の非常に有望であること、また生体内で iNKT 細胞を活性化させる手法としての α GC/DC の有用性を示した。