

学 位 論 文 題 名

Lower prevalence of circulating natural killer T cells in
patients with angina:
a potential novel marker for coronary artery disease

(狭心症患者では末梢血中のナチュラルキラー T 細胞が減少する
—冠動脈疾患の新規マーカーに関する研究—)

学位論文内容の要旨

I. 背 景

現在、動脈硬化症は炎症性疾患と認識されている。高血圧や高脂血症、糖尿病そして喫煙に代表される危険因子は血管内皮を傷害し、単球の血管外浸潤に必要な接着分子の発現を増加させる。内皮下へ浸潤した単球は変性脂質の一種である酸化型低比重リポ蛋白(oxidized LDL)を取り込むことでマクロファージに分化する。この過程で、末梢リンパ球の一種であるナチュラルキラー T (NKT) 細胞はこのマクロファージへの分化と泡沫細胞化を調節し、動脈硬化の進展に深く寄与すると考えられる。通常のリンパ球とは異なり、NKT 細胞はマクロファージ上の CD1d 分子に呈示される脂質抗原を認識する。マウスの実験系では NKT 細胞が Th1 型サイトカインを産生し、動脈硬化症を促進することをすでに示した。また、実際に oxidized LDL で培養したマクロファージによって NKT 細胞のインターフェロン(IFN)- γ 産生が誘導されることも示した。一連の NKT 細胞の活性化については、抗原刺激に伴って NKT 細胞表面に存在する NK1.1 や T 細胞受容体が down-regulation を起こし、見かけ上の細胞数が減少することが報告されている。

ヒトについては、自己免疫疾患や臓器移植後の拒絶反応で NKT 細胞が活性化され、Th1 サイトカインによって血管炎が増悪するとの報告がある。しかし、生活習慣病としての動脈硬化症では、末梢血中の NKT 細胞との関連を調べた報告は無い。

II. 目 的

狭心症患者では末梢血中の NKT 細胞分布に変化が見られるのか、そして冠危険因子との間に関連性があるのかを検討することを目的とした。

III. 方 法

対象は安定狭心症 (stable angina; SA) 群 6 名、不安定狭心症 (unstable angina; UA) 群 11 名、ならびに健常コントロール(control; C)群 9 名の 3 群とした。UA は Braunwald IIIB に分類される。

対象者の末梢血を採取し、フローサイトメトリーを用いて NKT 細胞を測定した。NKT 細胞は invariant な T 細胞受容体の特異的に発現するが、それを構成する α 鎖

(V α 24) と β 鎖 (V β 11) を認識する蛍光抗体を用いて NKT 細胞を同定した。CD3⁺CD4⁺CD8⁻ gate/ V α 24⁺V β 11⁺細胞を NKT 細胞と定義した。

IV. 結 果

対象の背景因子のうち、年齢、性別、body mass index、空腹時血糖、HbA1c、総コレステロール、中性脂肪ならびに収縮期・拡張期血圧については、3 群間に有意差は見られなかった。Brinkman index は C 群 (76.7 ± 38.6) と比較して SA 群 (758.3 ± 360.2)、ならびに UA 群 (890.0 ± 192.8) で高い傾向を示した。冠危険因子を高血圧、高脂血症、糖尿病および喫煙の 4 項目とした場合に、それらの数については C 群 (0.89 ± 0.26) と比較して SA 群 (2.50 ± 0.34)、ならびに UA 群 (2.46 ± 0.31) で有意に高値を示した。

末梢血中の NKT 細胞の割合は C 群 ($1.113 \pm 0.359\%$) と比較して SA ならびに UA 群 (それぞれ 0.167 ± 0.131 、 $0.273 \pm 0.114\%$) では有意に減少していた ($p = 0.0490$ 、 0.0387)。SA と UA の両群間には有意差は見られなかった ($p = 0.9563$)。NKT 細胞の分布と、背景因子の各パラメーターとの間には有意な相関は見られなかった。ロジスティック回帰分析では、狭心症の有無を規定する因子として NKT 細胞の減少 ($\chi^2 = 12.373$, $p = 0.0021$)、ならびに冠危険因子数の増加 ($\chi^2 = 11.942$, $p = 0.0026$) が有意な相対危険率を示した。

V. 考 案

我々はすでにマウスの実験系で、NKT 細胞受容体に特異的に発現される V α 14J α 18 を用いて polymerase chain reaction を行い、動脈硬化病変に NKT 細胞が存在することを示した。これとは反対に健常血管では V α 14J α 18 が発現しておらず、NKT 細胞が存在しないことも示した。また、フローサイトメトリーで解析すると、動脈硬化食を与えたマウスでは通常食のマウスと比較して、肝臓や脾臓で NKT 細胞が減少していた。これらの結果は、動脈硬化の進展に伴い NKT 細胞が末梢血を介して病変部に動員されていることを示唆している。加えて、動脈硬化食に含まれる脂質抗原の刺激により NKT 細胞が活性化され、T 細胞受容体を始めとする表面マーカーの down-regulation が誘導されていると考えられた。これらの機序により、動脈硬化の進展に伴ってフローサイトメトリーで検出できる NKT 細胞は減少するものと考えられた。

本研究では狭心症患者の末梢血 NKT 細胞の減少が確認された。動脈硬化のモデルマウスで得られた実験結果を裏付けるものと考えられた。

VI. 結 語

狭心症患者では健常者と比較して、NKT 細胞が減少していた。狭心症の存在に対して、NKT 細胞の減少ならびに冠危険因子数が独立した予測因子であることが判明した。これらの結果は、活性化した NKT 細胞が冠動脈病変を促進することを示唆している。NKT 細胞を介する動脈硬化症の進展経路は、冠動脈疾患の予防と治療に対して有用な標的と期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 居 喜 郎

副 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

Lower prevalence of circulating natural killer T cells in patients with angina: a potential novel marker for coronary artery disease

(狭心症患者では末梢血中のナチュラルキラーT細胞が減少する
—冠動脈疾患の新規マーカーに関する研究—)

現在、動脈硬化症は炎症性疾患と認識されている。高血圧や高脂血症、糖尿病そして喫煙に代表される危険因子は血管内皮を傷害し、単球の血管外浸潤に必要な接着分子の発現を増加させる。内皮下へ浸潤した単球は変性脂質の一種である酸化型低比重リポ蛋白(oxidized LDL)を取り込むことでマクロファージに分化する。この過程で、末梢リンパ球の一種であるナチュラルキラーT (NKT) 細胞はこのマクロファージへの分化と泡沫細胞化を調節し、動脈硬化の進展に深く寄与すると考えられる。通常のリンパ球とは異なり、NKT 細胞はマクロファージ上の CD1d 分子に呈示される脂質抗原を認識する。マウスの実験系では NKT 細胞が Th1 型サイトカインを産生し、動脈硬化症を促進することをすでに示した。また、実際に oxidized LDL で培養したマクロファージによって NKT 細胞のインターフェロン(IFN)- γ 産生が誘導されることも示した。一連の NKT 細胞の活性化については、抗原刺激に伴って NKT 細胞表面に存在する NK1.1 や T 細胞受容体が down-regulation を起こし、見かけ上の細胞数が減少することが報告されている。

ヒトについては、自己免疫疾患や臓器移植後の拒絶反応で NKT 細胞が活性化され、Th1 サイトカインによって血管炎が増悪するとの報告がある。しかし、生活習慣病としての動脈硬化症では、末梢血中の NKT 細胞との関連を調べた報告は無い。狭心症患者では末梢血中の NKT 細胞分布に変化が見られるのか、そして冠危険因子との間に関連性があるのかを検討した。

対象は安定狭心症 (stable angina; SA) 群 6 名、不安定狭心症 (unstable angina; UA) 群 11 名、ならびに健常コントロール (control; C) 群 9 名の 3 群とした。UA は Braunwald IIIB に分類される。対象者の末梢血を採取し、フローサイトメトリーを用いて NKT 細胞を測

定した。NKT 細胞は invariant な T 細胞受容体の特異的に発現するが、それを構成する α 鎖(V α 24)と β 鎖(V β 11)を認識する蛍光抗体を用いて NKT 細胞を同定した。CD3⁺CD4⁻CD8⁻gate/ V α 24⁺V β 11⁺細胞を NKT 細胞と定義した。

末梢血中の NKT 細胞の割合は C 群(1.113 ± 0.359 %)と比較して SA ならびに UA 群(それぞれ 0.167 ± 0.131 、 0.273 ± 0.114 %)では有意に減少していた ($p = 0.0490$ 、 0.0387)。SA と UA の両群間には有意差は見られなかった ($p = 0.9563$)。ロジスティック回帰分析では、狭心症の有無を規定する因子として NKT 細胞の減少 ($\chi^2 = 12.373$, $p = 0.0021$)、ならびに冠危険因子数の増加 ($\chi^2 = 11.942$, $p = 0.0026$) が有意な相対危険率を示した。

我々はすでにマウスの実験系で、NKT 細胞受容体の特異的に発現される V α 14J α 18 を用いて polymerase chain reaction を行い、動脈硬化病変に NKT 細胞が存在することを示した。これとは反対に健常血管では V α 14J α 18 が発現しておらず、NKT 細胞が存在しないことも示した。また、フローサイトメトリーで解析すると、動脈硬化食を与えたマウスでは通常食のマウスと比較して、肝臓や脾臓で NKT 細胞が減少していた。これらの結果は、動脈硬化の進展に伴い NKT 細胞が末梢血を介して病変部に動員されていることを示唆している。加えて、食餌中に含まれる脂質抗原の刺激により NKT 細胞が活性化され、T 細胞受容体を始めとする表面マーカーの down-regulation が誘導されていると考えられた。これらの機序により、動脈硬化の進展に伴ってフローサイトメトリーで検出できる NKT 細胞は減少するものと考えられた。

本研究で得られた結果は、活性化した NKT 細胞が冠動脈病変を促進することを示唆している。NKT 細胞を介する動脈硬化症の進展経路は、冠動脈疾患の予防と治療に対して有用な標的と期待される。

口頭発表に際し、小野江教授から動脈硬化における CD4⁻CD8⁻ ならびに CD4⁺ NKT 細胞の役割について質問がなされた。次いで筒井教授から NKT 細胞の活性化と病巣部への遊走について質問がなされた。最後に松居教授から NKT 細胞の自己免疫疾患ならびに動脈瘤への関与について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切な回答を行った。

この論文は、冠動脈疾患の新規マーカーを明らかにしたものとして意義のあるものと評価され、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。