

## 学位論文題名

# ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は高脂食飼育による 肥満マウスにおける耐糖能障害や微量アルブミン尿の 発症・進展に寄与する

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】近年、生活習慣の欧米化により肥満者が増加している。メタボリックシンドロームは内臓肥満を基盤として耐糖能障害、高脂血症、高血圧が集積した状態であり、動脈硬化を発症させ、心血管リスクを増大させる。脂肪細胞は、エネルギーを貯蔵する働きを持つだけでなく、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、アディポネクチンなどのアディポカインを分泌する。脂肪細胞の肥大化や脂肪重量の増加がアディポカイン分泌プロファイルを変化させ、インスリン抵抗性、脂質代謝異常などを引き起こすと考えられている。また、肥満者の脂肪組織ではマクロファージの浸潤がみられ、マクロファージによる脂肪組織での慢性炎症がメタボリックシンドロームやインスリン抵抗性の発症・進展に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。動脈硬化も炎症性疾患であり、動脈硬化病巣内にはリンパ球が存在し病巣進展に寄与する。各種リンパ球の中で、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は T 細胞抗原受容体 (TCR) と NK 細胞の発現する表面マーカーを共発現する特異な T リンパ球亜群である。NKT 細胞はこの TCR を介し糖脂質を認識して活性化すると、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  および Th2 サイトカインである IL-4 を速やかに産生し、局所での炎症反応を規定する。我々の研究も含め今までの研究で、NKT 細胞が動脈硬化病巣に存在し、動脈硬化の進展に重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。しかし、動脈硬化発症の基盤となる肥満に伴った代謝異常やメタボリックシンドロームにおける NKT 細胞の役割については不明である。NKT 細胞は脂肪組織にも存在することが報告されており、脂肪組織局所で糖脂質などの内因性リガンドを認識して慢性炎症に関与し、肥満に伴う代謝異常に影響を及ぼしている可能性がある。

【材料と方法】実験 1) オス野生型 C57BL/6J (WT) マウスと、NKT 細胞と T 細胞の著減する B<sub>2</sub> ミクログロブリンノックアウト (KO) マウスを用い、8 週齢より普通食 (Chow) または高脂食 (WD) で 13 週間飼育した。19 週齢で糖負荷試験と尿中微量アルブミン測定を、21 週齢で採血後屠殺し、性腺周囲脂肪組織を採取した。脂肪組織は脂肪細胞面積の測定や免疫染色を用いてマクロファージ浸潤の評価を行い、定量的 RT-PCR にて各遺伝子発現を評価した。実験 2) WT マウスを高脂食で 13 週間飼育した後、NKT 細胞を特異的に刺激する糖脂質  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) またはコントロールとしてリン酸緩衝食塩水 (PBS) を腹腔内投与した。投与 4 日後に採尿して尿中微量アルブミンを測定、8 日後に糖負荷試験を施行、9 日後に屠殺し、性腺周囲脂肪組織を採取した。

【結果】実験 1) 高脂食飼育では普通食飼育に比べて有意に内臓脂肪重量が増加し、脂肪細胞の肥大を認めた。WT マウス群と KO マウス群間では差は認められなかった。血漿 TNF- $\alpha$  濃度は、高脂食飼育 WT マウス群で上昇したが、KO マウス群では有意に抑制され

た。高脂食飼育 WT マウス群では耐糖能障害や微量アルブミン尿の出現を認めたが、KO マウス群では高脂食で飼育しても普通食飼育 WT マウス群と有意差は認めなかった。高脂食飼育 WT マウス群では、マクロファージの脂肪組織への浸潤や脂肪組織における MCP-1, MHC class II, CD11c の発現は普通食飼育に比べて有意に増加したが、高脂食飼育 KO マウス群でのマクロファージの浸潤, MHC class II, CD11c の発現は高脂食飼育 WT マウス群に比べて有意に減少した。実験 2)  $\alpha$ -GalCer 投与 9 日後の性腺周囲脂肪組織を用いた定量的 RT-PCR 法にて NKT 細胞の活性化が確認された。 $\alpha$ -GalCer マウス群で PBS マウス群に比べ有意な耐糖能の増悪, 微量アルブミン尿の増加, およびマクロファージの脂肪組織への浸潤の増加を認めた。また,  $\alpha$ -GalCer マウス群で MCP-1, MHC class II, CD11c, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , ICAM-1, RANTES の脂肪組織における遺伝子発現が有意に増加した。

【考察】NKT 細胞を活性化すると内臓脂肪組織で MCP-1 遺伝子発現が亢進し, マクロファージ浸潤の増強を認めた。MHC class II 分子の発現亢進も認めマクロファージは活性化されていた。内臓脂肪組織でマクロファージが引き起こす慢性炎症はメタボリックシンドロームの発症・進展において重要であるが, NKT 細胞はマクロファージの上流で慢性炎症をコントロールして病態の進行に関与することが確認された。肥満に伴う内臓脂肪組織には 2 つの対極化した M1 マクロファージと M2 マクロファージが存在し, CD11c などの表面マーカーで区分し得ることが提唱されており, 今回の実験で NKT 細胞活性化に伴って集簇・活性化したマクロファージは CD11c を発現しており, おもに M1 マクロファージであると考えられた。M1 マクロファージは IFN- $\gamma$  で誘導されることが知られており, NKT 細胞活性化による IFN- $\gamma$  の分泌が M1 マクロファージを誘導し, 局所で TNF- $\alpha$  が増加したものと考察され, 最終的に耐糖能障害を引き起こしたと考えられた。微量アルブミン尿は早期の血管内皮障害マーカーとして知られ, 心血管病の独立した危険因子として重要である。 $\alpha$ -GalCer 投与後の微量アルブミン尿の増加は一過性で耐糖能の悪化よりも早期に出現しており, 内臓脂肪組織の慢性炎症の増悪による影響よりも, 腎実質に存在する NKT 細胞が局所で活性化された結果であったと推察される。エネルギー過剰による肥満状態下では NKT 細胞は内臓脂肪組織・腎臓・血管壁などの局所で活性化されて慢性炎症を増悪させ, 肥満に伴う合併症の発症・進展に寄与している可能性が考えられ, NKT 細胞が慢性腎臓病・心血管病の共通の上流因子として心腎相関に関与している可能性がある。NKT 細胞活性の制御はメタボリックシンドロームや心血管病に対する治療標的として有望であると思われる。NKT 細胞活性物質  $\alpha$ -GalCer 誘导体は, NKT 細胞 TCR に対する親和性が異なるため, 最終的に誘導される炎症プロファイル (Th1/Th2) をコントロールできる可能性も示唆されており, これらのリガンド特性を利用して内臓脂肪組織や血管で特異的に NKT 細胞の活性を制御することが試みられており, メタボリックシンドロームや心血管病に対する新たな治療法として期待される。

【結論】高脂食飼育による肥満マウスにおいて NKT 細胞および T 細胞を欠損させると, 内臓脂肪組織における慢性炎症が軽減し, 耐糖能障害や微量アルブミン尿の発症が抑制された。一方,  $\alpha$ -GalCer を用いて NKT 細胞を活性化すると, 内臓脂肪組織へのマクロファージの集簇が増強し, 肥満に伴う代謝異常の増悪を認めた。NKT 細胞は内臓脂肪組織局所における慢性炎症を増強することにより, 内臓脂肪細胞の形態を変化させることなくアディポカイン分泌プロファイルを変化させて, 肥満に伴う代謝異常に寄与することが示された。以上より NKT 細胞はメタボリックシンドロームの発症・進展に重要な役割を果たしており, NKT 細胞の制御は新たな治療ターゲットとして有望であることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之  
副 査 教 授 松 居 喜 郎  
副 査 教 授 三 輪 聡 一

学 位 論 文 題 名

## ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は高脂食飼育による 肥満マウスにおける耐糖能障害や微量アルブミン尿の 発症・進展に寄与する

メタボリックシンドロームは内臓肥満を基盤として耐糖能障害、高脂血症、高血圧が集積した状態であり、動脈硬化を発症させ、心血管リスクを増大させる。脂肪細胞は、エネルギーを貯蔵する働きを持つだけでなく、TNF- $\alpha$ 、アディポネクチンなどのアディポカインを分泌する。脂肪細胞の肥大化や脂肪重量の増加がアディポカイン分泌プロファイルを変化させ、インスリン抵抗性などを引き起こすと考えられている。また、肥満者の脂肪組織ではマクロファージの浸潤がみられ、脂肪組織での慢性炎症がメタボリックシンドロームやインスリン抵抗性の発症・進展に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。動脈硬化も炎症性疾患であり、動脈硬化病巣内にはリンパ球が存在し病巣進展に寄与する。各種リンパ球の中で、ナチュラルキラーT (NKT) 細胞はT細胞抗原受容体 (TCR) とNK細胞の発現する表面マーカーを共発現する特異なTリンパ球亜群である。NKT細胞はこのTCRを介し糖脂質を認識して活性化すると、Th1サイトカインのIFN- $\gamma$ およびTh2サイトカインのIL-4を速やかに産生し、局所での炎症反応を規定する。今までの研究で、NKT細胞が動脈硬化病巣に存在し、動脈硬化の進展に重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。しかし、動脈硬化発症の基盤となる肥満に伴った代謝異常やメタボリックシンドロームにおけるNKT細胞の役割については不明である。NKT細胞は脂肪組織にも存在することが報告されており、脂肪組織局所で糖脂質などの内因性リガンドを認識して慢性炎症に関与し、肥満に伴う代謝異常に影響を及ぼしている可能性がある。

本研究では、NKT細胞が肥満に伴う代謝異常の発症・進展に関与しているかを検討するため、NKT細胞とT細胞の著減する $\beta_2$ ミクログロブリンノックアウトマウスを用いて、高脂食飼育肥満モデルでの代謝異常を検討した。さらに、NKT細胞が代謝異常に直接関わっているのかを明らかにするため、NKT細胞特異的刺激的糖脂質である $\alpha$ -ガラクトシ

ルセラミドを高脂食飼育肥満マウスに投与し、同様の解析を行った。

高脂食飼育による肥満マウスにおいて NKT 細胞および T 細胞を欠損させると、内臓脂肪組織における慢性炎症が軽減し、耐糖能障害や微量アルブミン尿の発症が抑制された。一方、 $\alpha$ -GalCer を用いて NKT 細胞を活性化すると、内臓脂肪組織へのマクロファージの集簇が増強し、肥満に伴う代謝異常の増悪を認めた。

高脂食飼育や  $\alpha$ -GalCer 投与により NKT 細胞が活性化されると内臓脂肪組織で IFN- $\gamma$  や MCP-1 遺伝子などの炎症性遺伝子の発現が亢進し、マクロファージ浸潤の増強、活性化が認められた。この結果、局所で TNF- $\alpha$  が増加し、最終的に耐糖能障害を引き起こしたと考えられた。NKT 細胞がマクロファージの上流で慢性炎症をコントロールして病態の進行に関与することが確認された。

今回の実験より、エネルギー過剰による肥満状態下では NKT 細胞は内臓脂肪組織・腎臓・血管壁などの局所で活性化されて慢性炎症を増悪させ、肥満に伴う合併症の発症・進展に寄与している可能性が考えられた。内臓脂肪組織においては、内臓脂肪細胞の形態を変化させることなくアディポカイン分泌プロファイルを変化させて、肥満に伴う代謝異常に寄与することが示された。

以上より NKT 細胞はメタボリックシンドロームの発症・進展に重要な役割を果たしており、NKT 細胞の制御はメタボリックシンドロームや心血管病に対する新たな治療ターゲットとして有望であることが示唆された。

公開発表に際し、まず三輪教授より高脂食飼育による脂肪組織の炎症の起因物質について、高脂食飼育による NKT 細胞活性化は何によるものかについて、アディポカインの分泌状況についての質問があった。ついで松居教授より NKT 細胞の血管への影響について、また、臨床応用に伴う現況と問題点についての質問があった。最後に主査より動脈硬化に対する NKT 細胞の制御に際し、今後どのように臨床に応用していくかについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果および文献的知識により適切な回答を行った。

この論文は、メタボリックシンドロームモデルとして高脂食飼育肥満マウスを用いて、NKT 細胞が内臓脂肪組織において慢性炎症を増強し、肥満に伴う代謝異常を増悪させることを初めて明らかにした点で高く評価され、今後 NKT 細胞の制御がメタボリックシンドロームから心血管病の新たな治療法となることが期待される。

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。