

学 位 論 文 題 名

ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は高脂血症発症
アポ E 欠損マウスにおける動脈硬化の粥腫破綻に寄与する

学位論文内容の要旨

【背景と目的】近年高齢化と食生活の欧米化に伴い、わが国においても心筋梗塞などの動脈硬化性疾患が増加している。動脈硬化の発症・進展においては、血管壁局所における脂質代謝異常を基盤とした慢性炎症が重要で、先行研究によって自然免疫を担うマクロファージ (M ϕ) や、獲得免疫の柱となる T 細胞の関与が明らかにされている。ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は、ナチュラルキラー (NK) 細胞と T 細胞双方の表面抗原を発現し、自然免疫と獲得免疫を調節する T 細胞亜群である。糖脂質を特異的に認識して炎症性サイトカインを産生することより、動脈硬化病巣の発症・進展において重要な役割を果たしていると考えられ、動脈硬化モデルマウスを用いた検討において、NKT 細胞は動脈硬化病巣に存在し、NKT 細胞の活性化により Th1 サイトカインを誘導し、動脈硬化病巣の発症・進展に関与していることが報告されている。急性心筋梗塞は冠動脈内の動脈硬化病巣での粥腫が破綻し血栓性閉塞をきたすことで発症するが、機序としては粥腫を覆う線維性被膜が分解されて破綻をきたすと考えられており、病変局所での慢性炎症が重要な役割を果たす。我々の高齢アポ E 欠損マウスを用いた検討では、大動脈弁輪部における複雑病変の面積は NKT 細胞を刺激活性化させても不変であったが、病巣内で線維性成分が減少しており、NKT 細胞活性化によって動脈硬化病巣に質的な変化がもたらされることが示唆されている。さらに我々は、粥腫破綻に関与する不安定狭心症患者において、末梢血中の NKT 細胞が活性化された結果、総数が減少していることを報告している。これらのことより、NKT 細胞は動脈硬化粥腫破綻に関与している可能性が考えられるが、これまで NKT 細胞と粥腫破綻の関係を直接検討した研究はない。本研究では、ヒト粥腫破綻に類似した病理所見が観察される高脂肪食投与アポ E 欠損マウスを用いて NKT 細胞を刺激活性化し、腕頭動脈レベルにおける動脈硬化病巣を病理組織学的に評価し、遺伝子発現の変化を生化学的に解析して、NKT 細胞が動脈硬化粥腫破綻において果たしている役割を検討した。

【材料と方法】高脂血症発症雄性アポ E 欠損マウスを用い、8 週齢より高脂肪食で 8 週間飼育した。高脂肪食開始と同時に NKT 細胞特異的刺激物質である α -ガラクトシルセラミド (α GC) またはコントロールとしてリン酸緩衝食塩水 (PBS) を週 2 回、計 16 回腹腔内投与した。16 週齢の時点で糖負荷試験を行い、採血後屠殺し、腕頭動脈、大動脈組織を採取した。腕頭動脈はホルマリン固定後に切片を作製し、エラスチカ・ワンギーソン染色を行い、最も病変形成が強い切片における粥腫の面積、埋没した線維被膜の数、弾性板の断裂数、線維被膜の厚さを測定した。左総頸動脈、左鎖骨下動脈分岐部を含む遠位大動脈弓組織から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を行った。

【結果】両群ともに体重、血清総コレステロール値、HDL、中性脂肪、遊離脂肪酸に有意差は認めなかった。糖負荷試験では空腹時血糖値に有意差は認めなかったが、グルコー

ス投与後 30 分, 60 分血糖値が α GC 投与群で PBS 投与群より有意に高値であった。内臓脂肪を用いた遺伝子発現解析の結果, α GC 投与群での Va14/Ja18 (NKT 細胞マーカー), MHC class II ($M\phi$ マーカー), RANTES (T 細胞ケモカイン) の発現は PBS 投与群にくらべて有意に亢進しており, NKT 細胞の活性化によって内臓脂肪で炎症が惹起されることが示された。腕頭動脈を用いた病理組織学的検討では, 両群とも同程度の粥腫形成が見られたが, α GC 投与群で粥腫内に埋没した線維性被膜や断裂した弾性板の数が増加し, 線維性被膜の厚さが減少しており, NKT 細胞の活性化によって粥腫が脆弱化することが示唆された。大動脈組織を用いた遺伝子発現解析では, Va14/Ja18, MHC class II, RANTES, IFN- γ , MMP-2 の発現は α GC 投与群で PBS 投与群にくらべて有意に増加しており, NKT 細胞特異的刺激物質 α GC の投与によって血管組織への NKT 細胞, T 細胞の集簇, $M\phi$ の活性化ならびに, T_H1 サイトカインである IFN- γ や細胞外マトリックス分解酵素 MMP-2 が病理組織で確認された粥腫の脆弱化に寄与していることが示唆された。

【考察】 アポ E 欠損マウスを高脂肪食で飼育した動脈硬化粥腫破綻マウスモデルにおいて, α GC を腹腔内反復投与して NKT 細胞を活性化すると, 腕頭動脈における動脈硬化粥腫の脆弱性が増すことが明らかになった。血管組織の遺伝子発現解析では, α GC 投与によって NKT 細胞や T 細胞の集簇および $M\phi$ の活性化が確認され, NKT 細胞も粥腫破綻において重要な役割を果たしていることが示された。NKT 細胞は炎症早期に活性化し, 自然免疫と獲得免疫の双方を調節する働きを有することから, NKT 細胞の活性化によって $M\phi$ や T 細胞が刺激され, 血管局所での慢性炎症が惹起されたと考えられた。NKT 細胞の活性化によって血管局所で IFN- γ や MMP-2 の発現亢進が認められたが, IFN- γ は T_H1 タイプの免疫応答を誘導し, 粥腫での脂質の蓄積や血管壁細胞のアポトーシスを誘導し, MMP も粥腫の脆弱性に重要なことが知られており, NKT 細胞活性化による動脈硬化粥腫破綻の有力な分子機序と考えられた。また, NKT 細胞刺激活性化によって, 耐糖能障害の悪化も認めており, 耐糖能障害が粥腫破綻に関与した可能性も考えられる。実際, 耐糖能障害が遷延すると生体内では糖化最終産物 (AGE: Advanced Glycation Endproducts) が増加するが, AGE は酸化 LDL の増加を介して血管内皮細胞や平滑筋細胞に酸化ストレスや炎症を惹起することが報告されている。今回の研究結果より NKT 細胞は動脈硬化の発症・進展に寄与しており, NKT 細胞活性化を抑制する介入が有効である可能性がある。一方, NKT 細胞は自己免疫性疾患や腫瘍などの病態では生体防御的な役割を果たしていることが示されており, 本研究の成果を臨床に応用するためには NKT 細胞の病態における関与についてさらに詳細な解析を行ない, 有効かつ安全な介入方法を開発する必要がある。

【結論】 アポ E 欠損マウスを高脂肪食で飼育した動脈硬化粥腫破綻マウスモデルにおいて, α GC を腹腔内反復投与して NKT 細胞を活性化することにより, 血管組織への NKT 細胞, T 細胞の集簇および $M\phi$ の活性化, T_H1 サイトカイン IFN- γ や細胞外マトリックス分解酵素 MMP-2 の亢進が認められ, さらに腕頭動脈における動脈硬化粥腫の脆弱性が増加した。これまでの研究結果と合わせると, NKT 細胞は動脈硬化病巣の発症・進展のみならず, 動脈硬化粥腫の破綻にも寄与していることが確認され, 免疫調節細胞である NKT 細胞が動脈硬化性疾患の新たな予防・治療の標的として有望である可能性が示唆された。

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 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は高脂血症発症 アポ E 欠損マウスにおける動脈硬化の粥腫破綻に寄与する

近年高齢化と食生活の欧米化に伴い、わが国においても心筋梗塞などの動脈硬化性疾患が増加している。動脈硬化の発症・進展においては、血管壁局所における脂質代謝異常を基盤とした慢性炎症が重要で、先行研究によって自然免疫を担うマクロファージ(M ϕ)や、獲得免疫の柱となる T 細胞の関与が明らかにされている。ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は、ナチュラルキラー (NK) 細胞と T 細胞双方の表面抗原を発現し、自然免疫と獲得免疫を調節する T 細胞亜群である。糖脂質を特異的に認識して炎症性サイトカインを産生することより、動脈硬化病巣の発症・進展において重要な役割を果たしていると考えられ、動脈硬化モデルマウスを用いた検討において、NKT 細胞は動脈硬化病巣に存在し、NKT 細胞の活性化により Th1 サイトカインを誘導し、動脈硬化病巣の発症・進展に関与していることが報告されている。急性心筋梗塞は冠動脈内の動脈硬化病巣での粥腫が破綻し血栓性閉塞をきたすことで発症するが、機序としては粥腫を覆う線維性被膜が分解されて破綻をきたすと考えられており、病変局所での慢性炎症が重要な役割を果たす。我々の高齢アポ E 欠損マウスを用いた検討では、大動脈弁輪部における複雑病変の面積は NKT 細胞を刺激活性化させても不変であったが、病巣内で線維性成分が減少しており、NKT 細胞活性化によって動脈硬化病巣に質的な変化がもたらされることが示唆されている。さらに我々は、粥腫破綻に関与する不安定狭心症患者において、末梢血中の NKT 細胞が活性化された結果、総数が減少していることを報告している。これらのことより、NKT 細胞は動脈硬化粥腫破綻に関与している可能性が考えられるが、これまで NKT 細胞と粥腫破綻の関係を直接検討した研究はない。本研究では、ヒト粥腫破綻に類似した病理所見が観察される高脂肪食投与アポ E 欠損マウスを用いて NKT 細胞を刺激活性化し、腕頭動脈レベルにおける動脈硬化病巣を病理組織学的に評価し、遺伝子発現の変化を生化学的に解析して、NKT 細胞が動脈硬化粥腫破綻において果たしている役割を検討した。

アポ E 欠損マウスを高脂肪食で飼育した動脈硬化粥腫破綻マウスモデルにおいて、NKT 細胞の特異的リガンドである α -ガラクトシルセラミドを腹腔内反復投与して NKT 細胞を活

性化することにより、血管組織への NKT 細胞、T 細胞の集簇および Mφ の活性化、T_H1 サイトカイン IFN-γ や細胞外マトリックス分解酵素 MMP-2 の亢進が認められ、さらに腕頭動脈における動脈硬化粥腫の脆弱性が増加した。これまでの研究結果と合わせると、NKT 細胞は動脈硬化病巣の発症・進展のみならず、動脈硬化粥腫の破綻にも寄与していることが確認され、免疫調節細胞である NKT 細胞が動脈硬化性疾患の新たな予防・治療の標的として有望である可能性が示唆された。

公開発表に際し、まず松居教授より動脈硬化の初期病変、大動脈瘤、移植心での動脈硬化病変での NKT 細胞の役割について質問があった。ついで小池教授より NKT 細胞の刺激方法による免疫反応の変化について、本研究における T_H 17 の検討の有無、ヒトの動脈硬化と NKT 細胞の関連に関する報告の有無について、また、動脈硬化研究におけるマウスの組織像とヒト動脈硬化病変の類似性についての質問があった。最後に主査より動脈硬化での NKT 細胞の活性化に際し、どのようなリガンドが候補として考えられるか、また、NKT 細胞とマクロファージの直接的な関係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、高脂血症発症アポ E 欠損マウスを用いて NKT 細胞が動脈硬化粥種の炎症を増強し、マクロファージや T 細胞を活性化させて動脈硬化粥種の破綻に関与するとの初めて明らかにした点で高く評価され、今後の動脈硬化粥種の破綻の機序解明やその予防治療に期待される。

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。