

# Studies on the Role of Natural Killer T Cells on Post-Infarct Cardiac Remodeling and Failure in Mice

(マウスの心筋梗塞後心筋リモデリングおよび  
心不全におけるナチュラルキラー T 細胞の役割に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

**(Background and Objectives)** Myocardial infarction (MI) leads to the development of heart failure (HF), which is the major cause of death in post-MI patients. The changes in left ventricular (LV) geometry, such as cavity dilatation associated with myocyte hypertrophy and interstitial fibrosis, referred to as remodeling, contribute to the development of depressed cardiac function in HF after MI. Various pathophysiological mechanisms including chronic inflammation have been reported to be involved in the development of LV remodeling and failure after MI. Natural killer T (NKT) cells have been shown to produce inflammatory cytokines and orchestrate tissue inflammation in various tissues including the vascular wall. However, no previous studies have determined the changes of NKT cells and their pathophysiological role in post-MI LV remodeling. The purpose of this study was to examine whether the activation or inhibition of NKT cells might affect the development of remodeling and failure after MI.

**(Materials and Methods)** MI was created in male C57BL/6J mice by ligating the left coronary artery, and sham operation was also performed. Mice received the intraperitoneal injection of either  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ GC), the activator of NKT cells, or phosphate-buffered saline (PBS) on 1 and 4 days after surgery. Four groups of mice, sham+PBS (n=10), sham+ $\alpha$ GC (n=10), MI+PBS (n=31), and MI+ $\alpha$ GC (n=27) were studied. After 28 days, echocardiography and hemodynamic measurements were performed. After collecting blood samples, mice were sacrificed for histological analyses including infarct size, myocyte cross-sectional area, collagen volume fraction, TUNEL staining and MMP zymography. RT-PCR was performed to quantify mRNA expression in the non-infarcted area of LV tissues at 7 and 28 days. To determine the effects of NKT cell deletion, MI was created in male C57BL/6J wild-type (WT; n=39) and NKT cell receptor ( $J\alpha 18$ ; n=42) knockout (KO) and were followed for 28 days.

**(Results)** Survival rate during 28 days of MI was significantly higher in MI+ $\alpha$ GC than MI+PBS (59% vs 32%,  $P<0.05$ ). LV end-diastolic dimension was smaller ( $5.0\pm 0.1$  vs  $5.4\pm 0.1$  mm,  $p<0.01$ ), and LV fractional shortening was greater ( $18.8\pm 0.6$  vs  $16.5\pm 0.6$  %,  $p<0.05$ ) in MI+ $\alpha$ GC than MI+PBS, with no significant changes in infarct size between groups. LV end-diastolic pressure and lung weight/body weight in MI+ $\alpha$ GC were lower than those in MI+PBS. The injection of  $\alpha$ GC to sham mice did not affect cardiac function and

structure. Histological analysis revealed that  $\alpha$ GC attenuated myocyte hypertrophy, interstitial fibrosis with decreased MMP-2 activity, and apoptosis in the non-infarcted area from MI mice. NKT cell receptor (V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18) gene expression was significantly increased in LV from MI compared with sham at 7 days, whereas it was not altered at 28 days. The injection of  $\alpha$ GC after MI further enhanced NKT cell receptor mRNA expression at 7 and 28 days. In parallel to NKT cell activation, it enhanced LV monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA at 7 days and also interleukin-10 (IL-10) persistently until 28 days. Anti IL-10 receptor antibody abrogated these protective effects of  $\alpha$ GC on MI remodeling. In NKT cell deletion study, survival rate during 28 days of MI was comparable between WT+MI and KO+MI. LV cavity dilatation and dysfunction were significantly exacerbated in KO+MI compared to WT+MI, with no significant changes in infarct size ( $56\pm 2\%$  vs  $58\pm 1\%$ ,  $P=NS$ ).

**(Discussion)** This is the first report to provide direct evidence for increased NKT cells in MI and the inhibitory effects of their activation on the development of post-MI HF. In the acute phase of MI, the infiltration of inflammatory cells is a physiological repair process by removing dead cardiomyocytes and scar formation of infarcted area. However, the chronic inflammatory response in the non-infarcted area causes the further myocardial damage and fibrosis, leading to the progressive LV remodeling and failure. The precise role of various inflammatory cells and chemokines in this disease process has not been fully elucidated. The NKT cells mediate various functions rapidly by producing a mixture of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cytokines and vast array of chemokines. NKT cells can function as a bridge between the innate and adaptive immune systems, and orchestrate tissue inflammation. In the present study,  $\alpha$ GC injection significantly enhanced NKT cell infiltration and could effectively ameliorate post-MI LV remodeling and failure and improved survival. Correspondingly, the inhibition of NKT cells worsened LV remodeling and failure after MI. Therefore, NKT cells play a protective role in LV remodeling and failure after MI. We found that the enhanced expression of IL-10 was involved in the inhibitory effects of NKT cell activation against LV remodeling and failure. The present study demonstrated that both TNF- $\alpha$  and IL-10 were increased in non-infarcted LV from sham and MI animals in association with an increase in NKT cells after the treatment with  $\alpha$ GC at 7 days. Interestingly, the enhanced expression of IL-10 gene by  $\alpha$ GC persisted only in MI mice, whereas TNF- $\alpha$  gene expression returned to the baseline levels. These changes of IL-10 gene expression completely corresponded to those of NKT cells. Moreover, the inhibitory effects of  $\alpha$ GC on LV remodeling were reversed by anti-IL-10 receptor antibody, indicating that IL-10 was involved in the beneficial effects of NKT cell activation against post-MI remodeling and failure. These results are consistent with the previous findings that the therapeutic effects of  $\alpha$ GC against T<sub>H</sub>1-like autoimmune diseases included the induction of immunosuppressive cytokine IL-10. IL-10 can inhibit the production of proinflammatory cytokines by macrophages and T<sub>H</sub>1 cells, which may regulate extracellular matrix, angiogenesis, and apoptosis. In the present study, the activation of NKT cells by  $\alpha$ GC decreased cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis, and inhibited interstitial fibrosis possibly through inhibiting the activation of MMP-2 in non-infarcted LV. There are several limitations to be acknowledged. First, we could not directly demonstrate the relation between NKT cells and IL-10 due to the technical difficulties. Second, the underlying mechanisms responsible for the activation of NKT cells after MI remain to be determined.

These problems should be explored for future studies.

**(Conclusion)** NKT cells have a protective effect on LV remodeling and failure after MI via enhanced IL-10 expression. Therapies designed to activate NKT cells may be beneficial against the development of post-MI heart failure.

# 学位論文審査の要旨

主 査	教 授	瀬 谷	司
副 査	教 授	西 村	正 治
副 査	教 授	三 輪	聡 一
副 査	教 授	川 口	秀 明
副 査	教 授	筒 井	裕 之

## 学 位 論 文 題 名

# Studies on the Role of Natural Killer T Cells on Post-Infarct Cardiac Remodeling and Failure in Mice

(マウスの心筋梗塞後心筋リモデリングおよび  
心不全におけるナチュラルキラーT細胞の役割に関する研究)

学位論文において申請者は、心筋梗塞後の心筋リモデリングおよび心不全の進展にナチュラルキラーT (NKT) 細胞が果たす役割について詳細な報告を行った。

申請者は、最初に心筋梗塞後心不全モデルマウスを用いて、NKT 細胞が心筋に存在するかどうかおよび増加するかどうかを検討した。心筋梗塞手術7日後に、非梗塞部心筋において有意にNKT細胞が増加した。次にNKT細胞の役割を明らかにするために、NKT細胞を特異的に活性化する $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GC)を心筋梗塞マウスに投与した。 $\alpha$ -GCを投与した心筋梗塞マウスにおいて、NKT細胞は有意に増加し、その増加は28日後まで持続した。この際、心筋梗塞サイズには変化がなかった。しかしながら、 $\alpha$ -GC投与によって心筋梗塞後の死亡率は有意に改善した。さらに、 $\alpha$ -GC投与は左室内径拡大や収縮能低下を改善させ、肺重量や左室拡張末期圧の上昇を弱めた。また、心筋梗塞マウスの非梗塞部心筋細胞肥大、間質線維化やアポトーシスを $\alpha$ -GCは改善させた。これらの結果は、NKT細胞の活性化によって、心筋梗塞後心筋リモデリングや心不全を改善させることを示唆した。NKT細胞の活性化による心筋リモデリング改善の機序を明らかにするため、心筋における炎症性サイトカインの遺伝子発現を測定したところ、 $\alpha$ -GC投与後のNKT細胞の変化と一致して、インターロイキン-10(IL-10)が増加した。そこで、 $\alpha$ -GC投与心筋梗塞マウスにIL-10受容体抗体を投与したところ、 $\alpha$ -GCの心保護的な役割は消失した。

最後に、NKT細胞欠損(Ja18KO)マウスを用いて、心筋梗塞後心筋リモデリングおよび心不全におけるNKT細胞の役割を検討した。Ja18KOに心筋梗塞を作成すると、野性型(WT)マウスと比較して、左室内径の拡大および収縮能低下は増加し、肺重量や左室拡張末期圧は更に上昇した。これらの結果は $\alpha$ -GC投与によるNKT細胞の活性化の結果を裏付ける結果であった。したが

って、NKT 細胞は心筋梗塞後心筋リモデリングおよび心不全の形成・進展に非常に重要な役割を果たしていることが示された。

以上の研究内容について、副査の西村正治教授より、1)  $\alpha$ -GC が NKT 細胞の活性化に特異的であるかどうかについて、2) 心保護効果を示した IL-10 の産生源が活性化した NKT 細胞であるかどうかについて、3) 投与した  $\alpha$ -GC の濃度や投与時期の選択理由について、主査の瀬谷司教授より、4) NKT 細胞を活性化するための抗原提示細胞について、5) 心筋梗塞モデルにおける内因性のリガンドについて、副査の三輪聡一教授より、6) 心筋梗塞後の心筋において、梗塞部と非梗塞部の分離方法について、7) IL-10 の心保護効果の重要性を示すため、IL-10 欠損マウスを用いた実験の有無について、8) 図 3.2.8.の説明の修正について、副査の川口秀明教授より、9) マクロファージ、MCP-1 および炎症性サイトカインの遺伝子発現の変化の意義について、10)  $\alpha$ -GC 投与が梗塞サイズを変化させなかった点について、11)  $\alpha$ -GC が左室機能を改善させた機序について、12) 臨床を見据えた際に、心筋への IL-10 治療が可能かどうかについて、副査の筒井裕之教授より、13) 心筋梗塞以外の原因で起こる心不全において  $\alpha$ -GC が有効であるかどうかについて質問を受けた。申請者は何れの質問に対しても、自己の実験データや過去の報告を引用しながら、概ね適切な回答をなし得た。

本論文は、①心筋梗塞後の心筋において、NKT 細胞が浸潤、増加していること、②NKT 細胞の活性化によって、心筋梗塞後の死亡率、心筋リモデリングおよび心不全が改善すること、③NKT 細胞による有効性に IL-10 の心保護効果が重要であること、④NKT 細胞の欠損によって、心筋リモデリングおよび心不全が増悪することを証明した。このことは世界ではじめて、心不全における NKT 細胞の役割を明らかにした研究結果である。心不全の薬物および非薬物治療は目覚ましい進歩を遂げてきたが、未だ予後不良の疾患でありその克服は循環器領域において重要な課題である。今回の研究は NKT 細胞が心不全における新たな治療標的になることを示唆する重要な研究である。

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、申請者が医学博士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。