

学位論文題名

ナチュラルキラーT細胞はアポリポ蛋白E欠損マウスにおける
アンジオテンシンII誘発性腹部大動脈瘤の進展に寄与する

学位論文内容の要旨

【背景と目的】腹部大動脈瘤は高齢者における有病率が非常に高い疾患である。瘤径の増大に伴い破裂の危険性が増加し、大動脈瘤が破裂した場合には致死率が高いため、無症状であっても一定の瘤径を超えた段階で外科的治療が必要となる。しかし、高齢者では全身的合併症のため手術リスクが高く外科的治療の適応外となってしまうことも多い。したがって腹部大動脈瘤の病態の解明とそれに基づく内科的治療の確立は重要な課題である。

腹部大動脈瘤の病理組織は、エラスチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスの破壊、血管平滑筋細胞の減少を特徴とするが、マクロファージやリンパ球など炎症細胞の浸潤も目立つ。特に炎症細胞は炎症性サイトカインや細胞外マトリックス分解酵素を産生し、瘤形成において重要な役割を果たしている。一般的に腹部大動脈瘤は動脈硬化を基盤として発症することが知られ、慢性炎症は腹部大動脈瘤と動脈硬化双方の発症に関与する共通の機序として考えられる。

ナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、ナチュラルキラー細胞とT細胞双方の表面抗原を発現するT細胞亜群である。NKT細胞は抗原提示細胞から提示された糖脂質を認識して活性化すると、ヘルパーT細胞をTヘルパー1型(Th1)細胞に分化させるサイトカイン(Th1サイトカイン)であるインターフェロン(IFN)- γ および、Tヘルパー2型(Th2)細胞に分化させるサイトカイン(Th2サイトカイン)であるインターロイキン(IL)-4などを迅速に産生する。NKT細胞はこれらのサイトカインによってヘルパーT細胞の免疫応答を規定するため免疫調節細胞として注目されている。動脈硬化モデルマウスを用いた検討では、NKT細胞は動脈硬化病巣に存在し、動脈硬化の発症・進展に重要な役割を果たすことが明らかにされている。

最近ヒト腹部大動脈瘤を用いた組織学的検討により、NKT細胞が瘤組織に存在することが報告された。NKT細胞は腹部大動脈局所で糖脂質などの内因性リガンドを認識し、慢性炎症を惹起させて瘤形成に関与している可能も考えられる。しかし、これまでNKT細胞が腹部大動脈瘤に及ぼす影響を検討した研究はなく、NKT細胞が果たす役割については不明である。本研究では、アンジオテンシン(Ang)II持続投与アポリポ蛋白E欠損マウスにおいてNKT細胞を刺激活性化し、NKT細胞が腹部大動脈瘤の発症・進展において果たす役割を検討した。

【材料と方法】2ヶ月齢雄性アポリポ蛋白E欠損マウスを用い、AngII(1000 ng/kg/min)あるいはリン酸緩衝食塩水(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2群に分け、NKT細胞を特異的に刺激する糖脂質OCH(0.1 μ g/g体重)(AngII-OCH群; n=10)およびPBS-OCH群; n=5)あるいはPBS(AngII-PBS群; n=15)およびPBS-PBS群; n=10)をAngII投与開始2日前とAngII投与中は週2回、計9回腹腔内投与した。4週後に血圧測定を行い、採血後屠殺し、大動脈を採取した。大動脈の一部は浸潤した白血球を分離してフロ

一サイトメトリー解析を行い、その他定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現解析、免疫組織化学染色や *in situ* zymography も行った。

【結果】PBS-PBS 群に比較して AngII-PBS 群および AngII-OCH 群では収縮期および拡張期血圧は有意に上昇したが、AngII-PBS 群と AngII-OCH 群の間に有意差は認めなかった。また、体重、血清総コレステロール、HDL コレステロール、non-HDL コレステロール、中性脂肪も AngII-PBS 群と AngII-OCH 群の間に有意差は認めなかった。

PBS-PBS 群および PBS-OCH 群では腹部大動脈の拡張は認めなかったが、AngII-PBS 群の腎動脈分岐近位部での最大径は PBS-PBS 群に比較して有意に大きく、さらに AngII-OCH 群では AngII-PBS 群に比較して有意に拡張していた。大動脈のフローサイトメトリー解析では、大動脈に浸潤した NKT 細胞の割合は AngII-OCH 群で PBS-PBS 群および AngII-PBS 群に比較して有意に増加していた。腹部大動脈の組織学的解析では、AngII-OCH 群で AngII-PBS 群に比較して弾性板断裂数は有意に増加し、壁内出血や大動脈解離の合併率も有意に上昇した。また、マクロファージや T リンパ球の浸潤も、AngII-OCH 群で AngII-PBS 群に比較して有意に増加していた。

腹部大動脈の遺伝子発現解析では、Va14/Ja18、MHC class II、RANTES、IFN- γ 遺伝子発現は AngII-OCH 群で AngII-PBS 群に対していずれも有意に亢進した。腹部大動脈の *in situ* zymography では、MMP 活性は PBS-PBS 群および AngII-PBS 群ではほとんど認めなかったが、AngII-OCH 群では弾性板断裂や壁内出血をきたした瘤形成部の中膜から外膜の領域に一致して亢進を認めた。

【考察】本研究では、アポリポ蛋白 E 欠損マウスに AngII を持続投与した腹部大動脈瘤マウスモデルにおいて、OCH を腹腔内反復投与して NKT 細胞を活性化すると、腹部大動脈瘤の進展が促進することが明らかにされた。フローサイトメトリー解析では OCH 投与で大動脈への NKT 細胞浸潤が増加していることが確認され、さらに病理組織学的解析では、マクロファージや T リンパ球が腹部大動脈壁内へ浸潤・活性化し、MMP 活性の亢進も認めた。また、瘤径の増大には大動脈解離の病態が関与していることも示唆され、NKT 細胞は腹部大動脈瘤の進展において重要な役割を果たしていることが示された。

これまでの研究では腹部大動脈瘤の形成には細胞外マトリックス分解酵素による細胞外マトリックスの破壊がきわめて重要であり、MMP-2 や MMP-9 が代表的分子とされている。MMP-9 および MMP-2 はそれぞれマクロファージや血管平滑筋細胞がその主な産生源であり、MMP は NKT 細胞活性化による腹部大動脈瘤の進展に関わる有力な分子機序と考えられた。今回の研究では NKT 細胞の活性化に伴ってマクロファージや T リンパ球も活性化し、MMP をはじめとする様々な炎症性サイトカインが分泌され、腹部大動脈瘤の進展につながったと考えられる。AngII 投与腹部大動脈瘤マウスモデルにおいては、瘤径増大の機序として血管中膜へのマクロファージの浸潤、MMP 活性亢進に加えて大動脈解離の合併が考えられているが、これまで大動脈解離の病態について検討した研究は数少なく、NKT 細胞などによる慢性炎症の関与が示唆された。

【結論】アポリポ蛋白 E 欠損マウスに AngII を投与した腹部大動脈瘤マウスモデルにおいて、OCH を腹腔内反復投与して NKT 細胞を活性化することにより、大動脈組織への NKT 細胞、T リンパ球およびマクロファージの集簇活性化、T_H1 サイトカイン IFN- γ 発現亢進や細胞外マトリックス分解酵素 MMP の活性亢進が認められ、さらに腹部大動脈瘤の進展が確認された。NKT 細胞は動脈硬化病巣のみならず腹部大動脈瘤の進展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 細胞は腹部大動脈瘤の新たな予防・治療の標的として有望であると考えられた。

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細胞はアポリポ蛋白E欠損マウスにおける アンジオテンシンII誘発性腹部大動脈瘤の進展に寄与する

本論文では、アポリポ蛋白 E 欠損マウスにアンジオテンシン II を持続投与した腹部大動脈瘤マウスモデルにおいて、OCH を腹腔内反復投与してナチュラルキラーT (NKT) 細胞を活性化すると、腹部大動脈瘤の進展が促進することを明らかにした。

審査会の質疑応答では、3人の審査担当者より質問および確認がなされた。まず副査 松居教授より以下の質問および確認があった。(1) アンジオテンシン II を投与していないマウスに OCH を投与しただけでは腹部大動脈瘤が形成されていないため、NKT 細胞は大動脈瘤の進展には寄与するが、大動脈瘤の発症に関与しているとまではいえないのではないか。

(2) NKT 細胞はアンジオテンシン II 投与により形成された腹部大動脈瘤のような特殊な大動脈瘤の進展には寄与するが、ヒトの大動脈瘤の進展にまで関与しているとまでは言えるのか。(3) NKT 細胞が炎症を悪化させると大動脈瘤の破裂による死亡率や死亡に至るまでの期間も悪化したのか。それに対して申請者は実験結果を踏まえ、ワイルドタイプのマウスに OCH を投与しただけでは大動脈瘤は形成されないのは事実であるが、アンジオテンシン II の投与により形成された腹部大動脈瘤には、OCH の投与が加わらなくとも NKT 細胞数が増加する傾向にあり、発症への関与も考えられること、炎症の悪化により死亡率や死亡に至るまでの期間に明らかな差はなかったことを回答した。

次に副査 三輪教授より以下の質問およびコメントがあった。(1) スライドで重要なデータを提示する際にはポイントでそこをきちんと示すようなプレゼンテーションの工夫が必要である。(2) フローサイトメトリーのデータを示す場合は非特異的な検出を除外するために未染色での解析データも同時に示すべき。(3) リアルタイム PCR の方法について、DNA の検出はどのように避けているのか。(4) 動物モデルとして何故高脂血症マウスやアンジオテンシン II の投与を用いているのか、すなわち動物モデルが大動脈瘤を発症する機序がどのようなものであり、NKT 細胞がその機序にどのように作用しているのか。また、アンジオテンシン II の投与により形成された腹部大動脈瘤は何故腎動脈上に限局して形成されるのか。それに対して申請者は基本的な解析手法や本動物モデルの選択に関しては知識や考察がやや不十分な点が認められたものの既報を引用し、本動物モデルが大動脈瘤を発症する機序はいまだはっきりとはしていないが、高脂血症が発症に必要であると考えられていること、またアンジオテンシン II は炎症細胞の遊走因子の発現を介してマクロファージの浸潤を惹起し、マトリックスメタロプロテアーゼなどの蛋白分解酵素が分泌され大動脈瘤の発症に関与すると考えられていることを回答した。

最後に主査 筒井教授より以下の質問およびコメントがあった。(1) 松居、三輪両教授からもコメントがあったように、動物モデルが大動脈瘤を発症する機序と NKT 細胞が大動脈瘤を進展する機序がどのように関連しているのかをきちんと考察することが必要。(2) ヒトの腹部大動脈瘤で NKT 細胞の関与を示唆する報告はあるのか、また関与しているのであれば NKT 細胞を活性化させる因子は何か。それに対して申請者は既報を引用しヒトの腹部大

動脈瘤をフローサイトメトリーで解析すると、NKT 細胞が集積していることが示されていること、また NKT 細胞の生理的リガンドはこれまではっきりとは同定されておらず、今後明らかにしていく必要があることを回答した。

本論文は、NKT 細胞が腹部大動脈瘤の進展に寄与することを明らかにした点で高く評価され、NKT 細胞は腹部大動脈瘤の新たな予防・治療の標的として有望である可能性が期待される。

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。