

## 学位論文題名

## Studies on the Role of Natural Killer T Cells on Cardiac Hypertrophy and Failure in Mice due to Chronic Pressure Overload in Mice

(慢性圧負荷によるマウスの心肥大および心不全における  
インバリアントナチュラルキラーT細胞の役割に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】心肥大は心不全の代表的な予後予測因子である。圧負荷に対して初期には代償性に求心性心肥大が生じ、心室壁へのストレスを正常化させ、左室のポンプ機能を維持しようとする。しかし、過剰な圧負荷が持続すると代償機構は破綻し、心筋の拡張および収縮機能が障害され、病的な心肥大と心リモデリングが起こる。炎症は心リモデリングの重要な分子生物学的因子の一つであり、インターロイキン6 (IL-6) や腫瘍性壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) は、心肥大や心不全の進展に重要な役割を担っている。一方、慢性炎症は病的な心肥大から心不全へと移行する過程で保護的に働くことも報告されており、心臓における炎症が心不全において両方向性の役割を果たしている事を示唆している。

Invariant natural killer T (iNKT) 細胞は、NK マーカーであるNK1.1 と可変性の無いT細胞受容体(マウスではVa14Ja18)を発現するT細胞であり、CD1dで提示された糖脂質抗原を認識する。代表的リガンドである $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ GC) はiNKT細胞を活性化させ、大量のT-helper type 1 ( $T_H1$ )、 $T_H2$  サイトカインおよびケモカインを産生して獲得免疫反応を形成することからiNKT細胞は自然免疫と獲得免疫の架け橋として機能し、組織炎症を統制していると考えられている。様々な動物モデルにおいて、iNKT細胞は保護的な役割が報告されており、その作用は、 $T_H2$  サイトカインの産生に依存していた。したがって、iNKTは心肥大や心不全の進展においても保護的に作用することが期待されるが、心肥大、心不全進展におけるiNKT細胞の役割を検討した報告は皆無である。

本研究では、圧負荷により生じた心肥大、心不全におけるiNKT細胞の病態生理学的な役割について検討した。

【対象と方法】雄の野生型C57BL/6Jマウス(WT)およびJa18遺伝子をノックアウトさせたJa18<sup>-/-</sup>マウス(KO)を使用した。マウス圧負荷心不全モデル作成の代表的な手術である大動脈縮窄手術(TAC)及びSham手術をマウスに施行した。実験は、以下の4セクションに分けて行った。①WTを用いてTAC後のiNKT細胞受容体のVa14Ja18遺伝子の定量的リアルタイムPCRによる経時的变化を観察した。②圧負荷心不全モデルにおけるiNKT細胞欠損の影響を検討し、WT+Sham, KO+Sham, WT+TAC, KO+TACの4群で解析した。まず、5週後の検討を行い、生存率と組織重量、心エコー、血行動態変化を観察した。次に、2週後の検討を行い、組織重量、心エコー、血行動態変化、組織学的解析、リアルタイムPCR、フローサイトメトリー、免疫プロット法、免疫組織染色での評価を行った。③圧負荷心不全モデルにおけるiNKT細胞活性化の影響を検討し、 $\alpha$ GC(1回0.1 $\mu$ g/g)もしくはPBSを、術後第1, 4, 8, 11, 14病日に腹腔内投与の上Sham+PBS, Sham+ $\alpha$ GC, TAC+PBS, TAC+ $\alpha$ GCの4群で5週後の生存率と組織重量、心エコー、血行動態変化を解析した。④圧負荷心不全モデルにおけるIL-10受容体抗体(IL-10Rab)投与の効果を検討し、IL-10Rab(100 $\mu$ g/マウス/回)もしくはPBSを術後第1, 4, 7, 10, 13病日に腹腔内投与の上、TAC+IL-10Rab, TAC+PBSの2群で2週後の生存率と組織重量、心エコー、血行動態変化を観察した。

【結果】マウス正常心筋の定量リアルタイムPCR及びフローサイトメトリーでiNKT細胞の存在を証明し、TAC手術2週後の心筋でiNKT細胞の発現が増加していることを定量的リアルタイムPCR及びフローサイトメトリーで確認した。iNKT細胞を欠損させることにより、WT+TACと比較して、KO+TACではWT+TACと比較して5週後の生存率は低下した。

また、心重量、左室重量、及び肺重量は増加し、左室内径が増加し、左室収縮率が低下し、左室拡張末期圧は上昇した。2週後では、KO+TACはWT+TACと比較して、心重量、左室重量、肺重量は増加し、左室内腔が拡大し、左室内径短縮率が低下した。心筋細胞断面積、間質線維化率はKO+TACでWT+TACに比較して増大し、MMP-2, pro-MMP2 活性化の増大を伴っていた。定量的リアルタイムPCRにおいてWT+TACでは、IL-10の遺伝子発現が増加したが、KOマウスでは、減少した。免疫プロット法では、KOマウスで、ERK1/2のリン酸化はWTマウスと比較して有意に増加し、KO+TACでは更に増加した。TAC手術後に、iNKT細胞を活性化させると、生存率に有意差が無かったが、TAC+PBSに比較してTAC+ $\alpha$ GCでは、心重量、左室重量、肺重量の増加、左室内腔の拡大、左室拡張末期圧の上昇ならびに左室内腔短縮率の低下は有意に抑制された。TAC+IL-10RAbとTAC+PBSの間で、生存率、組織重量、心エコーならびに血行動態に有意差が無かった。

【考察】本研究では、マウス心筋におけるiNKT細胞の存在が明らかにされた。TAC手術後の心筋でiNKT細胞が増加することが示された。また、iNKT細胞を欠損させると、TAC手術後の死亡率、左室リモデリング、および左室収縮能が悪化し、組織レベルでも心筋細胞肥大と心筋間質線維化が増大した。さらに、KOではIL-10遺伝子発現が減少し、ERKタンパクのリン酸化が増加した。一方、 $\alpha$ GCでiNKT細胞を活性化させると、TAC手術後の心重量、肺重量の増加および左室収縮末期圧の上昇が抑制された。

iNKT細胞は、自己免疫性疾患や炎症性疾患などにおいて保護的な役割を果たしている。一方で、iNKT細胞は、動脈硬化の血管壁の炎症や耐糖能異常での脂肪組織の炎症を活性化させることからiNKT細胞は様々な疾患の組織炎症で、保護的および攻撃的の両方向性の役割を担っていると考えられる。iNKT細胞の保護的な役割は $T_H1$ から $T_H2$ サイトカイン産生優位へシフトさせることや、IL-10等の抗炎症サイトカインを優位に産生させることによって説明される。本研究では、TAC手術後のiNKT細胞数の変化に伴って、IL-10の遺伝子発現がWT+TACで増加し、KO+TACで低下した。TAC手術後にIL-10RAbを投与しIL-10の作用を中和させたが、TAC+PBSとTAC+IL-10RAbの間に死亡率および心エコー、血行動態、および組織重量データに有意差はなかった。TNF- $\alpha$ は炎症性サイトカインとして作用し、心毒性と左室機能障害を導く一方で、心不全の進展に保護的な役割をする報告もある。実際、TNF受容体抗体やTNF抗体を心不全患者に投与した臨床研究では、有効性は確認されなかった。一方では、IL-10とTNF- $\alpha$ の比が心機能低下と関連する報告があり、本研究で遺伝子発現量から求めたIL-10/TNF- $\alpha$ 比は、KO+TACでWT+TACに比較して有意に低下していた。これらの知見は、心不全進展に慢性炎症が関わる機序は、単一のサイトカインでなく、サイトカインネットワークの調節に焦点を当てるべきであることを示唆し、iNKT細胞は、自然免疫反応と獲得免疫反応を繋ぐ架け橋として作用して圧負荷心不全におけるサイトカインネットワークの上流の調節因子として働いている可能性がある。

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) シグナルカスケードは、主にERK経路、p38経路、JNK経路の3種類のカスケードが存在する。特に、MEK1-ERK1/2経路の活性化によって心肥大が引き起こされ、この経路の抑制によって間質の線維化と心機能障害が抑制される。本研究では、KOの心筋では、WTと比較してERK1/2のリン酸化が有意に増加し、KO+TACにおいてさらに増加した。これらは、ERK経路がKOにおけるTAC後の心筋細胞肥大と間質の線維化の増悪の調節因子の一つである可能性を示唆している。

【結論】iNKT細胞はTAC手術の圧負荷心不全進展に対して保護的な役割を果し、心不全における炎症の機序においてiNKT細胞が重要な役割を果たしていることを明らかにした。従って、圧負荷心不全においてiNKT細胞を活性化させる治療法が期待される。今後の研究課題として心不全におけるiNKT細胞のより詳細な病態生理学的機序や生物学的特徴を解明していく必要がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 丸 藤 哲  
副 査 教 授 筒 井 裕 之  
副 査 教 授 西 村 正 治  
副 査 教 授 石 田 晋

## 学位論文題名

### Studies on the Role of Natural Killer T Cells on Cardiac Hypertrophy and Failure in Mice due to Chronic Pressure Overload in Mice

(慢性圧負荷によるマウスの心肥大および心不全における  
インバリエントナチュラルキラーT細胞の役割に関する研究)

圧負荷心不全において、慢性炎症は左室リモデリングに關与する重要な分子生物学的因子の一つである。インバリエントナチュラルキラーT (iNKT) 細胞は活性化によって大量のサイトカインやケモカインを産生し、組織炎症を統制していると考えられている。これまでに、圧負荷による心不全の進展における iNKT 細胞の役割を検討した報告はない。申請者は、圧負荷モデルマウスを用いて、iNKT 細胞の遺伝子欠損あるいは薬物的な活性化によって左室リモデリングや心不全進展へ及ぼす影響を検討した。実験動物は雄性 12~15 週齢の C57/B6 マウス (WT) 及び iNKT 細胞受容体をノックアウトした *Ja18* ノックアウトマウス (KO) を用い、マウスに大動脈縮窄術 (TAC) を行った。フローサイトメトリー法およびリアルタイム PCR 法によって、TAC 後の心筋において iNKT 細胞が浸潤、増加したことを明らかにした。WT マウスと比較して、KO マウスにおいて TAC 後の心筋リモデリングおよび心不全が増悪し、組織学的な心筋細胞肥大と心筋間質線維化の増大を伴い、MMP-2 及び pro MMP-2 活性が増加した。また、IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-10/TNF- $\alpha$  比が低下した。さらに、KO マウスでは ERK1/2 のリン酸化が増強し TAC により更に増大した。一方、TAC 後のマクロファージやリンパ球などの炎症細胞の浸潤に WT と KO マウスの間に差がなかった。次に、iNKT 細胞を特異的に活性化させる  $\alpha$  ガラクトシルセラミドを投与したところ、TAC 後の心リモデリングと心不全を改善させた。以上より、圧負荷心不全において iNKT 細胞は保護的な役割を果たしていることが明らかとなった。今回の研究は iNKT 細胞が圧負荷心不全における新たな治療標的になる事を示唆する重要な研究と考えられた。

以上の研究内容について、主査および副査の教授と以下の質疑応答及び評価があった。

1) iNKT 細胞が圧負荷モデルでどのようなサイトカインを放出し、その下流でどのような免疫細胞の動態を示すのかについての質問に対して、申請者は、iNKT 細胞の産生する代表的なサイトカインである IL-4 や IFN- $\gamma$  については TAC との関連性の報告は少なく、TNF- $\alpha$  や IL-10 の相互作用が重要であると考えていること、TAC においては通常マクロファージ、リンパ球の浸潤が報告されているが、iNKT 細胞を欠損させる事による差異がなかったことからサイトカイン産生と直接的炎症細胞浸潤とは別の機序であると考えていると回答した。

2) 線維化やアポトーシスにおける分子機序及び調節因子についてさらに詳細なメカニズムについて検討を要し、特に Pro-MMP2 の遺伝子発現レベルでの解析や分解酵素、さらに TGF- $\beta$  などについて追加検討の必要性が指摘された。

3) 心筋における iNKT 細胞数が極めて少量であっても強力な働きを担うメカニズムにおける見解についての質問に対しては、iNKT 細胞の莫大なサイトカイン産生能に依存すると考えていると回答した。

4) TNF- $\alpha$ 、IL-10 などのサイトカインについて遺伝子発現だけでなく、タンパクレベルやサイトカイン量の測定など更なる詳細な追加検討の必要性が指摘された。

5)  $\alpha$  ガラトシルセラミド( $\alpha$ GC) による iNKT 細胞を活性化させても TAC による死亡率に改善が見られなかった理由についての質問に対して、申請者は、iNKT 細胞が  $\alpha$ GC により活性化された場合に生じる anergy が関わっているという見解の旨を回答した。

6) TAC モデルにおいて急激に圧負荷が生じる急性侵襲期と持続した圧負荷がかかる慢性期における iNKT 細胞の動態に差異があるかという質問に対して、申請者は、TAC におけるサイトカインや細胞内シグナルの挙動は時間経過で大きく異なるため、急性侵襲期と慢性期において iNKT 細胞が時間経過で異なった役割を果たす可能性が期待される点を回答した。

6) 今後 iNKT 細胞の圧負荷心不全におけるメカニズムを解明する上での研究展開についてどのようなプランがあるかという質問に対して、申請者は、単一なサイトカインで心不全の制御が困難である事は過去に証明されており、iNKT 細胞の複雑なサイトカイン制御に注目し、本研究で違いがあった TNF- $\alpha$  と IL-10 の心筋におけるクロストークの研究を計画していると回答した。

この論文は、圧負荷モデルにおける iNKT 細胞の役割を初めて解明した点で高く評価され、今後の iNKT 細胞の生物学的研究の進歩により新たな心不全病態解明の鍵として期待される。

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。