

## 学位論文題名

Invariant natural killer T cells are involved in aortic  
valvular calcification via inhibiting osteoclastic  
differentiation in uremic apolipoprotein-E deficient mice

(インバリアントナチュラルキラーT細胞は破骨細胞分化を抑制することで、腎不全アポリポ蛋白E欠損マウスにおける大動脈弁石灰化に関与する)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 大動脈弁狭窄症は、75歳以上の高齢者の3~5%に認められる有病率の高い疾患で、急速な高齢化と食生活の欧米化に伴って近年増加傾向にあり、症候性となると予後は極めて悪く臨床的に大きな問題となっている。現時点では外科的大動脈弁置換術が唯一の標準的な治療法であるが、高齢者では合併症のため手術リスクが高く、外科手術の適応外となる症例も少なくない。動脈硬化症に対して有効とされているスタチン製剤を用いた脂質低下療法も無効であり、大動脈弁狭窄症の分子メカニズムを解明して病変の進行を抑制ないしは退縮させる治療法の開発が望まれている。

大動脈弁狭窄症は病理学的に弁尖の強い石灰化を特徴とする。近年、石灰化は局所での骨芽細胞・破骨細胞の分化を基盤とした骨形成によって起こされる能動的な組織学的変化(リモデリング)であることが提唱され、局所での骨芽細胞と破骨細胞の活性のバランスの変化により、石灰化の病変が形成されると考えられている。これらの細胞の分化は活性化したマクロファージやT細胞から分泌される多様なサイトカインにより調節されていることから、局所での慢性炎症が動脈硬化と同様に大動脈弁の石灰化に重要な役割を果たしていると考えられる。

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し、糖脂質を特異的に認識して多様な炎症性サイトカインを産生して自然免疫と獲得免疫をつなぐ免疫調節細胞である。NKT細胞の多くは特異的なT細胞受容体・Vα14/Jα18を発現し invariant NKT (iNKT) 細胞と呼ばれており、動脈硬化モデルマウスの動脈硬化病巣に存在し、iNKT細胞活性化刺激によって動脈硬化病巣が増悪することから、iNKT細胞は動脈硬化の発症・進展に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし、高度石灰化病変を特徴とする大動脈弁狭窄症において、iNKT細胞が果たす役割についてはまったく不明である。

本研究では腎臓全摘 ApoE KO マウスを用いて、大動脈弁石灰化における iNKT 細胞の果たす役割を検討することを目的とした。また、マウス脾細胞を用いて iNKT 細胞活性化が破骨細胞に与える影響を検討した。

【材料と方法】 雌性 ApoE KO マウスを用い、8週齢で右腎上極と下極を切除し10週齢で左腎摘出して腎不全を誘導した。12週齢より高脂肪食へ変更し、同時に iNKT 細胞特異的刺激性物質である α-ガラクトシルセラミド (αGC) (CRF-αGC; n=15) または、リン酸緩衝食塩水 (PBS) (CRF-PBS; n=16) を週1回、計9回腹腔内投与した。コントロールとして偽手術を施行する群 (Sham; n=13) も作成した。さらに、ApoE 蛋白と iNKT 細胞を欠損する ApoE/Jα18 DKO マウスを用いて同様に腎臓全摘し、αGC 投与群 (CRF-DKO-αGC; n=10) あるいは未投与群 (CRF-DKO; n=11) を作成した。すべてのマウスは20週齢で採血後屠殺

し、大動脈弁を含む心臓と胸部大動脈を採取した。組織切片を作成したのち、フォンコッサ染色で大動脈弁石灰化を評価した。また、胸部大動脈からは RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を行った。

*In vitro* 実験では ApoE KO マウスから脾細胞を分離し、RANKL 及び M-CSF を添加した培地で培養して単球系前駆細胞から破骨細胞へ分化誘導し、培養上清に  $\alpha$ GC を添加して iNKT 細胞を活性化させ破骨細胞分化に与える影響を検討した。

**【結果】** Sham 群に比し、CRF-PBS 群 及び CRF- $\alpha$ GC 群で血漿中の尿素窒素値と総コレステロール値の有意な上昇を認めた。大動脈弁尖の総面積に対する大動脈弁尖石灰化病変面積の割合は、Sham 群に比し CRF-PBS 群で有意に大きく、CRF- $\alpha$ GC 群でさらに増加した ( $1.6 \pm 0.3$  対  $2.5 \pm 0.2$  対  $3.5 \pm 0.2\%$ ,  $P < 0.05$ )。一方、CRF-DKO 群および CRF-DKO- $\alpha$ GC 群での石灰化病変の割合は CRF-PBS 群と同等であった。大動脈弁尖への Mac3 陽性マクロファージの浸潤は、CRF-PBS 群に比し CRF- $\alpha$ GC 群で有意に増加した ( $16 \pm 3$  対  $24 \pm 2\%$ ,  $P < 0.05$ )。胸部大動脈での遺伝子発現は、CRF-PBS 群に比し CRF- $\alpha$ GC 群において、V $\alpha$ 14/J $\alpha$ 18 (iNKT 細胞マーカー, 1.9 倍,  $P < 0.05$ )、MHC classII (マクロファージ活性化マーカー, 1.5 倍,  $P < 0.05$ )、IFN- $\gamma$  (4.0 倍,  $P < 0.001$ ) および、IL-4 (17 倍,  $P < 0.05$ ) が有意に亢進していた。Runx2、BMP2、BMP4、OPN (骨芽細胞マーカー) は CRF-PBS 群と CRF- $\alpha$ GC 群で差を認めなかったが、Calcitonin receptor (破骨細胞マーカー) は CRF- $\alpha$ GC 群で有意に発現が低下していた ( $0.2$  倍,  $P < 0.05$ )。以上より、iNKT 細胞活性化によって大動脈弁で IFN- $\gamma$  と IL-4 が発現亢進し、破骨細胞の分化が抑制されたと考えられた。

マウス脾細胞を分離し、RANKL と M-CSF で破骨細胞分化を誘導し、培養上清に  $\alpha$ GC (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 ng/mL) を加え iNKT 細胞を活性化すると濃度依存的に培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4 は増加し (IFN- $\gamma$ ; 1.3, 46, 210, 974, 2541, 4711 pg/mL, IL-4; 0.6, 4.0, 6.8, 57, 114, 125 pg/mL)、TRAP 染色陽性破骨細胞への分化は有意に抑制された (TRAP 染色陽性面積; 12, 9.1, 4.9, 1.6, 0.9, 0.2 mm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ )。培養上清に  $\alpha$ GC と共に IFN- $\gamma$ 、IL-4 中和抗体を添加すると、 $\alpha$ GC による破骨細胞分化抑制作用は消失した。

**【考察】** 高脂血症発症 ApoE KO マウスに腎不全を誘導すると大動脈弁石灰化を認め、さらに  $\alpha$ GC を投与し iNKT 細胞を活性化すると大動脈弁石灰化が進行した。大動脈組織での遺伝子解析や *in vitro* 実験から、iNKT 細胞活性化で IFN- $\gamma$  や IL-4 の発現が亢進し、破骨細胞分化抑制が確認された。一方、骨芽細胞分化は変化なく、骨芽細胞/破骨細胞分化バランスが骨芽細胞分化優位となった結果、局所での石灰化が進行したものと考えられた。

*In vitro* 実験において IFN- $\gamma$  と IL-4 に対する中和抗体の添加で iNKT 細胞活性化による破骨細胞分化抑制作用は消失したが、部分的なものであった。IFN- $\gamma$ ・IL-4 を介した機序のほか、iNKT 細胞表面に発現する CTLA-4 などの分子を介した細胞間の直接作用が関与している可能性が示唆される。本研究の結果から大動脈弁尖における破骨細胞の分化促進やその上流の iNKT 細胞の活性化制御が大動脈弁狭窄症に対する新たな治療介入点として有望と思われた。

**【結論】** 高脂肪食投与腎不全 ApoE KO マウスで  $\alpha$ GC による iNKT 細胞活性化で大動脈弁の石灰化が進行した。これは iNKT 細胞により分泌された IFN- $\gamma$  と IL-4 により局所における破骨細胞の分化が抑制され骨芽細胞分化が優位となるためであった。免疫調節細胞である iNKT 細胞と骨吸収を担う破骨細胞の制御が大動脈弁狭窄症と心血管石灰化の新たな治療ターゲットとなる可能性があると考えられた。

# 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 久 下 裕 司

## 学位論文題名

### Invariant natural killer T cells are involved in aortic valvular calcification via inhibiting osteoclastic differentiation in uremic apolipoprotein-E deficient mice

(インバリアントナチュラルキラーT細胞は破骨細胞分化を抑制することで、腎不全アポリポ蛋白E欠損マウスにおける大動脈弁石灰化に関与する)

申請者は、高脂肪食を投与した腎不全アポリポ蛋白E欠損 (ApoE KO) マウスで  $\alpha$  ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ GC) を用いたインバリアントナチュラルキラーT (iNKT) 細胞の活性化によって大動脈弁の石灰化が進行したこと、この現象が iNKT 細胞により分泌された IFN- $\gamma$  と IL-4 により局所における破骨細胞の分化が抑制され骨芽細胞の分化が優位となるために生じたことを証明した。このことは世界ではじめて、大動脈弁石灰化における iNKT 細胞の役割を明らかにした研究結果である。大動脈弁狭窄症は現状では有効な内科的治療法が存在せず、主要な組織所見である石灰化の進展防止は循環器領域において重要な課題であり、今回の研究は iNKT 細胞の活性化制御が大動脈弁狭窄に対する新たな治療標的になる可能性を示唆する重要な研究である。

以上の研究内容について、主査および副査の教授より、1)  $\alpha$ GC が iNKT 細胞の活性化に特異的であるかについて 2) iNKT 細胞の活性化制御を石灰化の治療に結びつけるために今後明らかにする必要がある事項について 3) 石灰化を評価した今回の腎不全モデルと他の動脈硬化モデルとの相違点について 4) 大血管組織での IFN- $\gamma$ 、IL-4 の亢進に対して TNF- $\alpha$  は変化を認めなかった点について 5) 大動脈弁石灰化以外の全身における石灰化 (血管石灰化や骨密度など) について 6) 臨床応用する場合にヒトで iNKT 細胞の活性化を確認する方法および、異常に活性化した iNKT 細胞を制御する方法について 7) マクロファージの活性化とそれに引き続く炎症性変化の関与について質問を受けた。申請者は何れの質問に対し、1)  $\alpha$ GC は既報において、iNKT 細胞を特異的に活性化する物質であることが確認されていること、申請者の実験でも、iNKT 細胞を欠く ApoE/Ja18 DKO マウスに  $\alpha$ GC を投与した場合に大動脈弁尖の石灰化の亢進が認められず、IFN- $\gamma$ 、IL-4 など炎症性サイトカインの発現亢進が全く認められないこと、また *in vitro* の実験でも iNKT 細胞を欠損した場合に  $\alpha$ GC の作用が完全に打ち消されることなどから  $\alpha$ GC は iNKT 細胞に特異的な物質であると考えられた。2) 今回の DKO マウスを用いた検討では大動脈弁尖の石灰化は変化を認めず、 $\alpha$ GC で活性化した場合にのみ石灰化を悪化させること、腎不全誘導による石灰化進行では iNKT 細胞の活性化が確認できなかったことなどから、今後 iNKT 細胞の制御を治療に結びつけるためにはヒトでの大動脈弁狭窄・弁石灰化・血管石

灰化が、iNKT 細胞の異常な活性化を一因として起こっている症例の存在を確認する必要がある。3) 広く用いられている高脂血症発症マウスに高脂肪食投与を投与することで動脈硬化を誘導するモデルでの心血管石灰化の進行は非常に遅く、石灰化を評価するためにはかなりの期間を要することが報告されているが、今回の腎不全マウスはカルシウム・リン代謝異常などを合併することから、動脈硬化と同時に組織の石灰化を比較的早期に誘導できるため、今回の研究では病態モデルとして用いた。4) iNKT 細胞の活性化で TNF- $\alpha$  の亢進も予測されていたが、心血管組織では亢進を認めなかった。この結果から既報において骨髄で認められた TNF- $\alpha$  による破骨細胞誘導作用が心血管組織で生じず、IFN- $\gamma$  と IL-4 の持つ破骨細胞抑制作用が強く発現した結果として大動脈弁尖の石灰化が悪化したものと考えた。5) 今回の 20 週齢での検討ではバルサルバ洞での組織学的な血管の石灰化は非常に軽度であり評価できなかった。今回の研究では骨密度は測定していないが、既報で iNKT 細胞の活性化で骨髄組織において破骨細胞を誘導し骨密度を減少させることが確認されており、iNKT 細胞の活性化による作用が局所で違ってくこと、この作用の違いがヒトにおける骨粗鬆症での血管石灰化の増悪といった体内でのカルシウム分布異常に対するひとつの機序である可能性が示唆された。6) iNKT 細胞を末梢血から分離し、サイトカイン分泌能を確認する方法、現時点では iNKT 細胞の内因性のリガンドは不明で、候補としてリゾフォスファチジルコリン等の物質が考えられているが、この点が明らかになれば血中濃度を測定することで iNKT 細胞の活性化を間接的に測定する方法となりえる。7) 内因性のリガンドを明らかにして、抗体を用いることで非活性化をする方法や、活性化刺激に対する反応性が低下するアナジー現象を誘導する方法などが考えられる。既報でスルファチドを投与することで iNKT 細胞のアナジー現象が起こることが報告されている。8) マクロファージの活性化から分泌される炎症性サイトカインによる骨芽細胞分化促進も予測されたが、それは確認されなかったため、今回は iNKT 細胞による IFN- $\gamma$  および IL-4 分泌による破骨細胞分化抑制作用が石灰化に結びついたものと考えた。以上申請者は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。

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。