

学位論文題名

Studies on the Role of Invariant Natural Killer T Cells on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Mice

(心筋虚血再灌流障害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】急性心筋梗塞は冠動脈が血栓により急性に閉塞する疾患であり、途絶した血流を迅速に再開させることが最も効果的な治療である。しかし、再開した血流自体がさらなる心筋壊死を引き起こすことも知られており、これを心筋虚血再灌流障害と呼ぶ。再灌流障害が生じることで、再灌流自身の恩恵が減ってしまうため、急性心筋梗塞時に再灌流障害を防ぐことが付加的な治療目標となる。これまで再灌流障害には様々な炎症細胞の関与が報告されている。

インバリアントナチュラルキラーT細胞 (iNKT細胞) は、NK細胞とT細胞の受容体を同時に発現するT細胞亜群である。活性化されたiNKT細胞はT-helper type 1 (T_H1) およびT_H2サイトカインの両者を迅速にかつ大量に産生し、獲得免疫反応を形成することから、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る。 α -galactosylceramide (α GC) は特異的にiNKT細胞を活性化させることが知られており、 α GCの投与により1型糖尿病、自己免疫性脳脊髄炎、関節リウマチ、腸炎、肝臓虚血再灌流障害が改善したと報告されている。一方、肝臓・腎臓・肺の虚血再灌流障害ではiNKT細胞の欠損が再灌流障害を減弱させたとも報告されている。

本研究では心臓虚血再灌流障害に果たすiNKT細胞の役割を解明することを目的とし、①心臓虚血再灌流障害でiNKT細胞が増加するかどうか、② α GCによるiNKT細胞活性化が心臓虚血再灌流障害に影響を与えるかどうか、③iNKT細胞欠損が心臓虚血再灌流障害に影響を与えるかどうかを検討した。

【材料と方法】虚血再灌流 (I/R) 手術は直視下に冠動脈を結紮し45分後にそれを解除した。Sham手術は冠動脈結紮以外の手技を同様に行った。実験は以下の3セクションに分けて行った。①C57BL/6JマウスにI/R手術を行い、再灌流後に心臓においてiNKT細胞が増加するかフローサイトメトリー法にて検討した。②C57BL/6JマウスにI/R手術もしくはSham手術を行い、再灌流30分前に α GC (0.1 μ g/g体重) もしくはvehicleを腹腔内に投与した。この4群において梗塞サイズの測定、免疫染色法による炎症細胞浸潤の評価、TUNEL染色法によるアポトーシスの評価、定量的RT-PCR法による心臓でのサイトカイン産生の評価を行った。また、サイトカイン中和抗体を使用し、サイトカイン中和が α GCの効果に及ぼす影響を評価した。③iNKT細胞を欠損させたJa18^{-/-}マウスと野生型マウス (WT) にI/R手術もしくはSham手術を行い、②と同様の検討を行った。またWTマウスから分離したNKT細胞をJa18^{-/-}マウスに養子移入し、その効果についても検討した。

【結果】①I/R手術24時間後の心臓の単核細胞をフローサイトメトリーで解析したとこ

ろ、iNKT 細胞の増加を認めた。② I/R+vehicle 群と比較して、I/R+αGC 群では梗塞サイズは縮小した ($47.1 \pm 2.5\%$ vs. $37.8 \pm 2.7\%$, $P < 0.05$)。免疫染色では、Sham+vehicle 群に比較して I/R+vehicle 群で MPO 陽性細胞数、CD3 陽性細胞数が有意に増加し、I/R+αGC 群ではこれらの増加が抑制された。また、TUNEL 陽性細胞も I/R+vehicle 群で増加し、I/R+αGC 群でこの増加が抑制された。定量的 RT-PCR 法では、I/R+vehicle 群と比較して、I/R+αGC 群では心臓での interleukin (IL) -10, IL-4, interferon (IFN) - γ 遺伝子発現が増加し、一方、tumor necrosis factor (TNF) - α と IL-1 β の炎症性サイトカインの遺伝子発現は減少した。抗 IL-10 受容体抗体を投与すると αGC の梗塞サイズ縮小効果は消失し、抗 IL-4 抗体、抗 IFN- γ 抗体の投与では αGC の効果は変化しなかった。③ WT+I/R 群と比較して、J α 18^{-/-}+I/R 群では再灌流 24 時間後の梗塞サイズは縮小した ($45.7 \pm 2.7\%$ vs. $33.9 \pm 1.8\%$, $P < 0.05$)。WT+Sham 群に比較して WT+I/R 群で MPO 陽性細胞数、CD3 陽性細胞数、TUNEL 陽性細胞数が有意に増加し、J α 18^{-/-}+I/R 群ではこれらの増加が抑制された。WT+Sham 群に比較して WT+I/R 群で心臓の IL-10, IL-4, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 遺伝子発現は有意に増加し、これらは J α 18^{-/-}+I/R 群で低下した。NKT 細胞の養子移入を行うと J α 18^{-/-}マウスの梗塞サイズは WT マウスと同程度に増加した。

【考察】本研究では、① I/R 手術後に iNKT 細胞が心臓で増加すること、② 再灌流前に αGC を投与すると梗塞サイズは縮小し、それには炎症細胞浸潤の減少、アポトーシスの抑制、炎症性サイトカイン産生の減少を伴っていたこと、さらにその効果が抗 IL-10 抗体により消失すること、③ iNKT 細胞欠損もまた梗塞サイズを縮小することを明らかにした。

これまで肝臓、腎臓、肺で I/R 手術後に iNKT 細胞がその組織で増加することが報告されており、①の結果はこれらと一致し、心臓でも虚血再灌流障害に iNKT 細胞が関与していることが示唆された。

IL-10 は強力な抗炎症性サイトカインであり、心筋虚血再灌流障害でも炎症細胞浸潤の抑制、アポトーシスの抑制、炎症性サイトカイン産生の抑制を介して保護的に働くことが報告されている。今回の研究では、αGC の投与が梗塞サイズを縮小し、抗 IL-10 受容体抗体によりこの効果が消失したことから、αGC による iNKT 細胞活性化が心筋虚血再灌流障害に対して示す保護効果は IL-10 の産生を介していることが示唆された。今回の結果から、αGC が急性心筋梗塞患者の虚血再灌流障害を減弱させる新しい治療法となる可能性が示唆された。

②の結果から iNKT 細胞の欠損では再灌流障害が増悪することが予想されたが、iNKT 細胞欠損でもまた梗塞サイズは縮小した。しかし、これまでの研究では、肝臓、腎臓、肺の虚血再灌流障害モデルで iNKT 細胞欠損によって再灌流障害が減弱することが報告されており、今回の結果はこれらと一致する。②と③で結果が逆方向とならなかったことについては、iNKT 細胞活性化の機序の相違が原因である可能性が考えられる。iNKT 細胞の反応はそのリガンドにより異なることが知られており、虚血再灌流時の内因性リガンドはいまだ明らかになっていない。すなわち、αGC による iNKT 細胞活性化と、内因性の活性化では作用が異なる可能性が考えられ、このことが αGC 投与と iNKT 細胞欠損の両者で梗塞サイズを縮小させた原因かもしれない。

【結論】本研究では I/R 手術後に iNKT 細胞が心臓で増加すること、再灌流前に αGC で外因性に iNKT 細胞を活性化すると心筋虚血再灌流障害に対し IL-10 の産生を介して保護的に働くこと、内因性の iNKT 細胞増加は催炎症性に働くことを明らかにした。急性心筋梗塞患者において αGC による iNKT 細胞活性化が虚血再灌流障害を減弱させる新しい治療法となる可能性が期待される。

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 三 輪 聡 一
副 査 教 授 清 野 研 一 郎

学位論文題名

Studies on the Role of Invariant Natural Killer T Cells on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Mice

(心筋虚血再灌流障害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)

申請者は、C57BL/6J マウスもしくは iNKT 細胞が欠損した $Ja18^{-/-}$ マウスに虚血再灌流手術を行い、また iNKT 細胞を活性化させる α GC を用いて、① 心筋虚血再灌流障害後に心臓のインバリアントナチュラルキラーT細胞 (iNKT 細胞) が増加すること、② iNKT 細胞の欠損により心筋虚血再灌流障害が減弱し、それには炎症細胞浸潤の減少、アポトーシスの減少、炎症サイトカイン産生低下が伴うこと、③ α GC による iNKT 細胞活性化は心筋虚血再灌流障害を減弱させ、それには炎症細胞浸潤の減少、アポトーシスの減少、炎症サイトカイン産生低下が伴うこと、さらに抗 IL-10 受容体抗体がこの保護効果を消失させることを明らかにした。

これらの結果から申請者は以下の通りの考察を行った。1) これまで肝臓、腎臓、肺で虚血再灌流手術後に iNKT 細胞がその組織で増加することが報告されており、①の結果はこれらと一致し、心臓でも虚血再灌流障害に iNKT 細胞が関与していることが示唆された。2) IL-10 は強力な抗炎症性サイトカインであり、心筋虚血再灌流障害でも炎症細胞浸潤の抑制、アポトーシスの抑制、炎症性サイトカイン産生の抑制を介して保護的に働くことが報告されている。今回の研究では、 α GC の投与が梗塞サイズを縮小し、抗 IL-10 受容体抗体によりこの効果が消失したことから、 α GC による iNKT 細胞活性化が心筋虚血再灌流障害に対して示す保護効果は IL-10 の産生を介していることが示唆された。今回の結果から、 α GC が急性心筋梗塞患者の虚血再灌流障害を減弱させる新しい治療法となる可能性が示唆された。3) ②の結果から iNKT 細胞の活性化では再灌流障害が増悪することが予想されたが、 α GC による iNKT 細胞活性化でもまた梗塞サイズは縮小した。②と③で結果が逆方向とならなかったことについては、iNKT 細胞活性化の機序の相違が原因である可能性が考えられる。iNKT 細胞の反応はそのリガンドにより異なることが知られており、虚血再灌流時の内因性リガンドはいまだ明らかになっていない。すなわち、 α GC による iNKT 細胞活性化と、内因性の活性化では作用が異なる可能性が考えられ、このことが α GC 投与と

iNKT 細胞欠損の両者で梗塞サイズを縮小させた原因かもしれない。

以上より、心筋虚血再灌流障害において内因性の iNKT 細胞活性化は虚血再灌流障害の一因となっており、 α GC による外因性の iNKT 細胞活性化は IL-10 産生を介して虚血再灌流障害に保護的に働くことが明らかとなり、 α GC による iNKT 細胞活性化が急性心筋梗塞患者における新たな治療目標となりうることを示唆する重要な研究と考えられた。

以上の研究結果について、主査および副査の教授より、① 虚血再灌流後の iNKT 細胞活性化がリガンド以外ではどのような機序で生じていると推測されるか、② 虚血再灌流障害を防ぐもので一般臨床において使用されているものがあるか、③ α GC 投与のタイミングはどのように設定したのか、④ α GC の投与量は適切か、⑤ $Ja18^{-/-}$ マウスでは虚血再灌流後に iNKT 細胞が増加することはないか、⑥ 抗原提示細胞にはどのようなものが考えられるか、⑦ TNF- α の上昇が IL-10 より先んじて生じているのではないか、などの質問を受けた。申請者は、それぞれの質問に対して、以下のように回答をした。① 低酸素/再酸素化自体が刺激となる可能性、IL-12 が iNKT 細胞を活性化させる可能性が考えられる、② 様々な薬剤が開発されているが、臨床で広く用いられている薬剤は現時点ではない、③ 臨床応用ということも視野に入れ、再灌流前の虚血中に投与することとした、④ 投与量は以前の文献を参考に iNKT 細胞が最大限に活性化される量を選択した、⑤ $Ja18^{-/-}$ マウスでは虚血再灌流後に iNKT 細胞が増加することはないことを確認している、⑥ 抗原提示細胞としては CD11c が増加しているため樹状細胞が考えられる、⑦ TNF- α については時間経過をまだ確認していなかったため今後検討する。

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。