



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Elucidating the Mechanisms of Chronic Inflammation Focusing on Natural Killer T Cells [an abstract of entire text]
Author(s)	齋藤, 晶理
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2086 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11214号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56171
Type	doctoral thesis
File Information	Akimichi_Saito_summary.pdf



学位論文（要約）

Elucidating the Mechanisms of Chronic Inflammation

Focusing on Natural Killer T Cells

（ナチュラルキラーT細胞に着目した
慢性炎症の遷延機序の解明）

2014 年 3 月

北海道大学

齋藤 晶理

1. 緒言

インバリアントナチュラルキラーT細胞 (invariant natural killer T cell, iNKT細胞) は、NK細胞マーカーとT細胞受容体を同時に発現するT細胞亜群である。そのT細胞受容体は可変性のない α 鎖を有し、マウスではV α 14-J α 18、ヒトではV α 24-J α 18であることが知られている。樹状細胞 (dendritic cells, DC) などの抗原提示細胞によって、MHCクラスI様分子であるCD1d分子により提示された α ガラクトシルセラミド (α GC) などの糖脂質抗原がiNKT細胞表面のT細胞受容体を刺激すると、iNKT細胞は即座に多量のinterferon (IFN)- γ あるいはinterleukin (IL)-4を分泌してT-helper type 1 (Th1)あるいはTh2型免疫応答を誘導し、獲得免疫反応を形成する。したがって、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る。

DCは、種々の抗原に対する免疫反応の起源および調整に関わる抗原提示細胞である。サイトカインやケミカルメディエーターなどの細胞外刺激や病原体関連分子パターンにより、DCはT細胞を活性化し、Th1あるいはTh2型の免疫応答を惹起する。またDCは、CD1d分子を介してiNKT細胞を活性化する主要な抗原提示細胞である。 α GCに曝露されたDCをマウスへ注入すると、 α GCを単独で注入した場合と比較し、iNKT細胞からのIFN- γ の産生がさらに亢進した。この結果は、DCに提示された α GCがiNKT細胞の反応を活性化することを示唆する。

近年、動脈硬化やメタボリックシンドロームの発症・進展において、血管や脂肪組織での慢性炎症が重要であることが注目されているが、炎症が遷延する機序については未だ明らかではない。そこで、慢性炎症の遷延、ひいては心血管病の発症・進展においてiNKT細胞の果たす役割の解明を目指し、本研究を立案した。

2. 第一章 高脂血症マウスにおける iNKT 細胞アナジーが心血管病の発症・進展に果たす役割の検討

主にTh2優位であるBALB/cマウスを用いた解析によると、iNKT細胞は、DCなどの抗原提示細胞と協調して働き、炎症部位がIL-4優位Th2型免疫応答の場合はNKT細胞が抗原提示細胞によって刺激されるとIFN- γ を分泌してTh1型免疫応答へと誘導する一方、IFN- γ 優位Th1型免疫応答の場合はIL-4を分泌してTh2型免疫応答へと誘導する。すなわち、iNKT細胞を中心としたnegative regulationが存在するこ

とが報告されている。

最近、アポリポ蛋白 E (ApoE) 欠損マウス (16 週齢) で抗原提示細胞からの iNKT 細胞の反応性が低下すること (アナジー状態) が報告された。しかし、この研究では *in vitro* の実験系を主体とし iNKT 細胞のみに着目しており、DC など他の炎症細胞との相互作用は不明である。

そこで、「高脂血症モデルマウスでは iNKT 細胞がアナジーに陥っているため negative regulation が破綻し、慢性炎症が遷延して動脈硬化が進展する」という仮説を立て、動脈硬化の発症・進展において iNKT 細胞が果たす役割の解明を目指し、動脈硬化血管壁における慢性炎症の基盤となる免疫制御機構を解明する本研究を立案した。

2.1. 方法と結果

BALB/c マウスおよび BALB/c 背景高脂血症自然発症 BALB/c.KOR/Stm Slc-APoE^{Shl} (C.SHL) マウスの脾細胞中の iNKT 細胞の数をフローサイトメトリー法で解析し、*in vitro* で α GC (100 ng/mL) を用いて刺激することでサイトカイン産生能を評価した。その結果、各群で脾細胞中の iNKT 細胞の割合に変化はなかったが、BALB/c マウスに比べて C.SHL マウスで培養上清中の IFN- γ (8054 $\pm$ 983 対 720 $\pm$ 302 pg/mL, $P<0.05$) および IL-4 (187 $\pm$ 27 対 60 $\pm$ 6 pg/mL, $P<0.05$) 濃度は低下しアナジーに陥っているものと考えられた。

BALB/c マウスから分離・誘導した DC を IL-4 あるいは IFN- γ の存在下、あるいはサイトカイン非存在下に α GC と反応させ BALB/c マウスまたは C.SHL マウスの脾臓に直視下で注入し、血清サイトカイン濃度を検討した。その結果、いずれの DC を用いた場合も血清 IFN- γ および IL-4 値に有意な差はなく、negative regulation を証明するには至らなかった。

2.2. 考察

本研究では BALB/c 背景高脂血症自然発症マウスにおいて iNKT 細胞がアナジーに陥っていることを示したが、iNKT 細胞と DC を中心とした negative regulation を示すことができず、iNKT 細胞がアナジー状態にあることで negative regulation が破綻し慢性炎症が遷延するという仮説を証明するには至らなかった。この原因としては先行実験とはマウスの種がことなることや遺伝子改変ではなく自然発症 ApoE 欠損マウスを用いた点、DC のソースが異なる点などが考えられた。

3. 第二章 肥満マウスにおいて iNKT 細胞の活性化はアンジオテンシン II 誘発性大動脈瘤の進展を抑制する

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クス分解酵素を産生し、大動脈瘤形成において重要な役割を果たしている。

レプチン欠損 *ob/ob* マウスにおいて AngII 誘発性腹部大動脈瘤が形成されることが報告されているが、このモデルにおける炎症細胞、特に iNKT 細胞との関与についての報告は皆無である。そこで、*ob/ob* マウスにおいて、iNKT 細胞と大動脈瘤形成の関連を明らかにするため、本研究を立案した。

3.1.方法と結果

レプチン欠損 *ob/ob* マウスに皮下浸透圧ミニポンプを用いてアンジオテンシン II (AngII; 1000 ng/kg/min) または 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さらに 2 群に分け、 α GC (0.1 μ g/g 体重) (AngII- α GC 群および PBS- α GC 群) または PBS (AngII-PBS 群および PBS-PBS 群) を週 2 回腹腔内投与した。

4 週間後の体重は各群間で差はなく、AngII 持続投与により収縮期圧、非 HDL コレステロール値は上昇したが、 α GC の投与はこれらに影響を与えなかった。腹部大動脈最大径は PBS-PBS 群に比べて AngII-PBS 群で有意に上昇 (833 ± 69 対 1726 ± 288 μ m, $P < 0.01$) し、この上昇は AngII- α GC 群で有意に抑制された (1241 ± 247 μ m, $P < 0.01$ 対 AngII-PBS)。大動脈組織から分離した単核球のフローサイトメトリー解析によると、PBS-PBS 群に比べて PBS- α GC 群および AngII-PBS 群で有意に iNKT 細胞は増加した。F4/80 陽性マクロファージおよび CD3 陽性 T リンパ球は AngII-PBS 群で増加し、この増加は AngII- α GC 群で有意に抑制された。AngII または PBS 投与 1 週間後の遺伝子解析では、Arginase-1 や Retnla (M2 マクロファージマーカー) の発現は AngII-PBS 群と PBS-PBS 群で同等であったが、AngII- α GC 群で有意に亢進した。

3.2.考察

α GC による iNKT 細胞の活性化により、血管壁へのマクロファージや T リンパ球の浸潤が抑制され、AngII 誘発性大動脈瘤形成が抑制された。さらに瘤形成早期において M2 マクロファージの浸潤が示唆された。M2 マクロファージは組織のリモデリング過程において炎症の消退に重要な役割を果たしており、血管組織にお

ける慢性炎症を抑制している可能性があるものと考えられた。IL-10 が AngII 誘発性腹部大動脈瘤の抑制に関与しているとの報告がある一方で、我々は α GC による iNKT 細胞活性化の結果産生される IL-10 が心筋リモデリングの抑制に重要な働きをしていることを明らかにしている。iNKT 細胞活性化による大動脈瘤抑制過程においても、IL-10 が重要な役割を担っている可能性が十分に考えられ、この点についてはさらなる検討が必要と思われた。iNKT 細胞の活性化をもたらす治療戦略はヒト大動脈瘤の進展を抑制しうるものと考えられた。

4. 第三章 臨床応用を目指した慢性炎症制御に基づく新規心血管病治療法の開発

α GC による iNKT 細胞の活性化は大動脈瘤など心血管病の治療戦略となりうる。しかしながら、 α GC による iNKT 細胞の活性化は一過性であることや、生体投与により肝障害を引き起こすために臨床応用ができないといった限界がある。これらの課題を克服するために、第一章で行った研究方法と同様のコンセプトである樹状細胞 (DC) を担体とした α GC (α GC/DC) による iNKT 細胞の活性化の手法が開発され、千葉大学において肺癌・頭頸部癌に対する臨床研究が進行している。

本研究の目的は、我々が見出した iNKT 細胞の炎症制御における基盤的役割に着目し、 α GC/DC を用いた iNKT 細胞の活性化により、心血管組織における炎症制御に基づく新たな心血管病治療法の開発を目指すものであるが、その第一歩として α GC/DC の作製およびその有効性の確認を行うこととした。

4.1.方法と結果

ヒト末梢血からアフエレーシスを用いて単核球を分離し、GM-CSF および IL-2 存在下で 6 日間培養した後に α GC を添加して α GC/DC を作製した。ヒト α GC/DC をマウスに静注すると血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 値は DC 単体を静注した場合に比べ有意に上昇し、ヒト α GC/DC はマウス iNKT 細胞の活性化作用を有した。

4.2.考察

α GC/DC の心血管病治療への臨床応用を目指す上で必須である非臨床研究の遂行にあたり、今回の結果は非常に重要な意味を持つものと考えられた。

5. 総括および結論

本研究では、 α GC による iNKT 細胞の活性化が慢性炎症を制御し心血管病に対する治療として非常に有望であること、また生体内で iNKT 細胞を活性化する方法としての α GC/DC の有用性を示した。 α GC/DC を用いることで慢性炎症を制御し心血管病の治療へつながる可能性を見出した。