

# 動脈硬化病巣進展におけるナチュラルキラーT細胞の 役割に関する研究

—マウス動脈硬化モデルを用いて—

## 学位論文内容の要旨

### I. 背景

近年、動脈硬化病巣は炎症性疾患であるとの認識が浸透し、その進展には変性脂質を貪食し泡沫化するマクロファージのみならず、リンパ球などの免疫担当細胞が重要な役割を担っていることが、明らかにされつつある。ヒトおよびマウスの動脈硬化病巣にはリンパ球の存在が確認されており、なかでも CD4 陽性のヘルパーT (Th) 細胞に関する報告が多い。Th1 細胞は動脈硬化促進に、Th2 細胞は動脈硬化抑制に寄与すると考えられている。実際、サイトカインにターゲットを絞った研究により、Th1 サイトカインであるインターフェロン (IFN)- $\gamma$ 、インターロイキン(IL)-12 などは動脈硬化に促進的に、Th2 サイトカインである IL-10 は抑制的に機能していると報告されている。

ナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、T 細胞と NK 細胞両者の表面マーカーを有し、ユニークな機能特性を有する細胞集団である。NKT 細胞に関しては、これまで動脈硬化への直接的関与を実証した報告はない。しかし、NKT 細胞は V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 などの invariant な T 細胞受容体 (TCR) を介して CD1d 分子により提示される脂質を認識すること、また活性化状態で強力な IFN- $\gamma$ 、IL-4 の産生能を示すことから、動脈硬化進展過程に関与する可能性は十分に考えられる。実際ヒト動脈硬化病巣において、CD1d 陽性細胞の存在が確認されていることも NKT 細胞の関与を示唆している。

### II. 目的

マウス動脈硬化モデルを用い、動脈硬化病巣進展における NKT 細胞の役割を検討する。

### III. 方法

C57BL/6 (WT) マウスと、NKT 細胞を欠く CD1d 欠損 (CD1d<sup>-/-</sup>) マウスに 10-30 週齢の間、動脈硬化食 (以下 AD、脂肪 15%、コレステロール 1.25%含有) を与えたのち屠殺し、実験に用いた。コントロールマウスは正常食 (chow) を与えた。次に動脈硬化自然発症モデルのアポ E 欠損 (apo E<sup>-/-</sup>) マウス (8 週齢) に、NKT 細胞のリガンドである  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) 0.1  $\mu$ g/g 体重、あるいは vehicle のみを (a)2 週間間隔で計 3 回、(b) 隔週毎計 11 回、腹腔内投与した。(a)は 13 週齢、(b)は 19 週齢で屠殺し実験に用いた。これらのマウスの末梢血を採取し、血清を分離後、酵素法により血清脂質を測定した。apoE<sup>-/-</sup>マウスを用いる実験においては、 $\alpha$ -GalCer 投与直前から投与 72 時間後までの血清 IFN- $\gamma$ 、IL-4 濃度を測定した。組織学的検索としては、心基部周囲を凍結包埋し、大動脈弁直上より 80  $\mu$ m 間隔、8 連続切片を作製、Oil Red-O で脂肪染色した。病巣面積はコンピュータ処理に

より測定した。動脈硬化病巣の質的評価には各種免疫染色、および Elastica-Masson 染色を行った。また脾臓・肝臓を摘出し、脾細胞・肝リンパ球を調整、各種抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。食餌による NKT 細胞の反応性の差を検討するため、AD または chow 飼育下 WT マウスに  $\alpha$ -GalCer を静注し、2 または 12 時間後に脾細胞を採取、1.5 時間培養の後、上清中の IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 濃度を測定した。動脈硬化病巣での V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18mRNA の発現を解析するため、AD あるいは chow 飼育下 WT マウス、apoE<sup>-/-</sup>マウスより採取した大動脈サンプルを用い RT-PCR を施行した。最後に、WT マウス、CD1d<sup>-/-</sup>マウスより腹腔マクロファージを採取し、24-48 時間 10-50 $\mu$ g/ml の低比重リポ蛋白(LDL)、あるいは酸化 LDL (OxLDL) と培養した。フローサイトメトリーにて Mac-1<sup>+</sup>細胞上の CD1d, H-2K<sup>b</sup>, I-A<sup>b</sup>, CD40 の発現を調べた。さらにリポタンパク添加、洗浄後に WT マウスの肝リンパ球を加え、IL-2 存在下で 24 時間共培養後上清を採取し、IFN- $\gamma$ , IL-4 濃度を測定した。

#### IV. 結 果

NKT 細胞の著減する CD1d<sup>-/-</sup>マウスに AD を負荷した際に形成される動脈硬化病巣面積は、同条件下の WT マウスと比し、有意に小であった。脂質プロファイルは両群で差がなかった。chow 飼育下に比して AD 飼育下 WT マウスでは、NKT 細胞の減少が観察されたが、 $\alpha$ -GalCer 投与直後の脾細胞からのサイトカイン産生能は十分に保たれており、その産生パターンは Th1 タイプに偏倚していた。apoE<sup>-/-</sup>マウスに  $\alpha$ -GalCer を投与し NKT 細胞を活性化すると、脂質プロファイルが同等であるにもかかわらず、初期動脈硬化病巣は有意に拡大した。さらに apoE<sup>-/-</sup>マウスに長期的に  $\alpha$ -GalCer 投与すると、対照群との病巣面積の有意差は消失したが、病巣中のコラーゲン含有量が有意に減少した。apoE<sup>-/-</sup>マウスおよび AD 飼育下 WT マウスの大動脈サンプルにおいて、V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 の TCR 再構成が mRNA レベルで確認された。一方、chow 飼育下 WT マウスのサンプルには V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18mRNA は検出されなかった。腹腔マクロファージに LDL、OxLDL を添加、培養すると、CD1d 発現が増強した。しかし、H-2K<sup>b</sup>, I-A<sup>b</sup>, CD40 の発現には明らかな変化を認めなかった。これらのマクロファージと肝リンパ球の共培養により、NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が認められた。

#### V. 考 案

WT マウス、および CD1d<sup>-/-</sup>マウスに AD を負荷するモデルの実験より、NKT 細胞の欠損は動脈硬化進展の抑制につながる事が判明した。また apoE<sup>-/-</sup>マウスに  $\alpha$ -GalCer 投与する実験より、NKT 細胞の活性化は動脈硬化を進展させることが示された。これらの結果より、NKT 細胞は動脈硬化に促進性に寄与すると結論した。AD 飼育下 WT マウスでは、脾臓および肝臓で NKT 細胞の減少が観察されたが、サイトカイン産生能は十分に保たれており、その産生パターンは Th1 タイプに偏倚していた。この結果は、Th1 反応が動脈硬化促進性であるという従来の報告に沿った結果といえる。NKT 細胞減少の機序としては、NKT 細胞の活性化誘発性細胞死 (AICD)、表面マーカーの持続的 down-modulation、動脈硬化病巣など末梢組織への NKT 細胞の遊走、などが考えられた。実際、NKT 細胞のメジャーポピュレーションに発現される V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 の TCR mRNA が、chow 飼育下 WT マウスの大動脈サンプルでは検出されず、AD 飼育下のサンプルで検出された。従って、NKT 細胞が *in situ* に遊走し機能すると考えられた。apoE<sup>-/-</sup>マウスに長期的に  $\alpha$ -GalCer 投与する実験において、対照群との病巣面積の有意差は消失した。この結果は、リンパ球は主に動脈硬化進展過程の初期段階に影響するという、Song らの報告と一致する。一方、 $\alpha$ -GalCer 投与により病巣中のコラーゲン含有量が有意に減少したことは、NKT 細胞を介して産生される IFN- $\gamma$  が、コラーゲン合成を低下させ、動脈硬化病巣を不安定化させると考えられた。つまり、NKT 細胞は進展した動脈硬化病巣に対しては質的変化をもたらすことが示唆された。これらの機序を検討するため、*in vitro* で腹腔マクロファージに OxLDL を添加、培養すると、CD1d 発現の増強

が認められた。さらにこれらマクロファージと NKT 細胞との共培養により、低レベルではあるが有意な IFN- $\gamma$  産生が観察された。動脈硬化病巣には変性脂質が多量に存在することから、この中のある種の成分が NKT 細胞の生理的リガンドとなっている可能性が考えられた。

## VI. 結 語

マウス動脈硬化モデルにおいて NKT 細胞は動脈硬化促進性に寄与すること、また NKT 細胞の活性化に変性脂質によるマクロファージ上の CD1d 発現亢進が関与することが判明した。NKT 細胞は動脈硬化病巣に存在し、機能していると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕  
副 査 教 授 小野江 和 則  
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

## 動脈硬化病巣進展におけるナチュラルキラーT細胞の 役割に関する研究

—マウス動脈硬化モデルを用いて—

動脈硬化進展過程においては免疫担当細胞が重要な役割を担っている。ヒトおよびマウスの動脈硬化病巣にはリンパ球の存在が確認されており、これまで主にT細胞を中心に報告がなされてきた。ナチュラルキラーT (NKT) 細胞に関しては、これまで動脈硬化への直接的関与を実証した報告はない。NKT細胞はV $\alpha$ 14J $\alpha$ 18などのinvariantなT細胞受容体 (TCR) を介してCD1d分子により提示される脂質を認識する。またNKT細胞は活性化状態で強力なIFN- $\gamma$ , IL-4の産生能を示すが、これらのサイトカインは動脈硬化の病態生理にも深く関与することが知られている。こうした背景に基づき、本研究ではマウス動脈硬化モデルを用い、動脈硬化病巣進展におけるNKT細胞の役割を検討した。

C57BL/6 (WT) マウスと、NKT細胞を欠くCD1d欠損 (CD1d<sup>-/-</sup>) マウスに10-30週齢の間、コレステロール1.25%を含有する動脈硬化食 (以下AD) を与えたところ、CD1d<sup>-/-</sup>マウスの動脈硬化病巣面積は、WTマウスに比し、有意に減少していた。脂質プロファイルは両群で差がなかった。AD飼育下WTマウスでは、正常食 (以下chow) 飼育下WTマウスよりNKT細胞の減少が観察されたが、 $\alpha$ -GalCer投与直後の脾細胞からのサイトカイン産生能は十分に保たれており、その産生パターンはTh1タイプに偏倚していた。

次に動脈硬化自然発症モデルのアポE欠損 (apo E<sup>-/-</sup>) マウス (8週齢) に、NKT細胞のリガンドである $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) 0.1  $\mu$ g/g体重、あるいはvehicleのみを (a)2週間間隔で計3回、(b)隔週毎計11回、腹腔内投与し、NKT細胞を活性化した際の動脈硬化への影響を解析した。(a)は13週齢、(b)は19週齢で屠殺し実験に用いた。(a)では脂質プロファイルが同等であるにもかかわらず、 $\alpha$ -GalCer投与により初期動脈硬化病巣は有意に拡大した。さらに長期的に $\alpha$ -GalCer投与した(b)では、対照群との病巣面積の有意差は消

失したが、病巣中のコラーゲン含有量が有意に減少し不安定プラーク的病巣となっていた。

NKT細胞のメジャーポピュレーションに発現される V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 の TCR mRNA が、動脈硬化病変で発現しているか、AD あるいは chow 飼育下 WT マウス、apoE<sup>-/-</sup>マウスより採取した大動脈サンプルを用い RT-PCR を施行したところ、apoE<sup>-/-</sup>マウスおよび AD 飼育下 WT マウスの大動脈サンプルにおいてのみ、V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 の TCR 再構成が mRNA レベルで確認された。このことより、NKT細胞が *in situ* に遊走し機能すると考えられた。

最後に、WT マウス、CD1d<sup>-/-</sup>マウスより腹腔マクロファージを採取し、24-48 時間 10-50 $\mu$ g/ml の低比重リポ蛋白 (LDL)、あるいは酸化 LDL (OxLDL)と培養した。フローサイトメトリーにて Mac-1<sup>+</sup>細胞上の CD1d, H-2K<sup>b</sup>, I-A<sup>b</sup>, CD40 の発現を調べたところ、OxLDL を添加時に WTマウス腹腔マクロファージ上の CD1d発現が増強した。さらにリポタンパク添加、洗浄後に WT マウスの NKT 細胞を多量に含有する肝リンパ球を加え、IL-2 存在下で 24 時間共培養後上清を採取し、IFN- $\gamma$ 濃度を測定したところ、OxLDL 処理 WT 腹腔マクロファージと NKT 細胞との共培養により有意な IFN- $\gamma$ 産生が観察されたが、CD1d<sup>-/-</sup>マウス腹腔マクロファージではこの反応は得られなかった。動脈硬化病巣には変性脂質が多量に存在することから、この中のある種の成分が NKT細胞の生理的リガンドとなっている可能性が考えられた。

以上よりマウス動脈硬化モデルにおいて NKT細胞は動脈硬化促進性に寄与すること、また NKT細胞の活性化に変性脂質によるマクロファージ上の CD1d 発現亢進が関与することが判明した。NKT細胞は動脈硬化病巣に存在し、機能していると考えられた。

口頭発表に際し、上出教授から動脈硬化食負荷時の NKT細胞減少の機序、病巣中 NKT細胞と動脈硬化病巣の量的関係および NKT細胞が動脈硬化に影響するサイトカイン以外の機序について質問がなされた。次いで小野江教授から NKT細胞が制御するサイトカインネットワークの動脈硬化への影響、老化としての動脈硬化の現代的解釈について質問がなされた。最後に北畠教授から臨床面での新たな動脈硬化診断・治療の可能性について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切な回答を行った。

本論文は、動脈硬化病巣進展における NKT細胞の役割を明らかにしたものとして意義があると評価され、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。