

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659379

 研究課題名（和文）活性化ナチュラルキラーT細胞を用いた動脈硬化の画期的新規治療の開発
 研究課題名（英文）Development of novel therapeutic strategy for atherosclerotic vascular diseases via the activation of natural killer T cells

研究代表者

筒井 裕之 (TSUTSUI HIROYUKI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70264017

研究成果の概要（和文）：

動脈硬化の形成・進展には、血管壁局所における炎症性サイトカインを主体とする慢性炎症が重要な役割をはたしている。ナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、炎症惹起性 Th1 サイトカインと抗炎症性 Th2 サイトカインの Th1/Th2 バランスを調節し、生体において炎症を制御するという極めて重要な役割を担っている。本研究によって、動脈硬化性血管病変の形成・進展過程に NKT 細胞による炎症制御機構が密接に関与していること、さらに NKT 細胞活性化は新規動脈硬化治療と期待できることがあきらかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The development and progression of atherosclerosis involves complex inflammatory processes between hematocytes and vascular tissues. Natural killer T (NKT) cells, a unique subset of T lymphocytes that recognize glycolipid antigens and secrete a large amount of T_H1/T_H2 cytokines, play a crucial role in regulating tissue inflammation. The present study demonstrated that inflammatory process regulated via NKT cells is involved in atherosclerotic lesions and NKT cells may be the novel therapeutic targets in atherosclerotic vascular diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：動脈硬化、炎症性サイトカイン、ナチュラルキラーT細胞、Th1/Th2 バランス、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

高血圧・糖尿病・メタボリックシンドローム・脂質異常症などの生活習慣病の増加、人口の高齢化にともない動脈硬化を基盤として発症する冠動脈疾患・動脈瘤・閉塞性動脈硬化症など心血管病の患者は増加の一途をたどっている。動脈硬化の形成・進展に、血管壁局所における炎症性サイトカインを主体とする慢性炎症が重要な役割をはたしていることは広く認められるようになった。しかしながら、いまだに動脈硬化の発症機序に基づいた臨床応用可能な効果的予防法・治療法は開発されてい

い。

最近、生体における炎症が、TNF- α など Th1 サイトカインと IL-10 などの Th2 サイトカインの「Th1/Th2 バランス」によって調節されていることがあきらかにされ、その制御機構の解明が急速に進展している。ナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞から刺激を受け種々のサイトカインを産生する炎症細胞のひとつであるが、Th1/Th2 バランスを調節し生体における炎症を制御する「炎症調節細胞」としての役割を担っている。さらに、NKT 細胞による Th1/Th2 バランス制御の特徴は、

相互に相手の産生するサイトカインによって負のフィードバック調節を介して Th1/Th2 バランスを適性化する点である。すなわち、炎症部位が Th1 優位の場合は、NKT 細胞は刺激によって Th2 優位の応答を誘導する。このような成績は、動脈硬化巣で NKT 細胞の機能低下により負のフィードバック制御機構が破綻し炎症が慢性化・遷延化していること、NKT 細胞の活性化により Th1/Th2 バランスを適正化し、炎症さらには動脈硬化の形成・進展を抑制できる可能性を示唆するものである。しかしながら、動脈硬化における NKT 細胞による炎症制御の役割はまったくわかっていない。さらに、NKT 細胞の活性化という新たなパラダイムに基づく動脈硬化の予防・治療法の有効性も検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動脈硬化巣における炎症の遷延化は、NKT 細胞の機能低下に起因する炎症制御機構の破綻が原因であるという仮説のもと、NKT 細胞活性化による Th1/Th2 バランスの適正化を介した血管壁の炎症制御というコンセプトに基づき、新規動脈硬化治療の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

本研究では、動脈硬化モデルマウスである ApoE 欠損マウスを用いて NKT 細胞による炎症制御の役割を Th1/Th2 バランスに着目して *in vitro* 細胞レベルと *in vivo* 動物実験の両面から解析する。これらの結果をふまえ、動脈硬化の形成・進展における NKT 細胞の役割を明らかにし、活性化 NKT 細胞による炎症制御によって動脈硬化が抑制されることを証明する。

(1) *in vitro* 培養細胞を用いた NKT 細胞の機能解析

動脈硬化病変における NKT 細胞の役割を検討するため、マウス脾臓より NKT 細胞と抗原提示細胞を含む単核球を分離し α -GalCer を添加して抗原刺激を行なって NKT 細胞機能を解析する。

① BALB/c マウスの脾臓から単核球を分離し、RPMI 1640 培地に 2.5×10^5 個播き、 α -GalCer (100mg/mL) を添加して培養する。またフローサイトメトリーによって脾臓由来単核球中の NKT 細胞の割合を確認する。

② 72 時間後に培養上清を回収し、Th1 サイトカイン (IFN- γ) と Th2 サイトカイン (IL-4) 濃度を測定し、NKT 細胞による Th1/Th2 バランスの変化を検討する。

さらに、BALB/c 背景 ApoE 欠損マウスの脾臓から分離した単核球を用いて、上記と同様の実験を行い、 α -GalCer 刺激に対する反応性が

低下しているかどうか検討する。

(2) *in vivo* における NKT 細胞による炎症制御機構の解析

1 の *in vitro* 培養細胞実験系で確認されたことが、生体内においても確認されるかをあきらかにする。

BALB/c マウスに IFN- γ (Th1) あるいは IL-4 (Th2) および α -GalCer 100mg/kg 体重を腹腔内投与し、以下の項目を測定し Th1/Th2 バランスの変化を評価する。

① BALB/c マウスより MACS システムを用いて CD11c 陽性脾細胞を分離し、R1 培地を用いて 7 日間培養する。

② その後、 α -GalCer および IFN- γ あるいは IL-4 を添加してさらに 7 日間培養し、各培養条件で得た細胞 (脾細胞由来樹状細胞) 5×10^5 個を BALB/c マウスあるいは、BALB/c 背景 ApoE 欠損マウスに養子移入する。

③ 48 時間後まで経時的に採血し、ELISA 法にて血漿中の Th1 サイトカイン (IFN- γ) と Th2 サイトカイン (IL-4) 濃度を測定する。

(3) NKT 細胞活性化の大動脈瘤に対する抑制効果

9~12 週齢オス ApoE 欠損マウスに皮下浸透圧ミニポンプでアンジオテンシン II (Ang II ; 1000 ng/kg/min) を 4 週間投与して作成した大動脈瘤モデルを用いて以下①-⑤を評価し、NKT 細胞活性化により動脈瘤形成が抑制されるかあきらかにする。

① 腹部大動脈の最大径

② 大動脈瘤の組織学的解析 (弾性板の断裂数、血管壁内の出血など)

③ 免疫組織染色による大動脈への炎症細胞浸潤 (Mac2 陽性マクロファージ、CD3 陽性 T リンパ球)

④ RT-PCR 法による (Th1/Th2 サイトカイン) 遺伝子発現

⑤ *In situ* zymography によるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性および RT-PCR による MMP/TIMP 遺伝子発現

4. 研究成果

(1) *in vitro* 培養細胞を用いた NKT 細胞の機能解析

BALB/c マウスおよび BALB/c 背景 ApoE 欠損マウスの脾臓より単核球を分離し、 α -GalCer を添加して培養した。72 時間後に培養上清を回収し ELISA 法にて上清中の IFN- γ および IL-4 濃度を測定した。また、フローサイトメトリー解析によって脾細胞中の NKT 細胞の割合を確認した。その結果、BALB/c 背景 ApoE

欠損マウスでは BALB/c マウスにくらべて、NKT 細胞の割合は同等であったが、 α -GalCer に対する反応性が有意に低下し NKT 細胞がアナジーに陥っていることが示唆された。

(2) *in vivo*における NKT 細胞による炎症制御機構の解析

ApoE 欠損マウスでの NKT 細胞アナジーが、「NKT 細胞を中心とした negative regulation (負の制御)」の破綻を来しているかどうか確認するため、BALB/c マウスより脾細胞を分離して 7 日間培養し、 α -GalCer および IFN- γ あるいは IL-4 を添加してさらに 7 日間培養した。これらの細胞を BALB/c マウスあるいは、BALB/c 背景 ApoE 欠損マウスに養子移入して経時的に採血した。これまでの報告では、IFN- γ 存在下に培養した樹状細胞に α -GalCer を添加して NKT 細胞を刺激すると IL-4 優位のサイトカイン産生パターンを示し、IL-4 存在下に培養した樹状細胞には IFN- γ 優位のサイトカイン産生パターンを示す「NKT 細胞を中心とした負の制御」の存在が示されていたが、今回の実験では IFN- γ 添加群、IL-4 添加群ともに同様のサイトカイン分泌パターンを呈し、「NKT 細胞を中心とした負の制御」を再現することはできなかった。

(3) NKT 細胞活性化の大動脈瘤に対する抑制効果

肥満マウスへの Ang II 持続投与大動脈瘤モデルを用いて、NKT 細胞活性化の効果を検討した。2 ヶ月齢雄性 *ob/ob* マウスに皮下浸透圧ミニポンプで Ang II (1000ng/min/kg) あるいは PBS (PBS 群) を持続投与した。Ang II 持続投与マウスをさらに 2 群に分け、NKT 細胞を特異的に活性化する α -ガラクトシルセラミド (α GC; 0.1 μ g/g 体重) あるいは PBS を反復投与した。4 週間後に腹部大動脈最大径は、PBS 群に比し Ang II-PBS 群で有意に増大した。PBS 群に比し Ang II-PBS 群において、大動脈瘤組織での F4/80 (M ϕ マーカー) 遺伝子発現が 2.5 倍、MHC-class II (M ϕ 活性化マーカー) が 4.6 倍、MMP-2 が 5.0 倍有意に増加した。 α GC 投与による NKT 細胞活性化によって血圧値は両群間で同等であったが、腹部大動脈最大径が Ang II-PBS 群に比し Ang II- α GC 群で有意に縮小した。

以上より、動脈硬化性血管病変の形成・進展過程に NKT 細胞による炎症制御機構が密接に関与していること、さらに NKT 細胞活性化は新規動脈硬化治療として期待できることがあきらかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 30 件)

1. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K: Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS ONE* 7(2):e30568, 2012 査読有 DOI: 10.1371
2. Satoh H, Ishimori N, Sakakibara M, Yamada S, Kawashima N, Urasawa K, Fujii S, Tsutsui H: Decreased glomerular filtration rate is a significant and independent risk for in-hospital mortality in Japanese patients with acute myocardial infarction: report from the Hokkaido acute myocardial infarction registry. *Hypertens Res* 35(4):463-469, 2012 査読有 DOI:10.1038
3. Sobirin MA, Kinugawa S, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, Hirabayashi K, Suga T, Azalia P, Takada S, Taniguchi M, Nakayama T, Ishimori N, Iwabuchi K, Tsutsui H: Activation of natural killer T cells ameliorates postinfarct cardiac remodeling and failure in mice. *Circ Res* 111(8):1037-47, 2012 査読有 DOI:10.1161
4. Danzaki K, Matsui Y, Ikesue M, Ohta D, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Iwakura Y, Yagita H, Tsutsui H, Uede T: Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(2):273-80, 2012 査読有 DOI:10.1161

[学会発表] (計 10 件)

1. Ishimori N, Tokuhara S, Nozawa A, Saito A, Tsutsui H: Invariant natural killer T cells are involved in the development of experimental abdominal aortic aneurysm and dissection in apolipoprotein-E deficient mice. European Society of Cardiology Congress 2012, (International Congress Center Munich, Germany)
2. Saito A, Ishimori N, Tokuhara S, Nozawa A, Nishikawa M, Tsutsui H: Activation of natural killer T cells ameliorates the development of angiotensin II-mediated abdominal aortic aneurysm formation in obese *ob/ob* mice. American Heart Association Scientific Sessions 2012, Los Angeles, 2012, (Orange County Convention Center, America)

〔図書〕（計 14 件）

1. 筒井裕之：北海道大学アドミッションセンター、知のフロンティア 北海道大学の研究者は、いま 第 2 号、2012、68-69

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 裕之 (TSUTSUI HIROYUKI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70264017

(2) 研究分担者

絹川 真太郎 (KINUGAWA SHINTARO)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60399871
石森 直樹 (ISHIMORI NAOKI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70399848

(3) 連携研究者

特になし