

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591096

研究課題名(和文) ナチュラルキラーT細胞による動脈硬化における慢性炎症遷延化の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Role of natural killer T cells in chronic inflammation of atherogenesis

## 研究代表者

石森 直樹 (ISHIMORI, Naoki)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：70399848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化の基盤となる脂質代謝異常で惹起される慢性炎症でNKT細胞が果たす役割を検討した。ApoE欠損マウスより単核球を分離培養し、NKT細胞を特異的に刺激する $\alpha$ -GalCerを添加し、培養上清を用いてサイトカイン産生能を確認した。ApoE欠損マウスでは正常対照マウスにくらべ $\alpha$ -GalCerに対する反応性が有意に低下しNKT細胞はアナジーに陥っていた。続いて、慢性炎症を模しTh1あるいはTh2サイトカイン存在下で培養した単核球に $\alpha$ -GalCerを添加したが、ApoE欠損マウス、正常対照マウスとも同様の炎症プロファイルを呈し、NKT細胞アナジーが慢性炎症に与える明らかな影響は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the role of natural killer T (NKT) cells in chronic inflammation elicited by dyslipidemia, which result in atherosclerosis. Splenocytes from apolipoprotein-E deficient mice, including mononuclear phagocytes and NKT cells, were cultured with  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer), which specifically activates NKT cells, and significantly reduced in the production of inflammatory cytokines compared to those from wild-type mice, suggesting NKT cell anergy. Splenocytes cultured with Th1 or Th2 cytokines were stimulated with  $\alpha$ -GalCer, but did not differ in the production of inflammatory cytokines between apolipoprotein-E deficient mice and wild-type mice. Thus, we could not elucidate the significant role of NKT cells in chronic inflammation in the present study.

研究分野：循環器病学

キーワード：慢性炎症 動脈硬化 マクロファージ リンパ球 免疫調節

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化によって肥満者は増加しており、人口の高齢化にともなう虚血性心疾患をはじめとする動脈硬化性疾患も増加傾向にある。これらの疾患は、わが国の医療費高騰の一因となっており、動脈硬化性疾患の発症・進展に関与する機序の解明と効果的な予防・治療法の開発は、極めて重要な問題である。

動脈硬化病巣では、脂質・糖代謝異常を基盤として血管壁にマクロファージが集簇して変性脂質を貪食して泡沫細胞となり病巣を形成するが、リンパ球も血管壁に浸潤し炎症性サイトカインや蛋白分解酵素などを分泌して病巣形成や粥腫破綻に大きく寄与する。また、動脈硬化発症の基盤となるメタボリックシンドロームでは、内臓脂肪組織にマクロファージのほかリンパ球も浸潤して代謝異常を引き起こす。いずれの病態でも、自然免疫をつかさどるマクロファージと、獲得免疫の柱となるリンパ球によって引き起こされる炎症が遷延するため発症に至るが、これらの組織での炎症が慢性化する分子基盤についてはまったく分かっていない。

ナチュラルキラーT (NKT) 細胞は自然免疫と獲得免疫を繋ぐTリンパ球亜群で、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GalCer)などの糖脂質を認識してTh1・Th2双方のサイトカインを分泌して生体内では免疫応答を調節する重要な役割を担っている。これまで我々は、NKT細胞が動脈硬化を来たした血管組織に存在して、動脈硬化病巣の発症・進展に寄与することを証明した(Blood 2004;104:2051)。また最近、NKT細胞は肥満にともなう内臓脂肪組織に浸潤し、炎症性マクロファージを誘引してTh1に偏倚した慢性炎症を誘導することを証明した(ATVB 2010;30:193)。これらの結果から、NKT細胞は動脈硬化性疾患の発症・進展できわめて重要な役割を果たしているが、これらの組織で認める慢性炎症の維持にNKT細胞がどのように関与しているのかは、まったく分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脂質代謝異常においてNKT細胞を中心とする免疫制御機構が破綻し、慢性炎症が誘導され動脈硬化病巣の発症・進展にいたるといふ仮説を検証し、動脈硬化症における慢性炎症遷延の本態はNKT細胞にあるという独自のパラダイムに基づく新たな心血管病の予防・治療法の開発を目指すものである。動脈硬化症の発症・進展においては、動脈壁における慢性・持続性炎症の遷延が重要な役割を果たしている。これらの病巣ではマクロファージやリンパ球などの炎症細胞が浸潤して炎症反応の持続が確認されているが、何故炎症が遷延するのか、炎症が慢性化する分子基盤についてはまったく分かっていない。NKT細胞は免疫応答を調節するTリンパ球亜群であり、動脈壁や内臓脂肪組織に局在し、動脈硬化症やメタボリックシンドロームの発症・進展で重要な役割を果たす。動脈硬化病巣における慢性炎症の基盤となる免疫制御機構をNKT細胞に着目して検討し、動脈硬化症の発症・進展に関わる炎症遷延化の病態を包括的に理解することを目的とし本研究を着想するに至った。

## 3. 研究の方法

本研究では、培養細胞を用いた *in vitro* 実験系と動脈硬化モデルマウスを用いた *in vivo* 実験系で、NKT細胞と樹状細胞との相互作用による免疫制御機構において脂質代謝異常が与える影響を解析する。まず、Th1(あるいはTh2)環境下で培養した樹状細胞でNKT細胞を抗原刺激し免疫応答を解析する。次に、Th1(あるいはTh2)環境下で培養した樹状細胞を高コレステロール血症モデル ApoE 欠損マウスに移入してNKT細胞を抗原刺激し免疫応答を解析する。さらに、Th2 偏倚させた ApoE 欠損マウスで NKT 細胞を抗原刺激し、NKT 細胞による免疫制御機構が動脈硬化病巣に与える影響を解析し、動脈硬化病巣における慢性炎症の基盤となる免疫制御機構を NKT 細胞に着目して検討する。

#### 4 . 研究成果

雄性 BALB/c 背景 ApoE 欠損マウス (C.SHL マウス) において、NKT 細胞がアナジーに陥っているかどうか確認するため、C.SHL マウスより脾臓を摘出して単核球を分離し、-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- $\gamma$  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、C.SHL マウスでは正常対照群 BALB/c マウスにくらべて、NKT 細胞の割合は同等であったが、-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た。

次に、C.SHL マウスでの NKT 細胞アナジーにおいて「NKT 細胞を中心とした negative regulation (負の制御)」が破綻していることを確認するため、BALB/c マウスから脾細胞由来樹状細胞を分化誘導し -GalCer を添加して、C.SHL マウスあるいは、BALB/c マウスに養子移入後に採血し、血漿中の IFN- $\gamma$  および IL-4 濃度を測定した。樹状細胞誘導の際、IFN- $\gamma$  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。

樹状細胞は培養法によりその性質が大きく異なることが指摘されており、骨髓より単核球を採取し GM-CSF を添加して培養した、「骨髓由来樹状細胞」を用いた研究が多い。そこで次に我々は、骨髓由来樹状細胞を用いて IFN- $\gamma$  あるいは IL-4 を添加して培養し「NKT 細胞を中心とした負の制御」の再現を試みた。しかし、IFN- $\gamma$  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。

NKT 細胞を中心とした負の制御の再現は、我々の仮説の前提となる重要な免疫応答である。樹状細胞は分化誘導を起こす培養法によって性質が大きく異なることが指摘されており、これまで我々は様々な条件下で分化誘導した樹状細胞を用いて実験を進め、NKT 細胞を中心とした負の制御の再現を試みた

が、現段階では成功に至っていない。

今後は、各培養条件を再度調整し、得られた細胞を C.SHL マウスあるいは、BALB/c マウスに養子移入して採血し、ELISA 法にて血漿中の IFN- $\gamma$  および IL-4 濃度を測定して、BALB/c マウスで認める負の制御が C.SHL マウスでは破綻していることを検証してゆきたい。

#### 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7件)

1.Nishikawa M, Ishimori N, Takada S, Saito A, Kadoguchi T, Furihata T, Fukushima A, Matsushima S, Yokota T, Kinugawa S, Tsutsui H:

AST-120 ameliorates lowered exercise capacity and mitochondrial biogenesis in the skeletal muscle from mice with chronic kidney disease via reducing oxidative stress.

*Nephrol Dial Transplant*. 2015 (in press)、査読有

2.Hamaguchi S, Kinugawa S,

Tsuchihashi-Makaya M, Matsushima S, Sakakibara M, Ishimori N, Goto D, Tsutsui H: Hyponatremia is an independent predictor of adverse clinical outcomes in hospitalized patients due to worsening heart failure.

*J Cardiol*. 63(3):182-188, 2014、査読有

3.Homma T, Kinugawa S, Takahashi M, Sobirin MA, Saito A, Fukushima A, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Masaki Y, Furihata T, Taniguchi M, Nakayama T, Ishimori N, Iwabuchi K, Tsutsui H: Activation of invariant natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice.

*J Mol Cell Cardiol*. 62:179-188, 2013、査読有

4.Andoh Y, Ogura H, Satoh M, Shimano K, Okuno H, Fujii S, Ishimori N, Eshima K, Tamauchi H, Otani T, Nakai Y, Van Kaer L, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K: Natural killer T

cells are required for lipopolysaccharide-mediated enhancement of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.

**Immunobiology.** 218(4):561-569, 2013、査読有

5.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

6.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):1037-1047, 2012、査読有

7.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

〔学会発表〕(計4件)

1.Saito A, **Ishimori N**, Nishikawa M, Kinugawa S, Tsutsui H: Circulating invariant natural killer T cells are decreased in patients with chronic heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2014, 2014年11月17日, McCormick Place (シカゴ・アメリカ)

2.Nishikawa M, **Ishimori N**, Takada S, Saito A, Kadoguchi T, Furihata T, Fukushima A, Matsushima S, Yokota T, Kinugawa S, Tsutsui H:

AST-120 ameliorates lowered exercise capacity and mitochondrial dysfunction of the skeletal muscle in mice with chronic kidney disease via reducing oxidative stress.

American Heart Association Scientific Sessions 2014, 2014年11月17日, McCormick Place (シカゴ・アメリカ)

3.Saito A, **Ishimori N**, Tokuhara S, Nishikawa M, Tsutsui H:

Activation of invariant natural killer T cells ameliorates the development of angiotensin II-mediated abdominal aortic aneurysm formation in obese *ob/ob* mice.

European Society of Cardiology Congress 2014, 2014年9月1日, Fira Gran Via (バルセロナ・スペイン)

4.Saito A, **Ishimori N**, Tokuhara S, Nishikawa M, Tsutsui H:

Activation of invariant natural killer T Cells ameliorates the development of angiotensin II-mediated abdominal aortic aneurysm formation in *ob/ob* mice.

The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014年4月15日, 京都市勧業館みやこめっせ (京都府京都市)

〔図書〕(計1件)

1.石森直樹, 筒井裕之: 動脈硬化におけるNKT細胞の役割 岩淵和也編: 医学のあゆみ 生活習慣病とNKT細胞 - 病態モジュレーターの面から, p12868-12871, 医歯薬出版, 東京, 2013年(分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

1. 名称: 樹状細胞を含有する医薬およびその製造方法  
発明者: 筒井裕之・石森直樹・絹川真太郎・齋藤晶理  
権利者: 同上  
種類: 特許

番号：PCT/JP2015/055547

出願年月日：2015年2月26日

国内外の別：国外

2. 名称：樹状細胞を含有する医薬およびその製造方法

発明者：筒井裕之・石森直樹・絹川真太郎・齋藤晶理

権利者：同上

種類：特許

番号：2014-36070

出願年月日：2014年2月26日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石森 直樹 (ISHIMORI Naoki)  
北海道大学・大学病院・准教授  
研究者番号：70399848

(2) 研究分担者

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

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

(3) 研究協力者

徳原 教 (TOKUHARA Satoshi)  
北見赤十字病院・循環器内科・副部長  
研究者番号：なし

齋藤 晶理 (SAITO Akimichi)  
北海道大学・大学病院・医員  
研究者番号：40735502

西川 幹人 (NISHIKAWA Mikito)  
帯広協会病院・循環器内科・医長  
研究者番号：なし