

学 位 論 文 要 旨

氏 名

吉野 和久



論 文 題 目

「Amelioration of experimental autoimmune myocarditis through activation of iNKT cells by
administration of α -galactosylceramide
(α -ガラクトシルセラミド投与によるインバリアントナチュラルキラーT細胞活性化を
介した実験的自己免疫性心筋炎の軽症化機序の研究)」

指 導 教 授 承 認 印

岡本浩簡司



(以下要旨本文)

【背景と目的】心筋炎は細菌・ウイルス感染の他、薬物・放射線・熱などの物理刺激、代謝障害や膠原病・サルコイドーシス・川崎病などの免疫異常、さらには妊娠によっても惹起される心筋を主座とする炎症性疾患である。症状の程度も、確定診断が困難な軽症例から死に至る重症例まで様々である。急性期を乗り越えても、傷害心筋の修復に伴う線維化の進行と残存心筋の肥大（心筋リモデリング）により心不全へと移行することもあり、心筋リモデリングは後の心機能へと大きく関わることが知られている。すなわち、心筋炎の予防や効果的な治療法の開発、心筋リモデリングの改善は現在も重要課題である。

インバリアント NKT (iNKT) 細胞は、MHC class Ib 分子である CD1d 拘束性に α -ガラクトシルセラミド (α -GC) など糖脂質抗原を認識し活性化される T 細胞亜群である。現在までに、iNKT 細胞は種々の炎症性疾患のマウスモデルにおいて時に調節的、一方で病態促進的役割を果たすことが示されている。これまで、実験的自己免疫性心筋炎 (EAMC) モデルに関しては、過去 1 報だけ α -GC の投与により炎症が軽症化したとの報告があるが、iNKT 細胞の実際の関与や奏功メカニズムの検討は十分なされていない。

本研究では、心筋ミオシン重鎖 α (MyHC-1 α) で免疫することにより誘導するマウス EAMC を用いて、1) iNKT 細胞の α -GC による NKT 細胞活性化で EAMC の軽症化は可能か、2) その奏功メカニズムは何か、について明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. マウスおよび EAMC の誘導

生後 6 週齢の BALB/c マウス (以下、単にマウス) を使用した。EAMC は、MyHC- $\alpha_{R614-629R}$ と完全フロイントアジュバント (CFA) の 1:1 乳剤として作成し、BALB/c マウスの背部皮下に、追加アジュバントとして百日咳毒素を腹腔に (*i.p.*) 注射し誘導した。さらに、初回免疫から 7 日後に同じ乳剤を追加免疫した。 α -GC (2 μ g) を投与する場合、乳剤に懸濁して初回免疫時に単回投与した。また、iNKT 細胞の EAMC における役割を明確にする目的で iNKT 細胞欠損 TRAJ18^{-/-}マウス (BALB/c 背景) を用いた。

2. 心臓単核細胞・所属リンパ節細胞の調整

安楽死後にマウスより腔内の血液を可及的に除去した心臓を剔出した。剔出心組織は細切後酵素処理を加え、振盪・消化した。処理後に遠心し、細胞懸濁液より単一細胞浮遊液を調整した。また、所属リンパ節を採取してホモジナイザーで組織を破碎し、同様に洗浄・遠心し、細胞浮遊液を得た。

3. 各種解析

3-1 フローサイトメトリー (FACS) 解析

単一浮遊細胞を Fc 受容体ブロック処理後、蛍光標識抗体を用いて表面抗原を染色し、フローサイトメーターで測定、解析した。心組織から調整した細胞は Complete Medium (CM; RPMI-1640 (10%牛胎児血清、抗生物質、 β -メルカプトエタノール添加) に懸濁し、抗原ペプチド存在下で培養し上清を採取した。上清中の産生サイトカイン濃度は、CBA kit (BD Biosciences)を用いて、製造元の protocol に従いフローサイトメーターで解析して算出した。

3-2 増殖能測定

調整したリンパ節細胞を CM に懸濁し、抗原ペプチド存在下で ^3H -Thymidine (^3H -TdR) を 16 時間共培養した後に、シンチレーションカウンターで ^3H -TdR 取込み量を測定し、T 細胞の増殖能を調べた。

3-3 リアルタイム PCR 解析

採取した心臓より標準的な AGPC 法を用いて RNA を回収した。逆転写にて cDNA を作成し、リアルタイム PCR を行い、 $\Delta\Delta\text{ct}$ 法を用いて発現量を比較・解析した。

【結果】

1. 心組織内 CD1d 発現細胞の解析

マウスの心組織において iNKT 細胞への抗原提示細胞 (APC) として機能し得る CD1d 発現細胞の存在や種類について検討するため心臓から単離した単核球をフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、CD1d 発現を認めるのは CD45⁺単核細胞中のマクロファージ (M ϕ : CD11b⁺F4/80⁺) と単球 (Mo: CD11b⁺Ly6C^{hi})で、平均蛍光強度 (MFI) で M ϕ >Mo であった。樹状細胞 (DC: CD11b⁺CD11c⁺)は非炎症心組織内においてはほとんど検出されなかった。また心組織の CD45⁺分画における CD1d 発現は検出できなかった。

2. α -GC 投与後の心組織内単核細胞、遺伝子発現の解析

次いで α -GC 投与時の上記細胞への影響を調べるため、 α -GC を *i.p* 投与し、投与後 1 日目と 1 週間後における心臓 CD45⁺単核細胞の動態や遺伝子発現を解析した。 α -GC 投与 1 日後には心臓 M ϕ 数に増加を認めるとともにその CD1d 発現も増強したが、細胞数・CD1d 発現量も 1 週間後には対照レベルまで戻った。また、リアルタイム PCR で NKT 細胞由来と考えられる *Ifng* および *Il4* などのサイトカイン発現、単球・マクロファージの遊走に関わるケモカイン *Ccl2* の発現などが対照マウスの発現と比較して 1 日後から増加していた。NKT 細胞に対するケモカインである *Cxcl16* 発現と *Il10* の発現は α -GC 投与後徐々に増加傾向を示した。

3. EAMC 誘導時のマウスの各種解析結果

3-1. EAMC 誘導マウス心組織内単核細胞動態・遺伝子発現の経時的解析

EAMC を誘導したマウスで免疫後の心組織内の単核細胞と各遺伝子発現を経時的 (免疫後 7 日、14 日、21 日、28 日、60 日) にフローサイトメーター、リアルタイム PCR で解析した。EAMC の心臓 M ϕ の数は 0 日目から 60 日目まで徐々に増加した。一方、Mo の数は 14 日目にピークを示した。樹状細胞 (DC) は 14 日目まで増加し、その後 60 日目まで続いた。iNKT 細胞は 21 日目に出現し 28 日目にピークを示した。また遺伝子発現は *Tnfa* と *Il10* の発現は 28 日目に大きく増加し、*Cxcl16*、*Ccl2* の発現は 14 日目を中心に増加した。

3-2. EAMC 誘導後 21 日目のマウスにおける各種解析結果

EAMC は誘導後炎症のピークが 21 日目にあるため、この定点で α -GC 投与（以下、実験群）と vehicle 投与（以下、対照群）の 2 群間で各種解析結果を比較した。

3-2-1. 心臓の組織病理像

対照群では心臓組織内に単核球の細胞浸潤・心筋傷害（HE 染色）、傷害箇所での修復のための線維芽細胞・線維の増生（マッソントリクローム染色）を認めた。実験群では対照群に比して線維化領域の割合が減少する傾向があった。

3-2-2. 心臓組織内単核細胞の FACS 解析

免疫 21 日目のマウスの心臓に浸潤した CD45⁺単核細胞は、対照群に比して実験群で iNKT 細胞（TCR β ⁺/ α -GC-CD1d tetramer⁺）の増加を認めた。一方、浸潤細胞中の好中球（CD11b⁺Ly6G⁺）は実験群において低下傾向であった。

3-2-3. 遺伝子発現解析

Tnfa 発現は、対照群に比べて実験群で有意に低下していた一方、*Il10* 発現には両群間で有意差を認めなかった。

3-2-4. リンパ節 T 細胞によるサイトカイン産生および増殖能

21 日目の免疫応答を調べるために、所属リンパ節由来の T 細胞を APCs 存在下に抗原ペプチドを加えて、*in vitro* でのサイトカイン産生を調べたところ、培養上清中の TNF- α 、IFN- γ 、IL-17A 産生両群間に有意な差は認められなかった。また、増殖能を調べるために ³H-Thymidine の取り込み試験を行ったが、両群間に 21 日後では抗原特異的 T 細胞増殖能に両群間で有意差はなかった。

【考察】EAMC 誘導マウスにおいて、誘導時より早期に iNKT 細胞を活性化した場合、心筋炎症・線維化の抑制が認められた。

無処置マウスに α -GC を *i.p* した結果、投与後 1 日目に心臓 M ϕ 数・CD1d 発現レベルは共に増加した。また *Ifng* および *Il4* の発現は対照マウスの発現と比較して増加しており、iNKT 細胞が α -GC 投与マウスの心臓で活性化されたことを示唆した。*Ccl2*、*Cxcl16* 発現の増加は α -GC 投与により、それぞれ Mo/M ϕ 、iNKT 細胞が心臓に動員される順序を示唆している。漸増傾向を示した *Il10* の発現は心臓の抗炎症環境の維持を反映したものと考えられた。

EAMC 誘導後の心臓単核細胞の動態をみると M ϕ は免疫後より経時的に増加を認め、その後 21 日目に iNKT 細胞の検出、28 日目にピークを認めた。一方で遺伝子発現は iNKT 細胞のピークと一致して 28 日目に *Il10* 発現の大きな上昇を認めた。EAMC の炎症のピークは免疫後 21 日目とされているが、免疫後 *Ccl2* により動員された M ϕ からの *Cxcl16* により iNKT 細胞が心臓に動員、IL-10 を産生し、ピークになった炎症状態の鎮静化に寄与した可能性がある。免疫時の α -GC 同時投与で iNKT 細胞を早期から活性化させた場合、免疫後 21 日目において心筋の線維化領域の減少と、*Tnfa* の有意な低下を認めた。その一方で同時点に *Il10* で有意な上昇を認めなかったのは、iNKT 細胞の活性化による *Il10* の有意な増加は 21 日以前にあった可能性が考えられる。その結果、21 日目において線維化の程度が対照群に比べて抑えられたと思われる。NKT 細胞が欠損する TRAJ18^{-/-}マウスでは EAMC 誘導にてクレアチンキナーゼ値・線維化面積などが野生型マウスに比

して大であったことは iNKT 細胞の心筋炎症に対する調節的機能の裏付けとなろう。

【結語】 iNKT 細胞は心臓 Mφにより提示される α -GC で活性化され、IL-10 などの産生を通じて EAMC の炎症細胞浸潤・線維化を軽症化する。