

ナチュラルキラーT細胞活性化による心不全治療法開発

北海道大学大学院 医学研究科 循環病態内科学

絹川 真太郎

1. 背景と目的

心不全の病態基盤は、心筋細胞肥大・細胞死や間質線維化からなる心筋リモデリングであるが、その形成・進展には心筋組織における慢性炎症や酸化ストレスが関与する。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、炎症惹起性 Th1 サイトカインと炎症抑制性 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¹⁾。NKT 細胞による炎症制御の特徴は、相互に相手の産生するサイトカインが負のフィードバック調節をかけ Th1/Th2 バランスを適正化する点である。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。さらに、自己免疫疾患において、NKT 細胞の機能低下に起因する炎症制御機構の破綻が Th1 優位の炎症遷延化に関与すること、NKT 細胞活性化作用を有する α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) により Th1/Th2 バランスを Th2 へシフトさせ、自己免疫疾患の病態を改善できることが報告された^{2,3)}。心筋組織にも NKT 細胞が存在することから、NKT 細胞の機能低下に起因する炎症の遷延・慢性化が心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与する可能性がある。さらに、 α -GalCer による NKT 細胞の活性化は IL-10 などの Th2 抗炎症性サイトカインを誘導し、心不全の病態を改善できると期待される。しかしながら、 α -GalCer による NKT 細胞の活性化は一過性であり、長期的に NKT 細胞を活性化させることができないことや、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、樹状細胞 (Dendritic cell; DC) を担体とした α -GalCer (α -GalCer/DC) による NKT 細胞の活性化の手法が開発され、癌領域で臨床試験 (第 1・2 相) が実施されている^{4,5)}。本研究の目的は、NKT 細胞の炎症制御における基盤的役割に着目し、 α -GalCer/DC を用いた NKT 細胞の活性化により、心筋組織における炎症制御に基づく新たな心筋リモデリング・心不全の予防・治療法の開発を目指すものであった。

2. 方法

過去の報告をもとに⁶⁾、C57BL/6Jマウスの脾臓からDCを分離し、*in vitro*で α -GalCer (100ng/mL) を GM-CSF (10ng/mL) とともに12時間インキュベートすることによって、 α -GalCer/DCを誘導した。C57BL/6Jマウスへ α -GalCer/DC (3.0×10^6 個) を尾静脈より投与した。投与0.5、1、3、6、12、24時間後に採血および心臓を取り出した。血漿IL-10、IL-4、IFN- γ をELISA法で、心臓におけるこれらの遺伝子発現をRT-PCR法で測定した。さらに、 α -GalCer/DCの作用がNKT細胞に特異的であることを証明するため、NKT細胞欠損マウスへ α -GalCer/DCを投与し、同様の実験を行った。さらに、C57BL/6Jマウスを用いて、心筋梗塞を作成し、 α -GalCer/DC (3.0×10^6 個) あるいはPBSを尾静脈から投与し、4週間飼育した。4週後の臓器重量、心筋梗塞サイズ、心エコー、左室内圧、組織学的評価を行った。

3. 結果

α -GalCer/DC (3.0 X10⁶個) をC57BL/6Jマウスの尾静脈より投与すると、血漿IL-10、IL-4、IFN- γ レベルはそれぞれ1時間後、3時間後、12時間後をピークとして増加した。心臓におけるIL-10、IL-4、IFN- γ の遺伝子発現はそれぞれ12時間後、6時間後、24時間後をピークとして増加した。一方、NKT細胞欠損マウスへ投与しても、これらのサイトカインレベルは全く増加しなかった。PBS投与群と α -GalCer/DC投与群の心筋梗塞マウスの生存曲線が比較された。 α -GalCer/DC投与群は有意に生存率が有意に改善した。PBS投与群では左室拡張末期径および収縮末期径が拡大し、左室短縮率は減少した。血圧や心拍数は変化がなかったが、左室拡張末期圧が増加した。この結果と一致して、肺重量も増加した。一方、 α -GalCer/DC投与では、左室拡張末期径、収縮末期径、左室短縮率が有意に改善した。左室拡張末期圧や肺重量も有意に改善した。非梗塞部心筋の組織学的評価では、PBS群で観察された心筋細胞肥大、間質の線維化増大、アポトーシス増加は、 α -GalCer/DC群で有意に抑制された。また、両群間の心筋梗塞サイズは変化がなかった。

4. 考察

我々はマウスの脾臓から取り出したDCに α -Galcerをパルスし、12時間培養した。この方法によって、 α -Galcerを単独でマウスへ投与した時と同様に、Th1およびTh2のいずれもが産生されることが明らかとなった。NKT細胞欠損マウスを使用し、 α -GalCer/DC投与によるサイトカイン産生はNKT細胞活性化によっていることが確認された。

以前、 α -Galcer単体を心筋梗塞後1日目および4日目に投与して、心筋梗塞後の心不全における役割を検討した⁷⁾。 α -Galcer投与によるNKT細胞の活性化により、IL-10やTNF- α が増加した。この時、生存率が改善し、心不全および心筋リモデリングが改善した。また、IL-10受容体抗体を投与しておく、 α -Galcerの効果は消失した。したがって、NKT細胞の活性化によって、IL-10を介して有効性を示すと考えられた。本研究の α -GalCer/DCの有効性もIL-10が重要な役割を果たしているかもしれない。

今後、この方法を臨床応用し、NKT細胞活性化による心不全患者の治療を目指した研究を推進していく予定である。

5. 発表

発表論文・学会発表はなし。

参考文献

- 1) Matsuda JL, et al. Curr Opin Immunol 2008;20:358-68
- 2) Hong S, et al. Nat Med 2001;7:1057-62
- 3) Miellot A, et al. Eur J Immunol 2005;35:3704-13
- 4) Motohashi S, et al. J Immunol 2009;182:2492-501
- 5) Kunii N, et al. Cancer Sci 2009;100:1092-98
- 6) Toura I, et al. J Immunol 1999;163:2387-91
- 7) Sobirin MA, et al. Circ Res 2012;111:1037-47