

動脈硬化病巣進展に果たすNKT細胞の役割

藤井 聡¹ 岩淵 和也² 中井 之人¹
三島 鉄也¹ 北島 顕¹ 小野江和則²

要旨: ナチュラルキラーT(NKT)細胞はマウスにおいて動脈硬化を促進する。ヒトでも虚血性心疾患に関与する。健常血管では抗原提示細胞のCD1d発現量は適切に保たれ、CD1dによるNKT細胞の活性化によりIL-4やIL-10が産生される。また、血管局所の免疫系を制御しており、動脈硬化血管では危険因子などによりCD1dの発現が亢進し、NKT細胞が過度に活性化され、その結果、炎症を惹起するIFN- γ やTNF- α が産生され血管壁での炎症が起こり、動脈硬化を促進すると推測される。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 929-932)

Key words: NKT cell, lymphocyte, atherosclerosis, ischemic heart disease

はじめに

ナチュラルキラーT(natural killer T: NKT)細胞はメインストリームT細胞と異なるT細胞亜群で¹⁾、T細胞抗原受容体(T cell receptor: TCR)複合体とナチュラルキラー(natural killer: NK)細胞のマーカー(抗原受容体分子NK1.1抗原、ヒトではNKR-P1受容体)を同時に発現する。TCRは偏ったレパトアからなり拘束分子もメインストリームT細胞の古典的主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)と異なり、主に非多型性MHCクラスI様分子のCD1dである¹⁾。NKT細胞は主にCD4⁺CD8⁻(CD4⁺NKT)と、CD4⁻CD8⁻(double negative NKT)の2群に分けられ、分化経路はCD4⁺CD8⁺まで共通の経路を通った後にT細胞と分岐するモデルが支持されている^{2, 3)}。しかし、NKマーカーを発現した前駆細胞の存在を示唆する結果もある⁴⁾。NKT細胞は自然免疫系と獲得免疫系を連携させ獲得免疫系の反応を制御する。初期に抗CD3抗体刺激に反応して急性に大量のインターロイキン(IL)4とインターフェロン(IFN) γ を産生することより、NKTが早期に産生するIL-4とIFN- γ はヘルパーT細胞の免疫応答型を決定するのに重要と考えられる。また、NKT細胞はFasリガンドを発現し、過度に活性化され

Fasを発現したT細胞を障害して免疫応答を調節するという。I型糖尿病などの自己免疫疾患でNKT細胞の減少が相関する⁵⁾。

動脈硬化症は炎症性疾患であり、高脂血症を基盤に炎症因子、特に流血中の単球が関与する⁶⁾。単球と共に病巣に存在するリンパ球については不明点が多い。病巣のリンパ球は主にCD4⁺T細胞であるとされてきた。NKT細胞は、活性化状態でTh1サイトカインであるIFN- γ およびTh2サイトカインであるIL-4産生能をもつ、CD1d分子により提示される脂質を認識する、CD1陽性細胞がヒト動脈硬化病巣に存在する⁷⁾、脂質代謝中枢である肝臓に多く分布しているなどの点から、動脈硬化症の発症や進展に関与する可能性がある。われわれはNKT細胞が動脈硬化に関与するかを動物モデルと虚血性心疾患患者で検討した。

NKT細胞は動物モデルにおいて動脈硬化を促進する

10週齢の雌C57BL/6マウス(wild-type: WT)とNKT細胞が著減するCD1dノックアウトマウス(CD1d^{-/-})に動脈硬化食(脂肪15%、コレステロール1.25%)を20週間投与した。また著明な動脈硬化を示すことが知られる雌ApoEノックアウトマウスに8週齢よりNKT細胞を

¹北海道大学大学院医学研究科循環病態内科

²北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野

2005年1月6日受付 2005年6月20日受理

特異的に活性化するリガンドとして知られる糖脂質 α -ガラクトシルセラミド (galactosylceramide, α -GalCer, 0.1 μ g/g body weight) あるいはvehicleを2週間隔で計3回腹腔内投与し, 3回目投与の1週間後に犠牲死させた。血液は血清分離後, 脂質を測定した。また, 肝臓, 脾臓よりリンパ球分画を得てフローサイトメトリー解析をした。心-大動脈を摘出し大動脈弁直上より80 μ m間隔で8連続切片を作製した。動脈硬化病巣の面積は, 血管組織を脂肪染色にて病巣を染色し, その面積を算出することで求めた。また, マウスよりチオグリコレート刺激下に腹腔マクロファージを採取し, 低比重リポタンパク (low density lipoprotein: LDL), あるいは酸化LDLと培養した。

CD1d^{-/-}の動脈硬化病巣はWTに比べ有意に軽微であった。また α -GalCer投与群の動脈硬化病巣はvehicle群と比べ有意に大であった(34,705 μ m² vs. 20,895 μ m², $p < 0.05$)。フローサイトメトリー解析では α -GalCer反復投与群でNKT細胞の有意な減少(60~75%)が認められた。各群において体重およびコレステロール, 高比重リポタンパク (high density lipoprotein: HDL), 中性脂肪など脂質代謝に有意な差を認めなかった。 α -GalCerによるNKT細胞の活性化は血清脂質プロフィールの変化を伴わずに動脈硬化促進性に寄与することが示された。マウスよりチオグリコレート刺激下に腹腔マクロファージを採取し, LDL, あるいは酸化LDLと培養した実験では, フローサイトメトリー解析にてMac-1⁺細胞上のCD1dの発現亢進が濃度・時間依存性に認められ, 変性脂質によるマクロファージ上のCD1d発現亢進がNKT細胞の動脈硬化促進性に寄与していると推察された。ApoEノックアウトマウスの動脈硬化病巣でのNKT細胞に特徴的なV α 14J α 281 mRNAの発現が確認され, NKT細胞は動脈硬化病巣局所に存在し*in situ*に機能している可能性が示唆されている⁸⁾。

虚血性心疾患患者のNKT細胞レベル

ヒトにおいてNKT細胞が動脈硬化に重要な役割を果たしているかを検討するため, 冠動脈造影により病変を確認した虚血性心疾患患者でNKT細胞レベルに変化が起こっているかを検討した。虚血性心疾患患者16名と健常対照群10名を対象とした。末梢血のCD3⁺CD4⁺CD8⁻細胞でゲートしたTCR-V β 11陽性TCR-V α 24陽性細胞をフローサイトメトリー解析で測定した。TCR-

V β 11陽性TCR-V α 24陽性細胞は健常対照群に比べ, 虚血性心疾患群では有意に低下していた[0.9 \pm 1.0 (SD)% vs. 0.2 \pm 0.3%, $p < 0.05$]。病状の安定した狭心症と, 不安定な狭心症では差は認めなかった。患者群では, 冠動脈疾患の危険因子(高血圧, 高脂血症, 糖尿病, 喫煙)の重積した患者でNKT細胞数が低い傾向を認めた。このことからNKT細胞の活性化がヒトでも動脈硬化の発症や進展に重要な役割を担っていることが示唆された。

NKT細胞の活性化と動脈硬化の関係

マウス動脈硬化モデルにおいてNKT細胞の活性化は動脈硬化促進性に寄与し, この機構に変性脂質によるマクロファージ上のCD1d発現亢進が関与していると考えられた。虚血性心疾患患者でもNKT細胞レベルは低下し, NKT細胞が動脈硬化の制御に関与することを示唆する所見が示された。NKT細胞数の活性化による減少を説明する機序として, 変性脂質の一部がCD1d分子によってNKT細胞に提示され, その結果, 活性化誘発性細胞死 (activation-induced cell death: AICD) が生じNKT細胞が減少する, NKT細胞が活性化される際にNK1.1やTCRのdown-modulationが持続的に生じ見かけ上NKT細胞の減少が見られる, 肝臓や脾臓組織から動脈硬化病巣など末梢組織へNKT細胞の遊走が生じるなどが可能性として挙げられる⁸⁾。

健常な血管では抗原提示細胞のCD1d発現量は適切に保たれ, CD1dによるNKT細胞の活性化によりIL-4やIL-10が産生される。また, 血管局所の免疫系を制御しており (Fig. 1A), 動脈硬化の血管では危険因子などによりCD1dの発現が亢進し, NKT細胞が過度に活性化され, その結果, 炎症を惹起するIFN- γ やTNF- α が産生され血管壁での炎症が起こり動脈硬化を促進すると推測される (Fig. 1B)。NKT細胞が動脈硬化を制御する機構, および治療標的分子を明らかにし, また臨床的にNKT細胞が虚血性心疾患の重症度や予後を予測するマーカーとなるかを検討したい。

文 献

- 1) Kronenberg M, Gapin L: The unconventional lifestyle of NKT cells. Nat Rev Immunol, 2002, 2: 557-568.
- 2) Gapin L, Matsuda JL, Surh CD et al: NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by

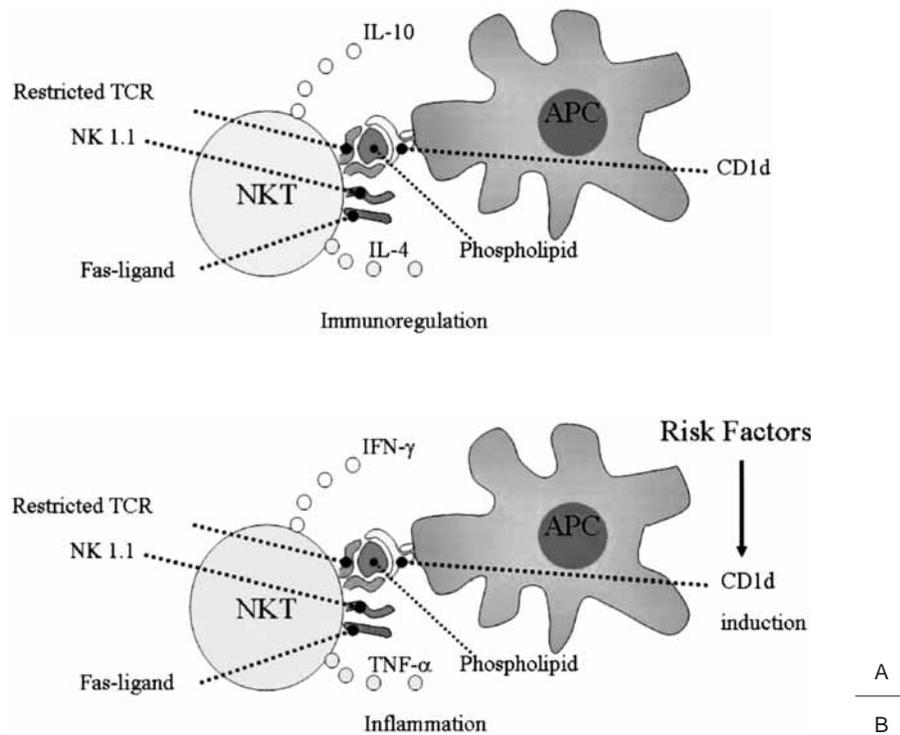


Figure 1 Proposed relationship between NKT cells and atherosclerosis.
 A: Under baseline conditions CD1d expression of antigen presenting cells (APC) is properly maintained. The interaction of phospholipids and CD1d can regulate the production of IL-4 and IL-10 from NKT cells in a reasonable manner, thus modulating the immune reaction in the vessel wall.
 B: In the atherosclerotic vessel wall coronary risk factors such as hyperlipidemia can increase the expression of CD1d in the APC, which results in over-activation of NKT cells. Increased production of proinflammatory cytokines by NKT cells can induce inflammatory reactions in the vessel wall and exacerbate atherosclerosis.

CD1d. *Nat Immunol*, 2001, **2**: 971–978.

3 Benlagha K, Kyin T, Beavis A et al: A thymic precursor to the NKT cell lineage. *Science*, 2002, **296**: 553–555.

4 Iwabuchi K, Iwabuchi C, Tone S et al: Defective development of NK1.1⁺ T-cell antigen receptor $\alpha\beta$ ⁺ cells in zeta-associated protein 70 null mice with an accumulation of NK1.1⁺ CD3⁻ NK-like cells in the thymus. *Blood*, 2001, **97**: 1765–1775.

5 Oishi Y, Sumida T, Sakamoto A et al: Selective reduction and recovery of invariant Valpha24JalphaQ T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 2001, **28**: 275–283.

6 Binder CJ, Chang MK, Shaw PX et al: Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med*, 2002, **8**: 1218–1226.

7 Melian A, Geng YJ, Sukhova GK et al: CD1 expression in human atherosclerosis. A potential mechanism for T cell activation by foam cells. *Am J Pathol*, 1999, **155**: 775–786.

8 Nakai Y, Iwabuchi K, Fujii S et al: Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood*, 2004, **104**: 2051–2059.

The Effects of Natural Killer T Cells on Atherosclerosis

Satoshi Fujii,¹ Kazuya Iwabuchi,² Yukihito Nakai,¹ Tetsuya Mishima,¹ Akira Kitabatake,¹ and Kazunori Onoe²

¹Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine,
and ²Division of Immunobiology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Hokkaido, Japan

Key words: NKT cell, lymphocyte, atherosclerosis, ischemic heart disease

Atherosclerosis is an inflammatory disease. Lymphocytes are involved in its development. The role of accumulated lymphocytes in vessel injury remains undetermined. Natural killer T (NKT) cells have intriguing characteristics such as self-reactivity and a capacity to rapidly secrete large quantities of cytokines. They can recognize lipid antigens presented by CD1d, and have a potent ability to produce interferon (IFN)- γ , a potentially pro-atherogenic cytokine. In addition to NKT cells accelerating atherosclerosis in mice, macrophages that had incubated with oxidized low-density lipoproteins (LDL) showed enhanced CD1d levels, resulting in inducing NKT cells to produce IFN- γ . Native LDL had no effects. To determine the etiological role of NKT in human cells profiling was performed using flow cytometry in patients with angina. Frequencies of V α 24-V β 11 double positive NKT cells in peripheral blood were significantly decreased in patients with angina compared with controls. There were no significant differences in the values between unstable and stable angina. A close correlation between accumulation of risk factors and reduction of NKT cells was observed. These experimental and clinical studies suggest that synergy among hyperlipidemia, oxidative stress and NKT cell activation accelerates coronary atherogenesis in angina. (J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 929–932)