

心筋リモデリング・心不全におけるNKT細胞による炎症制御とそれに基づく新規治療法の開発

筒井, 裕之
九州大学大学院医学研究院循環器内科学分野

<https://doi.org/10.15017/1792721>

出版情報：福岡醫學雜誌. 107 (10), pp.177-184, 2016-10-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

総 説

心筋リモデリング・心不全における NKT 細胞による炎症制御と それに基づく新規治療法の開発

九州大学大学院医学研究院 循環器内科学分野

筒 井 裕 之

はじめに

心筋梗塞に陥った心臓では、梗塞部心筋の線維化、壁の菲薄化に続き、非梗塞部心筋の代償性肥大と内腔の拡大が生じ、収縮機能不全が引き起こされる。さらに、細胞レベルにおいては、心筋細胞の肥大やアポトーシス、間質の線維化をきたす。このような心筋における一連の構築・機能変化を、「心筋リモデリング」と呼び、心不全の形成・進展において重要な役割を果たしていることが知られている¹⁾。現在では、心筋梗塞以外の原因疾患、例えば、高血圧や弁膜症、さらには心筋症においても心筋リモデリングが生ずることが知られており、心不全の発症・進展の病態基盤ととらえられている。

心筋リモデリングの形成・進展にはレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系や交感神経系などの神経体液性因子の活性化が関わっていることが知られており、これらを抑制する薬剤が実際の心不全治療に用いられている。さらに、この過程には神経体液性因子ばかりでなく酸化ストレスや慢性炎症が関与することもあきらかとなっている。

本稿では、心筋リモデリングにおける慢性炎症、特にその制御機構として注目されているナチュラルキラー T (Natural killer T; NKT) 細胞の役割とそれに基づく新たな心不全治療の開発について我々の研究で得られた知見をもとに概説する。

1. 心筋リモデリングと慢性炎症

心筋梗塞後には、梗塞部心筋だけでなく非梗塞部心筋においても単球やリンパ球など炎症細胞の浸潤が増加する。これら炎症細胞の浸潤には、ケモカインや炎症性サイトカインの発現亢進が密接に関わっている。さらに、これらを制御することによって梗塞後リモデリング・心不全が抑制されることも報告されている。すなわち、マクロファージの遊走を抑制する Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) を抑制する抗 MCP-1 遺伝子治療によって、梗塞後心筋リモデリングおよび心不全の進展が抑制された²⁾。また、不全心筋では炎症性サイトカインのひとつで心筋傷害をもたらすことが知られている Tumor necrosis factor- α (TNF- α) が増加している。しかしながら、抗 TNF- α 抗体を用いた心不全患者を対象とした研究では、その有用性は証明されなかった³⁾。このことは、心筋傷害性に働くと考えられるサイトカインを単独で抑制しても、必ずしも心不全の抑制には繋がらないことを示唆している。ケモカインやサイトカインは 2 面性を有し、心筋傷害性に働くだけでなく、心筋保護的に働く場合もある。すなわち炎症に関わる因子は、組織修復に関わったり、傷害に関わったりすると考えられる。さらに、単一のサイトカインではなく、様々なサイトカインネットワークが病態形成には関与する可能性も高い。また、様々な病期において、これらの役割が異なる可能性もある。

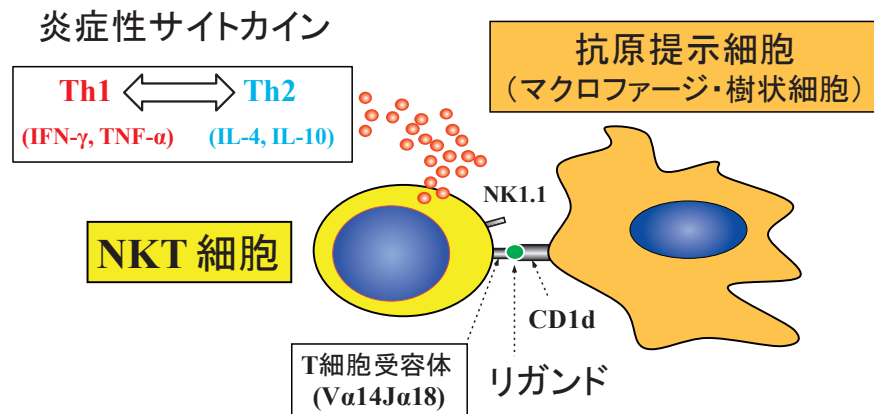


図1 NKT細胞

2. NKT細胞の役割

NKT細胞は、NK細胞マーカー (NK1.1) と可変性のない T細胞受容体 (マウスでは Va14Ja18) を発現する Tリンパ球の亜群である (図1)⁴⁾。マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞によって CD1d 拘束性に提示された糖脂質を認識し活性化される。これまで生体内の内因性抗原は明らかにされていないが、糖脂質である α -galactosylceramide (α -GC) が特異的に NKT細胞を活性化することが知られている。NKT細胞は、TNF- α や IFN- γ などの炎症惹起性 Th1 サイトカインと IL-10 や IL-4 などの炎症抑制性 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。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。

NKT細胞は自己免疫疾患や炎症性疾患などの病態形成に関与することがあきらかにされている。しかしながら、その関与は単一ではなく、I型糖尿病や関節リウマチモデル動物においては NKT細胞が保護的な役割を果たしていると示されている⁵⁾⁶⁾。一方で、動脈硬化においては、NKT細胞活性化が、その病態を進展させることが報告されている⁷⁾。

3. 心筋梗塞後における心筋 NKT細胞の変化

NKT細胞は単核球細胞中の割合として、肝臓に 10-20%、脾臓に 1.5%、胸腺に 0.5%、末梢血に 0.01-0.5% 存在することが知られている⁸⁾。一方、心臓において NKT細胞が存在するかどうかは明らかにされていなかった。我々は、マウスの心筋から単核球を分離し、フローサイトメトリー法で NKT細胞を検出した (図2A)⁹⁾。その結果、心筋においても極めて少数ながら NKT細胞が存在することを見出した。さらに、NKT細胞は冠動脈結紮により心筋梗塞を作成後7日の梗塞部心筋で約2倍に増加した。

手術後1日目および4日目に α -GC を腹腔内投与したところ、NKT細胞は7日後に著明に増加したが、28日後には元のレベルまで復していた。一方、梗塞後マウスに α -GC を投与したところ、NKT細胞は28日後でも増加したままであった。さらに、Va14Ja18 遺伝子発現でもフローサイトメトリーと同様に NKT細胞の増加が確認された (図2B)。

4. 梗塞後リモデリング・心不全に対する α -GC の効果

α -GC 投与により梗塞後心不全モデルマウスの生存率が有意に改善した (図3A)。さらに、心エコーにて梗塞マウスでは左室内径の拡大および収縮機能の低下をみとめたが、 α -GC 投与によってこれらは抑制された (図3B)。さらに、左室拡張末期圧や肺重量の増加も抑制された。したがって、 α -GC によって NKT細胞を活性化させると、梗塞後左室リモデリングおよび心不全が軽減し、生存率が改善することが示

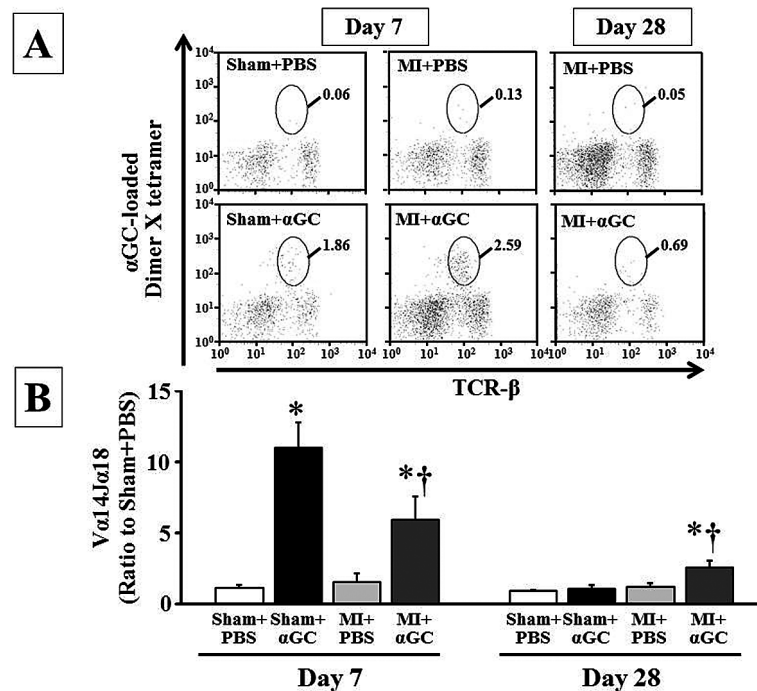


図2 心筋梗塞 (MI) 後の心筋 NKT 細胞の変化と α GC の効果 (文献9より引用)

された。さらに、非梗塞部心筋の組織学的解析にて梗塞マウスでは心筋細胞肥大、間質線維化、アポトーシスをみとめたが、これらはいずれも α -GC 投与により抑制された (図4)。

梗塞マウスでは、術後7日目にはマクロファージやリンパ球の浸潤が有意に増加し、 α -GC 投与によってさらに増加した。M1 マクロファージや M2 マクロファージのマーカーおよび MCP-1 や RANTES などのケモカインの遺伝子発現はいずれも梗塞マウスで増加し、 α -GC 投与によっていずれの群でもさらに増加した (図5A-D)。心筋における Interferon- γ 、TNF- α 、Interleukin (IL)-6 や IL-10 などのサイトカインの遺伝子発現は、いずれも α -GC 投与によって有意に増加した (図5E-H)。一方、28日後の心筋では、梗塞マウスの IL-10 のみが α -GC 投与によって増加した。これは NKT 細胞の動態と全く一致していた。これらの結果は、NKT 細胞が心臓局所において様々な炎症細胞浸潤およびケモカインやサイトカインの誘導に関わっていることを示している。

さらに、抗 IL-10 受容体抗体の投与によって、 α -GC で観察された梗塞後リモデリング改善効果や心不全進展抑制効果は消失した。以上より、 α -GC 投与による NKT 細胞活性化を介する心不全の抑制効果には IL-10 が重要な役割を果たしていると考えられた。これまでの報告で、NKT 細胞活性化により Th1 から Th2 への変化や IL-10 産生増加が想定されている¹⁰⁾。さらに、IL-10 には間質線維化の抑制や血管新生を介して、心保護効果を示すことも報告されている。 α -GC は、心筋梗塞後リモデリング・心不全ばかりでなく、虚血再灌流障害に対しても心保護的に作用するが、その効果も IL-10 を介している¹¹⁾¹²⁾。

以上のような成績は、 α -GC による NKT 細胞活性化を介する慢性炎症制御が、心筋リモデリング・心不全に対する新たな治療戦略となる可能性を支持するものである。

5. NKT 細胞活性化による慢性炎症制御に基づく新たな心不全治療の開発

わが国における心不全患者数は約 100 万人と言われているが、人口の高齢化、心不全の原因となる生活習慣病の増加、急性心筋梗塞に対する急性期治療の普及と治療成績の向上などによって、患者数は増加の

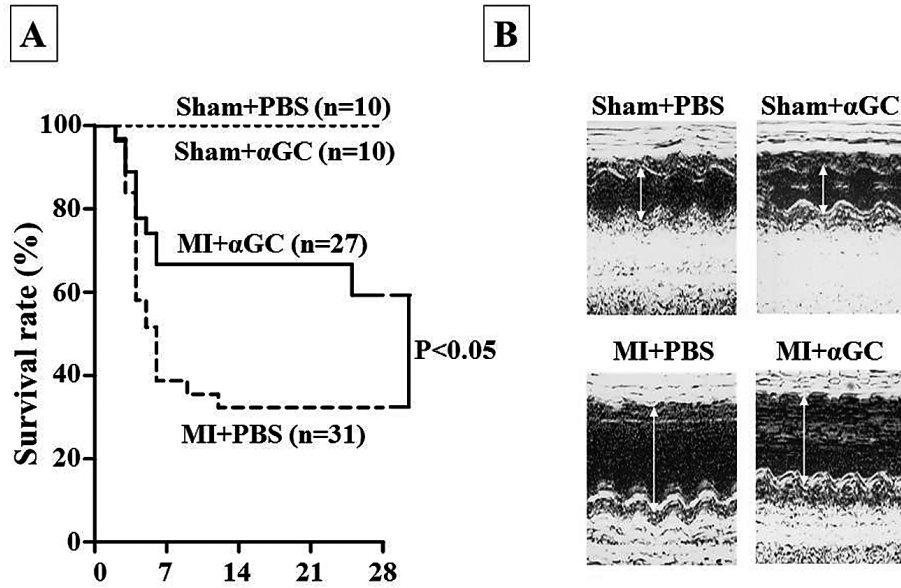


図3 梗塞後心不全モデルマウスに対するαGCの効果
 A： Kaplanマイヤー生存曲線， B：心エコー
 (文献9より引用)

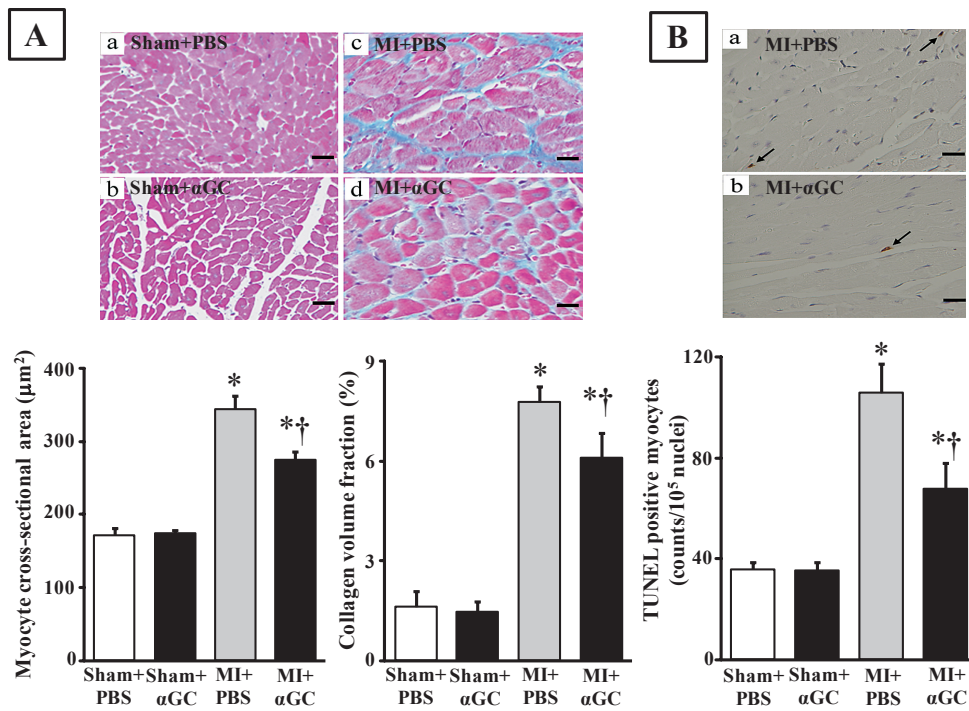


図4 梗塞後心不全モデルマウスの心筋リモデリングに対するαGCの効果
 A： HE 染色， B： TUNEL 染色
 (文献9より引用)

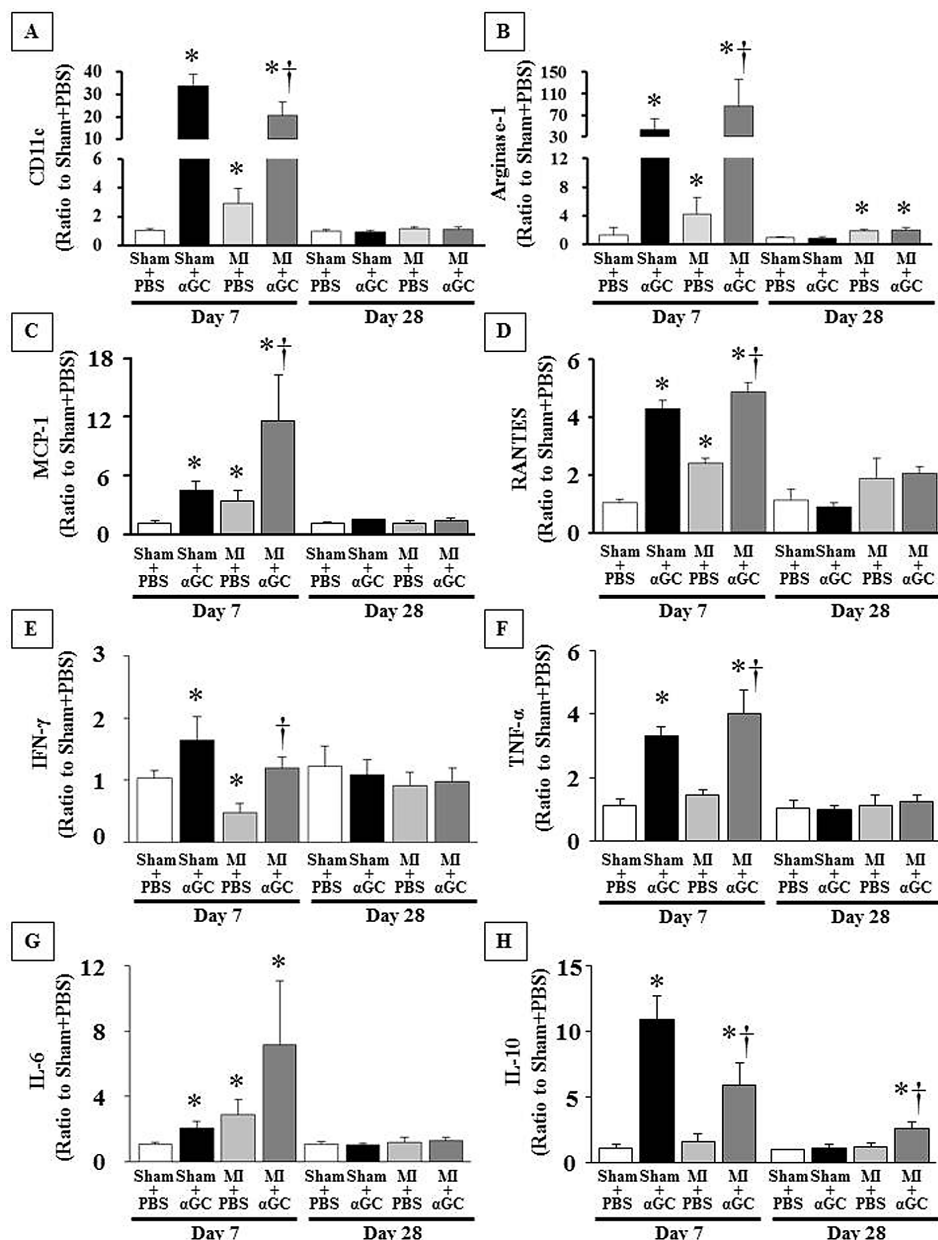


図5 梗塞後心不全モデルマウスの炎症細胞浸潤およびサイトカイン発現に対する α GCの効果 (文献9より引用)

一途をたどっている。近年の薬物療法・非薬物療法の進歩によって、その予後は格段に改善してきたが、重症例の予後は未だに不良であり、患者は増悪による入院を反復し、最終的には死に至る。したがって、心不全の新たな治療法の開発に対する医療現場の必要度は極めて高い。上記のような基礎研究における成果をもとに、 α -GCによるNKT細胞の活性化が、新たな心不全治療となる可能性を検証する開発研究に取り組んでいる。 α -GCによるNKT細胞の活性化は一過性であることや、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 -GC(α -GC/DC)によるNKT細胞の活性化の手法が開発された。本研究開発の特色は、NKT細胞の活性化の手法として心不全患者への臨床応用・実用化が十分可能な α -GC/DCを用いる点である。本治療法は既に癌領域(肺がん・頭頸部がん)で臨床試験が実施され先進医療として

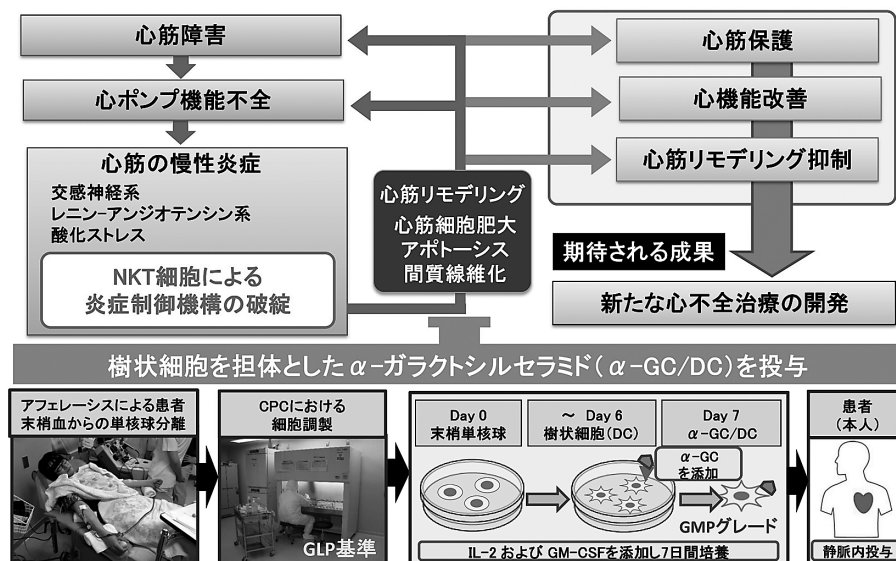


図6 樹状細胞を担体とした α -GC/DCによるNKT細胞を介した慢性炎症制御に基づく新たな心不全治療の開発(イメージ図)

承認されている。したがって実現可能性が極めて高く、実際の心不全治療として臨床応用に繋がるのが期待できる。 α -GCの心不全に対する有効性を検証する基礎実験はほぼ終了し、実用化を目指して以下のような研究開発を進めている(図6)。

- 1) ヒト α -GC/DCの規格決定および品質・安全性試験(GMP遵守)と有効性の確認
- 2) ヒト α -GC/DC(細胞製品)の製造体制の整備(GLP基準)
- 3) 臨床試験計画の策定(用法・用量等)(GCP基準)
- 4) 臨床試験(先進医療または医師主導治験)の実施
 - 第I相臨床試験(First in human試験)安全性の確認
 - 第II相臨床試験(ヒトPOC取得)有効性の検証

おわりに

心筋にはNKT細胞が存在し、心不全ではNKT細胞が増加した。さらに、 α -GC投与によるNKT細胞活性化は心不全に対する抑制作用を有することを初めて証明した。梗塞後心不全では、急性期における梗塞部の修復過程から心筋リモデリングの形成・進展過程のそれぞれの段階で、慢性炎症に関与する様々な因子が種々の役割を果たし、相互に修飾を受けながら病態を形成する。NKT細胞は、これらの病態に関与する様々な炎症関連因子を適正化するよう指揮・統制しているのではないかと考えられる。

今回の研究では、NKT細胞の役割を梗塞後心不全モデルで検討したが、他の心不全モデルで同様の現象が観察されるかどうかは明らかではない。また、外因性にNKT細胞を刺激した際の心不全に対する役割を検討したが、内因性に活性化・増加したNKT細胞がどのような役割を果たしているかは不明であり、内因性のリガンドも明らかではない。これらを解決すべくさらなる基礎研究の進展が必要である。さらに、心不全患者への臨床応用・実用化をめざして α -GC/DCを用いた新規治療の開発も加速化していく必要がある。

参 考 文 献

- 1) Pfeffer MA and Braunwald E : Ventricular remodeling after myocardial infarction : experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81 : 1161-1172, 1990.
- 2) Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Ikeuchi M, Matsusaka H, Suematsu N, Wen J, Egashira K and Takeshita A : Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 108 : 2134-2140, 2003.
- 3) Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT ; Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure Investigators : Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor- α , in patients with moderate-to severe heart failure : results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation*. 107 : 3133-3140, 2003.
- 4) Matsuda JL, Mallewaey T, Scott-Browne and Gapin L : CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol*. 20 : 358-368, 2008
- 5) Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y and Van Kaer L : The natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med*. 7 : 1052-1056, 2001.
- 6) Miellot A, Zhu R, Diem S, Boissier MC, Herbelin A and Bessis N : Activation of invariant NKT cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an IL-10-dependent pathway. *Eur J Immunol*. 35 : 3704-3713, 2005.
- 7) Nakai Y, Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Dashtsoodol N, Watano K, Mishima T, Iwabuchi C, Tanaka S, Bezbradica JS, Nakayama T, Taniguchi M, Miyake S, Yamamura T, Kitabatake A, Joyce S, Van Kaer L and Onoé K : Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood*. 104 : 2051-2059, 2004.
- 8) Watarai H, Nakagawa R, Omori-Miyake M, Dashtsoodol N and Taniguchi M : Methods for detection, isolation and culture of mouse and human invariant NKT cells. *Nat Protoc*. 3 : 70-78, 2008.
- 9) 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 and Tsutsui H : Activation of natural killer T cells ameliorates postinfarct cardiac remodeling and failure in mice. *Circ Res*. 111 : 1037-1047, 2012.
- 10) Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW and Kishore R : IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ Res*. 104 : e9-18, 2009.
- 11) 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 and Tsutsui H : Activation of invariant natural killer T cells by α -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 62 : 179-188, 2013.
- 12) Arslan F : Mediators of inflammation after cardiac ischemia : The role of invariant natural killer T (iNKT) cell. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2013 ; 63 : 118-121, 2013.

(特に重要な文献については、数字をゴシック体で表記している.)

プロフィール

筒井 裕之 (つつい ひろゆき)

九州大学教授 (大学院医学研究院 循環器内科学). 医学博士

◆**略歴** : 1982年九州大学医学部卒業. 1990年米国サウスカロライナ医科大学留学. 1994年九州大学医学部循環器内科助手. 2000年同講師. 2004年北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学教授. 2008-12年北海道大学病院卒後臨床研修センター長 (併任). 2012-13年北海道大学病院病院長補佐 (併任). 2013-15年北海道大学病院副病院長 (併任). 2016年より現職. 北海道大学産学・地域協働推進機構客員教授 (併任).

◆**研究テーマ** : 心血管病の基盤病態の解明と新規治療の開発をテーマとしています. 質の高い高度かつ安心の循環器診療を基本としながら, 基礎・臨床・疫学・開発研究まで幅広く研究を展開し, そのなかで次世代を担う循環器内科医・循環器研究者の育成を目指しております.

Role of Natural Killer T Cells in Cardiac Remodeling and Failure and the Development of Novel Therapeutic Strategy

Hiroyuki TSUTSUMI

Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University

Abstract

Chronic inflammation in the myocardium is involved in the development of left ventricular (LV) remodeling and failure after myocardial infarction (MI). Invariant natural killer T (iNKT) cells have been shown to produce inflammatory cytokines and orchestrate tissue inflammation. However, no previous studies have determined the pathophysiological role of iNKT cells in post-MI LV remodeling. We thus examined whether the activation of iNKT cells might affect the development of LV remodeling and failure. After creation of MI, mice received the injection of either α -galactosylceramide (α GC), the activator of iNKT cells, or phosphate-buffered saline 1 and 4 days after surgery, and were followed during 28 days. Survival rate was significantly higher in MI + α GC than MI + PBS. LV cavity dilatation and dysfunction were significantly attenuated in MI + α GC, despite comparable infarct size, accompanied by a decrease in myocyte hypertrophy, interstitial fibrosis, and apoptosis. The infiltration of iNKT cells were increased during early phase in noninfarcted LV from MI and α GC further enhanced them. It also enhanced LV interleukin (IL)-10 gene expression at 7 days, which persisted until 28 days. AntiIL-10 receptor antibody abrogated these protective effects of α GC on MI remodeling. The administration of α GC into iNKT cell-deficient $J\alpha 18(-/-)$ mice had no such effects, suggesting that α GC was a specific activator of iNKT cells. iNKT cells play a protective role against post-MI LV remodeling and failure through the enhanced expression of cardioprotective cytokines such as IL-10.

Key Words : inflammation, natural killer T cell, cardiac remodeling, heart failure, myocardial infarction