



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	第 299 号
氏名	伊藤 史織
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	スフィンゴシン 1-リン酸による NKT 細胞の免疫応答調節機構および肥満者における血中スフィンゴシン 1-リン酸濃度の解析
論文審査担当者	主査：木村 和哲 副査：藤井 聡, 林 秀敏, 服部 光治

氏名	いとう しおり 伊藤 史織
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 299 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	スフィンゴシン 1-リン酸による NKT 細胞の免疫応答調節機構および肥満者における血中スフィンゴシン 1-リン酸濃度の解析
論文審査委員	(主査) 教授 木村 和哲 (副査) 教授 藤井 聡・教授 林 秀敏・教授 服部 光治

#### 論文内容の要旨

Natural killer T (NKT) 細胞は抗原提示細胞に提示された糖脂質を抗原として認識する可変性のない T 細胞抗原受容体 (T-cell antigen receptor: TCR) を持つ T 細胞群である。NKT 細胞は自己免疫疾患やアレルギー、動脈硬化などにおいて TCR を介して様々なサイトカインを産生し、自然免疫系と獲得免疫系を賦活することで病態の制御に重要な役割を果たしている。とくに近年 NKT 細胞とメタボリックシンドロームとの関係が注目されており、NKT 細胞を欠損させた ApoE<sup>-/-</sup>マウスでアテローム性動脈硬化症の進展が減弱することや、高脂肪食で誘導されたインスリン抵抗性の増悪は NKT 細胞欠損マウスで抑制されることが報告されている。スフィンゴシン 1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate: S1P) は生理活性を持つスフィンゴ脂質代謝産物の一種で、S1P 受容体を介して血管新生、細胞の増殖、分化、生存、遊走、炎症等に関与している。肥満モデルマウスで血漿中 S1P 濃度が高くなるという報告があり、血中 S1P レベルと心血管疾患との相関を示唆する報告もある。肥満はメタボリックシンドロームの危険因子であり、動脈硬化症や 2 型糖尿病を進展させる要因である。本研究では肥満によって誘導された S1P が NKT 細胞の免疫応答調節機構に影響を及ぼしているという仮説を立て、S1P による NKT 細胞の免疫応答調節機構の解析および肥満による血漿中 S1P レベルの上昇機構の解析を行った。

本研究では可変性のない T 細胞受容体を介した免疫応答機構が NKT 細胞と同等である NKT 細胞ハイブリドーマ 1B6 細胞および 2E10 細胞を用いて実験を行った。S1P で NKT 細胞ハイブリドーマを刺激すると、有意に tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の mRNA 発現量とタンパク質産生量を増加させた。可変性のない TCR を持つ NKT 細胞の代表的なりゲンドは  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -galactosylceramide;  $\alpha$ -GalCer) である。 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドで NKT 細胞ハイブリドーマを刺激すると TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量および産生量が大きく増加し、S1P の存在下ではさらに増大した。

NKT 細胞ハイブリドーマには S1P 受容体サブタイプのうち NKT 細胞と同様に S1P<sub>1</sub>、S1P<sub>2</sub>、S1P<sub>4</sub> が発現していた。そこで、S1P による TNF- $\alpha$  増加作用が S1P 受容体を介した反応であるか調べるため、S1P 受容体阻害剤および下流シグナル分子の阻害剤を用いて S1P 刺激実験を行った。S1P<sub>1</sub> と S1P<sub>3</sub> の共アンタゴニストである VPC23019 および S1P<sub>2</sub> のアンタゴニストである JTE013 は S1P による有意な TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量増加を抑制した。JTE013 の方がより強い抑制が見られた。次に S1P 受容体の下流シグナル経路に存在する分子の阻害剤を用いて実験を行った。Rho キナーゼ阻害剤である Y-27632 は S1P による TNF- $\alpha$  の発現量増加を抑制しなかった。Gi 阻害剤である百日咳毒素 (PTX) も S1P による TNF- $\alpha$  の発現量増加を抑制しなかった。PKC 阻害剤である Ro-31-8220 は S1P による TNF- $\alpha$  の発現量増加を抑制した。S1P<sub>2</sub> 受容体

は Gq/PKC/PLC 経路を介して細胞の代謝調節を行っていることが知られている。以上の実験結果より、S1P による TNF- $\alpha$  の発現量増加に、S1P<sub>2</sub>/Gq/PKC/PLC 経路が関与している可能性が高いと考えられる。

S1P は T 細胞における二次リンパ組織から末梢への移出制御にも深く関わっている。血液やリンパ液中の S1P 濃度は高濃度に保たれているが、リンパ節内では低濃度になっている。S1P 濃度分布と一致して、血液中の T 細胞表面での S1P 受容体発現はダウンレギュレーションされているが、リンパ節に移住後の T リンパ球は S1P 受容体を再発現し、S1P 依存的にリンパ節外へ移出するモデルが示されている。そこで NKT 細胞ハイブリドーマの S1P による遊走を調べるため、ボイデンチャンバーシステムを利用して遊走実験を行った。上部チャンバーに NKT 細胞ハイブリドーマを入れ 24 時間インキュベートを行い、ケモタキセル膜上の細胞数を計数した。下部チャンバーに S1P を加えると、S1P に対する遊走が観察された。S1P 受容体をダウンレギュレーションさせる薬剤である FTY720 で前処理を行うと、S1P に対する遊走は見られなくなった。この結果より、NKT 細胞ハイブリドーマの遊走は S1P 受容体を介した反応であると考えられる。NKT 細胞ハイブリドーマは NKT 細胞に特異的なケモカイン受容体 CXCR6 を発現している。NKT 細胞ハイブリドーマで、CXCR6 のリガンドである CXCL16 に対する遊走が観察された。S1P は CXCL16 と同等の遊走促進作用を示した。Rho キナーゼ阻害剤 Y-27632 で処理を行うと遊走は増加し、Gi 阻害剤である百日咳毒素で処理を行うと S1P による遊走は抑制された。以上の結果より、NKT 細胞ハイブリドーマにおいて S1P は S1P 受容体を介した Rac の活性化により遊走を誘導していると考えられる。アテローム性動脈硬化病変部位には NKT 細胞が動員されることが報告されている。肥満は脂肪組織の低酸素状態を引き起こすが、低酸素刺激で脂肪細胞の S1P 放出が増加することがこれまでの研究によって明らかとなっている。局所的に高濃度となった S1P が NKT 細胞を誘引することで、病態の進展に寄与する可能性が考えられる。

合併症を持たない高血圧症あるいは脂質異常症の患者 120 名を対象に、高速液体クロマトグラフィーを用いて血中 S1P 濃度を測定し、病態との関連を解析した。患者の血漿中 S1P 濃度とボディマス指数 (Body mass index ; BMI) に正の相関が見られた (相関係数 Kendall's  $\tau = 0.205$ , 有意確率  $P = 0.001$ )。BMI を 25 以上のグループと 25 未満のグループに分け、平均血中 S1P 濃度の比較を行った結果、BMI が 25 未満のグループに対し、25 以上のグループでは有意に血中 S1P 濃度が高かった。S1P 刺激によってヒト肝癌細胞 HepG2 または 3T3-L1 脂肪細胞のプラスミノゲンアクチベーターインヒビター -1 (plasminogen activator inhibitor-1: PAI-1) 産生が増加するという実験結果がある。PAI-1 は線溶系の主な阻害因子で、血中 PAI-1 レベルの増加はアテローム血栓症と関連する。そこで ELISA 法によって血漿中の PAI-1 濃度を測定し、相関分析を行った。その結果、血漿中 S1P レベルと PAI-1 濃度の間には有意な正の相関が見られた (相関係数 Kendall's  $\tau = 0.265$ , 有意確率  $P < 0.001$ )。これらの結果より、ヒトにおいても肥満によって血漿中 S1P 濃度が上昇すると考えられる。また S1P と PAI-1 に有意な相関が見られるため、血漿中で上昇した S1P が PAI-1 産生を誘導し、線溶系を低下させている可能性も考えられる。

本研究により、1) 高濃度の S1P は NKT 細胞ハイブリドーマにおいて炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  産生を増加させること、2) S1P は NKT 細胞ハイブリドーマの遊走を促進すること、3) 肥満は血漿中 S1P 濃度の上昇を誘導することが明らかになった。肥満はメタボリックシンドロームの重要な危険因子であるが、肥満によって増加した S1P が NKT 細胞の炎症反応を誘導して心血管疾患を増悪させる可能性が考えられる。S1P 受容体を介した TNF- $\alpha$  の発現制御機構や NKT 細胞の遊走促進機構はメタボリックシンドロームの予防あるいは治療の標的になり得る。

### 論文審査の結果の要旨

申請者は本研究において肥満によって誘導された生理活性脂質スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) が、自己免疫疾患、アレルギー、動脈硬化などにおいて T 細胞抗原受容体を介して様々なサイトカインを産生し自然免疫系と獲得免疫系を賦活することで病態の調節に重要な役割を果たしている natural killer T cell (NKT 細胞)の免疫応答調節機構に影響を及ぼしているという仮説を立てた。S1P による NKT 細胞の免疫応答調節機構の解析および肥満による血漿中 S1P レベルの上昇機構の解析を行った。申請者はまず高濃度の S1P は NKT 細胞ハイブリドーマおよびマウス NKT 細胞において炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  産生を増加させることを示し、TNF- $\alpha$  発現量増加は S1P 受容体と PKC 経路を介した作用であることを明らかにした。次に S1P は NKT 細胞ハイブリドーマの遊走を促進することを示し、S1P 受容体下流にある G タンパク質の経路が NKT 細胞ハイブリドーマの遊走制御に関与していることを明らかにした。さらに、ヒト血漿中 S1P 濃度は肥満の指標である BMI および線溶系の生理的阻害物質である PAI-1 の血漿濃度と正の相関を示すことを明らかにし、血漿中

S1P 濃度が高い患者では血漿中 PAI-1 および TNF- $\alpha$  のレベルが高く、血管内皮機能の指標となる FMD 値が低い傾向となることを明らかにした。肥満はメタボリックシンドロームの重要な危険因子であり、肥満によって増加した S1P が NKT 細胞の炎症反応を誘導して心血管疾患を増悪させる可能性を示した。本論文は S1P 受容体を介した TNF- $\alpha$  の発現制御機構や NKT 細胞の遊走促進機構はメタボリックシンドロームの予防あるいは治療の標的になり得る可能性を明らかとしたものであり、NKT 細胞を標的とした新たな疾患治療法の開発や創薬研究に大きく貢献することを示唆する。学位論文として価値あるものと認める。