The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	免疫学的監視機構による梗塞後心筋細胞死誘導機構の解明と新規心不全治療法の開発
Author(s)	松本, 浩太朗
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72333
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　松本　浩太朗　　）	
論文題名	免疫学的監視機構による梗塞後心筋細胞死誘導機構の解明と新規心不全治療法の開発

論文内容の要旨

社会の高齢化、食の欧米化に伴い心不全患者は増加の一途を辿っている。医学の目覚ましい進歩にも関わらず、心不全の予後は悪く、新規治療標的の探索が必要不可欠である。心不全の発症・進展に心筋細胞死が寄与していることは広く受け入れられているが、その機序には不明な点が多い。従来、心筋細胞死の分子機構として、心筋細胞内の活性酸素種 (ROS) 産生やCa^{2+} overload等の細胞自律的な細胞死が想定されてきたものの、産生されたROS量や上昇した細胞内Ca^{2+}濃度が細胞死を惹起するに十分であるか否かに関しては議論の余地がある。また、近年、免疫・炎症反応が心血管疾患の増悪を促進していることが多数報告されている。そこで、本研究では、傷害心筋細胞・細胞傷害性免疫細胞間相互作用に着目し、免疫学的側面から心筋細胞死の機序を追究した。

生体内には、「免疫学的監視機構」と呼ばれる、癌細胞やウイルス感染細胞を除去する機構が備わっている。この機構では、NK細胞やγδT細胞といった細胞傷害性免疫細胞が、細胞膜上に発現している活性化受容体、Natural Killer Group 2 member D (NKG2D) を介して、標的細胞上のNKG2Dリガンド (NKG2DL) を認識することで、標的細胞にアポトーシスを誘導する。従来、癌の発症抑制機構、あるいは、ウイルス感染細胞除去機構として理解されてきた機構であるが、免疫学的監視機構が傷害を受けた心筋細胞に対しても機能し、細胞非自律的な心筋細胞死に寄与している可能性を想起し、検討を行った。

まず、マウスの左冠動脈を結紮することにより心筋梗塞 (MI) モデルマウスを作製した。MI後の心臓を回収し、解析を行った結果、NKG2DLの一つであるRetinoic acid early induced transcript-1 (Rae-1) の発現が傷害領域及び境界領域において認められた。Rae-1のアイソフォームのうちRae-1εがNKG2Dと最も親和性が高く、病態形成に大きく関与している可能性が高いとの仮説のもと、Rae-1εに着目して検討を進めた。Rae-1の発現誘導機序を追究したところ、p53がRae-1ε遺伝子のプロモーター領域に結合することで転写制御を行っていることを明らかにした。

次にMI後、心臓組織に浸潤してくる免疫細胞の解析を行った。その結果、梗塞後心臓組織に存在するNKG2D陽性免疫細胞は主にγδT細胞であった。また、γδT細胞の濃縮前後でパーフォリン及びグランザイムBの発現を比較したところ、濃縮後において発現の増加が認められた。したがって、これら因子がγδT細胞から産生されていることが示された。続いて、Rae-1εを過剰発現させた心筋細胞とγδT細胞を共培養した結果、アポトーシス陽性心筋細胞数が顕著に増加した。以上の検討により、心筋細胞上のRae-1εとγδT細胞上のNKG2Dが相互作用することによって、心筋細胞にアポトーシスが誘導されることを見出した。

さらに、NKG2D/NKG2DL機構の病態学的意義をin vivoにおいて検討した。MI後のマウスにRae-1εの阻害抗体を投与したところ、心筋細胞アポトーシス及び心筋線維化が有意に抑制された。同時に心肥大や心機能低下も抑制されており、心不全病態の改善傾向が認められた。しかし、本検討では阻害抗体を腹腔内投与しており、これらのデータだけでは抗体が心臓以外の組織において作用している可能性は否定できない。したがって、NKG2D/NKG2DL相互作用の心臓における重要性を検証するため、心筋細胞特異的にRae-1εを過剰発現させたトランスジェニック (TG) マウスを作製した。TGマウスは野生型マウスと比べて正常時の表現型に差は見られなかったが、MI後では、予想通り、心筋細胞アポトーシス及び心筋線維化割合が増加していた。さらに、心肥大を伴った心機能の悪化も引き起こされ、心筋細胞におけるNKG2D/NKG2DL相互作用の増強は心不全病態の悪化に繋がることが示された。

マウスによる検討により免疫学的監視機構の抑制が新規心不全治療戦略となる可能性は見出せたものの、NKG2DLは動物種間で保存されていない。そのため、ヒトへの臨床応用を目指す際、Rae-1εに対応するヒトNKG2DLを同定する必要がある。そこで、ヒトiPS細胞由来心筋細胞にp53を過剰発現させたところ、UL16-binding protein 1 (ULBP1) が有意な発現上昇を示した。ULBP1はGlycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型タンパク質であり、Rae-1εと共通の構造を有しているため、ULBP1がRae-1εに対応するNKG2DLである可能性が高い。

本研究により、NKG2D/NKG2DLシステムを介した傷害心筋細胞・細胞傷害性免疫細胞間相互作用が心筋細胞死を誘

導し、MI後の心リモデリングを促進していることを見出した。これまで免疫反応の制御を機序とした心不全治療薬は考案されておらず、本研究成果が、画期的な心不全治療法の開発に貢献しうると考える。また、ヒトiPS細胞由来心筋細胞等の細胞移植治療における免疫拒絶反応を抑制することにより、生着率を向上できる可能性がある。免疫学的監視機構が心筋細胞の病的状態をモニタリングするという機構は、生理的には長期のライフスパンにおける品質管理としての機能も有していると考えられ、循環器領域における新たな概念の提唱を意味するものである。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（松本　浩太朗　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
主 査	教授	藤尾　慈
副 査	教授	橋本　均
副 査	教授	井上　豪

論文審査の結果の要旨

哺乳類の心筋細胞は生直後に分裂能を著しく失うため､様々な循環器疾患によって誘導される心筋細胞死は、心筋細胞数の減少を招き、その結果、心機能の低下、すなわち心不全の発症につながる。これまで、ストレスによって心筋細胞死が誘導される分子機序に関して、数多くの研究がなされてきたが、その全容が解明されたとは言い難い。本研究において、学位申請者は、心筋細胞と免疫細胞との相互作用という観点から、心筋細胞死の分子メカニズムの解明を試みた。これまでの心筋細胞死研究の多くが、細胞内シグナルに焦点を絞って、すなわち、細胞自律的な細胞死に焦点を絞って行われてきたのに対し、細胞非自律的な細胞死という観点から心不全の発症機序にアプローチした点が独創的である。

学位申請者は、本研究の中で、以下のことを見出した；

1　マウスに心筋梗塞を発症させると、傷害を受けた心筋細胞において、がん抑制遺伝子p53依存性にNKG2DLの一つであるRae-1が誘導される

1　梗塞後の心筋組織に浸潤したγδT細胞がNKG2Dを介してRae-1を認識することにより、傷害を受けた心筋細胞に細胞死を誘導する

1　NKG2D/NKG2DL相互作用阻害は、心筋細胞死を抑制し、梗塞後心不全の発症を抑制する

1　心筋細胞におけるNKG2D/NKG2DL相互作用の増強は、心筋細胞死を促進し、梗塞後心不全を悪化させる。

これらのことは、NKG2D/NKG2DLシステムを介した、傷害心筋細胞・細胞傷害性免疫細胞間相互作用が、心筋細胞死を誘導し、心筋傷害後の組織リモデリングを増悪させ心不全発症を誘導すること、逆にNKG2D/NKG2DLシステムの阻害は、心不全発症を抑制することを示している。

以上、本論文は、心不全発症の新たな分子機序を見出し、また、新規心不全治療法を提唱するものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。