

アルコール慢性摂取はNKT様細胞活性の下方制御によりマウス骨粗鬆症を誘発する

目的： アルコールの慢性摂取（CAC）は多臓器に及ぶ悪影響をもたらし、特に骨組織においては続発性骨粗鬆症の原因となる。骨組織は、間葉系幹細胞由来の骨芽細胞と造血性幹細胞由来の破骨細胞との連関によりその恒常性が維持されている。近年の骨免疫学の発展に伴い、骨粗鬆症の鍵となる破骨細胞の分化成熟には破骨細胞分化因子RANKL（receptor activator of NF- κ B ligand）が中心的役割を果たす一方、IL-4やIFN γ が抑制的に作用していることが明らかとなった。CACは炎症性サイトカインを介して破骨細胞分化に関与するが、その分子生物学的機序には不明な点が多い。

哺乳動物の免疫システムは、抗原特異性の高いT細胞、B細胞による獲得免疫と、即時的反応が可能な抗原提示細胞による自然免疫に大別される。自然免疫に属するNatural Killer - T（NKT）細胞はNK1.1、CD3分子を表面抗原に持ち、抗原提示細胞が呈するCD1d分子を介して糖脂質を特異的に認識しNK細胞とTh1、Th2双方の形質、すなわちIL-4、IFN γ の多量かつ即時的産生能を持つT細胞亜群である。われわれは、本研究の過程において、TCR-CD1d複合体の検出頻度に劣るがNKT細胞とよく似たサイトカイン産生能をもつNKT様細胞を見出した。これをNKT-like細胞と呼称し、NKT細胞とともにCACがこれらの細胞を介して破骨細胞の活性に影響を及ぼし、続発する骨粗鬆症に関与していると仮説をたて検証した。

方法： 生後9週から水および10%エタノールを4週間投与した野生型雌マウスをそれぞれコントロール群（WT）、アルコール投与群（Alc）とし、生後13週で安楽死させ両側下肢骨を採取した。骨形態解析には末梢骨定量CT（pQCT）と μ CTを用い、脛骨骨端線から約1mm遠位の2次海綿骨領域において骨梁密度、骨量（BV/TV）を、骨幹部中央で皮質骨密度を測定した。また、骨代謝動態解析にはリアルタイム定量PCR（RT-qPCR）を用い、凍結粉碎した大腿骨遠位端をサンプルとして骨吸収および骨形成に関する遺伝子発現頻度を定量した。細胞解析に

はフローサイトメーターを用い、樹状細胞、マクロファージ、CD4、8陽性 (CD4+, CD8+) T細胞、Natural killer (NK) 細胞、NKT様(NKT-like)細胞の分布および細胞内サイトカイン (IFN γ 、IL-4) を測定した。これらのモデルに加え、NK T細胞の糖脂質抗原でありIL-4を選択的に誘導するOCHをアルコール投与群に接種したOCH投与群 (Alc/OCH) を設定し、上記手法により骨代謝動態を解析した。

結果： WTにおける骨基質中の各種免疫細胞の存在比率において、NKT-like細胞が最多であった。また、各種免疫細胞が産生するIL4産生量は、NKT-like細胞由来のものが有意に高値であった。Alcにおいて、各骨密度および骨量は有意に減少し、骨組織切片におけるTRAP染色の信号強度が増強した。また、NKT-like細胞由来のIL-4産生量は有意に低下し、骨吸収を示すNFATc1、Rank1発現量は有意に増加した。加えて、CD4+T細胞、NK細胞、NKT細胞、NKT-like細胞のCD69発現量はいずれも減少した。さらに、NKT-like細胞におけるTh2の転写因子GATA3は減弱した一方、Th1の転写因子T-betは不変であった。マクロファージ、樹状細胞においては、CD1d分子発現量、IL-12産生量の双方が有意に減少した。

Alc/OCHにおいては、骨梁密度は有意に増加した。NFATc1は変化がない一方、Rank1、Bglapは減少した。NKT細胞由来のIL-4は、OCH投与群で増加し、IL4、IFN γ を阻害すると、骨梁密度は減少した。

考察：本研究は、CACが抗原提示細胞のCD1d分子発現量、IL-12産生量の低下を通じてNKT細胞、NKT-like細胞のTh2機能を減弱し、IL-4の産生低下による続発性骨粗鬆症を惹起すること、また、OCHはNKT細胞、NKT-like細胞のIL-4産生を促し、骨梁密度および骨量の増加に寄与することを明らかにした。飲酒後における一連の免疫応答の変容は、骨髄内脂肪の組成変化が自然免疫細胞の活性化に必要な糖脂質抗原を減じ、CD1dおよびIL-12の産生量低下という形で顕在化することでNKT細胞、NKT-like細胞活性を下方制御に導く結果、続発性骨粗鬆

症を発症するというメカニズムを考察した。OCHをはじめ、自然食品や牛乳に含まれる良質な糖脂質抗原はNKT細胞、NKT-like細胞の賦活化を介してアルコール慢性摂取による続発性骨粗鬆症の治療に資する可能性を有すると考える。