

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Alcohol consumption induces murine osteoporosis by downregulation of natural killer T-like cell activity

アルコール慢性摂取はNKT様細胞活性の抑制によりマウス骨粗鬆症を誘発する

日本医科大学大学院医学研究科 微生物学・免疫学分野
研究生 成尾 宗浩

Immunity, Inflammation and Disease (2021年) 掲載

DOI: 10.1002/iid3.485

アルコール慢性摂取は多臓器に悪影響をもたらし、特に骨組織では続発性骨粗鬆症の原因となることが知られている。骨組織は、間葉系幹細胞由来の骨芽細胞と造血幹細胞由来の破骨細胞によりその恒常性が維持されている。近年の骨免疫学の進展により、RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が破骨細胞の分化を促進し、IL-4 や IFN- γ は抑制することが明らかにされた。アルコール慢性摂取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、その免疫学的機序には不明な点が多い。

哺乳類の免疫システムは、抗原特異的に機能する T 細胞と B 細胞から成る獲得免疫とパターン分子に即時的に反応する自然免疫に大別される。Natural killer T (NKT) 細胞は NK1.1 と CD3 を細胞表面に発現し、抗原提示細胞の CD1d を介して糖脂質を特異的に認識し、多量の IL-4、IFN- γ を即時的に産生するユニークな T 細胞集団である。申請者は、本研究で α -GalCer-CD1d テトラマーで認識されない NKT 様細胞 (NKT-like 細胞) が骨基質中に多く存在することを見出した。そこでアルコール慢性摂取が NKT-like 細胞を介して破骨細胞の活性に影響を及ぼし、骨粗鬆症を発症させるのか否かを検証した。

9 週齢の野生型雌マウスに水または 10% エタノールを 4 週間経口投与し、両側下肢骨を採取した。エタノール投与群の一部では、NKT 細胞の糖脂質抗原であり IL-4 産生を誘導する OCH の投与群を設定した。まず末梢骨定量 CT とマイクロ CT により骨形態を解析し、脛骨骨端線から約 1 mm 遠位の 2 次海綿骨領域の骨梁密度と骨量を、骨幹部中央で皮質骨密度を測定した。次に大腿骨遠位端を凍結粉碎し、骨吸収および骨形成の制御に関わる遺伝子を定量 RT-PCR で測定した。またフローサイトメーターにより樹状細胞、マクロファージ、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、NKT-like 細胞の割合とサイトカイン (IFN- γ 、IL-4) の産生を測定した。

野生型マウスの骨基質では、NKT-like 細胞は最大の免疫細胞集団であり、有意に高い IL-4

産生能を有することが明らかとなった。エタノール投与群では各骨密度と骨量は有意に減少し、骨組織切片の TRAP 染色の信号強度が増強した。また、NKT-like 細胞の IL-4 産生量は有意に低下し、骨吸収に関与する *Nfatc1*、*Tnfsf11* の骨基質中の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 転写因子 *Gata3* の発現は低下したが、Th1 転写因子 *Tbx21* は不変であった。マクロファージと樹状細胞の CD1d の発現と IL-12 の産生は有意に低下した。

一方、OCH の投与により NKT-like 細胞の IL-4 産生は増加し、骨梁密度も有意に増加した。骨基質中の *Nfatc1* の発現レベルに変化はないが *Tnfsf11* と *Bglap* の発現は減少した。更に OCH による骨梁密度の増加は IL-4 中和抗体の投与により抑制された。

本研究により、アルコール慢性摂取は抗原提示細胞の CD1d の発現と IL-12 の産生を低下させ、NKT-like 細胞の IL-4 の産生を低下させることにより骨粗鬆症を惹起することが明らかとなった。更に OCH は NKT-like 細胞の IL-4 の産生を促し、骨梁密度および骨量を増加させることを明らかにした。飲酒による骨髄の脂肪組織由来の糖脂質抗原の減少が、本研究で明らかにされたアルコールによる続発性骨粗鬆症の免疫学的機序の発端と推測される。

第二次審査では *Gata3* 発現低下の分子機序、大腿骨頭壊死やくる病との関連、年齢との相関性、アルコールの骨芽細胞への直接影響の可能性、骨組織染色の診断的意義など多岐にわたる質問がなされたが、的確な解答が得られ、申請者が本研究に関連する科学的知識を十分に有していることが示された。以上のことから本論文は学位論文として価値あるものと認定した。