

氏名	おざわ 小澤 忠嗣
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 728 号
学位授与年月日	令和 7 年 3 月 17 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	ヒト脳梗塞急性期における末梢血 Mucosal-Associated Invariant T Cells (MAIT 細胞) の動態と機能に関する研究
論文審査委員	(委員長) 教授 高橋 将文 (委員) 准教授 早川 盛禎 講師 瀬原 吉英

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

脳梗塞急性期において虚血に加え、梗塞巣における炎症の増幅が病態悪化と予後不良に強く関係している。近年、脳梗塞急性期に T リンパ球が梗塞巣で炎症を増幅させ病態悪化に関係していることが明らかにされてきた。我々は innate-like T 細胞に分類される T 細胞群の一つである Mucosal-Associated Invariant T cells (MAIT 細胞) の機能に注目してきた。脳梗塞と MAIT 細胞の関連について、現在までに MAIT 細胞をノックアウトしたマウスに脳梗塞をもたせると、梗塞巣が有意に縮小し、予後も良好となることが確認されている。MAIT 細胞はマウスよりヒトのリンパ球中により多く存在することが分かっており、MAIT 細胞制御はヒト脳梗塞急性期治療の新たな治療ターゲットとなることが期待される。一方でヒト脳梗塞急性期における MAIT 細胞の動態とその機能的役割は不明である。本研究の目的は、ヒト脳梗塞急性期の末梢血 MAIT 細胞の動態と機能を解析し、MAIT 細胞制御をターゲットとした新たな治療薬開発の基盤となるデータを構築することである。

### 2 研究方法

自治医科大学附属病院へ入院した脳梗塞急性期重症例 (National Institutes of Health Stroke Scale [NIHSS] スコア  $\geq 10$ )、軽症例 (NIHSS スコア  $< 10$ )、対照として、外来通院している非脳梗塞急性期例をコントロールとして登録した。脳梗塞症例は、発症 3、10、17 日にフローサイトメトリーで末梢血 MAIT 細胞の T 細胞中の割合、活性 (CD69 陽性率)、サイトカイン産生能 (IFN- $\gamma$ 、IL-17 陽性率) を測定した。同じく innate-like T 細胞の invariant natural killer T (iNKT)、gamma delta T ( $\gamma\delta$ T) 細胞、他に、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞も測定した。また、血清サイトカイン 18 種を 3 日目に測定した。コントロール例は受診日にそれぞれ同様に測定した。そして、臨床背景や病状経過を収集し、脳梗塞の重症度や予後、他の T 細胞サブセット、サイトカインの変化と MAIT 細胞の関連を検討した。特に予後については、予後良好群 (発症前 modified Rankin Scale [mRS] 0-1 の場合、3 か月後 mRS 0-1、発症前 mRS 2 の場合、3 か月後 mRS 2 以下にそれぞれ回復と定義)、予後不良群を設定し、予後不良との関連を検討した。

### 3 研究成果

脳梗塞重症群 30 名、軽症群 40 名、対照群 30 名を登録した。重症群、軽症群、対照群の男性はそれ

それぞれ 19 名 (63.3 %)、28 名 (70.0 %)、18 名 (60.0 %)、平均年齢は  $77.3 \pm 9.4$  歳、 $73.9 \pm 7.3$ 、 $73.1 \pm 8.3$  と 3 群間で有意な差はなかった。フローサイトメトリーの解析では、脳梗塞全体と対照群との比較では、脳梗塞 3 日目の T 細胞中の MAIT 細胞割合のみが統計学的に有意な減少がみられた。重症と軽症、対照の各群との比較では、脳梗塞 3 日目の末梢血 MAIT 細胞割合が重症群において著しく減少した一方、軽症群では変化がみられなかった (重症・軽症・対照 [中央値: 4 分位範囲]: 0.09 % [0.07-0.15], 0.33 % [0.15-0.92], 0.38 % [0.19-1.09]:  $p < 0.0001$ )。また、重症群で著しく減少した MAIT 細胞は、10 日、17 日にかけて回復傾向がみられた。さらに、重症群の MAIT 細胞は対照群と比べ 3 日から CD69 陽性率、IL-17 陽性率が有意に上昇していた。iNKT 細胞も、3 日目に対照群と比べ重症群において有意な減少を認めたが MAIT 細胞の変化と比べ統計学的な差は軽度であった。 $\gamma \delta$  T 細胞や CD4・CD8 陽性 T 細胞は対照群と比べ有意な変化は認めなかった。また、MAIT 細胞の軽症群では重症群で認められた変化は認めなかった。

重症度との関連について、入院時の NIHSS スコアと 3 日目の MAIT 細胞割合は負の相関を示した ( $r = -0.4262$ ,  $p = 0.0002$ )。予後との関連について 3 か月後の mRS と 3 日目の MAIT 細胞割合は負の相関 ( $r = -0.5119$ ,  $p < 0.0001$ ) がみられた。3 か月後予後不良群は予後良好群と比べ、3 日目の MAIT 細胞割合は有意に減少していた (予後良好群, 予後不良群 [中央値: 4 分位範囲]: 0.50 % [0.19-1.14], 0.11 % [0.07-0.18],  $p < 0.0001$ )。さらに、3 日目の MAIT 細胞割合を 4 分位で分けて関連する因子を含む多変量解析を行った結果、最低四分位群は、最高四分位群に比べ転帰不良が有意に多かった (オッズ比: 21.64、95%信頼区間: 1.41-331.58,  $p = 0.0273$ )。

#### 4 考察

本研究では、脳梗塞の早期に対照群と比較し、末梢血 MAIT 細胞が著しく減少した。さらに、MAIT 細胞の有意な減少は、重症脳梗塞において特異的であり、軽症脳梗塞では確認されなかった。また、3 日目の MAIT 細胞は、入院時の NIHSS スコアにより評価した重症度および脳卒中後 3 か月の mRS により評価した転帰不良の両者とも有意に負の相関を認めた。一方で、iNKT 細胞や  $\gamma \delta$  T 細胞の割合の変化は MAIT 細胞に比べ軽微であった。

MAIT 細胞に加え、iNKT、 $\gamma \delta$  T 細胞を主とする innate-like T 細胞は、さまざまな疾患で重要な役割を果たしており、脳卒中を含む中枢神経疾患においても注目されている。脳梗塞では、 $\gamma \delta$  T 細胞は脳梗塞動物モデルにおける病態増悪への関与が報告されているが、ヒト脳梗塞の末梢血の解析においては細胞数の変化や重症度や予後との関連は一定していない。iNKT 細胞は脳梗塞動物モデルにおいても増悪との関連が一定しておらず、ヒト脳梗塞の末梢血の解析では、予後不良との関連が示されているものもあるが、数の変化を含め必ずしも一定していない。

MAIT 細胞についてはヒト脳梗塞についての既報はないが、近年多くの疾患において、病態に関与していることが報告されてきた。関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症などの自己免疫疾患、さらに、糖尿病、肥満、悪性腫瘍などの自己免疫疾患以外の疾患でも、MAIT 細胞の病態への関与が示されている。MAIT 細胞の特徴的な動態として、これらの疾患に共通して末梢血中の MAIT 細胞数は減少し、一方、病変組織では MAIT 細胞の浸潤や活性化が確認されている。また、中枢神経系の疾患では、多発性硬化症患者で再発寛解型において、寛解期より疾患活動性が高い再発時に末梢血 MAIT 細胞の減少が顕著である。また、再発寛解型に対しより疾患活動性が高いと予測される一次進行型において末梢血 MAIT 細胞の減少が報告されている。近年では神経変性疾患であるアルツハイマー病でも MAIT 細胞の病態への影響と治療の可能性を示す報告がされている。本研究における末梢血 MAIT 細胞の減少はこれ

らの研究結果と一致するものであり、多発性硬化症やアルツハイマー病等と共に中枢神経疾患の一つである脳梗塞においても MAIT 細胞が重要な役割をもつことが示唆される。

本研究では、末梢血 MAIT 細胞の時間的な変化に加えて、軽症、重症群の両方で CD69 陽性率が上昇し活性が亢進していることが示された。さらに、重症群では対照群と比較して 3 日目と 10 日目に炎症性サイトカインである IL-17 産生能の亢進がみられた。2 型糖尿病、肥満、強直性脊椎炎の末梢血では、MAIT 細胞の IL-17 産生増加が観察され、さらに病変組織でも MAIT 細胞の IL-17 産生の増加が観察されている。これらの結果は、末梢血 MAIT 細胞の動態から病変組織における MAIT 細胞の動態への影響が予想される。IL-17 は、脳梗塞後の脳組織障害を促進する重要な炎症性サイトカインの一つである。これらの研究結果は、MAIT 細胞の活性化と IL-17 産生増加が虚血性脳損傷の病態に積極的に関与し、ヒト脳梗塞後の転帰不良と関連しているという本研究の結果を支持するものである。

本研究では、脳梗塞 3 日目の MAIT 細胞割合が 3 か月後の予後不良と有意に関連していることを示した。最近の研究では、肝不全患者や非小細胞肺癌、ループス腎炎等で、末梢血 MAIT 細胞が予後を予測する有用なマーカーであることが報告されている。本研究の結果から、これらの疾患と同様に MAIT 細胞が脳梗塞急性期における予後不良の予測因子として有用な可能性を示した。

## 5 結論

ヒト脳梗塞急性期では重症度に関連して末梢血 MAIT 細胞が減少し、活動性や IL-17 産生が亢進していた。これらの結果から、自己免疫疾患を含む様々な疾患における報告と同様に、脳梗塞急性期の病態増悪に MAIT 細胞が有意に関連し、重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、発症早期の末梢血 MAIT 細胞減少と脳梗塞の予後には有意な相関がみられ、脳梗塞後の予後予測の有力な因子にもなり得ることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

脳梗塞の急性期では、虚血による直接的な細胞死に加えて、酸化ストレスや過剰な炎症反応が、その病態増悪に大きく寄与しているが、炎症を生じる免疫機序は未だ不明な点が多い。一方、近年、自然免疫型 T 細胞が様々な疾患における炎症惹起の起点となる可能性が示されている。今回、申請者は、ヒト脳梗塞急性期において MAIT 細胞や iNKT 細胞、 $\gamma\delta$  T 細胞といった自然免疫型 T 細胞サブセットの末梢血中の変化、および脳梗塞重症度や神経学的予後といった臨床経過との関連を検討した。

その結果、

1) 自然免疫型 T 細胞サブセットの変化: 脳梗塞早期において MAIT 細胞が有意に減少しており、特に重症群において減少が著しく、その後に回復していた。また、重症群での MAIT 細胞では、CD69 および IL-17 陽性率が増加していた。一方、iNKT 細胞も早期で減少していたが、MAIT 細胞と比較するとその程度は少なかった。 $\gamma\delta$  T 細胞や CD4、CD8 陽性 T 細胞には有意な変化を認めなかった。

2) 重症度との関連: 入院時の NIHSS スコアと脳梗塞早期の MAIT 細胞割合は負の相関を示した。

3) 予後との関連: 3 ヶ月後の mRS で評価した予後不良と、脳梗塞早期の MAIT 細胞減少の割合は負の相関を示した。さらに、早期の MAIT 細胞割合を 4 分位で分けて解析したところ、最低 4 分位にいた患者では、最高 4 分位にいた患者に比較して転帰不良が有意に多かった。

以上の結果から、ヒト脳梗塞急性期では重症度に関連して末梢血 MAIT 細胞が減少し、これが脳梗塞後の予後不良にも関連することが明らかになった。

本研究の研究目的は明確で、研究方法も妥当である。特に、ヒト脳梗塞症例での知見は新規性や独自性もあり、将来的に脳梗塞臨床にも寄与することが期待される。また、本研究成果は、炎症が関与する様々な疾患の病態解明にも繋がる可能性がある。これらのことから、審査員全員一致で博士論文に相応しいと評価した。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は、研究背景や目的、方法、結果、考察について、決められた時間内で要領よく説明した。その内容の骨子は「論文審査の結果」に記載したとおりである。なお、審査委員からなされた主な質問やコメントは以下の通りである。

- 1) MAIT 細胞についての一般的な知識と、脳梗塞等の疾患におけるこれまでの報告
- 2) 脳梗塞後の炎症におけるマクロファージや好中球といった一般的な炎症細胞の寄与や MAIT 細胞との相互作用について
- 3) 脳梗塞部位への MAIT 細胞が集簇する機序としての、ケモカインの関与について
- 4) MAIT 細胞は IL-17 を産生するが、血中 IL-17 に差がなく、他の炎症性サイトカインである IL-6 や IL-8、MCP-1 に有意差を認めた機序
- 5) 解析を 3 日、10 日、17 日で行った理由
- 6) 方法に用いたフローサイトメトリー解析について

申請者は、ほとんどの質問に対して的確に返答した。一部の質問に関しては、検討されていない、あるいはこれから検討予定とのことで、申請者自身の仮説を交えることで適切に答えることができた。また、提出された学位論文では、一部の指摘事項について、適切に修正かつ加筆された。

以上の発表および質疑応答から、申請者が十分な資質と能力を有していることが明らかになり、審査委員全員一致で合格と判断された。