

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09699

研究課題名(和文) 脳梗塞におけるMAIT細胞制御と新規治療法に関する研究

研究課題名(英文) The association between MAIT cell and acute ischemic stroke

研究代表者

田中 亮太 (TANAKA, RYOTA)

順天堂大学・医学部・客員准教授

研究者番号：40407284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞急性期の病態と自然リンパ球MAIT (Mucosal-Associated-Invariant T) 細胞の関係について検討した。MAIT細胞ノックアウトしたマウスでは、コントロール群に比し脳梗塞巣体積が有意に減少し、脳梗塞後の神経学的機能障害が改善した。MAIT細胞ノックアウトマウスの梗塞巣ではミクログリアの活性が抑制され、炎症性サイトカインの産生が減少していた。MAIT細胞を抑制するリガンドを投与したマウスにおいてもノックアウトマウスと同様に脳保護効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで脳梗塞急性期病態へのMAIT細胞の関与は不明であったが、今回の研究結果からMAIT細胞の制御が脳梗塞急性期の新たな脳保護治療薬の有力な候補となりうることが判明した。現在脳梗塞治療の中核は閉塞血管の再開通療法であるが、これら治療の対象となる症例は一部である。これら再開通療法に加え、新しい脳保護治療の治療戦略を開発・構築していくことは脳梗塞患者の予後改善と健康寿命の延伸に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study is to assess the association between MAIT (Mucosal-Associated-Invariant T) cell and acute ischemic stroke. We used MAIT cell knockout mice and introduced transient middle cerebral infarction. MAIT cell knockout mice showed statistically significant reduction of infarct volume followed by neurological improvement compared with control group after focal ischemia. MAIT cell knockout mice also showed the attenuation of number of iba-1 positive microglia and its activation in the ischemic brain. Inflammatory cytokine such as IL-1、IL-6 and IL-17 in ischemic brain was reduced in MAIT knockout mice compare with control group. We finally injected ligand to attenuate MAIT cell to mice introduced transient focal ischemia. We found treatment with ligand of MAIT cell was protective for acute focal cerebral ischemia in mice. These result suggest that the attenuation of MAIT cell will be strong candidate for new neuroprotective treatment for acute ischemic stroke.

研究分野：神経内科学

キーワード：脳梗塞急性期 自然リンパ球 MAIT 炎症制御 新規脳保護治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は本邦の死因の第3位、寝たきりの原因の第1位であり、極めて社会保障負担の大きい疾患である。その75%以上を占める脳梗塞の治療戦略は、発症4.5時間以内の静注血栓溶解療法とカテーテルによる血栓回収療法が主体となるが、その恩恵にあずかる症例は少ない。そのためより均てん化した脳梗塞治療の選択肢として脳梗塞の病態に即した脳保護薬に対する期待は大きい。現在臨床現場では、フリーラジカル消去作用のあるエダラボンが脳梗塞急性期の脳保護薬として本邦で承認使用されているが、その効果は限定的である。脳梗塞急性期の病態には大量のフリーラジカル産生に伴う酸化障害以外に炎症反応やアポトーシス細胞死などの複雑な病態が関与している。近年炎症性T細胞が脳梗塞巣で2次的な炎症を惹き起こし、組織障害の増悪と神経症状の悪化に強く影響することが判明し、Tリンパ球の制御が新たな脳梗塞治療のターゲットとして注目されている。我々は獲得免疫と自然免疫の橋渡しをする自然リンパ球の作用に注目し、脳梗塞急性期の病態に与える影響について研究を行ってきた。その結果自然リンパ球であるMAIT (Mucosal-Associated-Invariant T) 細胞の制御が脳梗塞急性期の脳保護薬として作用する可能性が分かってきた。

2. 研究の目的

本研究は脳梗塞急性期における自然リンパ球であるMAIT (Mucosal-Associated-Invariant T) 細胞の役割を明らかにするとともに、MAIT細胞制御による脳梗塞急性期治療の新たな治療戦略を構築していくことを目的とする。これまでの報告からMAITの各種疾患における役割は異なることが分かっている。関節炎や潰瘍性大腸炎モデルではMAIT細胞が病態悪化に関与すると考えられている一方で、EAEや多発性硬化症モデルではMAIT細胞が病態抑制的に作用することが示されている。申請者らはMAIT細胞を欠損するMR1ノックアウトマウスを用い、脳梗塞急性期モデル(中大脳動脈一過性虚血再灌流モデル)を作成。MAITノックアウトマウスでは脳梗塞巣体積が縮小し、神経学的機能評価が軽減することを観察していた。つまり、MAIT細胞が脳梗塞急性期の病態悪化に関与している可能性が高い知見である。本課題ではMAIT細胞の脳梗塞急性期の病態への役割を詳細に解析しさらには、MAIT細胞を制御するMR1受容体リガンドを用いた新たな脳梗塞急性期の新規脳保護治療の可能性を明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) MR1ノックアウトマウスを用いたMAIT細胞の脳保護効果と神経機能障害

MR1ノックアウト(KO)マウスは、MAIT細胞の活性化に必要なMR1分子をノックダウンしたモデルである。マウスを吸入麻酔下に疼痛、呼吸管理を行い、体温は直腸温で37℃を維持した。マウスの頸部を皮下切開し、総頸動脈、外頸動脈、内頸動脈を分離。外頸動脈を遊離端とし、同部位よりあらかじめコーティングされた栓子を用い中大脳動脈を1時間閉塞し、その後栓子を抜去し再灌流したモデルを作製。梗塞巣の体積と神経学的機能障害の程度を虚血再灌流24時間、72時間後で評価。対照として野生型マウス(C57BL/6)を用い、同様に脳梗塞モデルを作製し比較した。梗塞巣体積は等間隔でスライスした切片をTTX 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride) 染色し、脱色素を示す領域を梗塞巣として判定。1個体あたり等間隔6切片を抽出し、Image-J softを用いて計測した。神経学的機能障害はNeurological Severity Scoreを用いて評価した。

(2) 脳梗塞後脳内ミクログリアの活性化の評価

虚血再灌流後24時間と72時間のマウス脳を灌流固定し脳を摘出。前処置を行った後にクリオスタットを用いて免疫染色用の切片を作成。脳梗塞後のミクログリアの活性化を抗iba1抗体を用い免疫染色し、iba1陽性ミクログリアの活性化と細胞数を組織学的に比較検討。評価は梗塞巣、梗塞周辺部で行った。

(3) 脳梗塞後の脳梗塞巣での炎症性サイトカインの経時的変化

虚血再灌流24時間、72時間後の脳を抽出し、ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 法を用いて、脳内炎症性サイトカインの経時的変化を解析。MR1KOマウスとコントロールマウスの各群で比較し、MAIT細胞制御が脳内炎症性サイトカイン産生に影響するか解析。

(4) フローサイトメトリーによる脳内細胞浸潤評価

FACS (fluorescence activated cell sorter)を用い、脳梗塞後の脳内細胞浸潤の評価。脳内に浸潤する血球成分(白血球、単球、Tリンパ球、Bリンパ球)の細胞数を比較する。特に脳梗塞巣におけるMAIT細胞浸潤の動態について明らかにする。

(5) 脳梗塞急性期に対するMR1受容体に対するリガンド投与の効果

MR1受容体に対するリガンド投与し、脳梗塞縮小効果と神経機能改善効果の有無を評価。MR1ノックアウトマウスの実験と同様に栓子を用いた一過性虚血再灌流モデルを用い、脳梗塞体積と神経学的機能評価を虚血再灌流24時間と72時間で評価。リガンド投与は再灌流直後と虚血再灌流24時間後の2回、尾静脈より投与した。コントロール群に対しては、同様のモデルを用い、尾静脈よりdimethyl sulfoxide (DMSO)を投与した。

4. 研究成果

(1) MR1ノックアウトマウスを用いたMAIT細胞の脳保護効果と神経機能障害

MAIT細胞を欠損するMR1ノックアウト(KO)マウスを用い、中大脳動脈1時間閉塞再灌流モデルを作成し、コントロールマウスと比較した。虚血再灌流24時間後の梗塞巣体積はコントロール群に比しKO群で縮小傾向を認められた(図1)。一方虚血再灌流72時間後の梗塞巣体積はコントロール群に比し、KO群で有意に縮小していた(図1)。神経学的機能評価をNeurological Severity Scoreを用いて各群で比較したが、虚血再灌流24時間時点では有意な神経学的機能評価に差は認められなかったが、虚血再灌流72時間ではコントロール群に比して、KO群で有意に重症度が軽減していた(図1)。MAIT細胞をノックアウトしたマウスでは、虚血再灌流早期より脳梗塞巣の縮小傾向を示し、虚血再灌流72時間後では統計学的有意に縮小していた。梗塞巣の縮小と比例して、神経学的機能障害もコントロール群に比し、KO群で有意に軽減していた。これらの結果はMAIT細胞が脳梗塞急性期において病態悪化に作用している可能性を示唆していた。

(2)脳梗塞後脳内ミクログリアの活性化の評価

脳梗塞周辺領域でのミクログリアの活性化の評価するため抗iba-1抗体を用いて組織学的に評価した。虚血再灌流24時間時点では、ミクログリアの細胞数はコントロール群に比してKO群で低下していた(図2)。またミクログリアの形態的变化はKO群でより活性化の低いresting form (ramified)を呈していた(図2)。虚血再灌流72時間後の評価では、ミクログリアの細胞数はコントロール群に比してKO群で低下していた(図2)。さらにミクログリアの形態的变化はコントロール群でより活性化が強いamoeboid formを呈していた(図2)。これらの結果からMAIT細胞をノックアウトしたマウスでは、虚血再灌流後のミクログリアの活性化が抑制され、炎症性反応が軽減することで脳保護作用を発揮していると推測された。上記データは実験マウスの数を増やして統計学的な解析を行っている。

(3)脳梗塞後の脳梗塞巣での炎症性サイトカインの経時的変化

脳梗塞急性期における脳内サイトカイン産生についてELISA法で解析した。特にIL-1, IL-6, IL-17, IL-23等の炎症性サイトカインに注目して測定した。虚血再灌流24時間後ではKO群はコントロール群に比してIL-6 (305.0 ± 89.9 vs 608.0 ± 43.4 pg/ml, $P < 0.005$), IL-1 (76.2 ± 13.5 vs 165.2 ± 32.8 pg/ml, $P < 0.05$), IL-17 (21.9 ± 2.5 vs 35.6 ± 3.5 pg/ml, $P < 0.005$)は有意に減少していた。一方でIL-23は両群で有意な差は認められなかった(530.2 ± 45 vs 484.1 ± 5.2 pg/ml, NS)。虚血再灌流72時間後ではKO群はコントロール群に比しIL-17 (20.1 ± 1.7 vs 37.7 ± 6.1 pg/ml, $P < 0.0005$)が有意に減少していたが、IL-6 (107.6 ± 23.5 vs 139.5 ± 108 pg/ml, NS), IL-1 (42.4 ± 8.1 vs 49.7 ± 7.9 pg/ml, NS)はKO群で減少傾向しめし、IL-23 (363.5 ± 123.6 vs 397.5 ± 96.9 pg/ml, NS)は両群で差は認められなかった。これらの結果はMAIT細胞が脳虚血再灌流早期から梗塞巣の炎症反応に影響し、サイトカイン産生抑制に関与していることが示唆された。一方で脳虚血再灌流亜急性期の72時間後では、IL-6やIL-1の産生はpeakoutして減少しており、その差も有意差は消失していたが、IL-17は虚血再灌流24時間後と同様の傾向を示した。これまでの報告ではリンパ球が脳梗塞後の病態に影響するのは超急性期より亜急性期で大きいと推測されているが、MAIT細胞はより早期に炎症制御に働き、脳保護作用に影響していることが推測された。

(4)フローサイトメトリーによる脳内細胞浸潤評価

FACSを用いて、梗塞巣における虚血再灌流24時間後と72時間後の浸潤細胞数について検討を行っている。現在までに梗塞巣にMAIT細胞が一定数浸潤していることを確認しているが、統計学的解析に耐えうる個体数が得られていない。これはMAIT細胞自体がマウス個体で少ないことから、マウスの数を増やして解析する必要があり、今後も解析を続き得ていく。

(5)脳梗塞急性期に対するMR1受容体に対するリガンド投与の効果

MR1受容体に特異的に結合するリガンドを用い、脳梗塞急性期に対する脳保護効果を検討した。

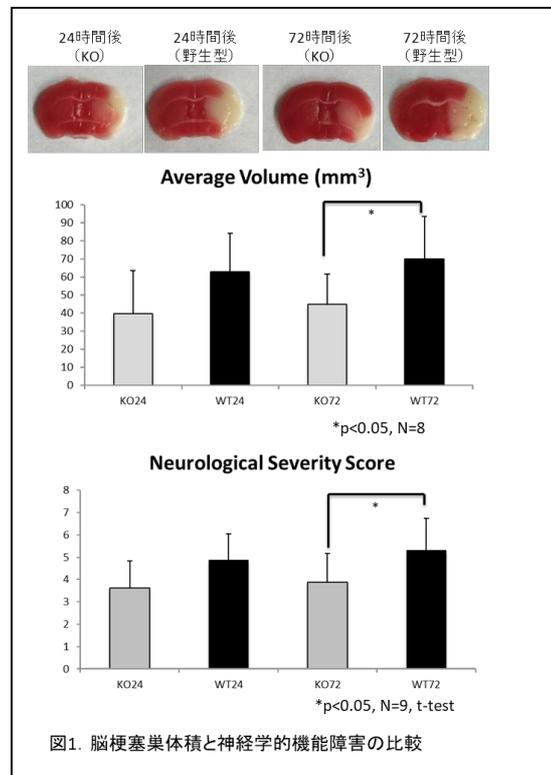


図1. 脳梗塞巣体積と神経学的機能障害の比較

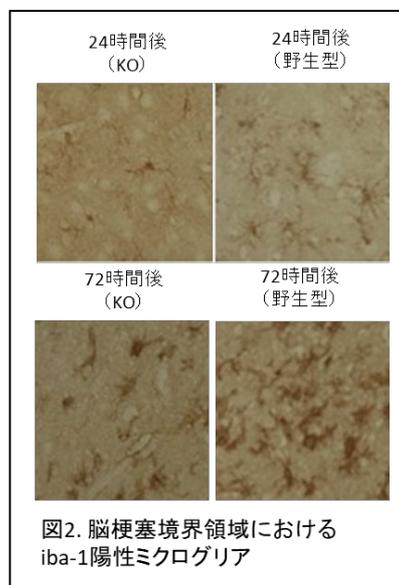


図2. 脳梗塞境界領域におけるiba-1陽性ミクログリア

雄性 C57BL/6 マウスを用い、上記のモデルと同様に虚血再灌流モデルを作成。再灌流直後と虚血再灌流後 24 時間の 2 回 tail vein より抑制性リガンドを投与し、虚血再灌流 24 時間、72 時間後の梗塞巣体積と神経学的機能障害の程度を KO マウスと同様に解析した。現時点で KO マウス群の解析とほぼ同様の結果が得られているが、統計学的な解析に必要なマウス数を現在検討している。今後組織学的評価や脳内炎症性サイトカインの評価も同様に解析する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

中島翔、脳梗塞急性期における MAIT 細胞制御と脳保護効果、第 61 回日本脳循環代謝学会学術集会、2018

中島翔、脳梗塞急性期における MAIT 細胞制御と脳保護効果、第 44 回日本脳卒中学会学術集会、2019

Sho Nakajima, The association between mucosal-associated invariant T (MAIT) cells and acute ischemic stroke、第 60 回日本神経学会学術大会、2019

Sho Nakajima, The association between mucosal-associated invariant T (MAIT) cells and acute ischemic stroke, Brain & Brain PET 2019, 2019

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：千葉 麻子

ローマ字氏名：CHIBA, asako

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：40532726

研究分担者氏名：志村 秀樹

ローマ字氏名：SHIMURA, hideki

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：前任准教授

研究者番号(8桁): 50286746

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中島 翔

ローマ字氏名：NAKAJIMA, sho

研究協力者氏名：栗田 尚英

ローマ字氏名：KURITA, naohide

研究協力者氏名：黒木 卓馬

ローマ字氏名：KUROKI, takuma

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。