

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07442

研究課題名（和文）MAIT細胞による脳梗塞急性期病態制御機構の解明と新規治療開発の基盤的研究

研究課題名（英文）The role of MAIT cell and its feasibility for the treatment of human acute ischemic stroke

研究代表者

田中 亮太（Tanaka, Ryota）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40407284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト脳梗塞急性期における自然リンパ球Mucosal associated invariant T cell（MAIT細胞）の動態と機能を解析した。コントロールや軽症脳梗塞に比べ、重症脳梗塞急性期早期（発症3日）では抹消血MAIT細胞が有意に減少する一方で、MAIT細胞は活性化し、炎症性サイトカインIL-17の産生能が有意に上昇した。MAIT細胞の比率は脳梗塞体積や重症度と負の相関を示し、退院時や3か月後の機能予後とも有意な相関を示した。これらの結果から脳梗塞急性期ではMAIT細胞が脳梗塞の病態に強く関係し、MAIT細胞制御を目標とした脳梗塞治療の新たなターゲットとなりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MAIT細胞は脳梗塞急性期の脳内炎症の増幅に関与することが動物実験で示されていた。今回の研究成果からMAITがヒト脳梗塞急性期、特に重症例において有意な関連が確認され、MAIT細胞がヒトにおいても脳梗塞急性期病態悪化に関与する可能性が強く示された。脳梗塞急性期治療はrt-PA静注療法や機械的血栓回収療法によって患者の予後を大きく改善出来る一方で、これらの治療の恩恵を受けられる患者は限られており、新たな治療法開発が望まれている。今回の研究成果はMAIT細胞制御を目的とした脳梗塞急性期治療開発を進めるための基盤となる必要かつ重要な知見と考える。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mucosal associated invariant T (MAIT) cell in human acute ischemic stroke. Number of circulating MAIT cells significantly decreased in patients with large ischemic stroke than control. CD69 expressing activated and IL-17 producing MAIT cells were significantly increased than control. These changes were not observed in patients with small ischemic stroke. There was an inverse association between number of MAIT cell and stroke volume, severity and poor outcome at 3 months after stroke. These results indicate that MAIT cell is associated with acute large ischemic stroke and MAIT cell could be an attractive candidate for the treatment of human acute ischemic stroke.

研究分野：神経内科学

キーワード：MAIT cell 脳梗塞急性期 脳内炎症 IL-17

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた本邦では脳梗塞が増加傾向にあるが、静注血栓溶解療法や機械的血栓回収療法の進歩によって、患者の予後を大きく改善出来るようになってきた。一方、これら積極的な再開通療法の恩恵を受ける症例は脳梗塞急性期全体の 10%前後に過ぎない。これは therapeutic time window が狭いことや重症脳梗塞では短時間で梗塞巣が完成してしまうことが原因である。脳梗塞急性期の病態は、血流遮断に伴う直接的細胞死以外に、酸化ストレス、過剰な炎症反応などが病態悪化に大きく寄与している。我々は GFP を発現する骨髄移植後マウスの脳梗塞モデルを作成し、急性期梗塞巣では末梢血由来 GFP 陽性細胞が発症早期より梗塞巣内に浸潤し、脳梗塞の病態に寄与することを明らかにしてきた (Neuroscience 2003:117:531-539.)。一方、最近の研究では末梢血由来 T リンパ球が脳梗塞急性期より脳内に浸潤し、脳梗塞後の炎症増幅と病態悪化に大きく関わっていることが明らかになっている。我々は自然リンパ球の Mucosal associated invariant T (MAIT) 細胞に着目し、脳梗塞急性期の病態に大きく関係していることを見いだした (JAHA, 2021:e018803)。MAIT 細胞をノックアウトしたマウスでは、コントロールに比し脳梗塞巣が有意に縮小し、機能障害も軽減することを確認した。梗塞巣内のミクログリアの活性や IL-1 や IL-6 等のサイトカインの発現は MAIT 細胞ノックアウト群で有意に抑制されており、脳梗塞後の炎症反応を抑制している可能性が高い。さらに、野生型マウスの脳梗塞モデルに脳梗塞発症後に MAIT 細胞を抑制するリガンド投与したところ、ノックアウトマウスと同様に脳梗塞巣が有意に縮小することを確認している。このようなマウス脳梗塞モデルの結果より、MAIT 細胞が脳梗塞の病態増悪因子として機能しており、また MAIT 細胞制御が脳梗塞急性期の脳保護治療の新たなターゲットとなり得ることが示された。

2. 研究の目的

我々の基礎的解析の結果から、MAIT 細胞は梗塞巣での炎症反応を増幅させ、脳梗塞急性期の病態を悪化させる可能性が非常に高い。さらに MAIT 細胞制御による新規脳梗塞治療法の開発を目的に、MAIT 細胞の抑制性リガンドを脳梗塞急性期に投与した実験も終了している。リガンド投与により脳梗塞巣への MAIT 細胞浸潤が抑制され、脳梗塞後神経炎症の抑制と脳梗塞巣の縮小させることを確認している。今後 MAIT 細胞制御を介したヒト脳梗塞急性期の新たな治療の実用化に向けて研究を進めていく予定である。

現在までに、動物モデルにおける MAIT 細胞の脳虚血急性期における動態は確認されたが、ヒトにおける MAIT 細胞の動態は良く分かっていない。そこで本研究の目的は、ヒト脳梗塞急性期における末梢血 MAIT 細胞の動態と機能を明らかにし、ヒト脳梗塞急性期における MAIT 細胞の役割を解明することである。本研究はヒトにおける MAIT 細胞制御をターゲットとした脳梗塞急性期の新たな治療戦略を構築するものであり、今後の臨床応用を目標とした開発には欠かせないデータとなる。

3. 研究の方法

対象患者は、自治医科大学附属病院へ通院/入院している脳梗塞急性期症例から、重症 30 例・軽症 30 例、また、健常者 (コントロール) 30 例を目標に登録する。

1) 対象基準

- 発症年齢 20 歳以上 89 歳以下、発症前 mRS0-2 (自立生活できる生活レベル)
- 脳梗塞急性期症例は、発症 48 時間以内。健常者は当院外来を通院している症例。
重症例：来院時 NIHSS 10, Large vessel occlusion(LVO)の症例(ICA, MCA(M2 閉塞含む), VA, BA, PCA)、軽症例：来院時 NIHSS<10, LVO 無し。
- tPA, 血栓回収療法の有無は問わない(ただし、短時間の劇的改善例は程度に応じて軽症ないし重症とする)

2) 除外基準：活動性悪性腫瘍合併例・膠原病合併例・ステロイド等の免疫抑制剤使用中。

研究方法

- 入院時同意取得後、約 3 日後、10 日後、17 日後に採血する。
- 末梢血中サイトカイン産生量を BioPlex200®で測定。
- フローサイトメトリー (FACS) 解析。
 - FACS にて末梢血中 CD4, CD8, MAIT, iNKT, $\gamma\delta$ T 細胞数と T リンパ球中の比率を解析
 - FACS にて各リンパ球の活性化を比較 (CD69 陽性リンパ球の比率)
 - 各リンパ球のサイトカイン産生能の比較 (IL-17, INF- γ)
- 臨床情報 (既往・重症度・予後・梗塞体積等) を収集し、サイトカイン産生量、各リンパ球の比率・サイトカイン産生量について、脳梗塞の梗塞巣の大きさ、重症度や予後との関連について検討する。

NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale (脳卒中の重症度スケール)

mRS: modified Rankin Scale (脳卒中後のアウトカムスケール)

4. 研究成果

(1) 登録患者の背景、臨床経過の特徴

同意を得て脳梗塞重症例 25 名、軽症例 30 名、健常例（コントロール）30 名を登録した。臨床背景について、重症群・軽症群・コントロール群はそれぞれ平均年齢 ± standard deviation (SD) (77.2 ± 9.32, 73.8.7 ± 6.81, 71.9 ± 8.06 歳: p=0.0553)、性別（男性 60.0, 70.0, 64.0%: p=0.7173）であった。脳卒中に関連する主要なリスク因子について、3 群で糖尿病や高血圧、脂質異常症、飲酒、喫煙等に統計的な有意差はなかったが、脳梗塞分類において心原性脳塞栓症が重症群で多いことと一致して心房細動は重症群が多かった（コントロール・軽症・重症: 6.67, 10.0, 68.0%: p<0.0001）。臨床経過は、軽症群と重症群は大きく異なり、軽症に比し重症群は脳梗塞体積も有意に大きく、退院時・3 ヶ月後 mRS の結果から、予後も明らかに不良であった（表 1）。

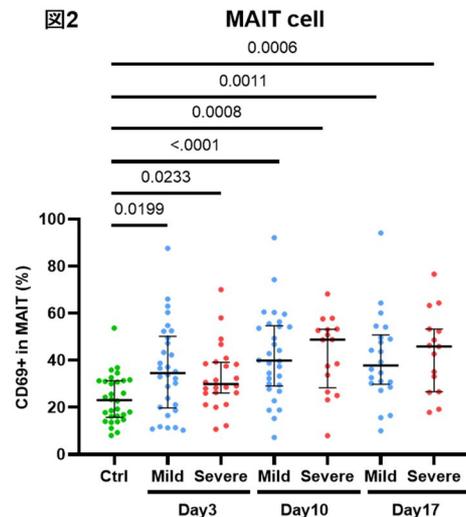
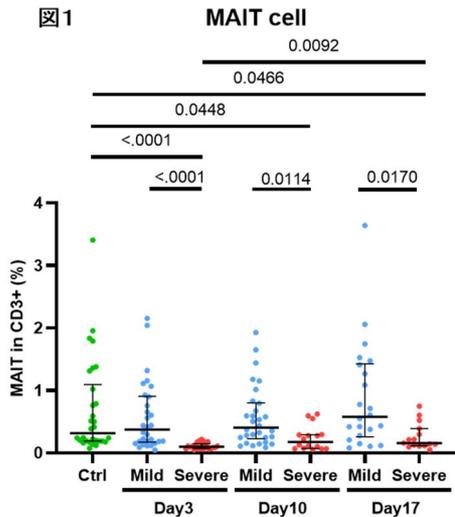
表 1. 軽症群と重症群の臨床経過			
	mild (n=30)	severe (n=25)	p Value
脳梗塞分類、n (%)			<0.0001
アテローム血栓性	8 (26.7%)	4 (16.0%)	
ラクナ	5 (16.7%)	0 (0%)	
心原性脳塞栓	2 (6.7%)	20 (80.0%)	
その他	12 (40.0%)	0 (0%)	
原因不明	3 (10.0%)	1 (4.0%)	
臨床経過			
入院時			
体温 ()	36.5 ± 0.44	36.5 ± 0.58	0.575
収縮期血圧、mmHg 平均±SD	173.5 ± 25.8	163.4 ± 29.4	0.2573
拡張期血圧、mmHg 平均±SD	99.9 ± 15.3	100.0 ± 20.2	0.99
心拍数、拍/分、平均±SD	81.9 ± 14.2	85.3 ± 20.5	0.4734
NIHSS、median (IQR)	2 (1-3.25)	19 (13.5-25)	<0.0001
退院mRS、median (IQR)	1 (1-3)	5 (4-5.5)	<0.0001
3 ヶ月mRS、median (IQR)	1 (1-2.25)	5 (3.25-6)	<0.0001
細菌感染、n、(%)	5 (16.7%)	14 (56.0%)	0.0023
発症日	day 3-7	day 2-6	
血管内治療、n、(%)	0 (0%)	4 (16.0%)	0.0229
血栓溶解療法、n、(%)	0 (0%)	12 (48.0%)	<0.0001
画像検査			
大血管閉塞、n、(%)	0 (0%)	23 (92.0%)	<0.0001
梗塞体積 (cm ³)、median (IQR)	0.55 (0.05-2.11)	83.14 (39.67-238.42)	<0.0001

(2) FACS 解析による脳梗塞急性期における末梢血の MAIT 細胞をはじめとした T リンパ球動態

脳梗塞急性期（約 3 日目）の末梢血 PBMC の解析では、MAIT 細胞の比率は重症群において著しく減少していた [MAIT 細胞/T リンパ球: 重症・軽症・コントロール; 0.097% (0.068-0.147), 0.356% (0.157-0.907), 0.316% (0.191-1.095): <0.0001] (図 1)。また、重症群は経時的にその後回復する傾向がみられ、3 日目に対し 17 日目は有意に上昇していた [重症群 3 日, 0.097% (0.068-0.147) 対 17 日, 0.152% (0.118-0.369): p=0.0092] (図 1)。MAIT 細胞は大きく変動した一方で自然リンパ球の T 細胞と iNKT 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞は変化が目立たず有意な差は認めなかった。

MAIT 細胞の減少を認めた重症群は、3 日目から細胞活性化の指標である CD69 陽性率もコントロールと比べ有意に上昇しており、脳梗塞急性期に MAIT 細胞は活性の亢進も伴っていることが示された。尚、CD69 陽性率の上昇は軽症例や他の T リンパ球: T 細胞、CD4+陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞も同様の傾向がみられた。

さらに炎症性サイトカインの一つである IL-17 を産生する MAIT 細胞はコントロールに比し、重症例で有意に上昇していた [IL-17 産生 MAIT 細胞: 重症・軽症・コントロール; 1.87 (0.965-4.305), 1.21 (0.600-2.245), 0.815 (0.385-1.560): p=0.0079] (図 3)。一方、軽症例ではコントロールと有意な差は認めなかった。また T 細胞と iNKT 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞についても有意な差は認めなかった。また、IFN 産生比率は軽症重症ともに MAIT 細胞を含め T リンパ球サブタイプではいずれも上昇していなかった。



(3) 血清サイトカインの動態

血清のサイトカインについては、3日目の測定でIL-6やIL-8がコントロールに比べ重症群が高い傾向がみられ、T細胞の変動とあわせ、炎症性サイトカインが上昇していることが確認された。このことから脳梗塞急性期には、末梢血でも炎症変化を生じていることが示唆された。

(4) 臨床症状・経過とMAIT細胞動態との関連

MAIT細胞と脳梗塞体積との関連について、入院時に確認された脳梗塞体積と3日目のMAIT細胞比率と負の相関がみられた(図4)。一方、T細胞、iNKT細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞は関連が目立たなかった。また、入院時の脳梗塞重症度の指標であるNIHSSスコアと3日目のMAIT細胞比率は負の相関がみられた。T細胞も同様の傾向を示したが、MAIT細胞の相関はより明確であった(図5)。以上から、発症時の脳梗塞体積が大きく臨床的にも重症であるほど、MAIT細胞比率が減少することが示された。

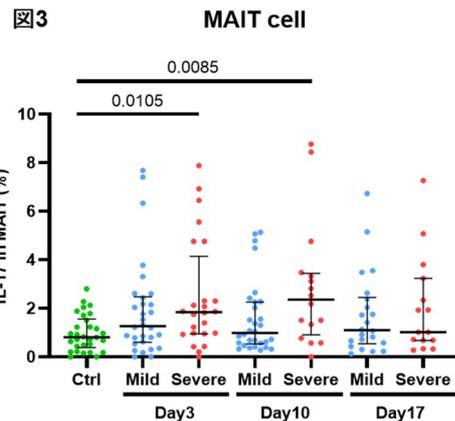


図4 入院時脳梗塞体積とMAIT細胞比率

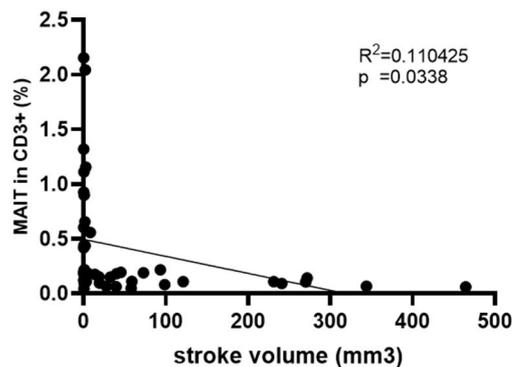
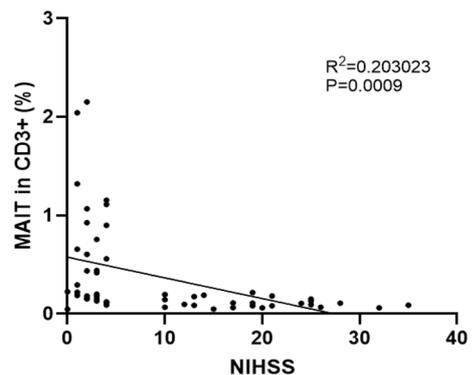


図5 入院時NIHSSとMAIT細胞比率



(5) MAIT細胞と予後との関連

機能的なアウトカムの指標として脳梗塞発症後のmRSとMAIT細胞比率の相関を検討した。退院時mRSと3日目のMAIT細胞比率は負の相関を示した。一方、他のT細胞サブタイプでは有意な相関はみられなかった。さらに、3ヶ月後mRSと3日目のMAIT細胞比率も同様に負の相関を示した(図6)。また、T細胞も比較的軽度ながら同様に負の相関を示した。尚、10日目、17日目のMAIT細胞比率と3ヶ月後mRSとの相関は明らかではなかった。以上から、発症3日目の早期のMAIT細胞比率の減少が予後不良の指標となり得ると考えた。

図6 3ヵ月後mRSとMAIT細胞比率

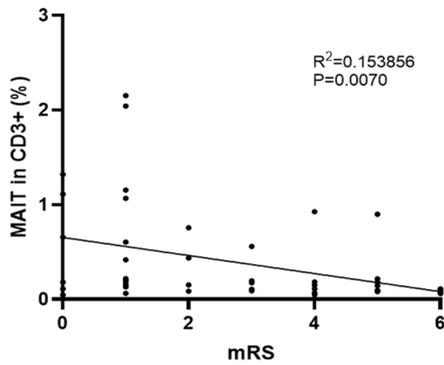
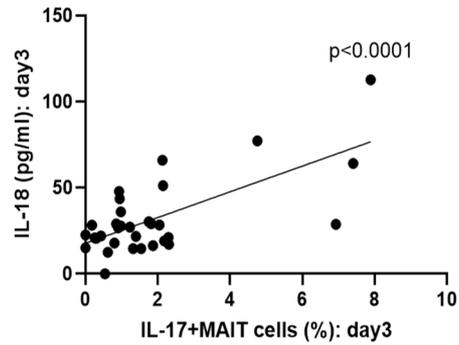


図7 IL-17陽性MAIT細胞比率と血清IL-18の関連



(6) 研究の考察

現在まで MAIT 細胞の動態が調べられている全身性エリテマトーデスや関節炎等の免疫疾患では、末梢血 MAIT 細胞は減少する一方で病変部への集積や病変における活性亢進が示されている。本研究で示された末梢血 MAIT 細胞の変動と活性化の結果は、他疾患での報告と同様の末梢血動態を示し、重症な大便秘では発症早期より脳梗塞巣内に MAIT 細胞が浸潤し、炎症増悪に寄与していることを支持する結果である。

さらに、脳梗塞発症 3 日目の IL-17 産生 MAIT 細胞比率の上昇と血清 IL-18 の相関がみられた (図 7)。今までに知られる MAIT 細胞活性化の機序として、MR1 受容体を介するほかに、IL-12, IL-18 等のサイトカインによる機序が知られており、脳梗塞急性期における MAIT 細胞活性化の機序として、IL-18 を介した MAIT 細胞の活性化・IL-17 産生増加が関与している可能性があり、MAIT 細胞を制御するメカニズムの一旦が明らかとなった。

今回の研究結果より、ヒト脳梗塞急性期における MAIT 細胞の動態と病態への関与が明らかとなった。この結果は、脳梗塞急性期治療の新たなターゲットとして MAIT 細胞制御が有用であることを支持する重要な知見と考える。本研究の結果を踏まえ、MAIT 細胞の脳梗塞病変における炎症増悪の役割や活性化のメカニズムを明らかにすることで、MAIT 細胞制御をターゲットとした新たな治療法開発に繋がれると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小澤忠嗣, 千葉麻子, 早川裕子, 大森司, 三宅幸子, 藤本茂, 田中亮太
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第66回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤忠嗣, 千葉麻子, 早川裕子, 大森司, 三宅幸子, 藤本茂, 田中亮太
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第49回日本脳卒中学会学術集会（STROKE2024）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------