

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16632

研究課題名（和文）心停止蘇生後病態における自然免疫調整機構の解明と新規免疫調整療法の開発

研究課題名（英文）Development of immunomodulatory therapy for mitigating post-cardiac arrest brain injury

研究代表者

多村 知剛（Tamura, Tomoyoshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：00571720

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：Sulfatide反応性NKT（dNKT）細胞は心停止蘇生後に脳へ遊走した。心停止後に脳に遊走したdNKT細胞は、TGF- β 1やIL-10を高頻度に発現し、脳の炎症性サイトカインとケモカインを低下させることで炎症性マクロファージと好中球の脳への遊走を抑制した。Sulfatideの投与はマウスの心停止後の転帰を改善した。院外心停止蘇生後患者においては、神経学的転帰不良の患者で蘇生後超急性期に、末梢血中のT細胞の割合が顕著に低下していた。一方、神経学的転帰が良好であった患者では、蘇生後超急性期に末梢血中のdNKT細胞が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心停止蘇生後患者は、全身性の虚血再灌流傷害に起因した多臓器障害が起こるが、特異的治療法がなく、生命予後が極めて不良である。体温管理療法は大掛かりな装置や高度な医療技術が必要であるため、限られた施設でのみ実施が可能である。また効果を発する目標体温に到達するまでに時間を要するため、有効な治療時間枠を逃している可能性がある。一方、自然免疫の賦活は蘇生後集中治療に干渉することなく速やかに実施できるという点で、蘇生後脳障害の予防および治療法として適している。従って心停止蘇生後の自然免疫を特異的に制御することができれば、心停止蘇生後の多臓器障害に対する新規治療クラスとなり広く普及する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：NKT cells are innate lymphocytes with immunoregulatory roles in critical illnesses, but their role after cardiac arrest (CA) is undefined. In a murine model of CA, sulfatide-specific diverse NKT (dNKT) cells trafficked to the brain. In the brains of mice lacking NKT cells (CD1d KO), we found increased inflammatory chemokine and cytokine expression and accumulation of macrophages and neutrophils when compared to wild-type mice. Cd1d KO mice also had increased neurological dysfunction and worse mortality after CA. dNKT cells expressed high levels of TGF- β 1 and IL-10. Small molecule therapy with sulfatide lipid after CA improved neurological function. An early increase in sulfatide-specific dNKT cells was associated with good neurological outcomes after out-of-hospital CA. Immunomodulation of dNKT cells via endogenous lipids can be a potential treatment approach after CA.

研究分野：心停止

キーワード：心停止 蘇生 脳障害 NKT細胞 免疫調整療法

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心停止蘇生後患者は、救命できたとしても脳や心臓に重篤な後遺症を遺し、生命予後が極めて不良である。これは心停止と自己心拍再開による全身性の虚血再灌流傷害に起因した障害で、心停止後症候群 (Post-cardiac arrest syndrome: PCAS) と呼ばれる。脳保護および生命予後改善を目的として PCAS 患者に対して行われる体温管理療法はその効果が十分とは言えず、新規治療の確立が急務である (Neumar, *Circulation* 2008)。我々は心停止蘇生後の虚血再灌流傷害を炎症と捉え、脳障害を改善する新規治療法の開発に取り組んでいる (Hayashida, *Circulation* 2014; Tamura, *Circ J* 2016; Tamura, *eClinMed* 2023)。虚血再灌流傷害を含む非感染性の炎症において、その炎症の悪化と収束には免疫機構が重要な役割を担うことが知られている。心停止蘇生後急性期に炎症性サイトカインが上昇する (Adrie, *Circulation* 2002) こと、獲得免疫系の T 細胞が脳障害の病態に関与する (Deng, *Neuroimmunol* 2014) ことが報告されている。しかしサイトカインの分泌と獲得免疫系の活性化を担う自然免疫の役割は心停止蘇生の分野では明らかでない。本研究の核心をなす問いは「免疫機構の統御不全が PCAS の病態を形成しているのか」である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記課題のうち自然免疫の調整役であるナチュラルキラー T (NKT) 細胞に着目して、心停止蘇生後の脳機能障害における自然免疫の役割を明らかにし、心停止蘇生後脳障害に対する新規免疫調整療法を開発することである。本研究は自然免疫を用いた免疫調整療法によって続発する免疫介在性脳障害の軽減を試みる初の研究である。臨床的有効性が唯一確認された TTM は大掛かりな装置や高度な医療技術が必要であるため、限られた施設でのみ実施が可能である。また効果を発する目標体温に到達するまでに時間を要するため、有効な治療時間枠を逃している可能性が近年指摘されている。一方、自然免疫の賦活は蘇生後集中治療に干渉することなく速やかに実施できるという点で、蘇生後脳障害の予防および治療法として適している。従って心停止蘇生後の自然免疫を特異的に制御することができれば、PCAS に対する新規治療クラスとなり広く普及する可能性がある。

3. 研究の方法

(1) マウス

10-12 週齢、体重約 25g の雄性、野生型 (WT) マウス (C57B6/J) と全 NKT 細胞を欠損する CD1d KO マウス (Cd1d^{-/-}) および invariant NKT (iNKT) 細胞のみを欠損する Jα18KO マウス (Traj^{-/-}) を用いた。

(2) マウス心停止モデル

マウス (C57B6/J、10-12 週齢、体重約 25g) をボックス内で麻酔 (イソフルラン) 後、気管挿管し人工呼吸下 (吸入麻酔) に右大腿動静脈にカテーテルを挿入した。直腸温、動脈圧モニタリング (PowerLab, ADInstruments) 下に塩化カリウムを静注して心静止とし、人工呼吸を中断した。心静止導入 10 分後から胸骨圧迫の開始、人工呼吸の再開、アドレナリンの投与による蘇生を行った。自己心拍再開 1 時間後まで直腸温を 37°C に保ち、抜管後ケージで経過観察した。24、48 時間後の脳機能スコア (10 が最良で 0 が死亡) と 10 日間の生存率を評価した。予備実験から各実験のサンプルサイズは各群 N=10-18 と推定した。

(3) 心停止後の脳への免疫細胞遊走の評価

上記マウス心停止モデルを用いて心停止 6、18、24 時間後の免疫細胞の遊走を flow cytometry を用いて評価した。NKT 細胞は CD45^{hi}TCRb⁺sulfatide-CD1d tetramer⁺、NK 細胞は CD45^{hi}NK1.1⁺、マクロファージは CD45^{hi}11b^{hi}CD68^{hi}、好中球は CD45^{hi}11b^{hi}Ly6G⁺をそれぞれゲーティングした。

(4) 心停止蘇生後の NKT 細胞の免疫表現型の解析

さらに (2) の flow cytometry において、細胞傷害性マーカーである PRF1、サイトカイン (IFN γ , TNF α , TGF- β 1, IL-10) を評価した。

(4) 脳中サイトカイン、ケモカインの発現の検討

RT-PCR を用いて、心停止 6 時間後あるいは 24 時間後の全脳のサイトカイン (*Ifng*, *Tnfa*, *Ill10*, *Ill12a*, *Ill12b*, *Ill18*)、ケモカイン (*Ccl2*, *Ccl15*, *Ccl17*, *CXCL2*) を評価した。

(5) 神経損傷の定量的評価

WT および CD1d KO マウスの心停止 24 時間後の海馬における Fluoro-Jade C 陽性細胞数を評価した。

(6) Sulfatide 投与が心停止蘇生後の転帰に与える影響の検討

WT、CD1d KO マウスに sulfatide (C24 mono-sulfogalactosylceramide (d18:1/24:0), Avanti) 25 μ g を心停止前あるいは蘇生直後に投与し、脳機能スコアと生存率とを評価した。

(8) 臨床的相関の確認

院外心停止蘇生後患者の自己心拍再開 6、48 時間後の末梢血単核球を分取し、flow cytometry で自然免疫 T 細胞である $\gamma\delta$ T 細胞、MAIT 細胞、diverse NKT 細胞、iNKT 細胞を神経学的転帰別に評価した。神経学的転帰は、1 ヶ月後の Cerebral Performance Category 1 あるいは 2 を良好と定義した。

4. 研究成果

心停止蘇生は血管内皮細胞や白血球の活性化、炎症性サイトカインの大量放出、臓器障害などを特徴とする全身性の炎症反応を惹起する (Adrie, *Circulation* 2002)。また体温管理療法を受けた心停止後患者では炎症性サイトカインが減少し、神経学的転帰の改善と関連する (Bisschops, *Crit Care* 2014) こと、マウス心停止モデルでは蘇生後の脳で T 細胞の遊走と $\text{INF}\gamma$ の増加が認められたが、これらの所見は T 細胞欠損マウスで減少する (Deng, *Neuroimmunol* 2014) こと

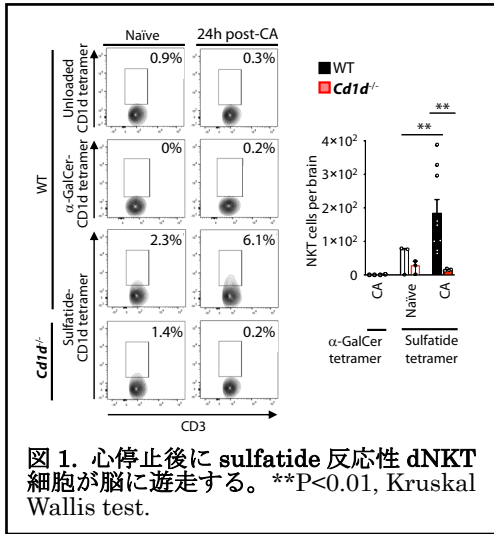


図 1. 心停止後に sulfatide 反応性 dNKT 細胞が脳に遊走する。*P<0.01, Kruskal Wallis test.

から、PCAS における免疫介在性脳障害の機序が示唆されている。心停止蘇生後超急性期の全身性炎症反応 (サイトカイン上昇) と急性期から亜急性期の獲得免疫の関与から、超急性期の PCAS の病態形成に自然免疫が関与しているとの着想を得た。特に、自然免疫細胞のうち NKT 細胞は感染症、自己免疫性疾患、がん、肝臓や腎臓の虚血再灌流傷害 (Arrenberg, *Gastroenterology* 2011; Yang, *J Am Soc Nephrol* 2011) など様々な病態において免疫反応の調整に中心的な役割を果たすことから、我々は NKT 細胞に着目して研究を行ってきた (Kim, *J Clin Invest* 2020)。

さらに NKT 細胞が認識する主な糖脂質である sulfatide は脳に最も多く存在する (Takahashi, *J Lipid Res* 2012) ことから、NKT 細胞が心停止蘇生後の脳障害に重要な役割を果たしているとの仮説を立てた。

マウス心停止モデルを用いて心停止蘇生後における NKT 細胞の役割を検討した。心停止蘇生 24 時間後には、sulfatide 反応性 NKT 細胞が脳に遊走することが明らかとなった (図 1)。一方、NKT 細胞を欠損する $Cd1d$ KO マウスを用いて同様に心停止蘇生を行うと、 $Cd1d$ KO マウスでは予想通り NKT 細胞の脳へ遊走が認められなかった。この $Cd1d$ KO マウスでは、心停止蘇

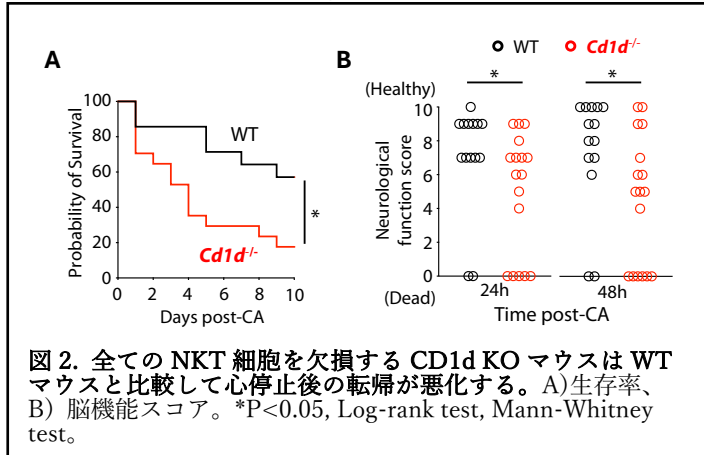


図 2. 全ての NKT 細胞を欠損する $Cd1d$ KO マウスは WT マウスと比較して心停止後の転帰が悪化する。A) 生存率、B) 脳機能スコア。*P<0.05, Log-rank test, Mann-Whitney test.

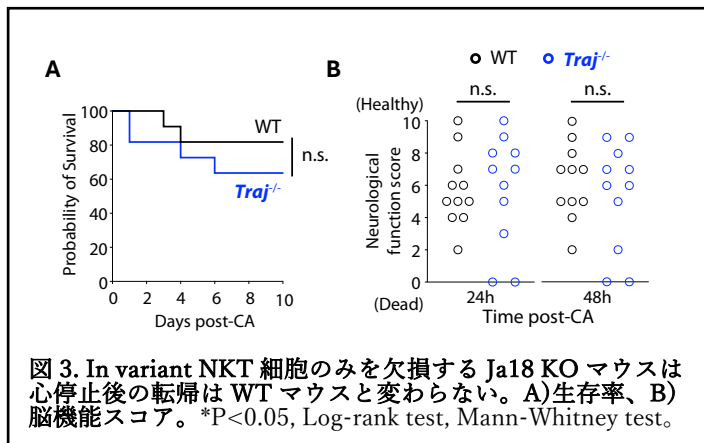


図 3. In variant NKT 細胞のみを欠損する $Ja18$ KO マウスは心停止後の転帰は WT マウスと変わらない。A) 生存率、B) 脳機能スコア。*P<0.05, Log-rank test, Mann-Whitney test.

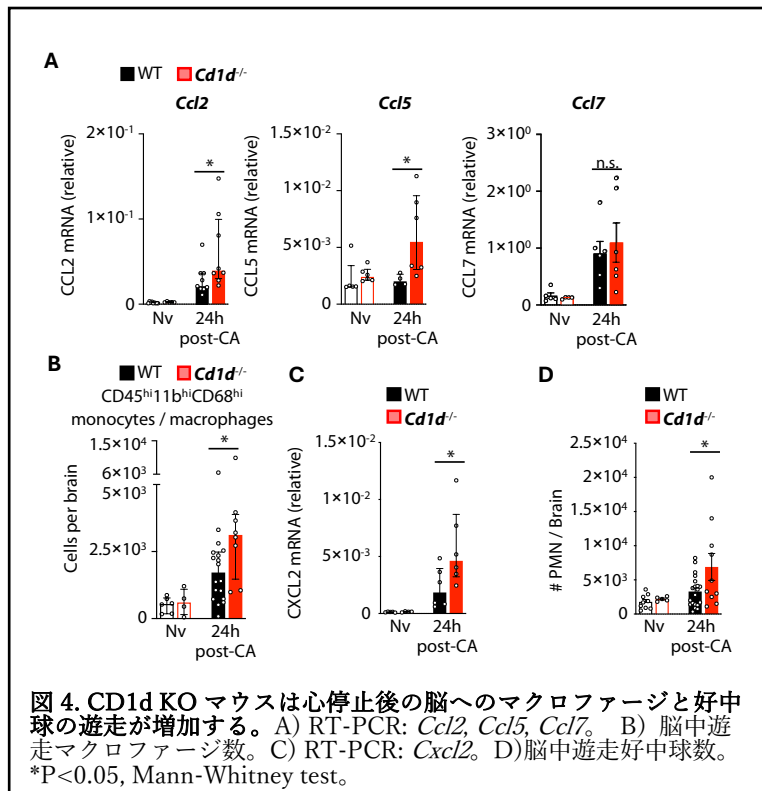


図 4. $Cd1d$ KO マウスは心停止後の脳へのマクロファージと好中球の遊走が増加する。A) RT-PCR: $Ccl2$, $Ccl5$, $Ccl7$. B) 脳中遊走マクロファージ数。C) RT-PCR: $Cxcl2$. D) 脳中遊走好中球数。*P<0.05, Mann-Whitney test.

生後の生存率と脳機能スコアが悪化した (図 2)。一方で iNKT 細胞のみを欠損する $J\alpha 18$ KO マウスは WT と比較して、心停止後の生存率と脳機能スコアに差がないことから、sulfatide 反応性の diverse NKT (dNKT) 細胞が心停止蘇生後に脳保護的機能を担うことが示唆された (図 3)。CD1d KO マウスでは、脳への炎症性マクロファージと好中球の遊走が増加し、それぞれのケモカインである *Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl2* の mRNA の発現が上昇していた (図 4)。さらに CD1d KO マウスでは心停止蘇生後の脳内 *Ifng* の発現が増加することから、dNKT 細胞は心停止蘇生後の脳内 $IFN\gamma$ 低下に寄与することが明らかとなった (図 5)。心停止蘇生後の脳に遊走した dNKT 細胞の大多数が TGF- $\beta 1$ および IL-10 を発現していた (図 6)。この結果より、dNKT の心停止後の転帰改善効果は、抗炎症サイトカインを介している可能性が示唆された。さらに、dNKT 細胞の抗原である sulfatide を用いて NKT 細胞を賦活化したところ、心停止前の sulfatide 投与は vehicle と比較して有意に生存率を改善した (図 7)。蘇生直後の sulfatide 投与は、生存率を改善する傾向を示すにとどまった。一方、sulfatide は投与時期を問わず、心停止後の脳機能スコアを改善した (図 7)。CD1d KO マウスにおいては、sulfatide の投与は心停止後の生存と脳機能をともに改善しなかった (図 8)。この結果から、sulfatide の心停止後の転帰改善効果は、dNKT 細胞を介していることが示唆された。次に、マウス心停止モデルで得られた知見の臨床的相関を確認す

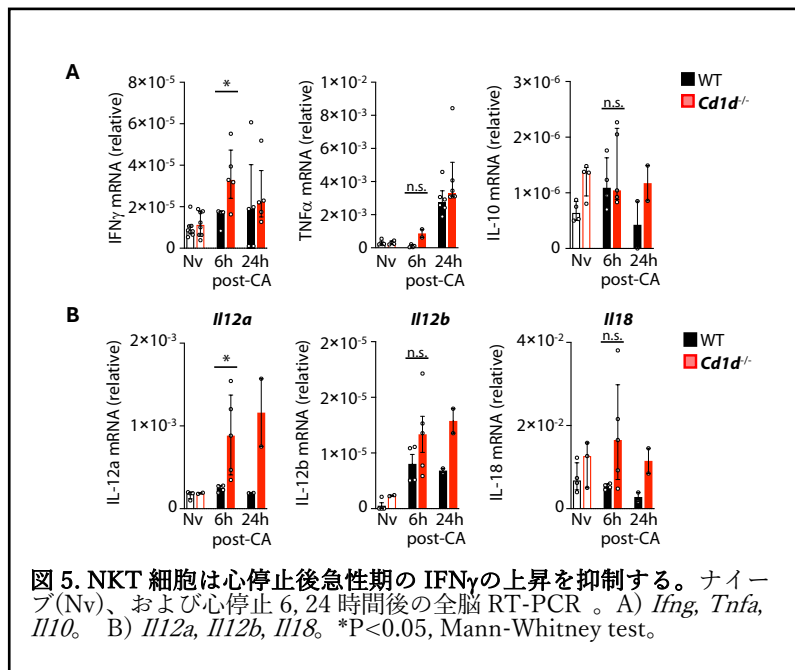


図 5. NKT 細胞は心停止後急性期の $IFN\gamma$ の上昇を抑制する。ナイーブ(Nv)、および心停止 6, 24 時間後の全脳 RT-PCR。A) *Ifng*, *Tnfa*, *Il10*。 B) *Il12a*, *Il12b*, *Il18*。 * $P < 0.05$, Mann-Whitney test。

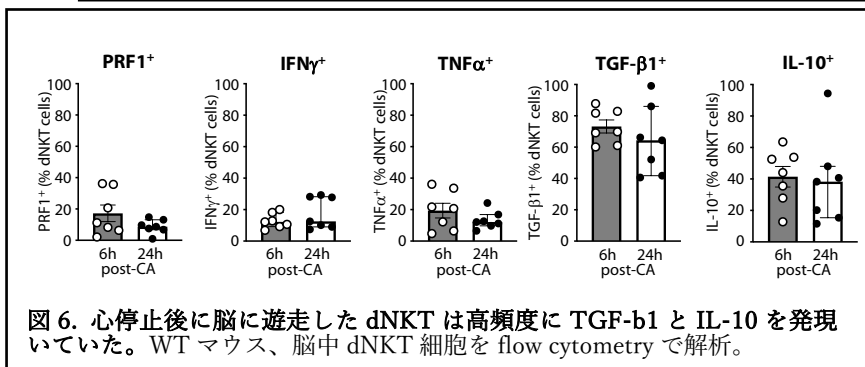


図 6. 心停止後に脳に遊走した dNKT は高頻度に TGF- $\beta 1$ と IL-10 を発現していた。WT マウス、脳中 dNKT 細胞を flow cytometry で解析。

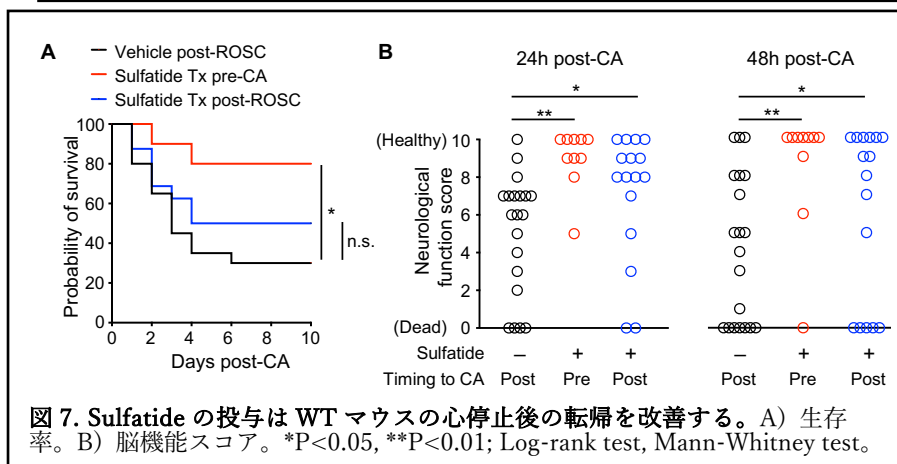


図 7. Sulfatide の投与は WT マウスの心停止後の転帰を改善する。A) 生存率。 B) 脳機能スコア。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Log-rank test, Mann-Whitney test。

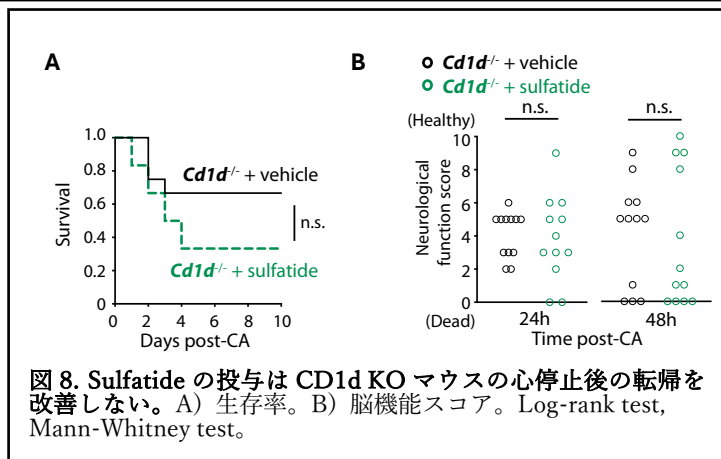


図 8. Sulfatide の投与は CD1d KO マウスの心停止後の転帰を改善しない。A) 生存率。 B) 脳機能スコア。 Log-rank test, Mann-Whitney test。

るために、健常ボランティア (N=27) と院外心停止蘇生後患者 (N=15) において、末梢血単核中の自然免疫 T 細胞を評価した。心停止蘇生 6 時間後の超急性期には、神経学的転帰不良の患者において顕著にリンパ球系細胞に占める T 細胞の割合が減少していた。この変化は、蘇生 48 時間後には不明瞭となった (図 9)。自然免疫 T 細胞を flow cytometry で観察すると、 $\gamma\delta$ T 細胞の割合は健常人と著変を認めなかった。MAIT 細胞は神経学的転帰に関わらず、心停止後に顕著に低下した。Sulfatide 反応性 dNKT 細胞は、神経学的転帰良好の患者において、蘇生後早期にその割合が上昇していることが明らかとなった (図 10)。一方、iNKT 細胞は心停止には、転帰によらず上昇する傾向を示した。以上から、院外心停止後患者においても、蘇生後急性期に末梢血中の dNKT 細胞の割合の上昇が、神経学的転帰良好と関連することが明らかとなった。

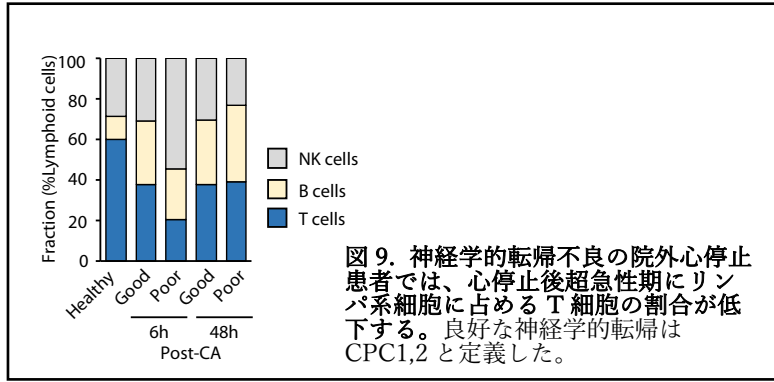


図 9. 神経学的転帰不良の院外心停止患者では、心停止後超急性期にリンパ球系細胞に占める T 細胞の割合が低下する。良好な神経学的転帰は CPC1,2 と定義した。

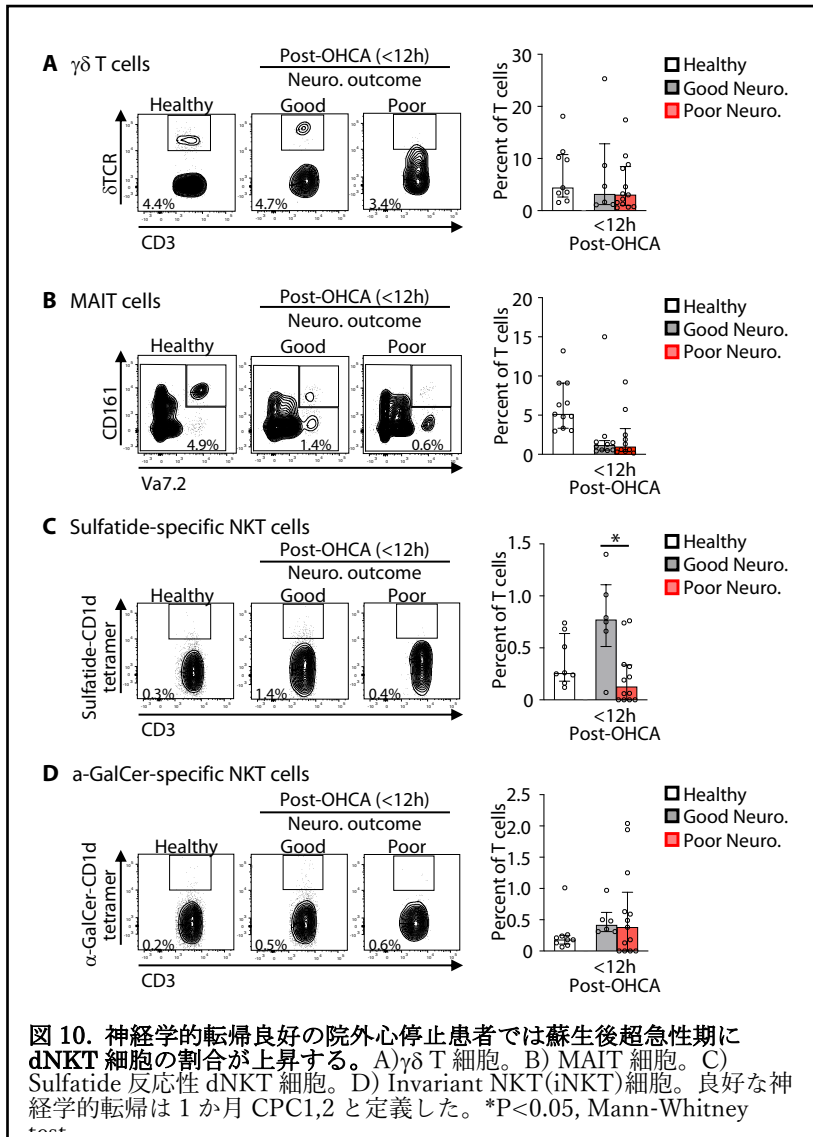


図 10. 神経学的転帰良好の院外心停止患者では蘇生後超急性期に dNKT 細胞の割合が上昇する。A) $\gamma\delta$ T 細胞。B) MAIT 細胞。C) Sulfatide 反応性 dNKT 細胞。D) Invariant NKT (iNKT) 細胞。良好な神経学的転帰は 1 か月 CPC1,2 と定義した。*P<0.05, Mann-Whitney test

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多村知剛
2. 発表標題 救急患者のバイオバンクを起点として転帰改善を目指すトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第50回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------