

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	薛 徹
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 781 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Persistent reduction of mucosal-associated invariant T cells in primary biliary cholangitis (原発性胆汁性胆管炎における粘膜関連インバリエント T 細胞の検討)
論文審査委員	主査 教授 小松 雅明 副査 教授 高塚 尚和 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

**【目的】** 粘膜関連インバリエント T (mucosal-associated invariant T, MAIT) 細胞は近年同定された自然リンパ球の一種であり、ヒトでは末梢血、腸管、肝臓に豊富に分布している。NK 細胞マーカーと T 細胞受容体の 2 つを同時に発現しており、その T 細胞受容体は通常の CD4<sup>+</sup> T 細胞および CD8<sup>+</sup> T 細胞とは異なり均一な  $\alpha$  鎖 (ヒトでは V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33) を使用することにより特徴付けられる。MAIT 細胞は結核やヒト免疫不全ウイルス (HIV) などの感染免疫への関与だけでなく、関節リウマチや全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患といった自己免疫疾患への関与が指摘されている。しかしながら、自己免疫性肝疾患との関連は十分に解明されておらず、本研究は原発性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis, PBC) における MAIT 細胞の関与について検討することを目的とした。

**【方法】** 新潟大学医歯学総合病院と関連病院で診断・治療された PBC 25 例を対象とし、倫理委員会承認済み (第 1474 号) の研究計画に基づき提供に同意いただいた肝生検組織及び外科的肝切除組織、末梢血を使用した。慢性ウイルス性肝疾患患者 19 例と転移性肝腫瘍患者 13 例を対照群とし、また、PBC 群ではウルソデオキシコール酸 (UDCA) による治療前後で末梢血検体の比較検討も行った。PBC 群の平均年齢は 66 (29-81) 歳 (男性 4 例, 女性 21 例)、慢性ウイルス性肝疾患群は 52 (30-81) 歳 (男性 11 例, 女性 8 例)、転移性肝腫瘍群は 66 (44-83) 歳 (男性 8 例, 女性 5 例) であった。肝組織と末梢血から比重遠心法にてリンパ球を分離後、フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) により CD69 や NKG2D, IL-18R, IL-7R などの細胞表面マーカーの発現を解析した。また、各群の末梢血リンパ球を *in vitro* で刺激後に MAIT 細胞の活性化と各種サイトカイン産生を FCM で解析した。MAIT 細胞は T 細胞受容体の V $\alpha$ 7.2 鎖が陽性で、かつ NK 細胞マーカーである CD161 を強発現している細胞として同定した。

**【成績】** 末梢血 T 細胞中の MAIT 細胞の占める割合、及び単位血液量あたりの MAIT 細胞の総数は PBC 群で他の群と比較して有意に減少していた (P = 0.038 及び P = 0.044)。また、肝臓中においても同様に PBC 群で MAIT 細胞の T 細胞に占める頻度の減少が認められた (P = 0.002)。MAIT 細胞は肝臓中では常に部分的に活性化され末梢血中と比較して CD69 を高発現しているが、PBC 群では末梢血中 MAIT 細胞での CD69 発現に有意な低下が認められた (P = 0.02)。また、MAIT 細

胞は IL-18R と IL-7R を高発現していることが知られているが、PBC 群の末梢血ではこれらの発現は他群と比較して有意に低下していた（それぞれ  $P < 0.01$ ,  $P = 0.03$ ）。

PBC 症例を血清トランスアミナーゼ（ALT）異常の有無で 2 群に分けると、ALT が異常値を示す PBC 患者群では活性化マーカーである CD69 と NKG2D の発現は末梢血中の MAIT 細胞で有意に増加していた（それぞれ  $P = 0.04$ ,  $P = 0.02$ ）。一方で、血清アルカリフォスファターゼ（ALP）や  $\gamma$ -GTP との有意な関連は認めなかった。PBC 群において、UDCA 治療により血清 ALT や ALP,  $\gamma$ -GTP が正常化すると、診断時点では顕著に減少していた血中 MAIT 細胞の T 細胞中に占める割合は有意に回復したが（ $P = 0.02$ ）、依然として他群と比較すると低値であった。また、治療前後で CD69 や IL18R, IL-7R 発現には変化が認められなかった。

*in vitro* において、MAIT 細胞は抗原による T 細胞受容体刺激だけでなく、IL-7 などのサイトカイン刺激のみでも活性化され各種サイトカインを産生することが知られている。CD3/CD28 ビーズによる T 細胞受容体刺激や IL-7 を用いて MAIT 細胞を刺激すると、それぞれの単独刺激により MAIT 細胞の CD69 発現は亢進し、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$ , IL-17 といったサイトカインを豊富に産生した。また同時にアポトーシスが誘導され MAIT 細胞は減少した。更に、CD3/CD28 ビーズと IL-7 を併用することによりこれらの反応は増強された。PBC 群では IL-7 刺激による MAIT 細胞の TNF- $\alpha$  産生は有意に低下していた（ $P = 0.04$ ）。

#### 【考案と結論】

PBC 群では MAIT 細胞が末梢血中・肝臓中ともに有意に減少しており、また肝障害が強い ALT 高値群で MAIT 細胞はより活性化していた。*in vitro* では MAIT 細胞を活性化することによりアポトーシスが誘導されたことから、PBC 症例における肝臓での MAIT 細胞の消耗による変化が示唆された。UDCA 治療により肝機能が改善した PBC 症例では、末梢血中の MAIT 細胞の割合に改善が認められたものの治療後も他群と比較すると低値の状態が持続しており、活性化マーカーに治療前後で変化が認められず、IL-7R や IL-18R の発現が低下していたことから、UDCA 治療により血清生化学データが改善した状態でも肝臓内では慢性炎症が持続していることが推察された。また、PBC では TNF- $\alpha$  の産生が低下していたことから、長期間の炎症持続による MAIT 細胞の疲弊状態が考えられ、本研究により MAIT 細胞の PBC 病態形成への関与が示唆された。

#### 審査結果の要旨

【目的】 本研究では、粘膜関連インバリエント T (mucosal-associated invariant T, MAIT) 細胞の原発性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis, PBC) における病態生理的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】 新潟大学医歯学総合病院と関連病院で診断・治療された PBC 25 例の肝生検組織および外科的肝切除組織、末梢血を使用した。慢性ウイルス性肝疾患患者 19 例と転移性肝腫瘍患者 13 例を対照群と、また、PBC 群ではウルソデオキシコール酸 (UDCA) による治療前後で末梢血検体の比較検討も行った。肝組織と末梢血から比重遠心法にてリンパ球を分離後、フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) により CD69 や NKG2D, IL-18R, IL-7R などの細胞表面マーカーの発現を解析した。また、各群の末梢血リンパ球を *in vitro* で刺激後に MAIT 細胞の活性化と各種サイトカイン産生を FCM で解析した。

#### 【結果】

PBC 群では MAIT 細胞が末梢血中・肝臓中ともに有意に減少しており、また肝障害が強い血清トランスアミナーゼ高値群で MAIT 細胞はより活性化していた。*in vitro* では MAIT 細胞を活性化することによりアポトーシスが誘導された。UDCA 治療により肝機能が改善した PBC 症例では、末梢血中の MAIT 細胞の割合に改善が認められたものの、治療後も他群と比較すると低値の状態が持続していた。また、活性化マーカーに治療前後で変化が認められず、IL-7R や IL-18R の発現が低下していた。また、PBC では TNF- $\alpha$  の産生が低下していた。

#### **【結論】**

本研究から、1) PBC 症例における肝臓での MAIT 細胞の消耗、2) 1)により UDCA 治療により血清生化学データが改善した状態でも肝臓内では慢性炎症が持続していることが推察された。つまり、長期間の炎症持続による MAIT 細胞の疲弊状態が PBC 病態形成に関与することが示唆された。

#### **【学位論文としての価値の有無】**

上述の新規性を鑑みて、学位論文としての価値を有すると判断した。