

# 【7】

氏 名	岸 遼
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第838号
学位授与の日付	令和5年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (内科学（内分泌代謝）)
学位論文題目	Increased number of Mucosal-Associated Invariant T Cells is associated with the inhibition of nonalcoholic fatty liver disease in high fat diet-fed mice (MAIT細胞数の増加は高脂肪食飼育マウスの肝脂肪蓄積を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 入 澤 篤 志 (副査) 教授 杉 本 博 之 教授 倉 沢 和 宏

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背 景】

自然免疫型T細胞のひとつであるMucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞は、自然免疫細胞と適応免疫細胞の両方の性質を持ち、自然免疫と適応免疫の橋渡し機能を担う。MAIT細胞は、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17などの炎症性サイトカインを産生し、アレルギー疾患や自己免疫疾患など様々な疾患の病態形成に関与する。脂肪肝や2型糖尿病も慢性炎症性の特徴を持つが、その病態におけるMAIT細胞の機能は不明であった。また、MAIT細胞はヒトT細胞中で最大の亜集団を形成するが、マウスではその数が極めて少ない。そのためマウスを用いたMAIT細胞機能の解析には、MAIT細胞を豊富に持つ新規マウスモデルの作製と解析が必要であった。共同研究者である若尾らは最近、マウスMAIT細胞のiPS細胞株を樹立した。また、同iPS細胞を用いてMAIT細胞を豊富に持つ新規マウス(以下Va19マウス)を作成した。

### 【目 的】

MAIT細胞が肥満に伴う肝臓および全身の代謝異常の病態に与える影響とその機序を明らかにすることを目的とした。

### 【対象と方法】

本研究は獨協医科大学実験委員会の承認を得て、指針にしたがって行った。

マウスはオスのみを使用した。Va19マウスおよびコントロールであるC57BL/6マウス（以下B6マウス）を生後6週齢から27週齢まで高脂肪食（以下HFD）または通常食（以下NC）にて飼育、4群を設定した。27週齢で、糖負荷試験（以下GTT）およびインスリン負荷試験（以下ITT）を行い、

MAIT細胞数の増加が糖代謝に与える影響を評価した。GTTでは、マウスにブドウ糖（2 mg/g体重）を腹腔内注射した。また、ITTでは、ヒトインスリンをNCマウスで1.0 mU/g体重、HFDマウスで1.5 mU/g体重の量、腹腔内注射した。血液サンプルは、ブドウ糖またはインスリン注射の前、15、30、60、90、120分後に尾静脈から採取した。数日間のリカバリー後にマウスを安楽死させ、精巢上体周囲脂肪（以下eWAT）・肝臓・腸管・血清を採取した。

血清のAST、ALT、総コレステロール、トリグリセリド（以下TG）、遊離脂肪酸（以下NEFA）は、酵素法にて測定した。肝臓のTGは、FOLCH法にて測定した。肝臓やeWATではインスリン抵抗性関連遺伝子や脂肪合成関連遺伝子をreal-time PCRにて測定した。転写物の相対量は、36B4の発現量にて正規化した。データの定量化はdelta-delta Ct法にて行った。

肝臓におけるMAIT細胞の割合は肝組織のフローサイトメトリーにて測定した。肝臓の脂肪蓄積は、肝組織のHematoxylin Eosin（HE）染色やSudanⅢ染色にて評価した。nonalcoholic fatty liver disease（NAFLD）の活性は、HE染色した肝組織を用い、NAFLD activity score（NAS）にて評価した。脂肪細胞の大きさは、画像解析システムを用いて定量評価した。腸管の透過性は、経口投与したFluorescein isothiocyanate（FITC）-dextranの血液中への漏出にて指標した。群間の比較はstudent' t検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

## 【結 果】

V $\alpha$ 19マウスはB6マウスと比べ、肝臓におけるMAIT細胞を60~80倍程度多く有していた。HFDに伴う脂肪肝に与えるMAIT細胞の影響をNASにて評価したところ、B6マウスと比べV $\alpha$ 19マウスではNASが有意に低値であった。また肝臓へのTGの含有量も有意に減少していた。real-time PCRにて評価した肝臓のACC1、SREBP1c、FASなど脂肪合成関連遺伝子の発現は、B6マウスと比べV $\alpha$ 19マウスで有意に低下していた。一方、脂肪酸酸化関連遺伝子であるCPT1A、ACOX1、ACOX2、PPAR $\alpha$ の肝臓における発現は、両マウス間で有意差がなかった。血清TGおよびNEFA濃度は、HFD飼育時のみB6マウスと比べV $\alpha$ 19マウスで低値であったが、NC時には両マウス間で有意差がなかった。

次に、MAIT細胞の増加と糖代謝との関連について検討した。肝糖新生の律速酵素であるPEPCK、PGC-1 $\alpha$ の発現は、HFD飼育時B6マウスに比べV $\alpha$ 19で低下していた。しかし、GTT、ITTで評価した糖代謝とインスリン感受性は、HFD飼育時、NC飼育時ともに、B6マウスとV $\alpha$ 19マウス間の有意差を認めなかった。

内臓脂肪組織の炎症性リモデリングは、肥満関連代謝異常の病態に重要な役割を果たす。そこで次に、MAIT細胞数の増加がeWATのHFD誘発性炎症性リモデリングに与える影響について検討した。予想に反し、eWATにおける炎症性サイトカインの発現や炎症性M1マクロファージの数は、B6マウスとV $\alpha$ 19マウス間で有意差を認めなかった。

MAIT細胞は、マウスの全組織中腸管粘膜に最も多く存在する。また、肥満症で引き起こされる腸管機能の異常は、肝臓および全身の代謝に悪影響を及ぼす。そこで最後に、MAIT細胞数の増加が腸管透過性に及ぼす影響を検討した。経口投与したFITC-dextranの血液中への漏出を腸管透過性の指標とした。血中FITC-dextran濃度は、HFD飼育時、NC飼育時共にV $\alpha$ 19マウスとB6マウス間で有意

差は認められず、MAIT細胞数の増加はマウスの腸管透過性に影響を及ぼさないと考えられた。

#### 【考 察】

本研究で、*V a 19*マウスの解析を通じ、MAIT細胞数の増加が肝臓の脂肪合成系遺伝子の発現と脂肪蓄積を抑制することを明らかにした。MAIT細胞がどのように脂質合成を抑制するのか、その機序の解明が残された今後の課題である。MAIT細胞から分泌される何らかの液性因子が、肝細胞の脂質合成に重要な酵素活性に抑制的な影響を与えるのではないかと仮説を持っている。そのような体液性因子を見出すために、今後MAIT細胞と肝細胞の共培養実験を計画している。また、*V a 19*マウスでは、B6マウスと比べてNEFA濃度が低下していた。肝臓はNEFAを材料として中性脂肪を合成するため、血清NEFAの低下が肝脂肪蓄積の低下の原因である可能性は否定できない。この可能性については、さらなる検討が必要である。

#### 【結 論】

MAIT細胞数の増加は、肝臓の脂肪合成経路の抑制を介し、肝脂肪蓄積を負に制御、脂肪肝を改善すると考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### 【論文概要】

自然免疫型T細胞のひとつであるMucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞は、自然免疫細胞と適応免疫細胞の両方の性質を持ち、自然免疫と適応免疫の橋渡し機能を担う。MAIT細胞は、炎症性サイトカインを産生し、アレルギー疾患や自己免疫疾患など様々な疾患の病態形成に関与する。脂肪肝炎や2型糖尿病も慢性炎症性の特徴を持つが、その病態におけるMAIT細胞の機能は不明であった。また、MAIT細胞はヒトT細胞中で最大の亜集団を形成するが、マウスではその数が極めて少ない。共同研究者である若尾らはマウスMAIT細胞のiPS細胞株を樹立し、MAIT細胞を豊富に持つ新規マウス（以下*V a 19*マウス）を作成した。

*V a 19*マウスおよびコントロールであるC57BL/6マウス（以下B6マウス）を生後6週齢から27週齢まで高脂肪食（以下HFD）または通常食（以下NC）にて飼育し、4群を設定した。申請論文では、27週齢にて、MAIT細胞が、肝臓および全身の糖・脂質代謝に与える影響とその機序について検証している。

HFDに伴う脂肪肝に与えるMAIT細胞の影響をNAFLD activity score (NAS) にて評価したところ、B6マウスと比べ*V a 19*マウスではNASが有意に低値であった。また肝臓へのトリグリセリド（以下TG）の含有量も有意に減少していた。real-time PCRにて評価した肝臓のACC1、SREBP1c、FASなど脂肪合成関連遺伝子の発現は、B6マウスと比べ*V a 19*マウスで有意に低下していた。一方、脂肪酸酸化関連遺伝子であるCPT1A、ACOX1、ACOX2、PPAR  $\alpha$  の肝臓における発現は、両マウス間で有意差がなかった。血清TGおよび遊離脂肪酸濃度は、HFD飼育時のみB6マウスと比べ*V a 19*マウスで低値であったが、NCには両マウス間で有意差がなかった。

次に、MAIT細胞の増加と糖代謝との関連について検討している。肝糖新生の律速酵素であるPEPCK、PGC-1  $\alpha$  の発現は、HFD飼育時B6マウスに比べ*V a 19*で低下していた。しかし、糖負荷試

験、インスリン負荷試験で評価した糖代謝とインスリン感受性は、HFD飼育時、NC飼育時ともに、B6マウスとV $\alpha$ 19マウス間の有意差を認めなかった。

以上の結果より、MAIT細胞数の増加は、肝臓の脂肪合成経路の抑制を介し、肝脂肪蓄積を負に制御、脂肪肝を改善すると結論づけている。MAIT細胞がどのように脂質合成を抑制するのか、その機序の解明が残された今後の課題である。

#### **【研究方法の妥当性】**

申請論文では、V $\alpha$ 19マウスおよびコントロールであるB6マウスを用いて比較検討している。サンプルサイズは十分であり、その結果の信頼性は高い。適切な対象群の設定と客観的な統計解析を行っており、本研究方法は妥当なものである。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

本研究は、V $\alpha$ 19マウスを用いて、MAIT細胞数の増加が肝臓の脂肪合成経路の抑制を介し、脂肪肝を改善したことを示した初めての研究である。MAIT細胞の機能を解析するには、MAIT細胞を豊富にもつマウスが必要であり、獨協医科大学先端医化学研究センターの若尾らのグループがV $\alpha$ 19マウスの作成に成功した。本研究はV $\alpha$ 19マウスを用いたことで得られた実験結果であり、新奇性・独創性に優れていると評価する。

#### **【結論の妥当性】**

申請論文では、多数のマウスを用いて、適切な対象群の設定の下、確率された実験手法と統計解析を用いて、MAIT細胞の増加と脂肪肝の改善の関係を位置付けている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、糖代謝、脂質代謝、免疫学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

#### **【当該分野における位置付け】**

申請論文では、MAIT細胞数の増加は、肝臓の脂肪合成経路の抑制を介し、脂肪肝を改善すると結論づけている。脂肪肝が改善した機序まで解明されれば、今後の脂肪肝の治療にも応用できる大変意義深い研究と評価ができる。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、免疫学や肝臓における糖や脂質代謝の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

#### **【学位授与の可否】**

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

#### **(主論文公表誌)**

International Journal of Molecular Sciences

(23 : 15309, 2022)