

## 「血液中に存在する脳梗塞後の自己抗体や炎症抑制因子の探索」

九州大学生体防御医学研究所 准教授

伊藤 美菜子

### 要旨

脳梗塞は主要な死亡・要介護原因であり、高齢化社会において再発抑制と慢性期機能回復の促進が重要課題である。本研究では、脳梗塞慢性期の血液中に存在する炎症抑制および組織修復因子の同定を目的とした。老齢および若齢脳梗塞モデルの解析から、老齢個体で形質細胞の増加と BCR クローナリティの上昇を認め、ミエリン脂質スルファチドを認識する自己抗体 (Clone#1) を同定した。老齢脳では長鎖・ヒドロキシ化スルファチドが増加しており、Clone#1 はオリゴデンドロサイト分化を促進し、EAE および老齢脳梗塞モデルで症状を改善した。ヒト脳梗塞患者でも抗スルファチド抗体は加齢とともに増加し、高値例で神経機能回復率が高い傾向を示した。さらに脳梗塞慢性期には末梢血 Treg が増加し、MHC クラス II や CTLA4 を高発現する抑制的・組織適応的表現型へ再プログラム化されていた。慢性期 PBMC や血清の移入は梗塞体積を縮小させ、この効果は Treg 依存的であった。以上より、老齢期に誘導される自己抗体と Treg 応答が免疫記憶様制御機構として機能し、脳梗塞後の再発抑制およびミエリン修復に寄与する可能性が示された。

### 背景・目的

脳梗塞は世界的に主要な死亡および要介護原因疾患であり、QOL を大きく減少させる疾患の一つである (1)。急性期の血栓溶解療法や血管内治療の進歩により救命率は改善しているものの、多くの患者が慢性的な神経障害を抱え、さらに再発率が高いことが臨床上的大きな課題となっている (2)。特に高齢化社会においては、再発抑制および慢性期の機能回復を促進する治療戦略の確立が強く求められている。

脳梗塞後の病態形成には、神経細胞死や血管障害に加えて、免疫系が段階的かつ複雑に関与する。急性期には自然免疫系が中心となって炎症反応を惹起するが、亜急性期から慢性期にかけては獲得免疫系が病態の進展および修復過程に関与することが明らかになりつつある (3, 4)。脳組織の壊死に伴い、通常は隔離されている中枢神経系由来自己抗原が末梢に放出されるにもかかわらず、自己免疫疾患が高頻度に発症しないという事実は、脳梗塞後に免疫寛容を維持しつつ組織修復を促進する内因性制御機構の存在を強く示唆している。

さらに、脳梗塞は高齢者に多発する疾患であり、加齢に伴う免疫系の変容 (が病態や回復機構に影響を及ぼす可能性が高い (5))。しかし、老齢個体における獲得免疫応答の質的变化や、血液中に存在する体液性因子の機能的意義については十分に解明されていない。以上の背景を踏まえ、本研究では脳梗塞慢性期の血液中に存在する自己抗体および炎症抑制に関与する免疫細胞に着目し、それらの同定と機能解析を行った。

本研究は、脳梗塞慢性期の血液中に存在する脳梗塞後の炎症抑制や組織修復を担う細胞や因子を同定することを目的とした。

## 方法

### マウス脳梗塞モデル

C57BL/6J マウスに中大脳動脈閉塞モデル (middle cerebral artery occlusion: MCAO) を作製した。頸部から総頸動脈を剖出し、外頸動脈よりシリコンコートしたナイロン糸を中大脳動脈の分岐点まで挿入して一過性虚血状態を作り、60 分後にナイロン糸を除去することで再灌流した。神経症状スコアは、過去に確立された 4 段階神経スコア法 (0; 観察可能な障害なし, 1; 前肢の屈曲, 2; 側頭部を押した際の抵抗力の低下, circling なし, 3; 側頭部を押した際の抵抗力の低下, circling あり) を用いて評価した。

### シングルセル RNA-seq 解析

麻酔したマウスを PBS を用いて経心灌流し、梗塞巣が存在する右大脳を取り出した。採取した組織からは、Gentle MACS (Miltenyi Biotec) を用いて、キットのプロトコルに従い、脳の細胞を単離した。調整した細胞はフローサイトメトリー用抗体で染色した。細胞染色には抗マウス CD45.2-FITC 抗体、抗マウス CD11b 抗体を用いた。同時に、Totalseq hashtag 抗体 (BioLegend) を各サンプルと反応させた。加えて、死細胞除去のために Fixable Viability Dye eFluor 780 を用いて死細胞を染色し、FACSMelody (BD Biosciences) を用いて死細胞を除外して採取した。

ライブラリは、Chromium コントローラ (10 × Genomics) を使用して、Chromium Next GEM Single Cell 5' Reagent Kits v2 (Dual Index, 10 × Genomics) のプロトコルに従って調製した。バーコード化された Single Cell VDJ 5' Gel Beads、細胞と RT 酵素を含むマスターミックス、およびオイルを Chromium Next GEM Chip K にロードすることによって GEM を調製した。その後、バーコード化された cDNA を GEM から生成した。cDNA は PCR によって増幅され、V(D)J、5' 遺伝子発現および Hashtag 配列を含むライブラリを調製した。その後、NovaSeq 6000 (Illumina) を使用してシーケンスを行った。

### #Clone1 抗体の作成

BCR レパトア解析で得た BCR 配列より、抗体の IgHV, IgKV 配列を持つプラスミドを作製した。作製したプラスミドは ScreenFect UP-293 を用いて、GlutaMax を加えた HE400 培地で培養中の HEK293 細胞へトランスフェクションした。トランスフェクション後、AB-Capture MAG2 (ProteNova) を用いて、キットのプロトコルに従い、細胞から #Clone1 抗体を精製した。

### 糖脂質 ELISA

脳梗塞モデルマウスまたは Control マウスの血漿、もしくは Clone1 抗体を用いて、CNS に存在する糖脂質 (GM1, GM2, GM3, GM4, GD3, Galactocerebroside, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b, Sulfatide) に対する ELISA を行った。1% ウシ血清アルブミン中に希釈した血漿を 0.2 μg の抗原を反応させたウェルに反応させ、吸着した抗体と HRP を反応させ、2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて反応を停止させた後、吸光度を測定した。また、ブランクには糖脂質をコートしていない (エタノールのみ) ウェルに血漿を加え、同様の操作を行ったものを使用した。

### フローサイトメトリー解析

脳細胞の調製には、同側大脳半球を解剖し、はさみで細かく刻んだ RPMI 培地 (2% v/v FBS 添加) に溶解したコラゲナーゼ D (2 mg/ml) および DNase I (1 mg/ml) を用いて、37°C で 180 rpm、30 分間消化した。消化サンプルを RPMI で希釈した 37% パーコールに懸濁し、25°C で 800 × g、20 分間遠心分離した。沈殿物を回収した。血液サンプルを PBS 3 ml でさらに希釈し、Lympholyte 4 ml 上に重ねた

後、室温で 800 × g、20 分間遠心分離した。界面の細胞層を回収した。細胞を染色バッファー (0.5% (v/v) FBS、2 mM EDTA を添加した PBS) で希釈した CD16/CD32 モノクローナル抗体 (1:20) を用いて、氷上で 5 分間インキュベートした。その後、細胞を Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (1:1000) の存在下で氷上 15 分間、表面抗原 CD45, CD11b, CD3, CD4, CCR4 の染色を行った。細胞内染色は、eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set を用いて、Foxp3, CTLA4 を染色した。LSRFortessa (BD Biosciences) で取得したデータを FlowJo で解析した。

### 統計解析

統計学的解析には GraphPad Prism (Version 9.5.2) を用いた。統計的有意性は、二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) に続いて、Tukey 検定による多重比較を行った。2 群間の差異を分析する際には Student t 検定を行った。P < 0.05 の場合に有意差あり (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001, ns は有意差なし) とみなした。

## 結果

### 老齢時の抗スルファチド抗体による神経炎症性疾患からの保護

老化に伴って出現する炎症誘発細胞は慢性炎症を惹起し、アルツハイマー病などの神経変性疾患や脳梗塞のような重篤な組織損傷にも関与する。若齢もしくは老齢マウスに脳梗塞を作製し、脳梗塞慢性期の脳細胞の scRNAseq 解析を行った。加齢に伴う顕著な変化として、抗体を産生する細胞である形質細胞が増加し、B 細胞受容体 (BCR) のクローナリティが老齢時に高いことを発見した (図 1)。特に増加していた BCR 配列から抗体を作製し (以下、Clone#1 と呼ぶ)、抗原を探索したところ、硫酸化糖脂質であるスルファチドを認識することを見出した (図 2)。Clone#1 抗体を用いた免疫染色では老齢マウスの脳組織だけで抗原が確認され、若齢脳や他の組織には抗原が認められなかった。若齢と老齢時の脳内のスルファチドを質量分析イメージングにより解析し、脂肪酸が長く、ヒドロキシ化されているものが老齢で増加することが分かった (図 3)。

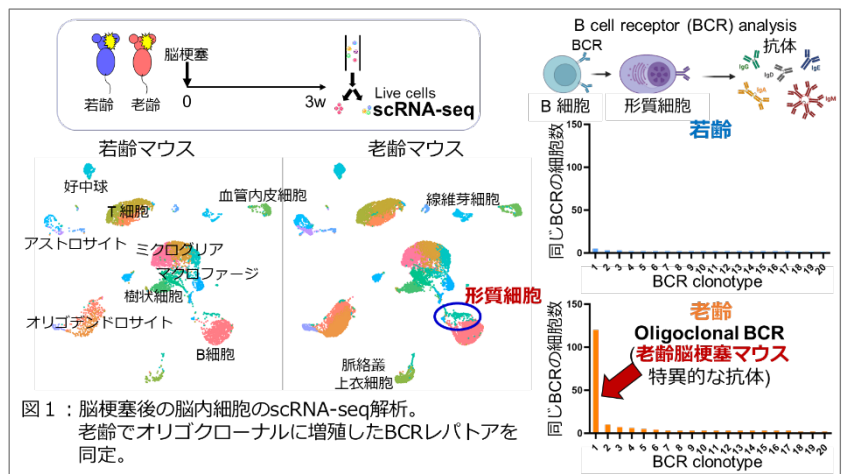


図 1: 脳梗塞後の脳内細胞の scRNA-seq 解析。老齢でオリゴクローナルに増殖した BCR レパトアを同定。

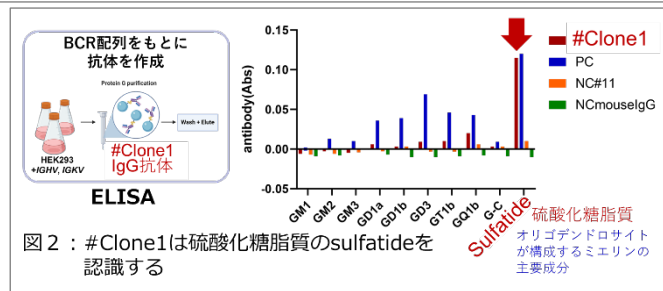


図 2: #Clone1 は硫酸化糖脂質の sulfatide を認識する

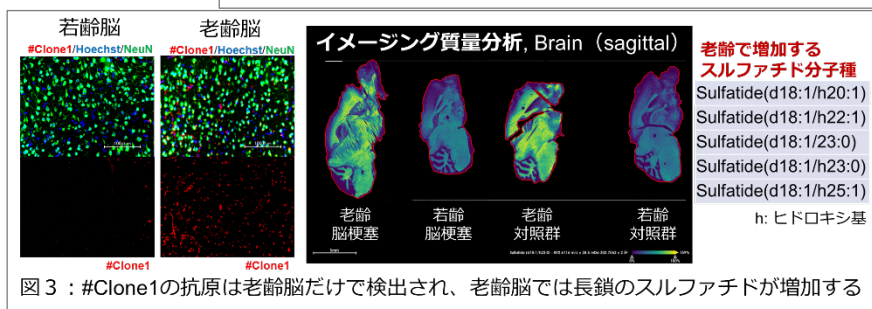


図 3: #Clone1 の抗原は老齢脳だけで検出され、老齢脳では長鎖のスルファチドが増加する

これらのスルファチドの合成や、細胞表面に発現させることで、抗体との結合を確認予定である。スルファチドはオリゴデンドロサイトが構成するミエリンに多く存在している。脳梗塞後のオリゴデンドロサイトでは老化により増殖能や発生・分化に関連する遺伝子発現が低下することから、損傷からの回復が遅れることが示唆された。オリゴデンドロサイトの分化における Clone#1 抗体の影響を調べるために、ヒト iPS 細胞から神経系の細胞に分化誘導する際に Clone#1 抗体を添加すると、アルツハイマー病患者由来の iPSC からオリゴデンドロサイトへの分化を促進することが分かった。一方で、アストロサイトや神経細胞への分化には影響がなかった。健常者由来の iPSC では Clone#1 によるオリゴデンドロサイトの分化はあまり促進されなかったことから、健常者と患者でのスルファチドの組成の違いを検討予定である。さらに、in vivo での Clone#1 抗体の効果を検証するために、ミエリンの損傷を引き起こす病態である多発性硬化症マウスモデルの EAE モデルや脳梗塞マウスモデルに Clone#1 抗体を投与したところ、症状の改善効果が認められた。脳梗塞では老齢時でのみ症状が改善され、老齢特異的なスルファチドの発現が重要であることが示唆された (図 4)。以上より、老齢時や病態時に特異的なスルファチドが合成され、それに対する自己抗体が産生されることで老化に抗うような保護的な役割を担っていることが明らかになった。スルファチドに対する抗体はオリゴデンドロサイトの分化や増殖を促すことでミエリンを再生させ、神経症状を改善することが示唆された。

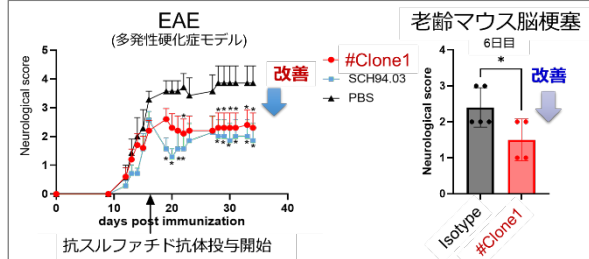


図 4: #Clone1はEAEや脳梗塞の神経症状を改善する

また、脳梗塞などの神経症状の重症度を示す、NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale)の入院時から退院時の回復率を比べると、抗スルファチド IgG の濃度が高い患者の方が回復率が高い傾向が認められた (図 5)。

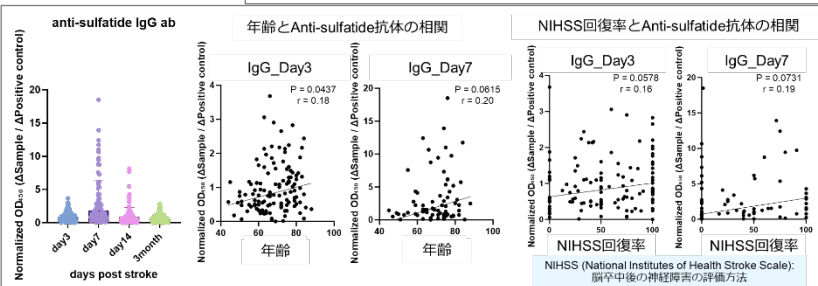


図 5: 脳梗塞後ヒト検体では、年齢に伴い抗スルファチド自己抗体が上昇する IgG抗体の濃度と脳梗塞後の神経障害からの回復率が相関する

以上の結果より、老齢時の脳梗塞後に産生される抗スルファチド抗体は、加齢に伴うミエリン修復能力の低下から保護する働きがある可能性が示唆された (図 6)。

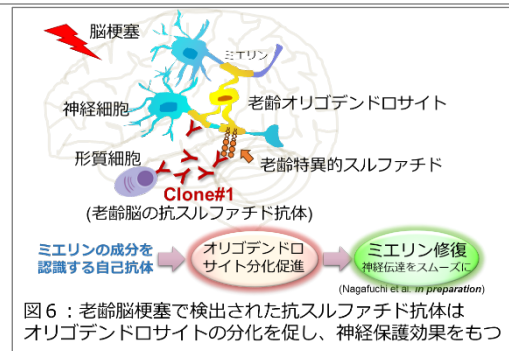


図 6: 老齢脳梗塞で検出された抗スルファチド抗体はオリゴデンドロサイトの分化を促し、神経保護効果をもつ

### 脳梗塞慢性期 PBMC における Treg の増加と機能的遺伝子発現の変化

次に、細胞性免疫応答の変化に着目した。虚血性脳卒中後に PBMC 中 Treg 割合が高い患者ほど予後が良好であるとの報告 (6)を踏まえ、慢性期 PBMC を詳細に解析した。その結果、マウスおよびヒトにおいて脳梗塞慢性期に Treg が有意に増加していることを確認した (図 7)。

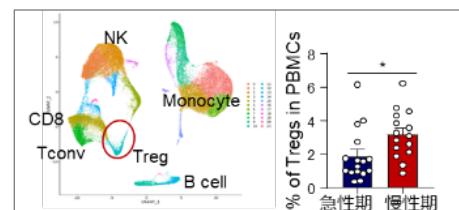
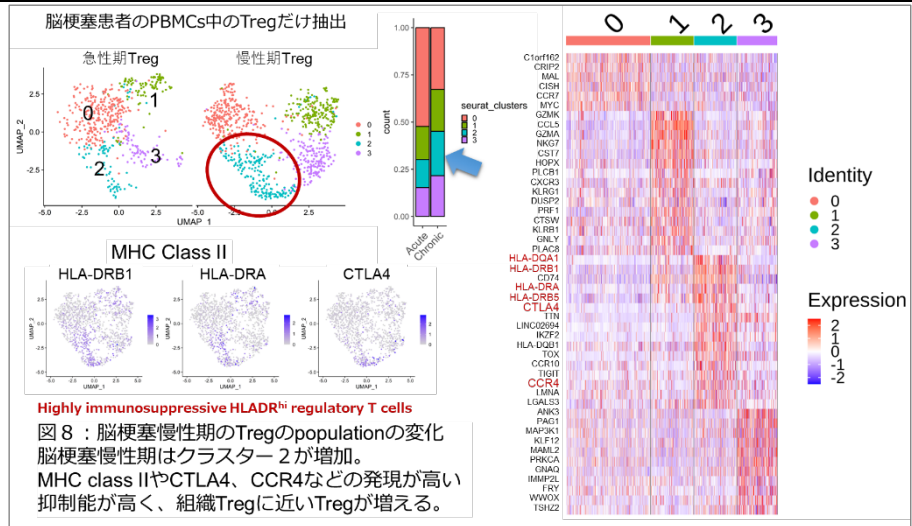
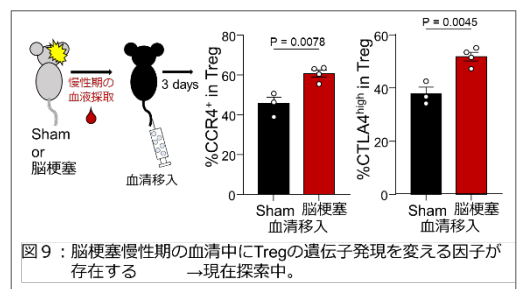


図 7: 脳梗塞患者の末梢血単核球 (PBMCs)では慢性期のTregが増加する

脳梗塞患者 PBMC の scRNA-seq 解析では、慢性期 Treg が MHC クラス II および CTLA4 を高発現する高度に抑制的なサブクラスター (7, 8) を形成していることが明らかとなった。さらに、これらの Treg は CCR4 などの組織 Treg 関連マーカーを高発現しており、脳組織由来 Treg に類似した表現型を示していた



(図8)。この結果は、末梢血 Treg が慢性期において組織適応的な性質を獲得している可能性を示唆する。機能的検証として、脳梗塞慢性期マウス由来 PBMC を他個体へ移入し、その後 MCAO を誘導したところ、梗塞体積の有意な縮小および神経学的スコアの改善が認められた。この保護効果は Treg を枯渇させることで消失した。したがって、慢性期 PBMC 中 Treg が脳梗塞改善に本質的に寄与している



ことが示された。また、PBMC だけでなく、脳梗塞慢性期マウス由来の血清を他個体に移入することによっても梗塞体積の有意な縮小および神経学的スコアの改善が認められた。脳梗塞慢性期の血清中に PBMCs 中の Treg の遺伝子発現を変える因子が存在することが示唆されたため、現在プロテオーム解析を行い因子を探索中である (図9)。

これらの結果から、一度虚血性イベントを経験した Treg は末梢血において表現型を再プログラム化し、再発時に迅速かつ強力に炎症を抑制する能力を獲得する可能性が示唆された。これは、脳梗塞後に免疫記憶様の制御機構が形成されることを示す重要な知見である。

## 考察

本研究は、老齢個体における脳梗塞後の免疫応答を包括的に解析することで、加齢に伴い誘導される自己抗体および制御性 T 細胞 (Treg) の新たな保護的役割を明らかにした。従来、自己抗体や炎症性免疫応答は神経変性や組織障害を悪化させる要因として捉えられることが多かったが、本研究では老齢特異的に誘導される抗スルファチド抗体がミエリン修復を促進し、神経症状を改善する可能性を示した点が重要である。特に、老齢脳で特異的に増加するスルファチド分子種を同定し、それに対する自己抗体が神経保護的に機能することを示したことは、加齢に伴う脂質代謝変化と適応的免疫応答の連関を示す新しい概念を提示するものである。

また、脳梗塞慢性期に末梢血 Treg が増加し、高度に抑制的かつ組織適応的な表現型へと再プログラム化されることを示した。さらに、慢性期 PBMC や血清の移入により梗塞体積が縮小したことから、虚血性イベント後に免疫記憶様の制御機構が形成される可能性が示唆された。これは、脳梗塞後の免疫応答が単なる炎症の遷延ではなく、再発に備えた適応的制御機構へと転換し得ることを示す重要な知見である。国内外において、脳梗塞研究は急性期治療や血管再開通療法に重点が置かれてきたが、本研究は慢性期

および老齢個体に焦点を当て、体液性免疫と細胞性免疫の両側面から再発制御機構を明らかにした点で国際的にも独自性が高い。とりわけ、自己抗体を治療標的ではなく「内因性修復因子」として再定義した点は、自己免疫学および神経免疫学分野に新たな視座を提供するものである。

社会的意義として、脳梗塞は高齢化社会において要介護状態の主要原因であり、再発予防および機能回復促進は喫緊の課題である。本研究で同定された抗スルファチド抗体や Treg 活性化因子は、将来的にバイオマーカーとして予後予測に応用できる可能性があるだけでなく、抗体医薬や免疫調整療法としての開発も期待される。特に、高齢者特異的な免疫制御機構を標的とする治療戦略は、加齢関連疾患に対する新たな医療アプローチを拓く可能性を有する。

今後は、老齢特異的スルファチド分子種の詳細な構造解析および合成系の確立、抗体との結合特異性の精密評価を進めるとともに、慢性期血清中に存在する Treg 活性化因子の同定をプロテオーム解析により進める必要がある。さらに、ヒト検体を用いた縦断的解析により、免疫記憶様制御機構が再発抑制にどの程度寄与するかを明らかにすることが重要である。

### 共同研究者

東京理科大学 吉村昭彦先生  
順天堂大学 横溝岳彦先生、李(岡田)賢哲先生  
近畿大学 桑原基先生  
九州大学 吾郷哲朗先生、中村晋之先生

### 引用論文

1. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Neurol.* 2024;23(4):344-81.
2. Flach C, Muruet W, Wolfe CDA, Bhalla A, Douiri A. Risk and Secondary Prevention of Stroke Recurrence: A Population-Based Cohort Study. *Stroke.* 2020;51(8):2435-44.
3. Shichita T, Ooboshi H, Yoshimura A. Neuroimmune mechanisms and therapies mediating post-ischaemic brain injury and repair. *Nat Rev Neurosci.* 2023;24(5):299-312.
4. Shi FD, Yong VW. Neuroinflammation across neurological diseases. *Science.* 2025;388(6753):eadx0043.
5. Toyoda K, Inoue M, Koga M. Small but Steady Steps in Stroke Medicine in Japan. *J Am Heart Assoc.* 2019;8(16):e013306.
6. Santamaría-Cadavid M, Rodríguez-Castro E, Rodríguez-Yáñez M, Arias-Rivas S, López-Dequidt I, Pérez-Mato M, et al. Regulatory T cells participate in the recovery of ischemic stroke patients. *BMC Neurol.* 2020;20(1):68.
7. Yang H, Ye S, Goswami S, Li T, Wu J, Cao C, et al. Highly immunosuppressive HLADR(hi) regulatory T cells are associated with unfavorable outcomes in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2020;146(7):1993-2006.
8. Xydia M, Rahbari R, Ruggiero E, Macaulay I, Tarabichi M, Lohmayer R, et al. Common clonal

origin of conventional T cells and induced regulatory T cells in breast cancer patients. *Nat Commun.* 2021;12(1):1119.

#### 助成研究に関連した発表論文

1. ○Kaneko R, Matsui A, Watanabe M, Harada Y, Kanamori M, Awata N, Kawazoe M, Takao T, Kobayashi Y, Kikutake C, Suyama M, Saito T, Saido TC, **Ito M**. Increased neutrophils in inflammatory bowel disease accelerate the accumulation of amyloid plaques in the mouse model of Alzheimer's disease. *Inflamm Regen.* 2023, 15:43(1):20.
2. Mise-Omata S, Ando M, Srirat T, Nakagawara K, Hayakawa T, Iizuka-Koga M, Nishimasu H, Nureki O, **Ito M**, Yoshimura A. SOCS3 deletion in effector T cells confers an anti-tumorigenic role of IL-6 to the pro-tumorigenic cytokine. *Cell Rep.* 2023, 29:42(8):112940.
3. Srirat T, Hayakawa T, Mise-Omata S, Nakagawara K, Ando M, Shichino S, **Ito M**, Yoshimura A. NR4a1/2 deletion promotes accumulation of TCF1+ stem-like precursors of exhausted CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *Cell Rep.* 2024, 26:43(3):113898.
4. Iizuka-Koga M, **Ito M**, Yumoto N, Mise-Omata S, Hayakawa T, Komai K, Chikuma S, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T, Yoshimura A. Reconstruction of Sjögren's syndrome-like sialadenitis by a defined disease specific gut-reactive single TCR and an autoantibody. *Clin Immunol.* 2024; 264:110258.
5. ○Watanabe M, Matsui A, Awata N, Nagafuchi A, Kawazoe M, Harada Y, **Ito M**. Differences in the characteristics and functions of brain and spinal cord regulatory T cells. *J Neuroinflammation.* 2024, 1:21(1):146.
6. Nakagawara K, Ando M, Srirat T, Mise-Omata S, Hayakawa T, **Ito M**, Fukunaga K, Yoshimura A. NR4A ablation improves mitochondrial fitness for long persistence in human CAR-T cells against solid tumors. *J Immunother Cancer.* 2024, 16:12(8):e008665.
7. Aki D, Hayakawa T, Srirat T, Shichino S, **Ito M**, Saitoh SI, Mise-Omata S, Yoshimura A. The Nr4a family regulates intrahepatic Treg proliferation and liver fibrosis in MASLD models. *J Clin Invest.* 2024, 15:134(23):e175305.
8. Hirata Y, Brems H, Van der Auweraer S, Ohyagi M, Iizuka M, Mise-Omata S, **Ito M**, Messiaen L, Mizuno S, Takahashi S, Legius E, Yoshimura A. Legius syndrome mutations in the Ras-regulator SPRED1 abolish its membrane localization and potentially cause neurodegeneration. *J Biol Chem.* 2024; 300(12):107969.
9. ○Takao T, Matsui A, Kikutake C, Kan-O K, Inoue A, Suyama M, Okamoto I, **Ito M**. Maternal asthma imprints fetal lung ILC2s via glucocorticoid signaling leading to worsened allergic airway inflammation in murine adult offspring. *Nat Commun.* 2025, 13:16(1):631.
10. Ishii Y, Shiota A, Takao T, Yamamoto N, Ogawa T, Jo A, Shinozaki S, Fukuyama S, Koga T, **Ito M**, Tanaka H, Tamura A, Tsukita S, Matsumoto K, Okamoto I, Kan-O K. Claudin-3 deficiency inhibits allergic responses in an ovalbumin-induced asthma mouse model. *Allergol Int.* 2025; 74(3):472-475.

11. Nonaka D, Yoshida S, Nakano K, Li X, Okamura T, Umemoto E, Yamada T, Watanabe M, Jinno S, **Ito M**, Tsuda M, Noguchi N, Jiang JX, Sumiya E, Sawa S. Fibroblast-derived CSF1 maintains colonization of gut mucosal macrophage to resist bacterial infection. *Mucosal Immunol.* 2025; 18(5):1113-1123.
12. Yamasaki A, Shintaku H, Harada A, Maehara K, Tanaka K, Saeki M, **Ito M**, Konishi H, Tsuda M, Prinz M, Kishi Y, Ohkawa Y, Yamamoto S, Masuda T. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A mediates mouse line- and fate-dependent cellular responses in Cx3cr1-Cre genetic tools. *Cell Rep.* 2025, 23:44(9):116267.
13. Dewa KI, Kaseda K, Kuwahara A, Kubotera H, Yamasaki A, Awata N, Komori A, Holtz MA, Kasai A, Skibbe H, Takata N, Yokoyama T, Tsuda M, Numata G, Nakamura S, Takimoto E, Sakamoto M, **Ito M**, Masuda T, Nagai J. The astrocytic ensemble acts as a multiday trace to stabilize memory. *Nature.* 2025, 648(8092):146-156.
14. Ohyagi M, **Ito M**, Iizuka-Koga M, Mise-Omata S, Yoshimura A. Stage-specific roles of clonally expanded CD8+ T cells in regulating amyloid pathology in Alzheimer's disease models. *Nat Commun.* 2025, 27;16(1):9458.
15. Komiyama S, Kodaira Y, Maeda R, Sugiura Y, Suzuki K, Saeki A, Kinashi Y, Oguchi H, Takano K, Onawa S, Matsui A, Sasaki E, Hattori-Muroi K, Kimura S, Fujimura Y, Ka Y, Ogura T, Hanaoka K, **Ito M**, Watarai H, Kaisho T, Udagawa N, Takahashi D, Hase K. M-cell-dependent commensal uptake confers encephalitogenic phenotypes on  $\gamma\delta$ T17 cells in Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2026, 13;123(2):e2506550123.