

令和元年5月20日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15667

研究課題名(和文) 脳梗塞慢性期の制御性T細胞の意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the significance of regulatory T cells in the chronic phase of cerebral infarction

研究代表者

伊藤 美菜子 (ITO, MINAKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特別研究員(PD)

研究者番号：70793115

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)：我々は脳梗塞慢性期における獲得免疫系の意義について解析を行った。慢性炎症の制御と脳神経系の関連はほとんど解明されていない。我々は脳梗塞発症後2週間以上を経過したマウスの脳内には急性期よりもはるかに多くのT細胞が浸潤しており、特に制御性T細胞(Treg)が大量に蓄積することを明らかにした。脳TregはCCL1、CCL20依存的に浸潤し、TCR認識・IL-2・IL-33・セロトニン依存的に増殖し、他の組織Tregとは違ったフェノタイプを示していた。この脳Tregは組織修復に関与するAmphiregulinを発現することによってアストロサイトのグリオシスや神経傷害を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞モデルマウスを用いて、脳梗塞慢性期には獲得免疫を担うリンパ球の一種である制御性T細胞(Tレグ)が大量に梗塞部位に集積し、神経修復過程を制御していることを発見した。この脳Tレグは他の組織に存在するTレグと異なり神経系に特徴的なセロトニン受容体を有しており、セロトニンによって増殖・活性化することがわかった。脳梗塞モデルマウスにセロトニンや脳内のセロトニンを増やす薬(抗うつ薬の一種)を投与したところ、脳Tレグが増加し神経症状が改善した。脳梗塞患者においても脳内セロトニンに作用する抗うつ薬が、脳梗塞の慢性期(リハビリ期)の治療に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the significance of the acquired immune system in the chronic phase of cerebral infarction. In humans and mouse models, the relationship between control of chronic inflammation and the cranial nervous system is poorly understood. We found that in the mouse brain two weeks or more after the onset of cerebral infarction, a large amount of T cells, especially regulatory T cells (Tregs), accumulated much more than in the acute phase. Brain Tregs infiltrated in CCL1- and CCL20-dependent manner, proliferated in TCR-recognition-, IL-2-, IL-33-, and serotonin-dependent manner, and exhibited phenotypes different from those of other tissue Tregs. This brain Tregs controlled astrocyte gliosis (astrogliosis) and nerve injury by expressing amphiregulin (Areg) involved in tissue repair.

研究分野：神経免疫

キーワード：制御性T細胞 脳梗塞

## 1. 研究開始当初の背景

脳卒中は本邦における主な死因、寝たきりの原因のひとつである。現在、脳梗塞の治療法は発症直後の血栓溶解薬投与などに限られており、発症直後しか適用できないことが問題である。脳梗塞は発症後の炎症によって増悪化することが知られている。研究代表者らはこれまで脳炎ウイルスや脳虚血モデルを用いて、感染や虚血時の炎症メカニズムの解明を目指してきた。特に我々のグループでは脳梗塞モデルにおいて発症3日以内に浸潤マクロファージが死細胞由来の DAMPs (danger associate molecular patterns) の刺激を受けて IL-23 や IL-1 などの炎症性サイトカインを放出することで梗塞巣の拡大と神経症状の悪化に寄与することを見出している (Shichita et al. *Nature Med.* 2012)。IL-1 産生にはインフラマソームという巨大なタンパク複合体が必要である。研究代表者らはウイルス感染時や脳虚血時にもインフラマソームが活性化することで炎症を惹起することに注目し、脳炎ウイルスによるインフラマソーム活性化メカニズムを明らかにした (Ito et al. *Plos Pathogens.* 2012)。また、インフラマソーム活性化を制御する因子として Bruton 's tyrosine kinase を同定し、脳虚血時に梗塞巣に浸潤したマクロファージからの IL-1 産生を制御することで、発症12時間後まで効果のある新たな治療法を報告した (Ito et al. *Nature Commun.* 2015)。さらに発症3日目から7日にかけて T 細胞が浸潤し、T 細胞からの IL-17 が梗塞病態の悪化に寄与することを報告している (Shichita et al. *Nature Med.* 2009)。

このように発症後7日以内の脳虚血急性期の自然免疫応答による炎症は大きく理解が進み、自然免疫を標的とした治療法の開発も注目されている (Fu et al. *Nature Rev. Neurol.* 2015.11, 524-535)。しかしながら急性期の現象をターゲットとすると治療可能時間が短い。また実際の患者は発症後長期にわたって障害を持ちながら不自由な生活を送っている。したがって梗塞後慢性期の免疫病態の理解が、慢性期を標的とした治療法の開発や予防的に脳梗塞の症状を軽減する方法の開発に必要である。しかしながらこれまで脳梗塞モデルで発症1週間以降の免疫学的な解析はほとんど行なわれていない。

## 2. 研究の目的

最近の研究により脳梗塞急性期の自然免疫応答による炎症メカニズムの解析は進んでいるが、発症数週間後の慢性期の獲得免疫応答についてはほとんど理解されていない。研究代表者はマウス脳梗塞モデルを解析したところ、発症2週以降に T 細胞が梗塞部位に大量に集積することを見出した。そのほとんどは Th1 細胞と制御性 T 細胞 (Treg) であった。T 細胞欠損マウスへの移入実験などから Treg は神経症状の改善に働くことが明らかとなった。本研究は脳梗塞モデルを用いて、脳梗塞慢性期の Treg 細胞の意義を明らかにするとともに、獲得免疫を利用して組織修復と神経再生を誘導する脳梗塞ワクチンの開発をめざす。

## 3. 研究の方法

実験的脳梗塞モデルではナイロン糸を中大脳動脈に挿入し、60分間虚血状態を惹起した後糸を抜き取ることで再灌流を行った (Shichita et al. *Nature Med.* 2009, 2012. Ito et al. *Nature Commun.* 2015)。

### (1) 脳梗塞慢性期の T 細胞の増幅と浸潤のメカニズム

脳梗塞マウスの脳内に浸潤した CD4 陽性 T 細胞は Th1 細胞と Treg が大半を占める。IFN- $\gamma$  欠損マウスや Treg 除去マウス (DEREG マウス) を用いて解析し、Treg がアストログリオシスの制御に重要であることを既に明らかにしている。そこで Treg の増殖と集積の機序を明らかにする。まず Treg が梗塞部位にあるいは所属リンパ節どちらで増殖しているのかを Ki67 染色で明らかにした。次に Treg を増加させる機構として IL-2 や TGF- $\beta$ 、プロスタグランジン (PGE2) などが報告されている。梗塞部位および所属リンパ節においてこれらの既存のサイトカインや化学メディエーターを定量する。候補物質が同定できればその欠損マウスや中和抗体を用いて、それらの Treg 増加における意義を明らかにする。もし既知のものでない場合は樹状細胞やマクロファージを単離して試験管内で Treg を増加させる活性があるかを調べ候補物質を絞り込む。

Treg が梗塞部位に集積するメカニズムを明らかにするために Treg の表面に発現するケモカイン受容体を FACS で同定する。同時にケモカインアレイを用いて、Treg の浸潤に関与する脳内のケモカインを同定する。そのケモカインもしくはケモカイン受容体の中和抗体や阻害剤、もしくは欠損マウスを用いることによって、Treg の浸潤阻害を検証する。また Treg 特異的に脳内に浸潤させるためにケモカインを脳室内投与し、治療効果を検討する。ケモカイン産生細胞を同定し、その発現誘導機構を明らかにする。

### (2) Treg によるアストログリオシス抑制機構

グリオシスはアストロサイトの増殖と活性化が引き金となる。アストロサイトを活性化する因子として炎症性サイトカインやトロンピンなど様々な因子が報告されている (Pekny et al. *Neurosci Lett.* 2014 Apr 17;565:30-8.)。

野生型マウスおよび Rag 欠損マウスや DEREG マウスの脳梗塞巣よりアストロサイトや T 細胞をセルソーターで分離し、マイクロアレイやリアルタイム PCR によってアストログリオシ

スを引き起こす因子を探索する。候補因子は Rag 欠損マウスや DEREK マウスの梗塞巣由来の細胞で発現が高いことが期待される。

T 細胞由来のアストロサイト制御因子を同定するために ex-vivo でのアストロサイトおよびミクログリアと T 細胞の共培養系を確立する。アストロサイトの活性化は GFAP や神経傷害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現を指標に用いる。で探索した候補因子の中和抗体や阻害剤の存在下で、梗塞巣の T 細胞とアストロサイトを共培養し、アストロサイトの活性化を抑制する実態を明らかにする。ex-vivo の系で明らかにしたことを in vivo に戻し、候補因子のノックアウトマウスや中和抗体を用いて脳梗塞後のアストログリオシスや神経症状を検討する。

### (3) Treg の抗原特異性と治療への応用

TCR トランスジェニックマウスを用いた実験から脳梗塞慢性期に浸潤してくる T 細胞は抗原特異的であると考えられる。従って、この抗原特異的な Treg による免疫寛容を誘導することで脳内炎症関連疾患の新規治療につながることを期待される。

WT と Rag 欠損マウスに脳梗塞を起こし、その後獲得免疫が成立してからもう一度反対側の脳半球に脳梗塞を起こすと T 細胞依存的に脳梗塞が軽減することを既に明らかにしている。また、一度脳梗塞を起こしたマウスに EAE を起こした場合にも抵抗性を示すことを見出している。すなわちこれらの実験により、同一の個体内で脳内炎症性疾患に対する寛容を成立させることができる。また脳梗塞巣より単離した Treg を Rag 欠損マウスに移入して再度脳梗塞を起こした場合、正常なマウス由来の Treg を移入したときよりも神経保護効果が認められた。従って、一度脳梗塞で放出される抗原によって活性化された Treg が二度目の脳内炎症に抑制的に働き神経保護効果につながっていると想定される。これを Treg を特異的に除去する DEREK マウスや前年度に同定した Treg 由来のアストロサイト制御因子を欠損するマウスを用いて証明する。

脳梗塞によって脳組織から放出される抗原を同定する。梗塞巣に浸潤している Treg 細胞を単離し Rag 欠損マウスに移入する。このマウスに脳梗塞を誘導して脳内に浸潤する自己応答性 Treg 細胞の選択性を高める。この Treg をシングルセルソーティングによって単離し、発現する TCR をクローニングする。さらに得られた TCRcDNA をレトロウイルスで Treg 細胞に発現させ、脳内への浸潤を確かめる。抗原は脳組織を破砕した脳組織液を含むメディアウム内で抗原提示細胞と TCR 導入 T 細胞を共培養することにより、T 細胞の活性化・細胞増殖を指標に調べる。この方法は関節炎モデルマウス等で確立されており (Ito et al. Science 2014; 346:363-368)、我々も自己免疫疾患モデルマウスで方法論を確立している。

抗原が同定できれば、抗原を利用してマウスをあらかじめ免疫しておき、その後脳梗塞を起こした場合の保護効果を検討する。

## 4. 研究成果

本研究課題では、脳梗塞慢性期に制御性 T 細胞が脳内に集積し、アストロサイトの過剰な活性化や神経細胞の死を制御するメカニズムが明らかとなった。従来、脳梗塞の慢性期には炎症は治まっていると考えられてきた。しかし、一見炎症反応が収束している慢性期にも、免疫系が活発に作動し重要な働きをしていることが明らかとなった。

ヒト脳梗塞における脳 Treg の研究はこれからであるが、血液中の Treg が多いほど予後が良いことも報告されている。脳梗塞発症後の時間が経過すると、現在の治療法においては再発予防やリハビリに限られているが、すでに臨床の場で用いられている抗うつ薬の投与が新たな治療法として期待される。

さらに、脳内炎症は脳梗塞だけではなく脊髄損傷などの脳脊髄組織の損傷でも、あるいは多発性硬化症のような自己免疫疾患やアルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患でも起こることが知られている。これらの脳内炎症にも獲得免疫が発動され脳 Treg が浸潤、集積し、神経症状に重要な役割を果たしている可能性がある。今後脳 Treg を標的とした脳神経疾患の全く新しい治療法の開発が加速すると期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

全て査読あり

1. **Minako Ito**, Kyoko Komai, Toshihiro Nakamura, Tanakorn Srirat, Akihiko Yoshimura. "Tissue regulatory T cells and neural repair." *Int Immunol*. 2019. Mar 20. pii: dxz031.
2. **Minako Ito**, Kyoko Komai, Setsuko Omata-Mise, Mana Iizuka-Koga, Yoshiko Noguchi, Taisuke Kondo, Ryota Sakai, Kazuhiko Matsuo, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Hiroko Nakatsukasa, Shunsuke Chikuma, Takashi Shichita and Akihiko Yoshimura. "Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery" *Nature*. 2019, Jan;565(7738):246-250.
3. Hiroko Nakatsukasa, Mayumi Oda, Jinghua Yin, Shunsuke Chikuma, **Minako Ito**, Mana Koga-Iizuka, Kazue Someya, Yohko Kitagawa, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, Ikuko

- Koya, Tsukasa Sanosaka, Jun Kohyama, Yu-ichi Tsukada, Soichiro Yamanaka, Takeji Takamura-Enya, Qianjin Lu, Akihiko Yoshimura. "Loss of TET proteins in regulatory T cells promotes abnormal proliferation, Foxp3 destabilization, and IL-17 expression." *Int Immunol*. 2019 Feb 6. doi: 10.1093/intimm/dxz008.
4. **Minako Ito**, Mana Iizuka-Koga, Makoto Ando, Akihiko Yoshimura. "Development and Functional Modulation of Regulatory T Cells by Transcription Factors and Epigenetics." *Cornea*. 2018, Nov;37 Suppl 1:S42-S49.
  5. Mitsuhiro Kanamori, Hiroko Nakatsukasa, **Minako Ito**, Shunsuke Chikuma, Akihiko Yoshimura. "Reprogramming of Th1 cells into regulatory T cells through rewiring of the metabolic status." *Int Immunol*. 2018 Jul 24;30(8):357-373.
  6. Sana Hibino, Shunsuke Chikuma, Taisuke Kondo, **Minako Ito**, Hiroko Nakatsukasa, Setsuko Omata-Mise and Akihiko Yoshimura. "Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance." *Cancer Res*. 2018, Jun 1;78(11):3027-3040.
  7. Hidenori Kasahara, Taisuke Kondo, Hiroko Nakatsukasa, Shunsuke Chikuma, **Minako Ito**, Makoto Ando, Yutaka Kurebayashi, Takashi Sekiya, Taketo Yamada, Shinichiro Okamoto, Akihiko Yoshimura. "Generation of allo-antigen-specific induced Treg stabilized by vitamin C treatment and its application for prevention of acute graft versus host disease model." *Int Immunol*. 2017, Dec 18;29(10):457-469.
  8. Mana Iizuka-Koga, Hiroko Nakatsukasa, **Minako Ito**, Takashi Akanuma, Qianjin Lu, Akihiko Yoshimura. "Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications." *J Autoimmun*. 2017, Sep;83:113-121.

〔学会発表〕(計6件)

1. **伊藤美菜子**、吉村明彦 “脳梗塞慢性期における制御性T細胞の機能解析” 第91回日本生化学会大会、2018年
2. **伊藤美菜子**、吉村明彦、“脳梗塞慢性期における制御性T細胞の意義” 第40回日本生物学的精神医学会、第61回日本神経化学会大会、2018年
3. **伊藤美菜子**、吉村明彦 “脳梗塞慢性期における制御性T細胞の機能解析” 第83回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2018年
4. **Minako Ito**, Akihiko Yoshimura, “Brain regulatory T cells suppress astroglial and potentiate neurological recovery” Keystone symposia New Frontiers in Neuroinflammation; What Happens When CNS and Periphery Meet? 2018年
5. **伊藤美菜子**、吉村明彦、“脳梗塞慢性期におけるTregの役割” 第4回病因研究会、2018年
6. **Minako Ito**, Akihiko Yoshimura, “Regulation of glial cells by Tregs in the chronic phase after stroke.” The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS2017), 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。