

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02719

研究課題名(和文) 脳Treg・ミクログリアの相互作用による脳組織修復促進メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of brain Treg-microglia interaction to promote brain tissue repair

研究代表者

伊藤 美菜子 (Ito, Minako)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：70793115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：FOXP3+制御性T (Treg) 細胞は、脳梗塞慢性期に脳組織特異的特徴を獲得し、神経症状の回復に寄与する。末梢に存在するTregは、脳卒中慢性期にその表現型を変化させ、脳卒中再発期の炎症や梗塞容積を減少させることができる。Tregは再発急性期に脳内で増加し、初発脳梗塞時に同一の抗原を認識したTregが、その後の再発側脳梗塞にも浸潤していることが明らかになった。再発時のTreg増加はCCR4/CCL17軸に依存していた。これらの結果は、再発時にTregが抗原やケモカインとともに急速に脳に浸潤し、免疫抑制と組織修復に寄与していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tregの誘導やオキシトシンを利用した、脳梗塞の新規治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：FOXP3+ regulatory T (Treg) cell acquire brain tissue-specific characteristics during the chronic stroke phase and contribute to neurological symptom recovery. Tregs in the periphery change their phenotype during the chronic stroke phase and can reduce inflammation and infarct volume during the recurrent stroke. Tregs increased in the brain during the acute phase of recurrence, and T cell receptor repertoire analysis revealed that Tregs recognizing identical antigens during the initial stroke also infiltrated the recurrent side of the subsequent stroke. The Treg increase depends on CCR4/CCL17 axis during stroke recurrence. These results suggest that Tregs infiltrate rapidly the brain with antigens and chemokines during stroke recurrence, contributing to immunosuppression and tissue repair. Unexpectedly, oxytocin increases in the brain after a stroke, plays an essential role in tissue repair and inflammation inhibition, and contributes to ischemic resistance during recurrence.

研究分野：神経免疫

キーワード：制御性T細胞 脳梗塞 オキシトシン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は、脳の血管からの出血や脳の血管の梗塞によって生じる。日本では脳卒中は死因の第4位であり、後遺症によるQOLの低下も問題である。脳卒中の再発率は最大で約51.3%であり、脳卒中の再発は脳卒中の初発症状と類似している。しかし、脳卒中に対する有効な治療法はほとんどない。

脳卒中モデルマウスでは、様々な種類の免疫細胞が梗塞領域に浸潤し、神経細胞障害の増強因子としても抑制因子としても働くことが示されている。制御性T細胞(Treg)は、免疫寛容と組織の恒常性維持に特化した機能を発揮し、脳卒中発症後1週間は脳卒中誘発性炎症を抑制し、脳損傷を軽減する。その後、Tregは脳内に蓄積し、脳組織特異的な特徴を獲得し、組織の修復を促進し、炎症を抑制することにより、神経症状の回復に寄与する。さらに、脳梗塞の慢性期には、頸部リンパ節と脳でTregが抗原特異的に増殖する。脳卒中後、自己抗原が放出され、自己抗体が産生されるが、梗塞が自己免疫疾患につながることはないことから、Tregの免疫抑制機能が示唆される。このように、脳梗塞初期におけるTregの機能の重要性は多くの研究で証明されている。しかし、脳梗塞の繰り返しにおけるTregの機能については不明な点が多い。

2. 研究の目的

ここでは、脳梗塞慢性期における免疫系、特にTregの可能性を明らかにするために、脳梗塞再発モデルマウスを開発し、脳梗塞慢性期におけるTreg能力の持続性に関する新たな知見を得た。

3. 研究の方法

脳卒中の繰り返しに対する免疫反応を調べるため、2回目の脳卒中による免疫反応と1回目の脳卒中による免疫反応を区別して、両側虚血性脳卒中を作成した。

4. 研究成果

(1) 右側に初発(1st attack)の脳梗塞を作り、その後、左側に再発させた(2nd attack)。その結果、再発時には梗塞体積が小さくなることが分かった。初発後、急性期に再発させると炎症が強過ぎてマウスは生き残らなかったが、8日目以降に再発させると、梗塞体積の減少傾向が認められ、脳梗塞後の免疫抑制状態からの回復を待つために以後の実験では初発から3週間後に再発を行った。また、虚血時間を短くして(30 min)初発の脳梗塞を軽くしても、初発と再発の間を長くしても、再発時の梗塞体積の減少が観察された。

(2) 次に、この虚血抵抗性は同一個体内だけで獲得されるのか、血行性に移行するのかを確かめるためにパラバイオシスを行い、脳梗塞マウスもしくはShamマウスと血液を循環させたのちに、脳梗塞を作製した。脳梗塞マウスと血液を共有したマウスでは梗塞体積が小さくなった。そこで、様々なタイムポイントで脳梗塞マウスから採取した血液を血清とPeripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)に分けて、別のマウスに移入し、その後、脳梗塞を起こした。急性期(Day1)と慢性期(Day10)の血清に梗塞体積や神経障害を抑制する成分が含まれることが分かった。急性期の梗塞体積の減少については、ストレスによるグルココルコイドやHMGB1による免疫抑制作用によることが報告されている。しかし、慢性期の脳梗塞抑制性の血清成分については明らかになっていない。またPBMCsについても慢性期のPBMCsの中に、抑制性の細胞が含まれることが分かった。

次に、慢性期のPBMC中の必須細胞が虚血寛容に関与しているかどうかを調べた。T細胞を欠損したマウスでは、再発時の抑制が限定的であったことから、T細胞が再発時の寛容に部分的に関与していることが示唆された。虚血性脳卒中後、PBMC中のTregの割合が高いほど予後が良好であることから16、PBMC中のTregの割合を調べたところ、Tregは脳卒中の慢性期にPBMC中で増加し、さらに、脳卒中慢性期におけるPBMCの梗塞体積および神経学的スコアの減少に対する効果は、Tregの枯渇によって失われた。これらのデータから、脳卒中慢性期のPBMCにおけるTregが、脳卒中の改善に極めて重要であることが示された。

(3) 次に、脳卒中再発時の脳におけるTregを調べた。再発急性期脳ではTregが増加し、一方、炎症性Th1細胞はMCAOを受けた対照急性期脳と比較して減少した。scRNA-seq解析により、コントロールの急性期ではIfngの発現が高いTh1集団が見られたが、再発時にはほとんど見られなかった。フローサイトメトリー解析と一致して、scRNA-seq解析でもTh1細胞の割合が減少し、Tregの割合が増加した。再発時の脳のTregは、対照の急性脳梗塞のTregよりも、組織修復因子の発現が高く、Areg、Il1r1(ST2)、Il2raなどの組織Tregマーカーも高かった。抗原特異的Tregは、記憶T細胞と同様に、同じ抗原で再活性化させると、より強い抗炎症能力を発揮する。しかし、抗原特異性が組織Tregの浸潤にどのように影響するかは、まだ不明である。抗原特異性が再発時のTreg浸潤に関与しているかどうかを推測するために、T細胞受容体

(TCR)レパートリー解析が行われた。興味深いことに、再発時の脳のTCRのほとんどは、最初の脳卒中中のTCRと共通していた。さらに、左右の脳の多くのTCRが頸部リンパ節でも検出されたことから、抗原によって活性化されたT細胞は記憶様細胞となり、脳卒中再発時に同じ抗原に曝露された結果、頸部リンパ節や血液から急速に脳に浸潤することが示唆された。CCR4リガンドであるCcl17は、対照群に比べ再発マウスで高レベルに発現していた。そこで我々は、再発時のTregの増加におけるCcl17の役割に注目した。Ccl17は再発脳卒中中で両側に発現が上昇し、発現細胞は樹状細胞であった。Tregで発現しているCCR4は、脳卒中発症直前の0日目や急性期の3日目よりも、脳卒中後13日目の慢性期のPBMCのTregで高発現していた。CCL17を介したTregの脳への移動の重要性を確認するために、CCL17に対する中和抗体を投与した後に脳卒中を再発させた。再発時の脳内Tregの増加は、CCL17抗体によって抑制された。さらに、虚血耐性による梗塞サイズの縮小は、CCL17抗体によって阻害された。これらの結果は、再発時の脳におけるケモカイン発現の変化と、血液中のTreg表現型(ケモカイン受容体の増加や組織修復マーカーの発現など)が、Tregの脳への移動を促進し、再発時の炎症抑制につながることを示唆している。

(4)

脳卒中急性期のマウスの血清を移植した結果、梗塞容積が減少したが、慢性期の脳梗塞抑制に関与する血清成分は不明であった。T細胞を持たないマウスにもある程度の虚血耐性があることがわかったので、脳全体のバルクRNA-seq解析に基づいて、Treg以外の虚血耐性因子を探索した。虚血耐性の候補遺伝子として、OxtとAvpの2つが同定された。これらの遺伝子は、偽マウスよりも脳卒中マウスの慢性期の反対側で高発現し、急性期のコントロールよりも再発部位で高発現した。視床下部ニューロンによって産生される神経ペプチドであるオキシトシン(OXT)は、社会的相互作用の調節に重要な役割を果たしている。さらに、OXTは神経炎症を抑制し、脳卒中後の神経保護をもたらす。しかし、脳卒中後の内因性オキシトシン上昇の生物学的意義は不明なままである。そこで本研究では、OXTに注目した。バルクRNA-seqデータは、脳卒中慢性期の同側脳と対側脳でOxt発現の増加を示した。さらに、Oxtの発現は急性期Re-MCAO群で急性期対照群よりも高かった。OXT受容体(Oxtr)は、神経細胞だけでなく、アストロサイト、ミクログリアにも発現している。OXTタンパク質は、脳梗塞後の亜急性期から慢性期にかけて同側に増加し、慢性期には対側に増加した。さらに、OXTは亜急性期および慢性期の血漿中にも検出された。OXTが脳卒中急性期の炎症と神経症状を軽減するかどうかを調べるため、OXTを鼻腔内投与したマウスに虚血性脳卒中を誘発した。OXTは、脳梗塞の雌雄マウスにおいて、梗塞体積を減少させ、神経機能を改善した。さらに、OXTは脳梗塞後の脳における好中球浸潤を減少させ、樹状細胞を増加させ、その結果、免疫細胞における炎症性遺伝子の発現が抑制された。遺伝子濃縮解析から、OXT投与は細胞死と炎症を減少させる一方で、抗原提示を増加させることが示唆され、急性期には、OXTはCD4⁺T細胞中のTregの割合を変化させなかったが、一方でOXTはAreg+ST2⁺Tregの数を増加させ、組織修復を促進した。

次に、Oxtの発現は脳卒中の慢性期にも対側で増加したため、内在性OXTが再発時の虚血寛容に関与しているかどうかを調べるため、最初のMCAO後にOXTRアンタゴニストを投与し、MCAO再発を誘導した。虚血耐性は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)群では再発時に観察されたが、OXTR拮抗薬(アトシバン;ATO)群では観察されなかった。浮腫と出血は、OXTR拮抗薬による治療後に増加した。最後に、脳卒中慢性期の組織修復と神経症状の回復に対するOXTの寄与を調べた。いくつかの試験において、慢性期のOXTは神経症状に対して回復効果を示し、Treg、特にAreg+ST2⁺組織修復Tregの数を増加させた。さらに、慢性期にOXTRアンタゴニスト(ATOまたはL-368,899塩酸塩;L3)を投与すると神経症状が悪化したことから、脳梗塞の慢性期におけるOXTの上昇が、組織の修復と神経症状の回復に重要な役割を果たしていることが示された。これらのデータを総合すると、内因性OXTレベルは脳梗塞後に上昇し、炎症、組織修復、再発時の虚血耐性の抑制に寄与していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamamoto S, Matsui A, Ohyagi M, Kikutake C, Harada Y, Iizuka-Koga M, Suyama M, Yoshimura A, Ito M.	4. 巻 15;13
2. 論文標題 In Vitro Generation of Brain Regulatory T Cells by Co-culturing With Astrocytes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 960036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.960036.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanamori M, Ito M.	4. 巻 7;173(3)
2. 論文標題 Immunity in the brain and surrounding tissues.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 145-151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko R, Matsui A, Watanabe M, Harada Y, Kanamori M, Awata N, Kawazoe M, Takao T, Kobayashi Y, Kikutake C, Suyama M, Saito T, Saïdo TC, Ito M.	4. 巻 15;43(1)
2. 論文標題 Increased neutrophils in inflammatory bowel disease accelerate the accumulation of amyloid plaques in the mouse model of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-023-00257-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimura A, Ohyagi M, Ito M.	4. 巻 157
2. 論文標題 T cells in the brain inflammation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Adv Immunol.	6. 最初と最後の頁 29-58.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.ai.2022.10.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makoto Ando, Taisuke Kondo, Wataru Tomisato, Minako Ito, Shigeyuki Shichino, Tanakorn Srirat, Setsuko Mise-Omata, Kensuke Nakagawara, Akihiko Yoshimura.	4. 巻 1(1)
2. 論文標題 Rejuvenating Effector/Exhausted CAR T Cells to Stem Cell Memory Like CAR T Cells By Resting Them in the Presence of CXCL12 and the NOTCH Ligand.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research Communications	6. 最初と最後の頁 41-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2767-9764.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kyoko Komai, Minako Ito, Seitaro Nomura, Shigeyuki Shichino, Manami Katoh, Shintaro Yamada, Toshiyuki Ko, Mana Iizuka-Koga, Hiroko Nakatsukasa and Akihiko Yoshimura	4. 巻 20:12
2. 論文標題 Single-Cell Analysis Revealed the Role of CD8+ Effector T Cells in Preventing Cardioprotective Macrophage Differentiation in the Early Phase of Heart Failure.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 763647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.763647.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mise-Omata S, Ando M, Srirat T, Nakagawara K, Hayakawa T, Iizuka-Koga M, Nishimasu H, Nureki O, Ito M, Yoshimura A.	4. 巻 29;42(8)
2. 論文標題 SOCS3 deletion in effector T cells confers an anti-tumorigenic role of IL-6 to the pro-tumorigenic cytokine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 112940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112940.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Srirat T, Hayakawa T, Mise-Omata S, Nakagawara K, Ando M, Shichino S, Ito M, Yoshimura A.	4. 巻 26;43(3)
2. 論文標題 NR4a1/2 deletion promotes accumulation of TCF1+ stem-like precursors of exhausted CD8+ T cells in the tumor microenvironment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 113898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2024.113898.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 中枢神経系の免疫細胞の動態と組織修復
3. 学会等名 第32回サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minako Ito
2. 発表標題 Immune cell behavior and functions in the neurological recovery.
3. 学会等名 15th World Congress on Inflammation (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minako Ito
2. 発表標題 Elucidation of immune cell dynamics after ischemic stroke.
3. 学会等名 Neuro2022.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 Elucidation of mechanisms of pathological deterioration of central nervous system diseases due to aging and systemic immune activation.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minako Ito
2. 発表標題 Regulation of brain lipid metabolism after ischemic stroke by brain immune cells.
3. 学会等名 第 51 回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minako Ito
2. 発表標題 Immune responses in neurological diseases
3. 学会等名 19th Mind Brain Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤美菜子
2. 発表標題 脳梗塞後の免疫細胞の動態と組織修復機構の解析
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤美菜子
2. 発表標題 グリア細胞と免疫細胞の相互作用による脳組織修復機構の解明
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤美菜子
2. 発表標題 Elucidation of interactions between immune cells and glia in brain inflammation.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤美菜子
2. 発表標題 脳内炎症性疾患における免疫細胞の動態の解析
3. 学会等名 第33回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 脳内炎症性疾患における免疫細胞の動態の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 Involvement in the development of Alzheimer ' s disease through activation of systemic immune response.
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 免疫応答によるアルツハイマー病発症への関与
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 神経免疫の基礎研究と臨床現場をつなぐ
3. 学会等名 第31回日本医学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Minako Ito
2. 発表標題 Elucidation of interactive cellular changes between astrocytes and immune cells
3. 学会等名 第66回日本神経化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 中枢神経系疾患における脳内免疫細胞の意義
3. 学会等名 第43回阿蘇シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Minako Ito
2. 発表標題 Analysis of immune cells in the brain of a mouse model of autism spectrum disorder
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 脳内炎症に関わる免疫システム
3. 学会等名 第 72 回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 脳梗塞再発時の免疫動態と神経修復の解析
3. 学会等名 第66回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 脳における免疫応答と腸脳相関
3. 学会等名 日本食品免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 末梢免疫応答のアルツハイマー病への影響
3. 学会等名 第42回日本認知症学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 老化マウスの脳内炎症と小胞体の関与
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 中枢神経系疾患における脳内免疫細胞の意義
3. 学会等名 第97回日本薬理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 美菜子
2. 発表標題 虚血性脳血管障害と神経免疫
3. 学会等名 第163回日本医学会シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Minako Ito
2. 発表標題 Significance of regulatory T cells in the central nervous system
3. 学会等名 5th CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology (国際学会)
4. 発表年 2024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