

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06951

研究課題名(和文) 中枢神経系疾患における制御性T細胞の脳特異的性質獲得機構

研究課題名(英文) Acquisition mechanism of brain-specific properties for regulatory T cells in central nervous system diseases

研究代表者

山本 伸一 (Yamamoto, Shinichi)

順天堂大学・健康総合科学先端研究機構・非常勤助教

研究者番号：10634800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織制御性T細胞(組織Treg)は、様々な組織に常在する、あるいは損傷組織に蓄積し、非免疫細胞と相互作用することで恒常性維持や組織修復に寄与している。しかし、組織Tregの発生メカニズムは十分に解明されていない。私たちは、*in vitro*で脳Tregの特性を誘導する培養法を開発した。さらに、パーキンソン病モデルでは、*in vitro*で誘導された脳Tregは脾臓Tregよりも脳に浸潤しやすく、病理学的症状をより効果的に改善した。これらの結果は、*in vitro*で誘導された脳Tregは、脳Tregの発生の理解と炎症性脳疾患の治療に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに脳Tregが脳特異的性質を獲得する現象に関しては、私達が初めて報告してきた。しかしながら、この獲得機構は明らかになっていなかったため、本研究では、脳Tregの発生・誘導機構を*in vitro*において明らかにした。さらに、*in vitro*で誘導された脳Tregを病態モデルマウスに投与し、神経症状への影響を解析することができたことは、これまでにない新奇かつ創造的な研究である。この研究によって、脳梗塞、パーキンソン病および多発性硬化症の増悪化のTregによる制御方法の理解と幅広い脳内炎症性疾患の治療・予防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)：Tissue regulatory T cells (Tissue Tregs) resident in various tissues or accumulate in damaged tissues are contribute to homeostasis and tissue repair by interacting with non-immune cells. However, the mechanism of tissue Treg development is not fully understood. We developed a culture method that induces brain Treg characteristics *in vitro*. Furthermore, in Parkinson's disease models, *in vitro* induced brain Tregs infiltrated into the brain more readily and ameliorated pathological symptoms more effectively than splenic Tregs. These results suggest that *in vitro* induced brain Tregs may contribute to our understanding of brain Treg development and the treatment of inflammatory brain diseases.

研究分野：神経免疫

キーワード：制御性T細胞 Treg 組織Treg アストロサイト 脳 脳疾患

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々な中枢神経系関連疾患では、免疫系との関与が明らかになりつつあり、多発性硬化症や抗 N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体抗体脳炎などをはじめ、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経疾患と免疫系の関連性が報告されている。中枢神経系において、炎症や免疫応答の制御に重要な脳特異的制御性 T 細胞(Treg)の存在が明らかになり、脳 Treg による神経系炎症制御の理解は、様々な中枢神経系疾患の治療・予防法の開発に重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳炎症後に脳内浸潤する脳 Treg が、脳環境に応じて脳特異的遺伝子発現の獲得メカニズムを解明し、脳内炎症性疾患の制御と脳組織修復を促すことであり、脳 Treg の発生・誘導機構を *in vitro*、*in vivo* において明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、脳特異的 Treg の誘導機構を解明することで、新しい中枢神経系炎症性疾患の治療・予防法の確立を目指すために、今後の以下の方法を遂行した。

#### (1) 脳 Treg 誘導メカニズムの解明

まず Treg はマウスの脾臓やリンパ節から取り出し、アストロサイトまたはミクログリアは、マウス新生仔脳から初代分離培養した。次に、様々な生理活性因子でアストロサイトまたはミクログリアと共培養した後、培養後の Treg を解析 (生存率、細胞増殖) した。さらに、組織 Treg 共通マーカーおよび脳 Treg 特異的マーカーをタンパクレベル (FACS) と遺伝子レベル (qPCR および RNAseq) で発現解析した。

#### (2) 脳 Treg 誘導因子や *in vitro* 誘導脳 Treg による *in vivo* での脳内炎症制御

*in vitro* で作製した脳 Treg を脳梗塞、多発性硬化症 (EAE) およびアルツハイマー病モデルの病態モデルに移入することによって、*in vivo* での脳内浸潤と神経症状改善効果を FACS、免疫組織化学およびロータロッドテストで検討した。

### 4. 研究成果

脳 Treg 誘導メカニズムを解明するために、Treg と初代培養アストロサイトとの共培養系を確立した。まず培養系の検討として、アストロサイトまたはミクログリア単独培養、アストロサイトとミクログリアの混合培養や成熟脳切片を用いたスライスカルチャーとの比較を行なった。その中で、脾臓とリンパ節から得られたナイーブ Treg が初代培養アストロサイトの存在下で活性化され、T 細胞受容体刺激によって増殖されることを明らかにした。さらに様々な生理活性因子で Treg とアストロサイトを共培養すると、特に IL-33 とセロトニンを加えることで顕著な Treg の増殖活性が見られた (図 1)。

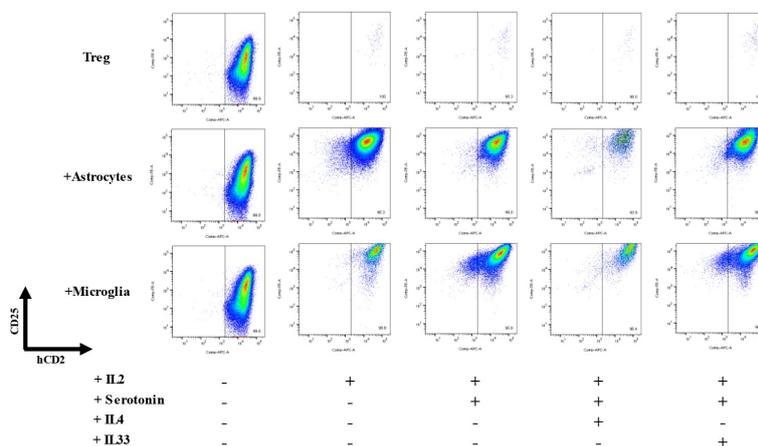


図1 アストロサイトとの共培養によるTregの増殖活性

このアストロサイトの存在下で誘導された Treg を組織 Treg に共通するマーカーとして ST2 の発現を調べてみると、IL-4 によって誘導されてくる傾向はあったが、IL-2、IL-33、セロトニンとの組み合わせでは、Treg の増殖活性と ST2 の発現をどちらも誘導することが明らかとなった。一方でミクログリアでは、Treg の増殖活性はされるが、ST2 の発現傾向は見られなかった。

さらに、これらのアストロサイトとの培養条件下において詳細に調べるために、組織 Treg のマーカーをタンパクレベルで解析してみると、ST2、KLRG1 および CCR8 において発現が見られた (図 2)。次に組織 Treg および脳 Treg のマーカーとして遺伝子レベルで解析を行なった結果、GATA3、Pparg、Il1rl1、KLRG1、Ccr8、Htr7、Penk および Ednrb で、その発現レベルが上昇していた。また、トランスクリプトーム解析より、同様の遺伝子発現パターンを示したことがか

ら、*in vitro* で脳 Treg に近い誘導が可能であることが明らかとなった (図2)。また、これらの誘導において細胞間の接着性と非接着性をトランスウェルまたはアストロサイトコンディショニングメディウムを用いて解析したところ、これらの脳 Treg への誘導にはアストロサイトとの接着性が必要である事が示唆された。

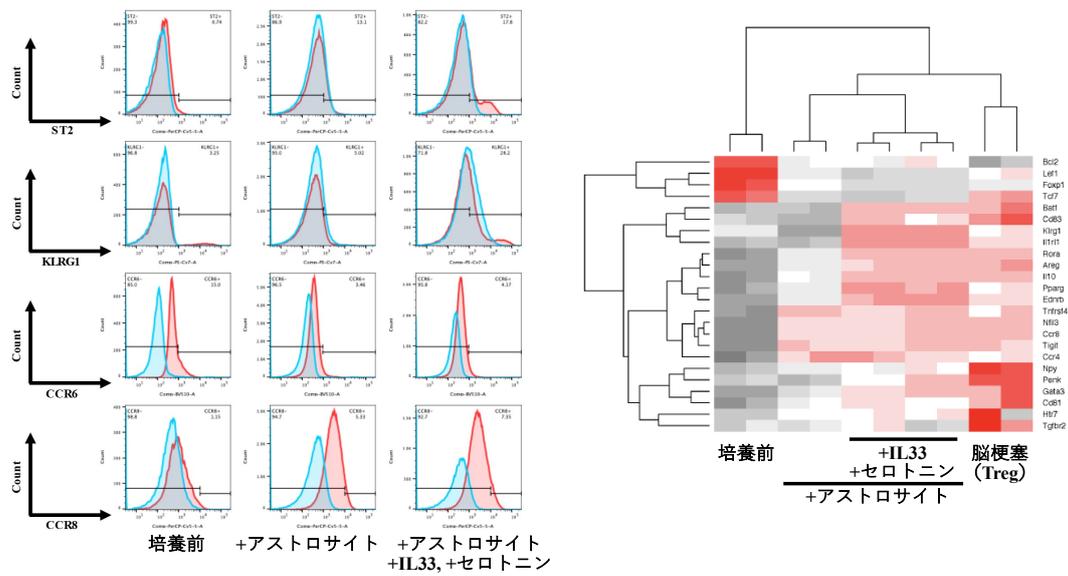


図2 アストロサイトとの共培養による組織および脳Tregマーカーの発現増

次に、*in vitro* で作製した脳 Treg を病態モデルマウスに移入することによって、*in vivo* での脳内への浸潤と神経症状改善効果を検討した。まず、CD3 欠損マウスの脳梗塞モデルを用いてマウス脳への浸潤を調べてみると、*in vitro* で作成した脳 Treg は培養前の Treg よりも効率的に損傷脳に浸潤する傾向があった。さらに、多発硬化症モデル (EAE) では、移植により臨床スコアが改善されることも明らかとなった。次に、神経毒 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (MPTP) を投与してドーパミン作動性ニューロンの変性を引き起こすパーキンソン病モデルを使用した。MPTP 投与後3日目に *in vitro* で作成した脳 Treg の移植を行うと、移植された脳 Treg は培養前の Treg よりも効率的に脳に蓄積された。さらに MPTP 投与後7日目に、パーキンソン関連症状のロータロッドテストで評価した。

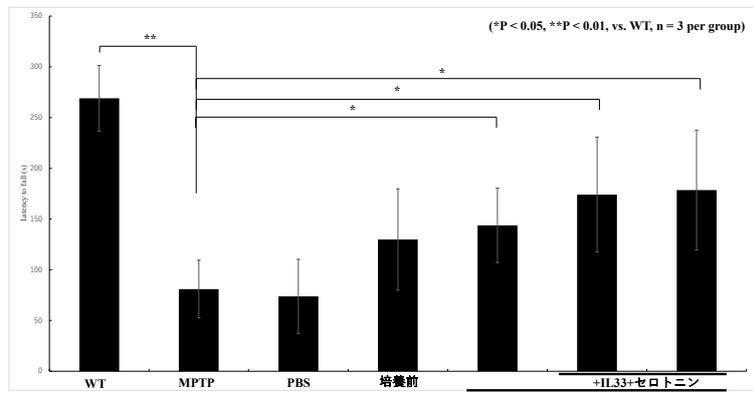


図3 ロータロッドテスト

MPTP によって誘発された運動機能障害は、Treg の移植によって回復傾向が見られた (図3)。この運動機能障害の回復は、培養前の Treg と比較して *in vitro* で作成された脳 Treg でより顕著であった。さらに、ミクログリア活性化およびリン酸化  $\alpha$ -シヌクレインの発現から、黒質ドーパミン作動性ニューロンの変性および炎症も抑制されることが明らかとなった。

これらの結果より、*in vitro* で脾臓とリンパ節から得られたナイーブ Treg を脳 Treg に近い誘導を可能にし、脳梗塞、多発性硬化症およびパーキンソン病モデルにおいて脳内への浸潤と病理学的にも改善されることを初めて見出した (図4)。今後の脳 Treg の理解と炎症性脳疾患の治療開発に貢献できる可能性が期待される。

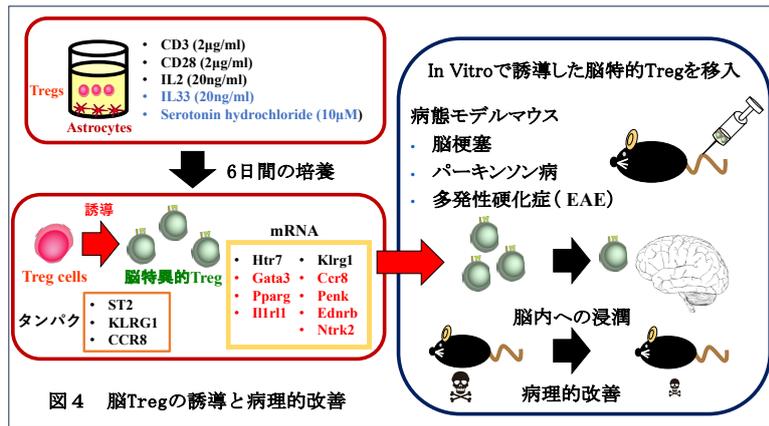


図4 脳Tregの誘導と病理的改善

<引用文献>

Yamamoto S, Matsui A, Ohyagi M, Kikutake C, Harada Y, Iizuka-Koga M, Suyama M, Yoshimura A, Ito M. In Vitro Generation of Brain Regulatory T Cells by Co-culturing With Astrocytes. *Frontiers in Immunology*. 2022; Vol.13: Article 960036.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Shinichi, Matsui Aiko, Ohyagi Masaki, Kikutake Chie, Harada Yoshihiro, Iizuka-Koga Mana, Suyama Mikita, Yoshimura Akihiko, Ito Minako	4. 巻 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 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinichi Yamamoto, Akihiko Yoshimura and Minako Ito
2. 発表標題 In vitro generation of brain regulatory T cells by co-culturing with astrocytes
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinichi Yamamoto, Akihiko Yoshimura and Minako Ito
2. 発表標題 In vitro generation of brain regulatory T cells by co-culturing with astrocytes
3. 学会等名 17th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinichi Yamamoto, Akihiko Yoshimura and Minako Ito
2. 発表標題 In vitro generation of brain regulatory T cells by co-culturing with astrocytes
3. 学会等名 KAI International Meeting 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinichi Yamamoto, Akihiko Yoshimura and Minako Ito
2. 発表標題 In vitro generation of brain regulatory T cells by co-culturing with astrocytes
3. 学会等名 第51回日本免疫学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 伊藤美菜子、山本伸一、大谷木正貴、吉村昭彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 201
3. 書名 神経免疫 メカニズムと疾患	

1. 著者名 山本伸一、大谷木正貴、安藝大輔、伊藤美菜子、吉村昭彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 生物の寿命延長	

〔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