

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16572

研究課題名（和文）敗血症性脳症とそれに伴う精神疾患の発症機序解明と制御性T細胞に着目した治療戦略

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenesis of septic encephalopathy and associated psychiatric disorders and therapeutic strategies focusing on regulatory T cells

研究代表者

齋藤 雅史（Saito, Masafumi）

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：80826321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症性脳症とそれに伴う精神疾患の回復機序に、脳に増加する制御性T細胞（Treg）が関与することを示した。本研究の敗血症マウスモデルは、敗血症誘導から20日程度で不安様行動が回復した。敗血症誘導15日目以降、Tregが脳内に増加し、60日目まで増加を続けた。このTregはKi67が低かったことから、脳外から浸潤してきたと考えられた。細胞表面のケモカイン受容体を解析するとCXCR3が高発現しており、同時期において、脳内にCXCL-9/-10 mRNAが増加した。以上の結果から、CXCR3/CXCL9/-10 axisにより脳に浸潤したTregが、敗血症に伴う精神疾患の回復に寄与したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症生存者が増加する一方で、退院後の社会復帰は約半数であることが示された。彼らに認められる精神障害などの神経障害は、敗血症に伴う敗血症性脳症が原因とされてきたが、予防することは難しかった。また、ミクログリアが治療ターゲットとして研究されてきたが、奏功していないのが現状であった。その一方、本研究では神経障害の回復機序を明らかにすることで、敗血症生存者のスムーズな社会復帰に繋げることを目的とした。敗血症後、脳内に制御性T細胞が増加することを初めて明らかにし、それが脳の恒常性の回復に寄与することで、神経障害を緩和することを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Increased numbers of regulatory T cells (Treg) in the brain are involved in the mechanism of recovery from sepsis-associated encephalopathy and sepsis-induced psychiatric disorders. The sepsis mouse model in this study recovered anxiety-like behavior about 20 days after sepsis induction. After day 15 of sepsis induction, Tregs increased in the brain and continued to increase until day 60. These Tregs were thought to have infiltrated from outside the brain due to low Ki67 expression. When the chemokine receptor on this cell in the brain, Tregs expressed CXCR3. On the other hand, mRNA levels of CXCL-9 and -10, which are known as ligands of CXCR3, were enhanced. These results suggest that Tregs infiltrated into the brain by the CXCR3/CXCL9/-10 axis contributed to the recovery from sepsis-associated encephalopathy and sepsis-induced psychiatric disorders.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 敗血症性脳症 精神障害 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染に対する制御不能な宿主応答に伴う多臓器不全で、集中治療分野において重要な疾患の一つである。致死率は高いものの、とりわけ医療先進国では、医療技術やガイドラインの制定により、患者の生存率は80%以上まで改善されてきた。その一方、敗血症患者の長期予後は不良であることが示唆されている。退院後の敗血症患者における2年以内の社会復帰率は約半数程度であり、また、遷延する精神障害などの重篤な後遺症を認める患者は、約20%であることが報告された。よって、現代の敗血症治療の焦点は、患者の救命から長期予後の改善へとシフトしている。

患者が退院後も長期間の重篤な神経障害に苛まれる原因として、敗血症性脳症が挙げられる。敗血症性脳症は約70%の患者が呈するとされるが、病態は複雑で、明確な発症機序は不明である。これまでの動物実験の結果から、敗血症誘導直後に脳内に存在するミクログリアが長期間活性化し、過剰な炎症反応を示すことで神経細胞等が障害され、脳の恒常性が破綻すると考えられている。動物実験レベルでは、この細胞の活性化を抑制することで敗血症性脳症が緩和され、うつや認知機能低下というような神経障害が抑制された。しかしながら、ミクログリアの活性化は敗血症誘導から24時間以内に起こることが分かっており、救命第一の集中治療現場では、治療ターゲットとするのが難しいのが現状である。

一方、敗血症マウスの脳を解析した結果、好中球や単球が増加した後に、T細胞が顕著に増加することを観察した。また、過去の知見から、敗血症を誘導したラットの認知機能は、いかなる介入もなしに自然と回復することが知られている。これらのことから、脳に増加したT細胞は敗血症マウスの神経障害の治癒に関与すると仮説をたて、その表現型、増加方法、あるいは敗血症性脳症の病態形成に対する生理学的意義を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、敗血症性脳症およびそれに伴ううつ様症状の回復におけるT細胞の役割を明らかにし、頸部リンパ節と制御性T細胞(Treg)に着目した敗血症性脳症およびうつ様症状の治療方法を提案する。

3. 研究の方法

C57BL/6Jマウスに敗血症を誘導するため、体重1gあたり規定量の盲腸内容物(CS: Cecal Slurry)を腹腔内に注射した。臨床データに基づき生存率80%の実験系で行うため、本研究では0.5mgを投与することでマウスに敗血症を誘導した。敗血症誘導後、2日ないしは3日目の体重減少率をもとにグループ分けをすることで重症度合いを平均化した。また、このモデルでは、敗血症誘導から7-10日目ではマウスのうつ様行動の増悪を認め、15日目以降から徐々に回復する様な経過を認めた。

研究1: 敗血症誘導後、経過時間的にマウスの脳内のT細胞の変動、および表現型を解析した。

研究2: 敗血症誘導後、マウスに継続的にanti-mouse CD4 antibodyあるいはanti-mouse CD8 antibodyを投与することで後天的なCD4⁺/CD8⁺T細胞の欠失モデルを作成し、行動試験を行なうことで不安様行動を評価した。

研究3: 細胞増殖マーカーの発現、あるいは、ケモカイン受容体発現の解析から増加方法を推定した。

研究4: 敗血症誘導後、マウスの頸部リンパ節を外科的に除去したモデルを作成し、脳のT細胞を解析した。

4. 研究成果

研究1: 敗血症マウスの脳内におけるT細胞の変動

敗血症誘導から30日目までマウスの脳内におけるT細胞の変動を調べたところ、CD4⁺T細胞が増加したことが分かった(図1A)。敗血症誘導から30日目の脳を部位ごとに摘出し、CD4⁺T細胞の分布を解析したところ、大脳皮質、中脳、および小脳で顕著に増加したことが明らかとなった(図1B)。この時、脳中のCD4⁺T細胞の表現型を解析したところ、helper T(Th)1、Th2、Th17細胞と比較して制御性T細胞(Treg)が顕著に増加していた。同様の結果は、脾臓でも認められた(図1C)。この結果から、脳に増加したTregが敗血症性脳症の緩和、およびそれに伴う精神障害の緩和に関与すると考え、その経過時間的な細胞数の変化を調べた。すると、Tregは敗血症誘導から20日目以降、徐々に脳内に増加し、60日目まで増加し続けたことが分かった(図1D)。

研究2: CD4⁺T細胞を欠失させた敗血症マウスの不安様行動の評価

敗血症誘導から5日目以降、マウスに継続的にanti-mouse CD4 antibody(αCD4群)あるいはanti-mouse CD8 antibody(αCD8群)を投与することで後天的なCD4⁺/CD8⁺T細胞の欠失モデルを作成した。対照にはIgG(IgG群)を投与した。不安症を評価するために、ショ糖選択試験を行なった。3群間で総飲水量は変わらなかったものの、αCD4群ではショ糖水への嗜好性が顕著に低下していた(図2A)。続いて、強制遊泳試験を行うことで敗血症マウスのうつ様行動を評価したところ、αCD4群では不動化時間が顕著に延長した。また、αCD4群に対し抗うつ薬のdesipramine(αCD4+des群)を投与したところ、うつ様行動は改善された(図2B)。最後にオープンフィールド試験を行ったところ、αCD4群では総移動距離が顕著に減少し(図2C)、中央エリアでの滞

在時間や侵入回数も減少した。これらのマウスを深麻酔下で犠死せしめ、脳の炎症性サイトカインの発現量を解析したところ、 α CD4 群では他の群と比較して Interleukin (IL)-10 や Brain derived neurotrophic factor (BDNF)が顕著に低下していた(図 2D)。以上の結果は、研究 1 の結果を支持するものであった。

研究 3：敗血症誘導後、脳内に Treg が増加したメカニズム

Treg が脳にどのように増加したかを明らかにするため、まず、細胞増殖マーカーである Ki67 発現を調べた。脳の T 細胞における Ki67 発現は明確に 2 つに分かれ、CD4⁺ T 細胞は CD8⁺ T 細胞と比較して、その発現は顕著に低かった(図 3A)。このことから、CD4⁺ T 細胞の表現型の一つである Treg においても、脳内での Ki67 の発現は低いことが予測された。予想した通り、Treg の Ki67 発現は低く、敗血症誘導後の脳における自己増殖能は低いことが示唆された(図 3B)。このため、Treg は chemotaxis により脳に浸潤したと考えた。そこで、脳の Treg のケモカイン受容体を解析したところ、C-X-C motif chemokine 3 receptor (CXCR3) が敗血症誘導前と比較して、20 日目で顕著に増加していた(図 3C)。敗血症マウスに anti-mouse CXCR3 antibody (CXCR3 群)を投与したところ、脳での Treg 増加が抑制された(図 3D)。脳におけるケモカインリガンドの発現を解析したところ、CXCR3 リガンドである CXCL9 および CXCL10 mRNA の発現が 15 日目で増加していたことが分かった(図 3E)。以上の結果から、Treg は敗血症誘導後、CXCL9/CXCL10/CXCR3 axis により脳に浸潤したことが示唆された。

研究 4：頸部リンパ節を除去した敗血症マウスにおける敗血症性脳症および精神障害の遷延

既知の研究から、頸部リンパ節は脳の所属リンパ節であることが分かっている。研究当初、頸部リンパ節に *in vitro* で増殖させた Treg を移植する予定であったが困難であった。そのため、敗血症マウスから頸部リンパ節を除去し、脳の Treg の増加や不安様行動に与える影響について調べた。マウスを 4 群に分け (Vehicle+Sham; Vehicle+exCLN; CS+Sham; CS+exCLN (exCLN: 頸部リンパ節除去群))、敗血症誘導から 5 日目に頸部リンパ節を除去した。その結果、CXCL9 および CXCL10 mRNA の発現は CS+Sham と CS+exCLN 群では変化なかったものの、CS+exCLN 群では脳内での Treg の増加が抑制された(図 4A, B)。強制遊泳試験の結果では、わずかではあるものの、有意に不動化時間が延長した(図 4C)。CS+exCLN 群の脳において、炎症性サイトカインである IL-1 β の mRNA レベルは高値を示していた一方、抗炎症性サイトカインの IL-10 および BDNF mRNA の発現レベルは低かった。以上の結果から、CS+exCLN 群では Treg の浸潤が抑制されたことから敗血症性脳症が遷延したと考えられた。

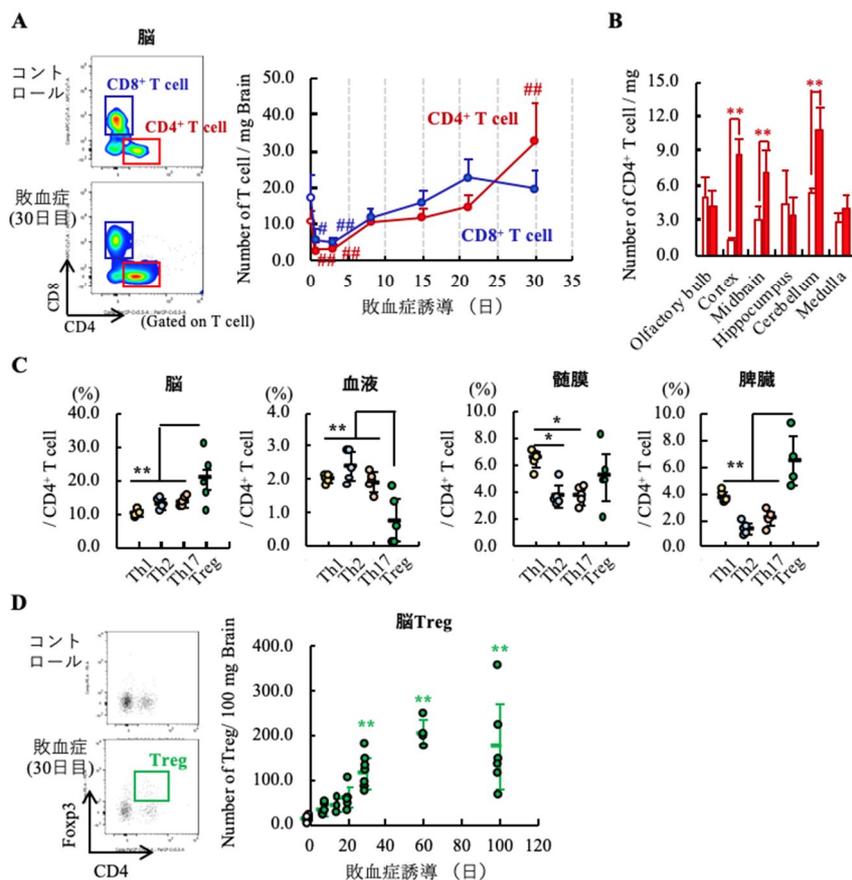


図 1. 敗血症誘導後、脳には Treg が増加した

A) 敗血症誘導後マウスの脳における CD4⁺ T 細胞 () および CD8⁺ T 細胞 () の推移。
 B) 脳の部位ごとに解析した CD4⁺ T 細胞の分布。C) 脳および他の組織における CD4⁺ T 細胞の表現型解析。D) 敗血症誘導から 100 日目までのマウスの脳における Treg の推移。*p<0.05, **p<0.01。

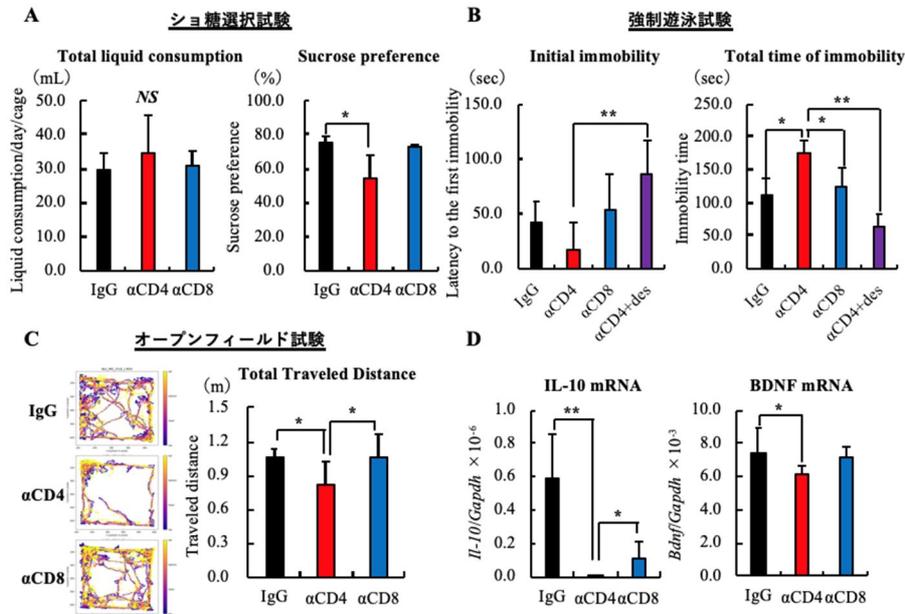


図 2. αCD4 群では敗血症マウスの不安様行動の回復が遅延した
 A) ショ糖選択試験。B) 強制遊泳試験。C) オープンフィールド試験。D) 定量 PCR による IL-10 および BDNF mRNA 発現量の解析。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

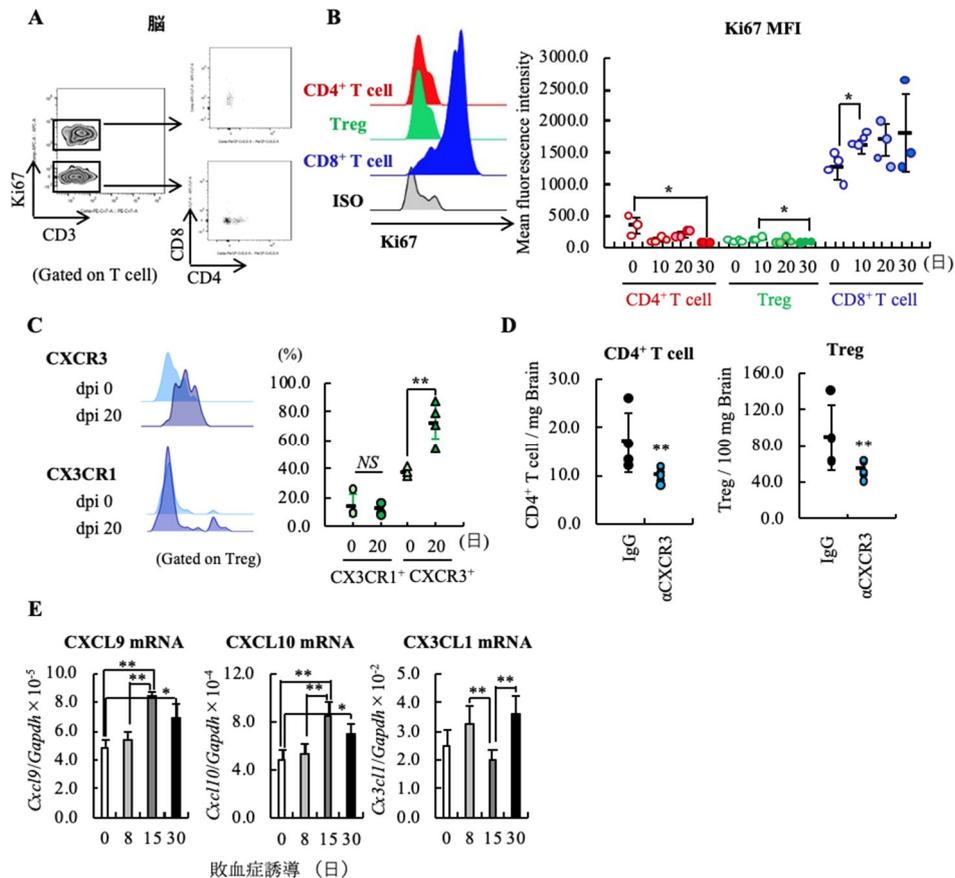


図 3. Treg は CXCL9/CXCL10/CXCR3 axis により脳に浸潤した
 A) 脳の T 細胞における Ki67 発現。B) CD4⁺ T 細胞、Treg および CD8⁺ T 細胞の Ki67 発現の比較。C) Treg のケモカイン発現受容体の解析。D) anti-mouse CXCR3 antibody を連続投与した敗血症マウスの脳における Treg の抑制。E) 定量 PCR による CXCL9、CXCL10 および CX3CL1 mRNA 発現量の解析。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

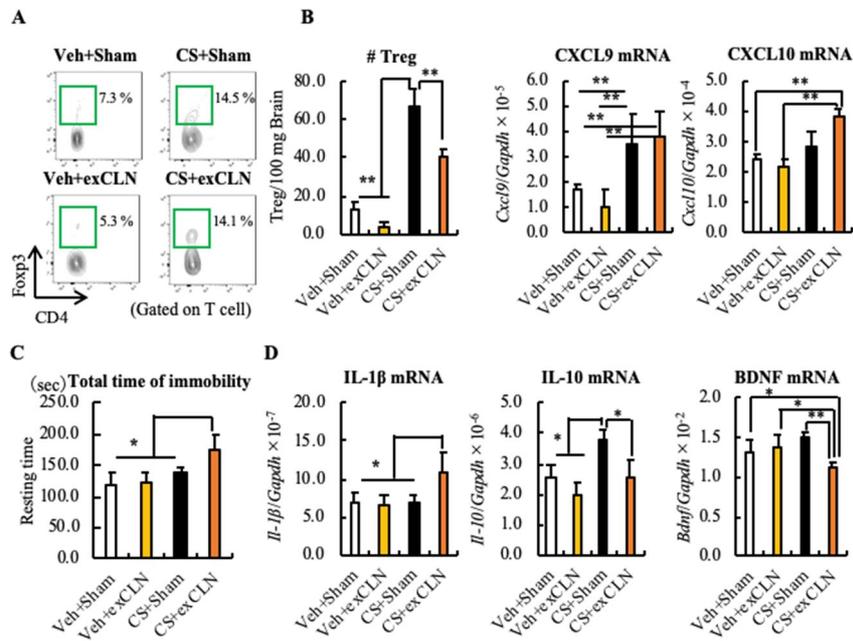


図 4. 頸部リンパ節を除去すると脳への Treg の浸潤は抑制された

A) 頸部リンパ節を除去した敗血症マウスの脳における Treg の抑制。B) 定量 PCR による CXCL9 および CXCL10 mRNA 発現量の解析。C) 強制遊泳試験。D) 定量 PCR による IL-1β、IL-10 および BDNF mRNA 発現量の解析。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Saito Masafumi, Fujinami Yoshihisa, Ono Yuko, Ohyama Shohei, Fujioka Kazumichi, Yamashita Kimihiro, Inoue Shigeaki, Kotani Joji	4. 巻 92
2. 論文標題 Infiltrated regulatory T cells and Th2 cells in the brain contribute to attenuation of sepsis-associated encephalopathy and alleviation of mental impairments in mice with polymicrobial sepsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 25 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2020.11.010	査読の有無 無
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 Masafumi Saito	4. 巻 3
2. 論文標題 Does Sepsis-Associated Encephalopathy Begin and End with T Cells?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Mucosal Immunology Research	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) なし	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齋藤雅史
2. 発表標題 敗血症マウスの脳内に浸潤したT細胞は、敗血症性脳症を抑制し、精神障害の回復を促進する
3. 学会等名 第35回 日本shock学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤雅史
2. 発表標題 敗血症モデルマウスにおいて、脳内に浸潤したT細胞は敗血症性脳症とそれに伴う不安様行動の回復を促進する
3. 学会等名 外科代謝栄養学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤雅史
2. 発表標題 CX3CR1high macrophage and Treg in the brain may help to improve anxiety-like behavior in septic mice
3. 学会等名 International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------