

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19382

研究課題名（和文）脳組織特異的制御性T細胞誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of brain tissue-specific regulatory T cell induction

研究代表者

伊藤 美菜子（Minako, Ito）

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：脾臓由来の制御性T細胞（Treg）は、脳の支持細胞であるアストロサイトの存在下で効率よく増幅された。IL-33とセロトニンを加えることで、ST2、PPAR γ 、セロトニン受容体7（Htr7）の発現といった脳組織特異的なTregの特性の一部を付与できた。さらに、T細胞が疾患進行に関与しているとされるパーキンソン病モデルにおいて、iB-Tregは脾臓Tregよりも脳内に浸潤しやすく、病的症状をより効果的に改善することが確認された。これらのデータは、iB-Tregが脳Tregの発生に関する理解に貢献し、炎症性脳疾患の治療薬にもなり得ることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制御性T細胞は免疫応答を抑制する細胞であり、様々な炎症性疾患の治療法となりうるが、全身性の免疫抑制のために感染症やがんの拡大などのリスクが高まることが問題として挙げられる。本研究では脳組織に特化したTregを作製することができるため他の組織への影響が少なく、副作用を抑えた治療法につながる。脳に限らず、他の組織の支持細胞や誘導因子と共培養することで、様々な組織特異的なTregの誘導に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Naive Tregs derived from spleen were activated and efficiently amplified by T cell receptor (TCR) stimulation in the presence of primary astrocytes. Furthermore, the addition of IL-33 and serotonin was able to confer some of the characteristics of brain Tregs, such as ST2, PPAR γ , and serotonin receptor 7 (Htr7) expression. For example, brain Treg markers such as Gata3, Pparg, Il1r1l, Klrg1, Penk, and Htr7 were highly expressed in iB-Tregs. Furthermore, in a Parkinson's disease model, in which T cells are implicated in disease progression, iB-Tregs infiltrated the brain more readily than splenic Tregs and more effectively ameliorated pathological symptoms. These data contribute to our understanding of brain Treg development and indicate that iB-Tregs may be a potential therapeutic agent for inflammatory brain diseases.

研究分野：神経免疫

キーワード：制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、皮膚や脂肪や筋肉などの組織に特異的に局在する制御性 T 細胞に関する研究が盛んである。肺、皮膚、脂肪、大腸といった様々な非リンパ組織 Treg とリンパ組織の scRNA-seq、scTCR-seq、ATACseq を用いた包括的なプロファイリングにより、リンパ節から非リンパ組織 Treg 細胞表現型獲得に向けた段階的なリプログラミングが明らかになった。しかし中枢神経系での脳 Treg に関する報告はほとんどない。また、様々な組織において、組織 Treg のフェノタイプ解析や起源を探る研究は進んでいるが、組織 Treg の誘導メカニズムの同定には至っていなかった。

我々はマウス実験的脳虚血（脳梗塞）モデルを用いて脳損傷後の炎症によって梗塞や神経症状が増悪化することを見出し報告してきた。発症 1 週間以内の急性期にはマクロファージや $\gamma\delta T$ 細胞を中心とした自然免疫関連炎症が脳内炎症の主役であることを見出してきた。また発症 2 週間目以降の慢性期には多量の Treg が浸潤しており極めて特殊な様相を示すことを見出した。特に Treg が脳特異的な性質を獲得することでミクログリアやアストロサイトの過剰な活性化を制御して神経症状の回復に寄与することを明らかにしていた。

2. 研究の目的

脳炎症後に脳内に浸潤する脳 Treg が脳環境に応じて脳特異的遺伝子発現を獲得するメカニズムを解明することで、脳内炎症性疾患の制御や脳組織修復を促すことを目的とした。

具体的には、脳 Treg の発生・誘導機構を *in vitro*、*in vivo* において明らかにする。そこで得られた脳 Treg 誘導関連因子の脳室内投与や欠損マウスにより、脳 Treg 誘導や脳細胞制御、神経症状への影響を解析する。この研究によって脳梗塞や脊髄損傷、あるいは多発性硬化症の増悪化の Treg による制御方法の理解が進むものと期待される。さらに脳内慢性炎症との関連が示唆されるアルツハイマー病モデルや他の神経疾患モデルを用いて広く脳内炎症における Treg によるグリア細胞や神経細胞の制御機構およびその中枢神経系疾患への意義を明らかにすることを目的とした。

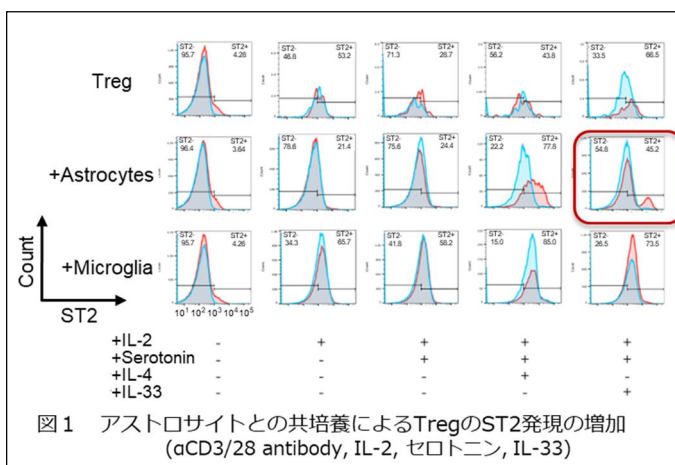
3. 研究の方法

以前に脳梗塞後の脳 Treg の分化や増殖に必要な特徴を明らかにしていた。*In vitro* で脳 Treg を誘導するために、脾臓やリンパ節から単離した Treg をミクログリアやアストロサイトなどの様々な細胞と共培養し、サイトカインやホルモンなどの脳 Treg の分化に重要な因子で刺激をした。RNA シーケンス解析により遺伝子発現を比較し、脳組織の Treg に近い Treg を、脳梗塞モデルやパーキンソン病モデルに移入した。

4. 研究成果

CD25、Foxp3、ST2 (組織 Treg のマーカー) の発現と増殖により、Treg の活性化段階を評価した。その結果、ミクログリアとの共培養、またはアストロサイトとミクログリアの両方との共培養では、Treg の活性化は見られるが増殖は低く、アストロサイトのみとの共培養では増殖が見られ、強い Treg 活性化が見られた。次に、Treg とアストロサイトの共培養にサイトカインと生理活性物質を添加した。IL-2、IL-4、IL-33、セロトニンを共培養系に添加すると、CD25 と Foxp3 の発現が有意に上昇した。次に、Treg の活性化と増殖を促進する因子を組み合わせた存在下で、共培養を実施した。アストロサイトとの共培養において、IL-2、IL-33、セロトニンの組み合わせが最も効率よく増殖を促進し、脳内 Treg の特徴である ST2、KLRG1、Htr7 発現を誘導した (図 1)。

まず、アストロサイトと Treg の直接的な相互作用が必要かどうかを確かめるために、共培養時にトランスウェルを用いて Treg とアストロサイトまたはミクログリアを分離した場合の Treg 活性化と ST2 発現を調べた。Treg とアストロサイトが直接接触していない状態では、Treg の活性化と ST2 発現は観察されず、*in vitro* で Treg を脳内 Treg 様性質に誘導するために



は、アストロサイトとの接触が必要であることが分かった。

上記の結果を踏まえ、*in vitro* で作製した脳内 Treg 様細胞 (iB-Tregs) の特性をさらに検討した。iB-Tregs の特性を *in vivo* 脳内 Treg と比較するために、Treg の total RNA-seq 解析と主成分分析 (PCA) を実施した。その結果、iB-Treg は脾臓 Treg とは異なり、脳梗塞や実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) のマウスの脳から分離される脳 Treg と類似していることを確認した。ヒートマップ解析により、Gata3、Pparg、Il1rl1、Klrg1、Penk、Htr7 などの個々の脳 Treg マーカーは、脾臓 Treg よりも iB-Treg においてより高い発現量を示し、これは脳梗塞 Treg に近かった (図 2)。これらのデータは、iB-Treg が脳 Treg と完全には同一ではないにせよ、脳 Treg の特性の多くを共有していることを示した。

次に、神経毒である MPTP を投与してドーパミン作動性ニューロンの変性を起こさせるパーキンソン病モデルを用いた。神経変性には T 細胞、特に Th17 細胞が関与していることが報告されており、Treg は疾患モデルの症状を抑制する。MPTP 投与後 3 日目の野生型マウスに iB-Treg 移植を行ったところ、移植した Foxp3+hCD2+ iB-Treg が脾臓 Treg よりも効率よく脳に集積していることは非常に明らかであった。次に、MPTP 投与 7 日後のパーキンソン関連症状について、ロータロッドパフォーマンステストを用いて運動協調性を評価した。MPTP により誘発された運動機能障害は、Treg の移植により回復した。この運動機能障害の回復は、脾臓 Treg と比較して iB-Treg でより顕著であった (図 3)。ミクログリア活性化およびリン酸化 α シヌクレイン発現によって測定されるドーパミン作動性神経細胞変性および黒質における炎症の抑制も、脾臓 Treg および iB-Treg (A) と比較して B 型および C 型 iB-Treg においてより顕著であった。これらのデータは、IL-33 とセロトニンの存在下で、アストロサイト共培養システムが、遺伝的および機能的な脳 Treg 様細胞を *in vitro* で生成できるという我々の提案を強く支持する (図 4)。

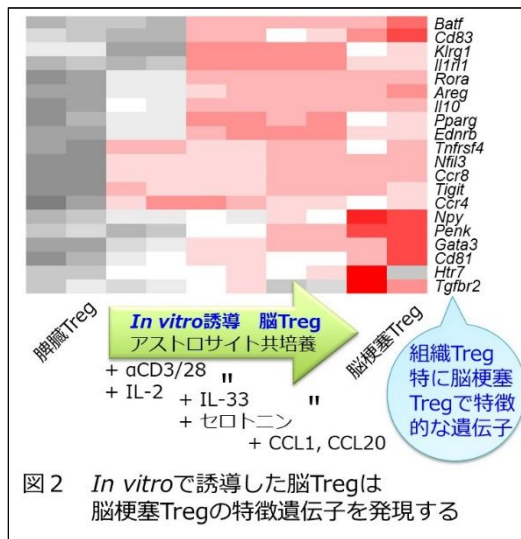


図 2 *In vitro* で誘導した脳 Treg は脳梗塞 Treg の特徴遺伝子を発現する

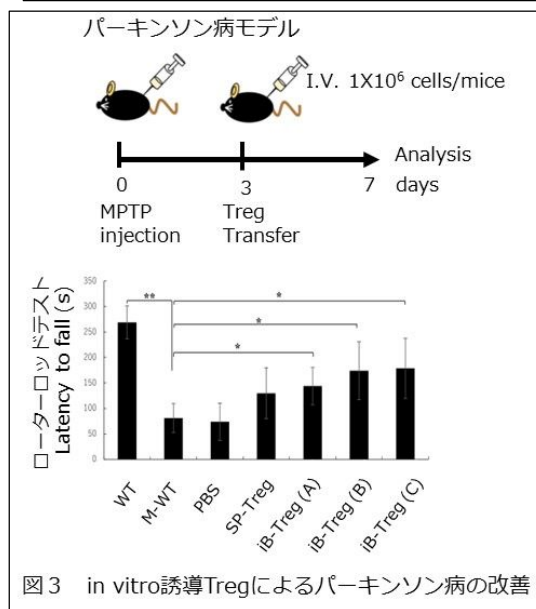


図 3 *in vitro* 誘導 Treg によるパーキンソン病の改善

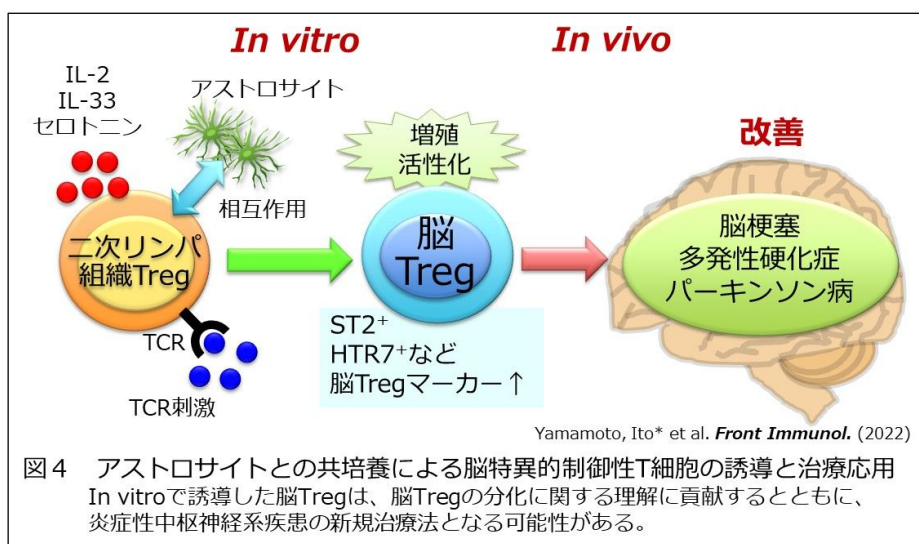


図 4 アストロサイトとの共培養による脳特異的制御性 T 細胞の誘導と治療応用
In vitro で誘導した脳 Treg は、脳 Treg の分化に関する理解に貢献するとともに、炎症性中枢神経系疾患の新規治療法となる可能性がある。

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. *Front. Immunol.* 13:960036. (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2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
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 13:960036.
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 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
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 43(1):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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 13件 / うち国際学会 2件）

〔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
---------	---------