

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H06175

研究課題名（和文）炎症の終息と組織修復に関与する免疫細胞システムの解明

研究課題名（英文）Immune systems involved in the resolution of inflammation and tissue repair

研究代表者

吉村 昭彦（YOSHIMURA, Akihiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：90182815

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 137,900,000円

研究成果の概要（和文）：マウス脳梗塞モデルを中心に臓器損傷によって誘発される炎症および組織修復に関与する免疫機構を解明した。脳梗塞発症後1日以内の急性期に炎症が起き症状の悪化が起きるが、3日目以降には炎症は終息し始める。これにマクロファージとその表面に発現するスカベンジャー受容体が関与することを明らかにした。さらに発症2週間以降の慢性期に脳内に大量の制御性T細胞が蓄積し、ミクログリアやアストロサイトの過剰な活性化を抑制して神経症状の回復に寄与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

ヒト脳梗塞とTregの関連を示唆する報告は多い。例えばヒト脳梗塞において末梢血のTregの数と予後の関係が報告されている。セロトニントランスポーター阻害剤(SSRI)は脳梗塞患者の神経症状を改善することが複数報告されている。したがってヒト脳梗塞慢性期においても脳Tregが神経修復に働いている可能性はある。腎傷害モデルにおいてもやはり慢性期にTregが腎臓に集積し腎機能回復を促進していることを我々は報告している。組織に浸潤するTregは炎症の収束のみならず組織修復にも重要な役割があることが示された。さらに組織特異的なTregを用いた組織特異的な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）：We have elucidated the immune mechanisms involved in inflammation and tissue repair induced by organ damage, focusing on a mouse model of cerebral infarction. Inflammation occurs in the acute phase within one day after stroke, resulting in worsening of symptoms, but inflammation begins to subside on the third day or later. They found that macrophages and scavenger receptors expressed on the surface of macrophages are involved in this process. Furthermore, they found that a large number of regulatory T cells accumulate in the brain during the chronic phase after the second week of disease onset and contribute to the recovery of neurological symptoms by suppressing the excessive activation of microglia and astrocytes.

研究分野：基礎医学 免疫学

キーワード：免疫制御 マクロファージ 制御性T細胞 神経炎症 組織修復

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞などによる脳組織破壊によって炎症が惹起され梗塞体積の増大や神経症状の悪化につながるものが古くより指摘されて来た。我々はマウス脳梗塞モデルを用いて、脳梗塞発症後の炎症プロセスを明らかにしてきた。すなわち発症1日以内の急性期に浸潤マクロファージが死細胞由来のペルオキシレドキシンなどの 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 (Shichita et al. *Nature Med.* 2012, 18: 911-917; Ito et al. *Nature Commun.* 2015, 6: 7360.) こと、さらに発症後2~3日に T 細胞が浸潤し、IL-23 の刺激にตอบสนองして IL-17 を産生し病態の悪化を寄与することを報告した (Shichita et al. *Nature Med.* 2009, 15: 946-950)。しかしながらそれ以降の炎症反応が終息するプロセスや慢性期の炎症や免疫細胞の役割についてはほとんど解析されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス実験的脳梗塞モデルを用いて炎症の終息と組織修復に関わる免疫応答を明らかにすることである。特に慢性期の獲得免疫応答における T 細胞の役割についてはこれまで全く不明であった。本研究では様々な脳内炎症におけるリンパ球が認識する脳内抗原の神経修復過程への意義およびそのメカニズムの解明、治療応用を目的とする。

3. 研究の方法

マウス実験的脳虚血再灌流 (MCAO) モデル (脳梗塞モデル) は、60 分の一過性の脳虚血を作り、その後、経時的に観察を行う。解析は脳組織の神経細胞免疫染色による梗塞部位の体積測定、免疫細胞の免疫染色のほか脳組織から Flow cytometry を用いて細胞を単離して遺伝子発現解析などを行なった。行動解析は一定時間内のマウスの移動面積を評価することで行なった。脳梗塞慢性期の解析では発症2週間目以降を慢性期として脳内 T 細胞の解析のほか、アストロサイトの活性化を GFAP 染色で、神経細胞死をカスパーゼ3の染色などで判断した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞後の炎症の収束に関わるマクロファージと受容体の同定

虚血によって脳組織が壊死に陥ると、発症後1~3日の早期にマクロファージや好中球などの炎症細胞が脳内に浸潤する。特に発症後1日目のマクロファージは、IL-1 や IL-23, TNF- などの炎症性サイトカインを産生して炎症を促進する。一方で、梗塞発症4日目を過ぎるとペルオキシレドキシンや HMGB1 などの DAMPs (damage-associated molecular patterns) はマクロファージにより急速に細胞内に取り込まれて、リソゾームによって分解される。このように、DAMPs が分解されてなくなることが炎症の収束に重要であると考えられる。

マクロファージがどのような機構で DAMPs を取り込むのか、その受容体は明らかにされていなかった。我々は DAMPs に特異的な受容体が存在すると考えて、その遺伝子のクローニングを行なった。蛍光標識された DAMPs を取り込めなくなった変異マクロファージを単離して、もとのマクロファージと比べて発現していない遺伝子を抽出し、それらをひとつずつ変異マクロファージに戻して取り込みが回復するかを調べた。その結果タイプ A スカベンジャー受容体と呼ばれる *Msr1* や *Marco* が DAMPs の取り込みに重要な受容体であることがわかった。さらに DAMPs の取り込みを促進する転写因子として *Mafb* も単離された。*Msr1* 遺伝子のプロモーター領域の解析から *Mafb* が *Msr1* の転写を引き起こすことがわかった。*Msr1*/*Marco* 欠損マウス、およびマクロファージ特異的 *Mafb* 欠損マウスを用いて脳梗塞モデルを行なったところ、これらのマウスでは通常3~4日で消失するはずの DAMPs が4日目以降も残存していた。その結果炎症性サイトカインの発現も低くならず、梗塞体積の増大や神経症状の悪化が認められた。したがって *Mafb* によるスカベンジャー受容体の発現誘導が DAMPs をクリアランスすることで炎症を収束させる重要なメカニズムであることが明らかとなった (図1参照)。

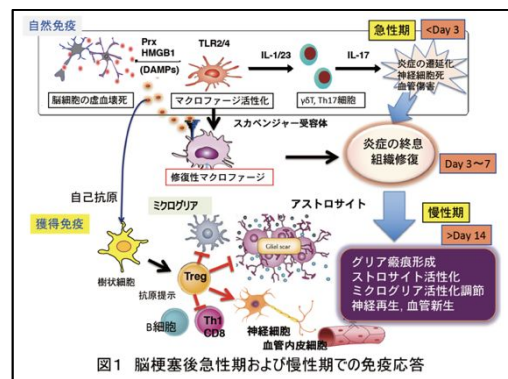
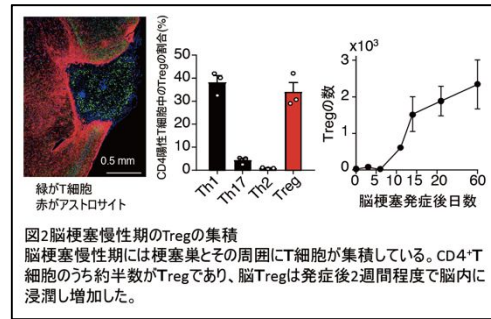


図1 脳梗塞後急性期および慢性期での免疫応答

本研究成果は *Nature Med.* 2017, 23: 723-732 に発表した。

(2) 脳梗塞慢性期における Treg の集積と役割

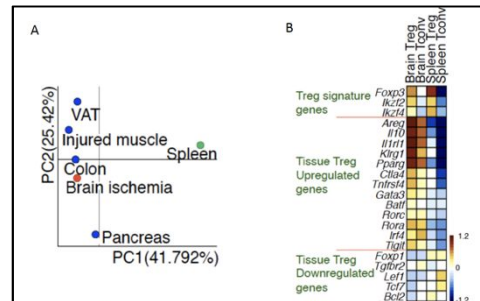
脳梗塞後の炎症は自然免疫が主体で、それ以降の慢性期において炎症は収まっていると考えられてきたため、免疫細胞の役割についてはほとんど解析されていなかった。ところが我々は脳梗塞発症2週目以降の慢性期に T 細胞が集積することを見出した。細胞を分画したところ集積する CD4 陽性 T 細胞のうちおよそ半数が Foxp3 陽性の制御性 T 細胞 (Treg) であった。通常二次リンパ組織の



Treg は CD4⁺T 細胞の 10% 程度であり、これだけの Treg が集積しているために見た目の炎症は抑制されていると考えられる。慢性期の Treg は脳梗塞巣の内部のみならず梗塞部位周辺に局在し、アストロサイトや生き残った神経細胞と近接していることが示された (図 2)。

そこでまず T 細胞の浸潤の意義を明らかにするために脳梗塞後慢性期に FTY720 によって T 細胞の集積を止めたところ神経症状の悪化が見られた。さらに抗 CD4 抗体を投与し CD4 陽性 T 細胞を除去することでも神経症状が悪化した。したがって T 細胞、特に CD4 陽性 T 細胞が脳梗塞後慢性期に神経症状の改善に寄与していることがわかった。次にジフテリア毒素 (DT) によって Treg を一過性に除去できる DEREG マウスを用いて Treg を除去する実験を行なったところ神経症状が悪化した。逆に Rag 欠損マウスや CD3 欠損マウスのような T 細胞が存在しないマウスに Treg を戻すと神経症状が改善された。これらのことから脳梗塞慢性期には脳内に Treg が大量に浸潤し神経症状の改善に重要な役割を果たしていることが示された。

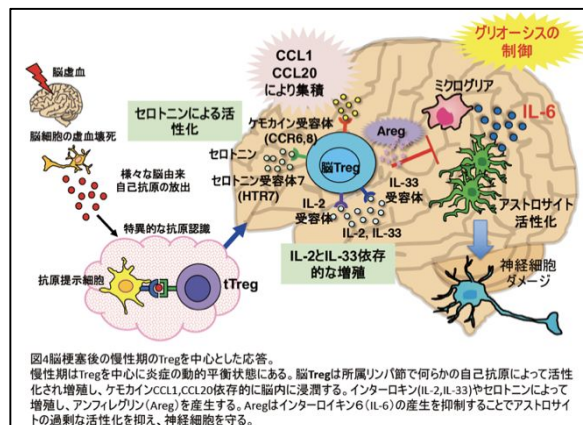
脳内に浸潤した Treg の性質を解析したところ、Helios 陽性であり CTLA-4、PD-1、CD103、Areg (アンフィレグリン)、ST2 を高発現していた。このような組織に常在、もしくは浸潤する Treg を近年組織 Treg (Tissue Treg) と呼ぶことが提唱されている (Panduro, M. et al. *Ann. Rev. Immunol.* 2016, 34: 609-633)。



遺伝子発現解析から脳 Treg は *Pparg*、*Klrg1*、*Ctla4*、*Tigit*、*Gata3*、*Batf*、*Irf4* など高発現し、*Tcf7* と *Lef1* の発現が低下していることから組織 Treg に近いことがわかった (図 3)。よって我々は脳梗塞後の慢性期に脳内に局在する Treg を組織 Treg の仲間であることから脳 Treg と呼ぶことにした。

脳 Treg の増幅には TCR シグナル、IL-2、IL-33 が必須であった (図 4)。また脳 Treg は CCR6 と CCR8 を発現し、脳梗塞巣で上昇する CCL20 や CCL1 依存的に脳内に浸潤した。また脳

Treg は cAMP を上昇させるセロトニン受容体 7 (Htr7) を発現していた。脳梗塞慢性期にセロトニンや選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) を投与すると脳 Treg が増加し神経症状が改善した (図 4)。よって脳 Treg は脳という特殊な環境に順応した機能を獲得しており、神経伝達物質によって刺激を受ける増幅するという非常に興味深い性質を有している。さらに脳 Treg は Areg を強く産生することで、アストロサイトの過剰な活性化 (アストログリアーシス) を抑制していることがわかった。以上マウスの実験的脳梗塞モデルから得られた脳 Treg の発生機構と神経回復機序について図 4 にまとめた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Chikuma S, Yamanaka S, Nakagawa S, Ueda MT, Hayabuchi H, Tokifuji Y, Kanayama M, Okamura T, Arase H, Yoshimura A.	4. 巻 206
2. 論文標題 TRIM28 Expression on Dendritic Cells Prevents Excessive T Cell Priming by Silencing Endogenous Retrovirus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 1528-1539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2001003.	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 Sakai R, Ito M, Yoshimoto K, Chikuma S, Kurasawa T, Kondo T, Suzuki K, Takeuchi T, Amano K, Yoshimura A	4. 巻 9
2. 論文標題 Tocilizumab monotherapy uncovered the role of the CCL22/17-CCR4+ Treg axis during remission of crescentic glomerulonephritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Transl Immunology.	6. 最初と最後の頁 e1203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cti2.1203.	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 Sakai R, Ito M, Komai K, Iizuka-Koga M, Matsuo K, Nakayama T, Yoshie O, Amano K, Nishimasu H, Nureki O, Kubo M, Yoshimura A	4. 巻 18
2. 論文標題 Kidney GATA3+ regulatory T cells play roles in the convalescence stage after antibody-mediated renal injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Immunol.	6. 最初と最後の頁 1249-1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-00547-x.	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 Teratani T, Mikami Y, Nakamoto N, Suzuki T, Harada Y, Okabayashi K, Hagihara Y, Taniki N, Kohno K, Shibata S, Miyamoto K, Ishigame H, Chu PS, Sujino T, Suda W, Hattori M, Matsui M, Okada T, Okano H, Inoue M, Yada T, Kitagawa Y, Yoshimura A, Tanida M, Tsuda M, Iwasaki Y, Kanai T.	4. 巻 585
2. 論文標題 The liver-brain-gut neural arc maintains the Treg cell niche in the gut.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 591-596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2425-3.	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 Imura Y, Ando M, Kondo T, Ito M, Yoshimura A	4. 巻 5
2. 論文標題 CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 e136185.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.136185.	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 Ito M, Komai K, Mise-Omata S, Iizuka-Koga M, Noguchi Y, Kondo T, Sakai R, Matsuo K, Nakayama T, Yoshie O, Nakatsukasa H, Chikuma S, Shichita T, Yoshimura A	4. 巻 565
2. 論文標題 Brain Regulatory T Cells Suppress Astroglial and Potentiate Neurological Recovery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 246-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0824-5	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 Ito M, Komai K, Nakamura T, Srirat T, Yoshimura A.	4. 巻 31
2. 論文標題 Tissue regulatory T cells and neural repair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 361-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz031	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 Chen J, Lopez-Moyado IF, Seo H, Lio CJ, Hempleman LJ, Sekiya T, Yoshimura A, Scott-Browne JP, Rao A	4. 巻 567
2. 論文標題 NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 530-534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-0985-x.	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 該当する

1. 著者名 Dees C, Potter S, Zhang Y, Bergmann C, Zhou X, Luber M, Wohlfahrt T, Karouzakis E, Ramming A, Gelse K, Yoshimura A, Jaenisch R, Distler O, Schett G, Distler JH.	4. 巻 130
2. 論文標題 TGF- β -induced epigenetic deregulation of SOCS3 facilitates STAT3 signaling to promote fibrosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 2347-2363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI122462	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 該当する

1. 著者名 Fujiwara Seiki, Hoshizaki Midori, Ichida Yu, Lex Dennis, Kuroda Etsushi, Ishii Ken J., Magi Shigeyuki, Okada Mariko, Takao Hiroyuki, Gandou Masahiro, Imai Hiroataka, Hara Ryujiro, Herzog Herbert, Yoshimura Akihiko, Okamura Hitoshi, Penninger Josef M., Slutsky Arthur S., Uhlig Stefan, Kuba Keiji, Imai Yumiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Pulmonary phagocyte-derived NPY controls the pathology of severe influenza virus infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 258 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-018-0289-1	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 該当する

1. 著者名 Sekiya Takashi, Hibino Sana, Saeki Keita, Kanamori Mitsuhiro, Takaki Satoshi, Yoshimura Akihiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1627 ~ 1638.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.07.008	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14件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Molecular mechanism of T cell exhaustion by NR4a nuclear receptors and its reversion
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村昭彦
2. 発表標題 cAMPを介した免疫制御の分子機構
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Neural Damage and Repair after Ischemic Brain Injury by Innate and Adaptive Immunity
3. 学会等名 The 9th NIF Winter School on Advanced Immunology in Awaji Island（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiko Yoshimura, Takashi Schichita and Minako Ito
2. 発表標題 Neural Repair after ischemic brain injury by Regulatory T cells
3. 学会等名 NCNP Neuroimmunology international symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minako Ito, Takashi Shichita, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Neural Repair after Ischemic Brain Injury by Regulatry T cells
3. 学会等名 2019, Chinese Society of Immunology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minako Ito, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Regulation of inflammation after ischemic brain injury by innate and adaptive immunity
3. 学会等名 the 9th international DAMPs and Alarmin Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minako Ito, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Neural Repair after Ischemic Brain Injury
3. 学会等名 the 14th World Congress on Inflammation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Neural Damage and Repair after Ischemic Brain Injury by Innate and Adaptive Immunity
3. 学会等名 The 9th NIF Winter School on Advanced Immunology in Awaji Island (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minako Ito, Takashi Shichita, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Neural Repair after Ischemic Brain Injury by Regulatory T cells
3. 学会等名 2019, Chinese Society of Immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村昭彦
2. 発表標題 制御性T細胞のエピジェネティック変化による免疫疾患制御
3. 学会等名 第25回 日本免疫毒性学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村昭彦、伊藤美菜子
2. 発表標題 Regulation of Inflammation after Stroke by Macrophages and Regulatory T Cells
3. 学会等名 Keystone Symposia on New Frontiers in Neuroinflammation,（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>脳梗塞における神経症状回復を促す新規免疫細胞の発見 http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/science/201903_02.html 脳梗塞慢性期において神経症状を回復させる新規脳内T細胞を発見 https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2019/1/7/28-50388/ 脳梗塞における神経症状回復を促す新規免疫細胞の発見 http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/science/201903_02.html 脳梗塞慢性期において神経症状を回復させる新規脳内T細胞を発見 https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2019/1/7/28-50388/</p>

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			
米国	La Jolla Institute for Immunology			