

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14587

研究課題名(和文) Trimethyltin投与マウス脳再生モデルにおける免疫系細胞の機能について

研究課題名(英文) Immune regulation of brain regeneration in trimethyltin-treated mice

研究代表者

櫻井 優 (SAKURAI, Masashi)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：00747967

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)：Trimethyltin (TMT) 投与マウスは有用な脳組織再生のモデル動物である。本研究では、TMT投与モデルの脳病変に遊走するTリンパ球に注目し、Tリンパ球が脳組織再生に与える影響について検討した。代表的な免疫抑制剤であるプロドニゾロン(PSL)をTMT投与マウスに投与したところ、脳病変へのTリンパ球の遊走が抑制され、同時に脳組織再生の促進が観察された。また、Tリンパ球を欠損するヌードマウスを用いてTMT投与モデルを作成すると、免疫系が正常なマウスと比べ脳組織再生の促進が見られた。以上の結果からTリンパ球は脳組織再生を阻害すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳は再生しない臓器と考えられてきた。しかし、近年の研究により脳にも少数の神経幹細胞が分布しており、脳梗塞などの病変内に新しい神経細胞が産生されることが報告されている。すなわち、脳にも弱いながら他の臓器のように再生力が存在する可能性がある。本研究では、白血球の一種であるTリンパ球が脳の再生を阻害することが示された。本研究の成果は白血球に代表される免疫系が脳の再生を制御する可能性を示したことにその意義があり、脳再生医療分野に貢献する一知見を得たものである。

研究成果の概要(英文)：Trimethyltin (TMT)-treated mice is a useful animal model for the investigation of brain tissue regeneration. In this study, we focused on T lymphocytes which migrate into the brain lesions of TMT-treated mice. At first, prednisolone (PSL), a common immunosuppressant, was administered to TMT-treated mice. Immunohistochemical analysis revealed that PSL treatment could inhibit the T lymphocyte migration and improve brain tissue regeneration. Then, we made TMT-treated mice using nude mouse which lacks mature T lymphocytes. TMT-treated nude mice also showed improved brain tissue regeneration compared with TMT-treated mice having normal immune system. These results indicated that T lymphocytes prevent the brain tissue regeneration in TMT-treated mice.

研究分野：神経病理

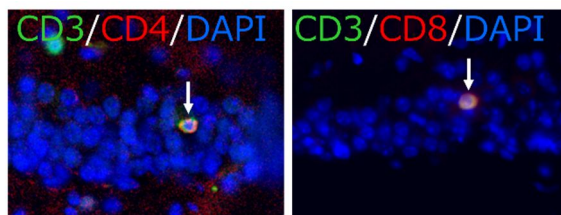
キーワード：脳 再生 リンパ球 マウス

### 1. 研究開始当初の背景

脳や脊髄といった中枢神経組織は一度損傷すると再生しない。その原因は中枢神経が再生力に乏しく、損傷を受けた病変組織の環境が再生に適していないためだと考えられている。一方で、近年の研究により、脳には特定の部位に神経幹細胞が存在し、生涯を通して神経細胞を産生することが明らかとなってきた(成体脳の神経新生)。生理的な神経新生に加えて、この神経幹細胞は脳が損傷を受けた際には、その病変部へと新たな神経細胞を供給することが報告されている。すなわち、脳に存在する神経幹細胞は、病的な状態において、再生性の神経新生に寄与すると考えられている。

有機スズ化合物である Trimethyltin (TMT) は、マウスに投与すると海馬歯状回を構成する神経細胞(顆粒細胞)に強い毒性を示す。しかし驚くべきことに、本モデルでは破壊された歯状回が完全に再生する。海馬歯状回の下顆粒細胞層は、上述した神経幹細胞が分布する特定の領域であり、この神経幹細胞が新たな顆粒細胞を供給することで本モデルには脳組織の再生が生じる。

我々は、TMT 投与マウスの歯状回病変に、通常脳内ではほぼ観察されない T リンパ球が分布することを捉えた。脳や脊髄以外の臓器においては、損傷を受けた際に白血球が遊走する炎症反応が生じ、組織の再生と密接に関係する。脳は正常時には血液脳関門により血中の免疫系からは隔離されているが、脳梗塞などの病変部には白血球の遊走が見られる。脳組織の再生においても白血球が何らかの働きを持つ可能性が高い。本研究では TMT 投与マウスを用いて、リンパ球を含む免疫系細胞は種々の臓器の再生に関与し、脳の再生にも重要な働きを持つ可能性が高い。



**図 1. T リンパ球サブタイプの同定。**

TMT 投与マウスの歯状回の二重免疫蛍光像。CD3/CD4 に陽性を示すヘルパー T 細胞(左)、CD3/CD8 に陽性を示す細胞傷害性 T 細胞(右)がそれぞれ検出された。矢印がそれぞれの二重陽性細胞を指す。

### 2. 研究の目的

本研究は「脳の再生における免疫系細胞(特にリンパ球)の機能解明」を目的とする。TMT 投与モデルは、従来の脳疾患モデル動物(脳梗塞モデル、脳外傷モデルなど)では観察が困難であった、脳組織の再生が明瞭に生じるモデルであり、その脳病変を解析することで脳組織再生という現象に関わる多様な要因を解析し得る。

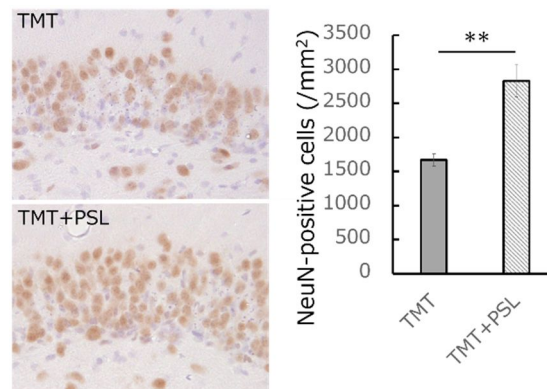
### 3. 研究の方法

本研究では、TMT 投与マウスの脳機能を行動試験(強制水泳試験または尾懸垂試験)により評価し、組織学的手法により脳病変の解析を実施した。

### 4. 研究成果

最初に、TMT 投与マウスの歯状回病変に遊走する T リンパ球のサブタイプについて検討した。T リンパ球の汎用的なマーカー分子である CD3 と、サブタイプ特異的なマーカー分子を二重免疫蛍光により検出し、CD3/CD4 に二重陽性を示すヘルパー T 細胞と CD3/CD8 に二重陽性を示す細胞傷害性 T 細胞が TMT 投与モデルの脳病変に分布することを確認した(図 1)。ヘルパー T 細胞は種々のサイトカインや成長因子を発現し得る細胞であり、脳組織の再生を正にも負にも調整し得る。一方で、細胞傷害性 T 細胞は、パーフォリンやグランザイムの発現を特徴とし、病原体や周囲の細胞を傷害する。そのため、細胞傷害性 T 細胞は、脳組織中の細胞を傷害し、再生を負に調整すると考えられた。なお、Foxp3 の発現を特徴とする制御性 T 細胞は TMT 投与マウスの脳内に確認されなかった。

続いて、代表的な免疫抑制剤であるプレドニゾロン(PSL)を TMT 投与マウスに投与した。TMT 投与 7 日後に強制水泳試験を実施すると、PSL 投与群では対照群と比較し、有意な無動時間の短縮、すなわち脳機能の回復が認められた。その脳組織を採材し、免疫染色により NeuN (成熟神



**図 2. PSL 投与による脳組織再生の促進**

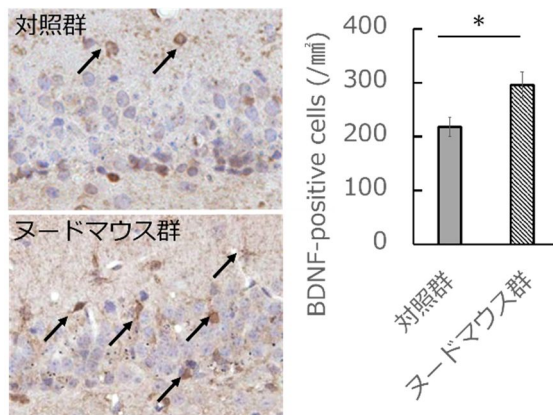
NeuN 免疫染色像と歯状回の陽性細胞数。TMT のみを投与した対照群と比べ、PSL 投与群(TMT+PSL)では多くの陽性神経細胞が観察される。成熟神経細胞の増加は脳組織再生の促進を示唆している。

NeuN (成熟神

経細胞マーカー) および ZnT3 (顆粒細胞軸索マーカー)を検出し脳組織の再生を評価したところ、PSL 投与群ではこれらの有意な増加(陽性細胞数、陽性領域)が確認され、脳組織再生の促進が示唆された(図 2)。CD3 陽性 T リンパ球を検出すると、PSL 投与群では海馬にみられる CD3 陽性細胞が有意に減少しており、プレドニゾロン投与により T リンパ球の遊走が抑制された結果、上述の脳機能の回復および脳組織の再生が促進されたと考えられた。本実験からは PSL が脳組織の再生に直接的に影響を与える可能性を否定できないが、TMT 投与モデルの脳病変へ遊走する T リンパ球が脳組織の再生を阻害する可能性が示唆された。

そこで、T リンパ球を欠損するヌードマウス (Balb/cAJcl-nu/nu)を用いて TMT 投与モデルを作製した。TMT 投与 7 日後に対照群 (Balb/cAJcl を用いた TMT 投与モデル)と比較すると、ヌードマウスでは尾懸垂試験における無道時間が有意に短縮し、脳機能の回復が示唆された。その脳組織では歯状回の NeuN 陽性細胞(顆粒細胞)数、および ZnT3 陽性領域(顆粒細胞軸索)の増加が認められ、脳組織再生の促進が示唆された。また、神経新生の活性を評価すべく Doublecortin を検出し未成熟神経細胞数を評価した。ヌードマウス群では歯状回における Doublecortin 陽性細胞の有意な増数が認められ、神経新生の活性化が示唆された。さらに、神経新生に重要な神経栄養因子の 1 つである脳由来神経栄養因子(BDNF)を検出すると、ヌードマウスでは BDNF 陽性細胞の増加が見られた(図 3)。すなわち、ヌードマウス TMT 投与モデルでは BDNF 発現の増強により、歯状回病変における神経新生が活性化し、脳組織の再生が促進されると考えられる。T リンパ球はこれらのプロセスに関与することで脳組織の再生を阻害すると推察された。

以上のように、TMT 投与脳組織再生モデルの脳病変には少なくともヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞が遊走し、脳組織の再生を阻害すると考えられる。本研究の成果は免疫系が脳組織再生の制御に関わることを示唆するものである。



**図 3. BDNF の発現**

BDNF 免疫染色像と歯状回における陽性細胞数。ヌードマウス TMT 投与モデルでは BDNF 発現細胞が増加しており、これが脳組織再生の促進につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫻井 優、竹中 美紀、坂井 祐介、森本 将弘
2. 発表標題 Trimethyltin投与歯状回再生モデルにおけるリンパ球の遊走
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井 優、竹中 美紀、光井 裕貴、坂井 祐介、森本 将弘
2. 発表標題 Trimethyltin投与脳再生モデルにおけるTリンパ球の機能
3. 学会等名 第7回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木 奈緒、櫻井 優、坂井 祐介、森本 将弘
2. 発表標題 Trimethyltin投与マウスにおけるTリンパ球による脳組織再生の阻害
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------