

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025  
課題番号：21H05044  
研究課題名：獲得免疫による脳内炎症の制御および修復機構の解明  
研究代表者氏名（ローマ字）：吉村 昭彦（YOSHIMURA Akihiko）  
所属研究機関・部局・職：慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授  
研究者番号：90182815

研究の概要：

脳梗塞やアルツハイマー病などの脳内炎症に関わる脳疾患において、これまではミクログリアが主要な免疫細胞として解析されてきたが、獲得免疫を担うT細胞、B細胞などのリンパ球や自己抗体はようやくその重要性が認識されつつある。本研究では脳梗塞やアルツハイマー病などの神経変性疾患における神経傷害とその修復過程における獲得免疫系の意義を明らかにする。

研究分野：基礎医学 免疫学

キーワード：メモリーT細胞 自己抗体 神経炎症 アルツハイマー病 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループでは、マウス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来た。さらに炎症を終結させるメカニズムの解明にも取り組み、発症後期にはスカベンジャー受容体群を発現する修復性のマクロファージや制御性T細胞(Treg)が炎症の収束と神経回復に寄与することを明らかにした。特に慢性期の炎症制御と脳神経系の関連はほとんど解明されていなかったが、我々は発症2週間目以降の慢性期に脳内に多量のT細胞が浸潤しており、獲得免疫が発動することを見出した。特に脳内Tregはアンフィレグリン(Areg)を産生し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た。このように脳組織傷害後の組織修復にも免疫細胞-脳細胞間相互作用が関与することが明らかとなったが、その他の脳内炎症において組織修復期の脳内免疫細胞の役割およびそれら免疫細胞間、免疫細胞-神経系細胞間の相互作用がどのように脳組織あるいは神経修復に関与するかはほとんど解明されていない。一方で我々は脳梗塞のみならず多発性硬化症やアルツハイマー病モデルでも脳特異的な特徴を持つTreg細胞が脳内に蓄積することを見出している。認知症に対してレカネマブなどの抗体療法が注目を集めているが、神経変性疾患や精神疾患の分野でも獲得免疫系の関与が示されつつある。

2. 研究の目的

免疫系細胞が神経系細胞を巻き込んで引き起こす「脳内炎症反応」は短期的には神経細胞にとって悪影響があるものの、炎症収束後の脳機能修復とその維持に不可欠と考えられる。しかし、その制御破綻による過剰な反応は脳機能の障害、発達行動異常、脳機能損傷などと密接に関係する。そこで、本研究領域ではマウスモデルを中心に脳傷害時の*in vivo*モデルおよび一細胞RNAシーケンス(scRNAseq)解析を組み合わせることで、多様な免疫-神経細胞相互作用からなる中枢神経組織の組織修復機構の解明およびその制御不全から生じる病態発生の理解をめざす。

3. 研究の方法

- 1) 一細胞 scRNAseq 解析による免疫細胞-脳細胞の相互作用と新規遺伝子の探索：脳梗塞モデルおよび EAE モデルにおいて発症後3日目の急性期と24日目の慢性期の脳もしくは脊髄の単核球 scRNAseq のデータを取得する。また一度脳梗塞を起こしたマウスの反対側にもう一度脳梗塞を起こす再発モデルやアルツハイマー(AD)モデルマウス(APPマウス)においても scRNAseq 解析と TCR, BCR 解析を行う。
- 2) 脳炎症後のT細胞やB細胞の由来や抗原特異性を解析し、脳内炎症における共通抗原を見し、それによる病態への意義と新規治療法の開発：脳内浸潤B細胞クローンが発現する抗体を用いて抗原を同定する。組替え抗体は293細胞を用いた培養系で作製する技術を用いる。これらの解析で得られたTCRや抗体が他の脳内炎症でも観察されるかをEAEやADモデルでも検証する。脳や他の臓器と腸で共通する(あるいは交差する)TCR、BCR、抗体を用いて、脳リンパ球が一度腸を経由して発生する可能性を検証する。
- 3) 神経細胞、グリア細胞とマクロファージやT細胞の2次元共培養系を確立し、試験管内で細胞間相互作用と機能分子を検索する。

4. これまでの成果

1) scRNAseq による免疫細胞 脳細胞の相互作用と新規遺伝子の探索

脳梗塞モデル scRNAseq のデータ：発症後3日目の急性期と24日目の慢性期の scRNAseq を施行した。脳梗塞後急性期には浸潤マクロファージや樹状細胞が主体で、慢性期にはリンパ球の集積が主体になることが確認された。また、慢性期にはミクログリアの変化が修復されつつある。scTCR, BCR 解析により、各T細胞サブセットでオリゴクローナルに増幅しているTCRを同定しており、そのうちいくつかは脳内抗原に反応性であった。再発モデル：梗塞抵抗性のメカニズムを解明するために、脳梗塞発症後の急性期、慢性期、および反対側の脳細胞のバルク RNAseq および scRNAseq を行った。RNAseq などの検討の結果、細胞性の因子

は Treg、液性の因子の一つはオキシトシンであることが示唆された。オキシトシン受容体アンタゴニストの投与により耐性が解消された。現在オキシトシン産生細胞と受容細胞の同定を行なっている。アルツハイマー(AD)モデルにおける scRNA 解析：T細胞欠損マウスの背景から T細胞が A の沈着に積極的に関与することが示された。APP マウスではミクログリアが T細胞依存的に病原性に変化している割合が増加していた。さらに脳内で増加している CD8<sup>+</sup>T細胞の TCR を T細胞に導入したところ T細胞の脳内浸潤の増加が認められた。脳内浸潤 B細胞クローンが発現する抗体の意義の解明：脳内で増幅している BCR 遺伝子を単離し抗体を作成し現在検証中である。脳-腸関連による ADモデルの増悪化：炎症性腸疾患(IBD)モデルの一つである DSS 腸炎を誘導した APP マウスの脳では、凝集した A の増加が観察された。脳内の免疫細胞の scRNAseq 解析により好中球由来の MMP9 が A の蓄積に関与することを見出した。

## 2) メモリーT細胞の活性化による老化関連疾患の改善と脳内炎症、アルツハイマー症状への影響

RNAseq 解析により脳内における Treg やメモリーT細胞に PD-1 や NR4a といった T細胞疲弊関連分子の発現が高いことを見出した。東京大学の中西教授らとの共同研究を行い、抗 PD-1 抗体投与によって PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞が PD-L1 陽性の老化細胞の殺細胞効果が増強され、脂肪肝などの一定の老化関連疾患抑制効果を示すことを見出した。現在、脳への影響を脳梗塞や AD マウスでの検討を行なっている。さらに脳梗塞のみならず APP マウスにおいてもメモリーT細胞に NR4a の発現が高いことを見出した。NR4a は Treg の機能維持に重要な働きをするほか、CD8<sup>+</sup>メモリーT細胞の疲弊化に関与する。またヒトではパーキンソン病の関連遺伝子としても知られている。CD8CreNR4aflox,Nr4a2flox マウスを用いて CD8<sup>+</sup>T細胞特異的 NR4a 欠損マウスを作成し解析をおこなっている。ヒトにおけるメモリーT細胞の研究体制を構築するために、SARS-CoV-2 に対する mRNA ワクチン接種後のメモリーB および T細胞応答を解析する系を立ち上げた。今後、モデルマウスを用いてワクチン、アジュバント投与とメモリーT細胞と脳内炎症の関連について調べる。

## 3) グリア細胞とT細胞の2次元共培養系の確立と脳 Treg 誘導因子の同定

マウス脳梗塞モデルほか EAE や ADモデルにおいて、脳内に Treg が集積し ST2 やセロトニン受容体 7(Htr7) の発現など特徴的な性質を獲得していることを見出した。そこで脳 Treg の特性を in vitro で付与する培養法の開発を試みた。ナイーブ Treg を IL-33 とセロトニン存在下で初代アストロサイトと共培養すると ST2、PPAR、Htr7 の発現といった脳 Treg の特性の一部を付与できた。こうして得られた Treg はパーキンソン病モデルを改善した。

### 5. 今後の計画

再発モデルにおいてはオキシトシンの産生細胞と受容細胞を同定する。再発時の Treg 増加メカニズムの解明と。オキシトシンの抗炎症機構を明らかにする。また脳梗塞 Treg で増幅されている TCR を試験管内で誘導した Treg に導入し、脳浸潤性や脳梗塞後の神経回復への影響を確かめる。またアルツハイマー(AD)モデルで増幅されていた TCR 導入 CD8<sup>+</sup>T細胞の A 蓄積に及ぼす影響を解明する。細胞接着や IL-2 産生などを指標に抗原発現細胞を同定し発現ライブラリーを用いて標的自己抗原を同定する。

すでに脳梗塞モデルで増幅する BCR は同定し、他の脳内炎症モデルでの発現を確認している。さらに 293細胞で抗体として産生を開始している。精製抗体を得たならば抗原の同定を行うと同時に、反応する細胞を同定する。さらに iPS 細胞由来脳神経細胞やグリア細胞を用いて試験管内での影響を調べる。

CD8<sup>+</sup>T細胞がミクログリアの分化を恒常性から病原性に転換する分子機構の解明を行う。特に CD8 特異的 NR4a 欠損マウスを用いて脳内 T細胞における NR4a の意義を明らかにする。

脳 Treg の性質を付与するアストロサイト因子を解明する。また Areg を誘導する因子を同定する。

### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Kaneko, R., M. Ito(14/14). 2023. 'Increased neutrophils in inflammatory bowel disease accelerate the accumulation of amyloid plaques in the mouse model of Alzheimer's disease.' *Inflammation and regeneration* 43:20
2. Mise-Omata, S., and A. Yoshimura (20/20). 2022. 'Memory B Cells and Memory T Cells Induced by SARS-CoV-2 Booster Vaccination or Infection Show Different Dynamics and Responsiveness to the Omicron Variant', *J Immunol*, 209: 2104-13.
3. Wang, T. W., A. Yoshimura (12/13), and M. Nakanishi. 2022. 'Blocking PD-L1-PD-1 improves senescence surveillance and ageing phenotypes', *Nature*, 611: 358-64.
4. Yamamoto, S., A. Yoshimura(8/9), and M. Ito. 2022. 'In Vitro Generation of Brain Regulatory T Cells by Co-culturing With Astrocytes', *Front Immunol*, 13: 960036.
5. Komai, K., M. Ito, and A. Yoshimura (10/10). 2021. 'Single-Cell Analysis Revealed the Role of CD8(+) Effector T Cells in Preventing Cardioprotective Macrophage Differentiation in the Early Phase of Heart Failure', *Front Immunol*, 12: 763647.
6. A. Yoshimura, M. Ohyagi, M. Ito 'T cells in the brain inflammation' *Advances in Immunology Vol 157 in press*. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2022.10.001>

令和3年度 紫綬褒章 (吉村昭彦) 令和4年度 国際サイトカイン学会ファイザー賞(吉村昭彦)

### 7. ホームページ等

[http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical\\_info/science/201903\\_02.html](http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/science/201903_02.html)

<http://new2.immunoreg.jp>