

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05937

研究課題名(和文) Tリンパ球による脳組織再生阻害機序の解明

研究課題名(英文) Prevention of brain tissue regeneration by T cells

研究代表者

櫻井 優 (Sakurai, Masashi)

山口大学・共同獣医学部・准教授

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)：本研究では、リンパ球を移植したヌードマウスを用いたTrimethyltin (TMT) 投与脳組織再生モデルを解析することで、移植細胞が脳組織再生に与える影響を評価した。CD4陽性ヘルパーT細胞およびCD8陽性細胞障害性T細胞のいずれの移植においても、脳組織再生の阻害が生じたことから、これらのT細胞サブセットが脳組織再生の阻害に関与すると考えられた。また、これらの細胞移植したTMT投与モデルでは、神経新生の減衰およびグリア細胞活性化の変化がみられたため、T細胞はこれらを介して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

脳および脊髄から構成される中枢神経系は、一度損傷すると再生することは無いと考えられてきた。しかし、近年の研究により脳にも微弱な再生力が存在する可能性が示唆されており、また、多能性幹細胞等を用いた再生医療研究が中枢神経系においても精力的に行われている。本研究は、哺乳類の脳に再生が生じるTMT投与マウスモデルを解析し、その脳組織再生機序の一端を解き明かすことで、これら中枢神経系の再生医療分野の発展に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, the influence of T cell repopulation on brain tissue regeneration was investigated. CD4+ helper or CD8+ cytotoxic T lymphocytes were repopulated in nude mice and used as a mouse model for brain tissue regeneration by trimethyltin (TMT) injection. Brain tissue regeneration and associated changes were examined immunohistochemically. In both CD4+ and CD8+ repopulated groups, neuronal regeneration was inhibited. In addition, neurogenesis was declined and glial activations were altered. Thus, in TMT-injected mouse model, both helper and cytotoxic T cells are thought to prevent brain tissue regeneration through affecting neurogenesis and glial activations.

研究分野：神経病理

キーワード：脳 マウス Trimethyltin 再生 免疫 リンパ球

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を受けると、失われた神経細胞が新たに形成されることはなく、中枢神経組織は再生能を欠くとされてきた。一方で、脳には特定の部位に神経幹細胞が存在し、脳病変内に新たな神経細胞を供給することが報告されており、脳には微弱な再生能が存在することが示唆されている。

脳は免疫特権を持つ臓器と考えられてきた。精密な障壁である血液脳関門により血中の白血球から隔離されることがその大きな理由であり、正常な脳組織中には白血球はほぼ含まれない。しかし、脳の損傷時には血中の白血球が病変内へ遊走する。これは損傷に伴う血液脳関門の破綻などによるもので、脳梗塞や脳外傷の病変には血中の白血球が遊走し、病変の進展等に関与することが示されている。

有機スズ化合物である Trimethyltin (TMT) は、マウスに投与すると脳の海馬歯状回を構成する顆粒細胞に選択的な毒性を示す。しかし、この海馬病変はおよそ 3 週間でほぼ完全に再生する。これは病変部の直下に位置する顆粒細胞下帯に神経幹細胞が分布しており、この神経幹細胞が新たな顆粒細胞を供給するためである。TMT 投与マウスは哺乳類の脳組織再生モデルとして有用である。我々はこの TMT 投与マウスの脳組織を解析し、病変部に CD3 陽性 T 細胞が遊走することを捉えた。加えて、T 細胞を欠損するヌードマウスを用いた TMT 投与モデルでは、脳組織再生の促進が認められた。以上から、TMT 投与マウスでは T 細胞が脳組織再生を阻害すると考えられるが、その詳細な機序については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、T 細胞による脳組織再生の阻害機序を解明することを目的とした。また、T 細胞には多様なサブセットが存在することから、重要な役割を担うサブセットの同定を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、TMT 投与マウスの脳を主に組織学的手法により解析した。まず、通常の免疫系を持つマウスを用いて TMT 投与モデルを作製し、二重免疫蛍光により海馬病変に浸潤するリンパ球のサブセットを検討した。次に、リンパ球を移植したヌードマウス (T 細胞を欠損) を用いて TMT 投与モデルを作製し、その脳組織に生じる変化を解析した。

4. 研究成果

1) T 細胞サブセットの同定

T 細胞全般のマーカー分子である CD3 およびサブセット特異的分子を免疫二重蛍光で検出し、海馬病変に浸潤する T 細胞リンパ球サブセットを同定した。海馬病変には CD3/CD4 陽性ヘルパー T 細胞および CD3/CD8 陽性細胞障害性 T 細胞が確認され、これらが脳組織再生の阻害に関連するリンパ球サブセットと考えられた。

2) リンパ球移植ヌードマウス TMT 投与モデルの解析

移植したリンパ球が脳組織再生に如何に影響するかを検討するため、ヌードマウスに種々の条件でリンパ球を移植し、そのマウスを用いて TMT 投与モデルを作製した。

2-1) 全リンパ球の移植

ドナーマウスの脾臓懸濁液より Lympholyte-M Cell Separation Media (CEDARLANE、カナダ) を用いてリンパ球を抽出し、ヌードマウスに移植した。その後 TMT を投与し、7 日後に脳組織を採取して免疫組織学的解析を実施した。

神経細胞の再生を評価するため Neuronal Nuclei (NeuN) 抗体を用いて成熟神経細胞を検出した。海馬歯状回の NeuN 陽性細胞数は対照群 (リンパ球移植の代わりに溶媒のみを投与) と比較して、移植群において有意に減少していた。また、神経細胞の樹状突起および軸索を Microtubule-associated protein 2 (MAP2) 抗体および Zinc transporter 3 (ZnT3) 抗体により検出した。これらの陽性領域を計測すると、いずれも移植群において有意な減少がみられた。以上から、移植したリンパ球により、脳組織再生の阻害が生じることが確認された。ヌードマウスが T 細胞を欠損することを踏まえると、移植した T 細胞が脳組織再生の阻害に関与すると考えられた。

2-2) CD4 陽性細胞の移植

成果 1 において CD4 陽性ヘルパー T 細胞の遊走を認めたため、CD4 陽性細胞をドナーマウスより抽出し、ヌードマウスに移植して TMT 投与モデルを作製した。CD4 陽性細胞の抽出は CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse (Miltenyi Biotec, ドイツ) により実施した。2-1 同様に TMT 投与から 7 日後に脳組織を採取して、免疫組織学的解析を実施した。

神経細胞の再生を検討すると、CD4 陽性細胞移植群では、対照群と比較して NeuN 陽性成熟神経細胞の有意な減少が認められた(図 1)。MAP2 陽性領域および ZnT3 陽性領域についても、CD4 陽性細胞移植群において有意な減少が認められた。このため、移植したヘルパー T 細胞が脳組織再生の阻害に関与すると考えられた。

Doublecortin (DCX) 抗体を用いて未成熟神経細胞を検出し、海馬歯状回の神経新生について検討した。DCX 陽性細胞数は、CD4 陽性細胞移植群で有意に減少しており、神経新生活性の減衰が示唆された。また、一般に脳組織傷害時に反応性変化を示すミクログリアおよびアストロサイトについて検討するため Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) 抗体および Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いてこれらのグリア細胞を検出した。CD4 陽性細胞移植群では、対照群と比較して Iba1 陽性ミクログリアの有意な減少が認められた(図 2)。一方で、GFAP 陽性アストロサイト数に顕著な変化は見られなかった。以上より、CD4 陽性ヘルパーは海馬歯状回の神経新生の減衰およびミクログリア活性化の抑制により脳組織再生を阻害することが示唆された。

2-3) CD8 陽性細胞の移植

次に CD8 陽性細胞をドナーマウスよりヌードマウスへ移植し、TMT 投与モデルを作製した。CD8 陽性細胞は、ドナーマウスの脾臓懸濁液より CD8 Microbeads, mouse (Miltenyi Biotec) を用いて抽出した。TMT 投与から 7 日後に脳組織を採取し、免疫組織学的解析を実施した。

CD8 陽性細胞移植群においても、対照群と比較して NeuN 陽性成熟神経細胞の有意な減少が認められた。一方、MAP2 陽性領域および ZnT3 陽性領域に顕著な変化はみられなかった。このため、CD8 陽性細胞は脳組織再生の阻害に関連するが、樹状突起や軸索の伸長に強い影響を示さないと思われる。

DCX 免疫組織化学により神経新生について検討すると、CD8 陽性細胞移植群では、対照群と比較して陽性細胞の有意な減少がみられた。また、Iba1 陽性ミクログリアおよび GFAP 陽性アストロサイトは、移植群において有意に増加していた。以上より、CD8 陽性細胞障害性は、海馬歯状回の神経新生の減衰および各グリア細胞活性化の増強により脳組織再生を阻害することが示唆された。

以上の研究成果より、TMT 投与マウスにおいて、ヘルパー T 細胞および細胞障害性 T 細胞の両者が脳組織再生の阻害に関与すると考えられた。いずれの T 細胞サブセットも、神経新生およびグリア細胞の活性化に影響することで脳組織再生を阻害すると思われるが、その詳細は未だ明らかではない。今後、その機序についてより詳細な解析が必要であると考えている。

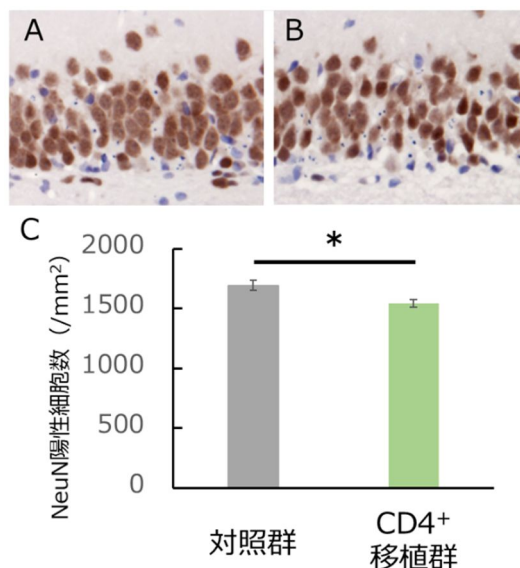


図 1. 神経細胞の再生。(A, B) 対照群 (A) および CD4 陽性細胞移植群 (B) の NeuN 免疫組織化学像。(C) NeuN 陽性細胞数。移植群では成熟神経細胞が減少しており、移植細胞による再生の阻害が示唆される。* $p < 0.05$ 。

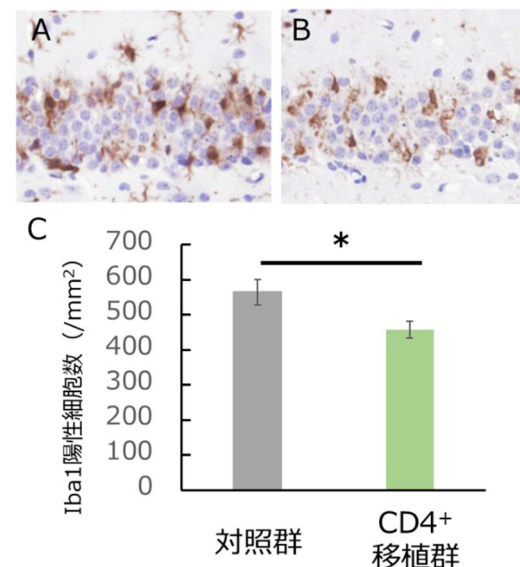


図 2. ミクログリアの活性化。(A, B) 対照群 (A) および CD4 陽性細胞移植群 (B) の Iba1 免疫組織化学像。(C) Iba1 陽性細胞数。移植群ではミクログリア数の減少がみられ、その活性化の抑制が示唆される。* $p < 0.05$ 。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Sakurai Masashi、Takenaka Miki、Mitsui Yuki、Sakai Yusuke、Morimoto Masahiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Prednisolone improves hippocampal regeneration after trimethyltin induced neurodegeneration in association with prevention of T lymphocyte infiltration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 21～30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/neup.12926	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 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 櫻井 優、笹本 実花、青木 菜緒、森本 將弘
2. 発表標題 Trimethyltin投与脳組織再生モデルにおけるリンパ球移植効果の検討
3. 学会等名 第63回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masashi Sakuai, Mika Sasamoto, Kyoko Yoshizaki, Masahiro Morimoto
2. 発表標題 Prevention of brain tissue regeneration by CD4-positive T cells
3. 学会等名 The 10th ASVP and 10th JCVP Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 櫻井 優、今泉 実子、坂井 裕介、森本 將弘
2. 発表標題 Trimethyltin投与脳組織再生モデルにおけるRolipram投与効果の検討
3. 学会等名 第9回日本獣医病理学専門家境界学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------