

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82611

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20787

研究課題名(和文)免疫依存性神経変性病態に対するI型インターフェロンの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of type I interferon for immune-dependent neurodegenerative pathogenesis

研究代表者

Yeh Tzu-wen (Yeh, Tzu-wen)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 免疫研究部・リサーチフェロー

研究者番号：40904389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、中枢神経系(CNS)に生じるGranzyme Bを産生する細胞障害性Eomes陽性Th細胞が、二次進行型多発性硬化症(SPMS)や神経変性疾患における神経細胞死の原因となることを見出したが、Eomes陽性Th細胞の誘導機序は不明であった。その後、I型インターフェロン(IFN-I)シグナルの阻害により、Eomes陽性Th細胞が減少することが明らかとなったことから、本研究では、IFN-Iが高発現する遺伝子改変マウスを用いて、Eomes陽性Th細胞の生成機序の解明を行った。その結果、IFN-IがTh細胞のEomes発現誘導と神経細胞死に重要な役割を果たす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

I型インターフェロン(IFN-I)は、ウイルス感染時に産生され、その増殖を抑制する液性因子であるが、慢性炎症を誘導するIFN-Iが免疫応答に及ぼす作用や、その過剰産生を伴う種々の中枢神経疾患に対する病態修飾機序は不明である。本研究では、神経変性病態に関わるEomes陽性Th細胞の生成と同細胞による神経細胞障害が、CNS内におけるIFN-Iの過剰産生により生じるという学術的に重要な成果を得た。神経変性疾患ではCNS内のIFN-I産生亢進が共通して生じるため、Eomes陽性Th細胞依存性の神経細胞死におけるIFN-Iの意義を解明することで、中枢神経疾患の病態機序の理解がさらに進むことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that neurotoxic Eomes-positive helper T cells (Eomes+ Th cells) expressing granzyme B is associated with the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Eomes+ Th cells were accumulated in the postmortem CNS specimen from secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) and mouse models of SPMS and neurodegenerative diseases. Moreover, we found that blockade of type I interferon (IFN-I) signals ameliorated late EAE symptoms with reduced Eomes+ Th cell accumulation in the CNS. Therefore, IFN-I might contribute to the development of Eomes+ Th cells in the CNS. To provide evidences for IFN-I-mediated Eomes+ Th cell development, we used LMO mouse strains that express massive IFN-I. As a result, we found that upregulation of IFN-I production alone is enough for the induction of Eomes expression in Th cells in vivo.

研究分野：神経免疫

キーワード：type I interferon Eomes 多発性硬化症 Granzyme B 神経変性疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当研究室では、中枢神経系 (CNS) の神経変性病態を伴う進行型の多発性硬化症 (SPMS) のモデルマウスを樹立し、転写因子 Eomes を発現する CD4<sup>+</sup> T 細胞 (Eomes 陽性 Th 細胞) が、マウスモデルの CNS と SPMS 患者の死後脳および末梢血で選択的に増加することを見出した。その後、典型的な神経変性疾患のマウスモデルの CNS への Eomes 陽性 Th 細胞の集積を見出し、同細胞が神経変性病態に密接に関わる可能性を明らかにした。Eomes 陽性 Th 細胞は、慢性炎症環境下の CNS 内で徐々に出現するが、その生成機序は不明である。一方、炎症性サイトカインである IFN-I の阻害により、CNS 内への Eomes 陽性 Th 細胞の集積が顕著に抑制されることから、神経変性病態の形成過程における IFN の役割に着目した。IFN-I は、ウイルス感染時に増加する核酸成分を認識して産生される抗ウイルス因子であるが、IFN-I シグナル制御の破綻が原因となる遺伝性のアイカルディ・グチエール症候群 (AGS) では、全身性の強い炎症反応とともに、高頻度で中枢神経症状を呈することが知られている。同様に、IFN-I 過剰産生を伴う自己免疫疾患である全身性ループス (SLE) 患者も高頻度に中枢神経症状を呈するが、IFN-I の過剰産生による中枢神経症状の発症機序は不明である。多くの神経変性疾患においても、発症に伴うグリア細胞由来の IFN-I 産生増加を認めるが、IFN-I の誘導因子、および過剰に産生された IFN-I が神経細胞障害とどのように関わるか、などはいずれも不明である。とくに全身性の IFN-I 過剰産生を容易に末梢で検出可能な AGS や SLE と異なり、脳実質に限局した IFN-I 産生亢進を末梢で捉えることは極めて難しく、神経変性疾患における IFN-I の役割はほぼ分かっていない。本研究では、全身性あるいは CNS に限定して IFN-I を過剰産生する遺伝子改変マウスと、複数の神経変性病態モデルマウスを IFN-I 受容体欠損マウスと掛け合わせることで、IFN-I の過剰産生が、CNS 内における Eomes 陽性 Th 細胞の生成と神経細胞障害に及ぼす影響を、分子レベルで明らかにし、免疫依存性の神経変性病態の分子機序の全容解明を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では神経変性病態における IFN-I の作用機序の解明を行うことを目的とする。ミクログリアは中枢神経系に分布する免疫細胞であり、アルツハイマー病のモデル動物の解析から、IFN-I の過剰産生と抗原提示分子の発現亢進が、神経変性病態と連動するミクログリアサブセットの機能的特徴であることが示された。神経変性病態中の機能変性になるミクログリアと、CNS 内に蓄積した Th 細胞の Eomes 発現および神経障害性の解析することにより、Eomes 陽性 Th 細胞依存性の神経変性病態を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) IFN-I の過剰産生と Th 細胞の Eomes 発現の相関を解析するために、全身性に IFN-I を過剰産生するマウス (Trex1 欠損マウス; Trex1KO) および SLE モデルである MRL-lpr マウスと、CNS 限定的に IFN-I を過剰産生するマウス (CX3CR1-Cre/USP18 欠損マウス; USP18 cKO) を IFN-I 受容体欠損と組み合わせて、CNS と二次リンパ組織における Th 細胞の Eomes 発現を flow cytometry を用いて解析した。

(2) 各組織における IFN-I の過剰産生を確認するために、単離したマウスの脾臓細胞とミクログリアにおける IFN-I 誘導遺伝子 (ISG, Mx1 and Oas1a) の発現を定量 PCR で定量した。

(3) IFN-I 過剰産生マウスの CNS における、T 細胞の集積部位の同定を試みた。4%PFA で灌流・固定した Trex1cKO マウスと対照マウスの脳から作成した組織切片を用いて免疫蛍光染色による T 細胞の分布を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 全身性の IFN-I 過剰産生マウス (IFN<sup>Het</sup>/Trex1<sup>KO</sup> マウス) では、対照マウス (IFN<sup>Het</sup>/Trex1<sup>Het</sup> マウス) と比較して、CNS と二次リンパ組織における Eomes 陽性 Th 細胞頻度が顕著に増加した (Figure 1A)。とくに CNS における Eomes 陽性 Th 細胞増加の割合は他の組織より高い傾向にあり、Eomes 陽性 Th 細胞の生成が CNS でより効率的に生じる可能性が示された。一方、IFN<sup>KO</sup>/Trex1<sup>KO</sup> マウスの Eomes 陽性 Th 細胞の頻度は、対照マウスと同程度であり、Eomes 陽

性 Th 細胞の生成が IFN-I 依存性であることが確認された。また Eomes 陽性 Th 細胞の細胞障害性を担うグランザイム B (Gzmb) の発現は、CNS に浸潤した IFN<sup>Het</sup>/Trex1<sup>KO</sup> マウスのみで認められ、同様に IFN<sup>KO</sup>/Trex1<sup>KO</sup> マウスではキャンセルされた (Figure 1B)。脾臓細胞の ISG 発現は、IFN<sup>Het</sup>/Trex1<sup>KO</sup> マウスのみで増加しており、一連の反応が IFN-I 依存性であることが確認された (Figure 1C)。

(2) Eomes 陽性 Th 細胞の顕著な増加は、USP18 cKO マウスで認められたが、二次リンパ組織では確認できなかった (Figure 2A)。同様に、USP18 cKO マウスの CNS 内に浸潤した Eomes 陽性 Th 細胞の一部は Gzmb を発現することが確認された (Figure 2B)。CNS から分離したミクログリアにおける ISG 発現を定量したところ、USP18 cKO マウスの ISG 発現が、対照マウスと比べて著しく高いことが確認された (Figure 2C)。

(3) 同様に SLE モデルマウスの Eomes 陽性 Th 細胞を定量したところ、MRL-lpr マウスの CNS および二次リンパ組織における Eomes 陽性 Th 細胞数が、対照 MRL<sup>+</sup> マウスに比べて明らかに増加していることが示され (Figure 3A)。Trex1KO マウスと同様に、Eomes 陽性 Th 細胞の比率はいずれの組織でも増加し、その一部は Gzmb 陽性であった (Figure 3B)。

(4) CNS 内の IFN-I 過剰産生により、Eomes 陽性 Th 細胞の顕著な増加を確認したことから、CNS 内における T 細胞の局在を、免疫蛍光染色を用いて検討した。その結果、Trex1KO マウスの海馬近傍の脳室面に TCR 陽性細胞を観察した。一方、対照マウスでは、このような T 細胞浸潤は認められなかった (Figure 4)。

Figure 1. IFN<sup>Het</sup>/Trex1<sup>KO</sup>マウスのEomes陽性Th細胞は増加した

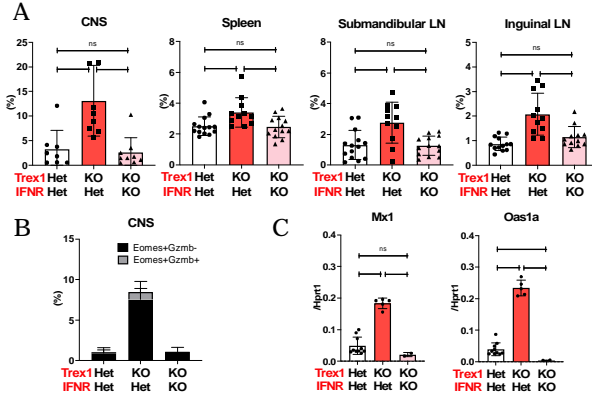


Figure 2. USP18 cKOマウスのEomes陽性Th細胞は増加した

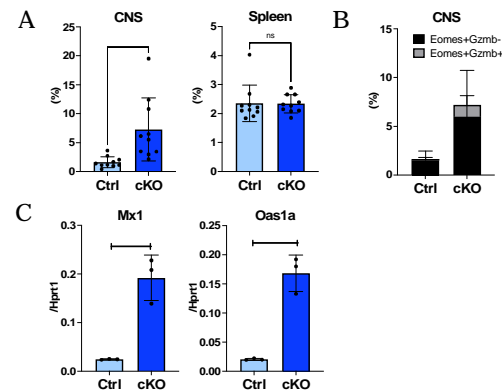


Figure 3. MRL-lprマウスのEomes陽性Th細胞は増加

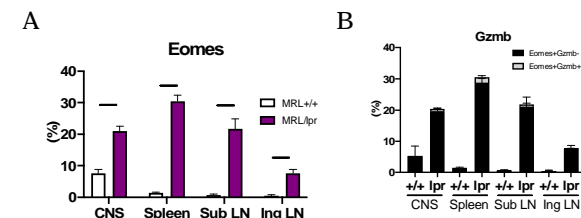
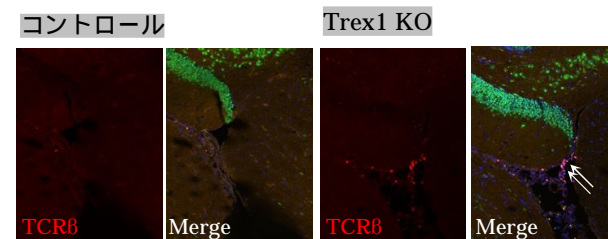


Figure 4. 免疫細胞の局在



我々は、3種類の IFN-I 過剰産生マウス (Trex1KO、USP18cKO および MRL-lpr) を用いて、IFN-I の産生亢進が生じる部位特異的に、Eomes 陽性 Th 細胞が誘導され、その一部が Gzmb を発現することを明らかにした。よって IFN-I が Eomes 陽性 Th 細胞の生成を介して神経変性病態の誘導に密接に関わることを明らかにした。一方、これらの IFN-I 過剰産生マウスは、そのままでは明確な中枢神経症状を示さないことから、神経細胞死の誘導には、抗原依存性の同細胞の活性化と Gzmb の放出が必須であると考えられる。今後、IFN 過剰産生の結果として生じた Eomes 陽性 Th 細胞により、神経変性病態がいかに形成されるのか、Eomes 陽性 Th 細胞の認識抗原との関連を含めて、その分子機序を明らかにしていく必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tzu-wen Yeh, Chenyang Zhang, Ben Raveney, Fumio Takahashi, Marco Prinz, Takashi Yamamura, Shinji Oki
2. 発表標題 Induction of Eomes-expressing Th cells via upregulation of type I interferon
3. 学会等名 第 51 回日本免疫学会学術集会
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
---------	---------