

脳内炎症の収束と組織修復にかかわる免疫細胞の解析

吉村昭彦

慶應義塾大学医学部 微生物学免疫学教室

【研究の背景】

脳血管障害(脳卒中)は日本人の死因の第 3 位で年間 11 万人弱が死亡し、患者総数は 100 万人を超えている。脳卒中のなかでも、脳の血管が詰まるなど血流が減少することによって、酸素や栄養が不足して脳組織が壊死に至る脳梗塞が約 75%を占めている。脳梗塞は死亡率が高いだけでなく後遺症が重く、患者の生活の質(QOL)が非常に低下する。発症後数時間以内の脳梗塞であれば、詰まった血管の再開通(血栓溶解または血栓除去)によって神経症状や後遺症の改善が期待できるが、そのような早期に発見できるケースは限られており、それ以降の有効な治療法に乏しい。しかし脳細胞の死に伴って炎症反応が惹起され、炎症を制御することで脳梗塞の症状を緩和できることも明らかになってきた。脳梗塞急性期や亜急性期の自然免疫応答に関する研究は進んできているにもかかわらず、慢性期の獲得免疫応答は明らかとなっていない。

制御性 T 細胞(Treg)は、転写因子 Forkhead box P3(Foxp3)を主要なマスター転写因子とし、自己抗原、共生細菌由来抗原、および外来抗原など多様な抗原に対して過剰な免疫応答を抑制する。生体内において、Treg には胸腺で発生する thymus-derived Treg(tTreg)と抹消でナイーブ CD4 陽性 T 細胞から発生する peripheral Treg(pTreg)が存在する。生体内における免疫恒常性の維持には、tTreg および pTreg の両方のサブセットが協同的に働いている¹⁾。これまでの研究では Treg が抑制する相手としては主に活性化されたエフェクター T 細胞や樹状細胞、マクロファージなどが中心であった。しかし近年、定常状態および傷害時における非リンパ組織に局在する Treg 細胞が注目を集めている。それらは組織 Treg と呼ばれ共通の性質を示すと同時に、それぞれの組織に特化した特徴を有する(図 1)²⁾。これまで脳内の Treg は脳や脊髄の損傷後の炎症や多発性硬化症(MS)のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)で解析されて来たが、細胞数が非常に少なく、組織修復に関係する脳内 Treg の存在は不明であった。我々はマウス脳梗塞モデルを用いて梗塞発症後 2 週間以上経過した慢性期に Treg が脳内に大量に集積することを見出した。

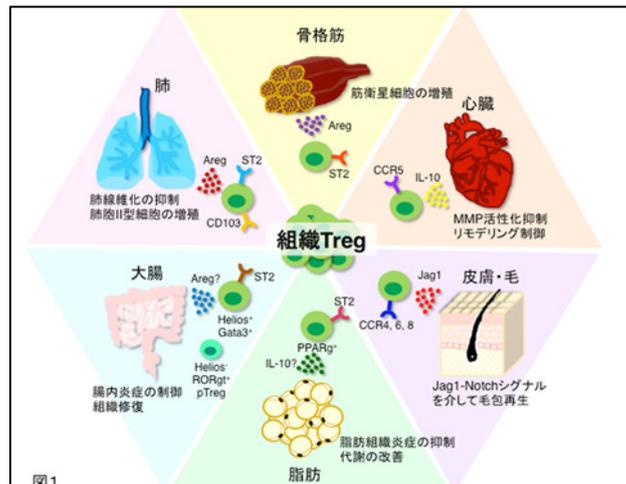


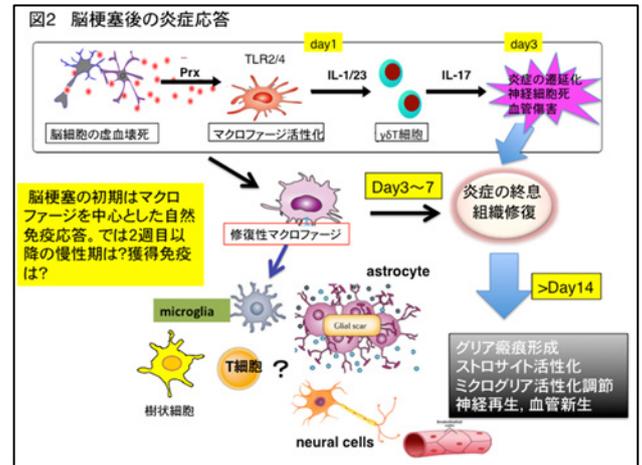
図 1

【目 的】

本研究の目的は、脳梗塞慢性期の獲得免疫応答における T 細胞の役割について明らかにすることである。T 細胞のサブセットや役割を理解できれば、それらを制御することによって新しい治療法につなげることができる。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。

我々はマウス実験的脳虚血(脳梗塞)モデルを用いて脳損傷における免疫系の役割を明らかにしてきた。これまでに、マクロファージを中心とした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 日目には炎症性のマクロファージが梗塞部位に浸潤し、死細胞由来の物質を認識して炎症性サイトカインを放出する^{3,4)}。その後 3 日目に γ δ T 細胞が浸潤し IL-17 を放出して神経細胞死が亢進する⁵⁾。それ以降はマクロファージが修復性に転換し炎症物質を除去、およそ 1 週間で炎症反応が収束する⁶⁾(図 2)。

しかし、それ以降の慢性期においては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。本研究では特に神経症状の緩和に重要な脳 Treg について全く新しい知見が得られた⁷⁾。



【方 法】

マウス中大脳動脈閉塞モデルを用いて、60 分の一過性の脳虚血を作り、その後、脳組織の免疫染色、リアルタイム PCR や脳組織から細胞を抽出して Flow cytometry を用いて解析した。脳梗塞後の脳組織から制御性 T 細胞をセルソーターを用いて単離し、マイクロアレイ解析を行った。

【結 果】

1. 脳梗塞における脳 Treg の集積

実験的脳虚血再灌流(MCAO)モデル(脳梗塞モデル)では、発症 2 週目以降の慢性期に T 細胞が集積することが見出された。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 細胞であった。これまでに脳梗塞急性期(1 週間以内)に Treg が少数脳内に認められ、脳梗塞後の神経障害を抑制するとされてきたが、浸潤する細胞数は極めて少なく、組織 Treg としての性質を示さず IL-10 を産生するなどバイスタンダーとして若干の寄与をするのみである。しかし慢性期の Treg はその数 10 倍以上存在し、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。

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。先に述べたように CD4 陽性 T 細胞の約半数が Treg である。そこでさらに DEREK マウス(ジフテリア毒素(DT)によって Treg を一過性に除去できるマウス)を用いて Treg を除去すると神経症状が悪化した。逆に Rag 欠損マウスや CD3 ϵ 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。

2. 脳 Treg の性質

次に脳内に浸潤した Treg の性質を解析した。脳内の Treg は他の組織 Treg と同様に Helios⁺ の tTreg 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。また脂肪組織 Treg に似て PPAR γ を高発現し、*Tcf7* と *Lef1* の発現が低下していた。よって我々は脳梗塞後の慢性期に脳内に局在する Treg を脳 Treg と呼ぶことにした。

まず Treg は脳内のみならず所属リンパ節でも増加していたことから何らかの特異的抗原を認識してクローナル増幅を行っていると考えられる。そこで次世代シーケンサーおよびシングルセルによる PCR によって TCR 遺伝子のレパトア解析を行った。すると TCR β 遺伝子および TCR α 遺伝子(特に TCR α 遺伝子)の使用に強い偏りがあることが見出された。さらに抗原認識が Treg の増加に必要なことを示すために TCR トランスジェニックマウスを用いたところ脳内での T 細胞の増加はほとんど見られなかった。したがって脳内の Treg は何らかの抗原を認識してリンパ節でクローナル増幅を行っていると考えられる(図 3 左)。

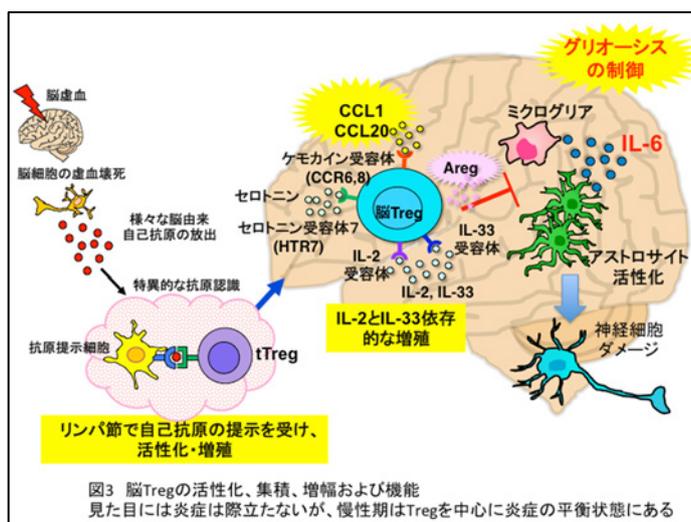
また脳梗塞後慢性期に脳内に局在する Treg を単離し別のマウスに移植して脳梗塞を起こすと通常のマウス由来の Treg よりも効率的に脳内に浸潤し増幅することがわかった。そこで脳 Treg の増幅機構を調べた。IL-2 はすべての Treg の生存、増殖で必須であり、抗 IL-2 抗体の投与によって脳 Treg の数は減少した。脳 Treg は IL-33 受容体(ST2)を高発現することから IL-33 の関与が示唆された。そこで IL-33 欠損マウス、ST2 欠損マウスを調べたところ脳 Treg の数は減少した。よって脳 Treg の増幅には TCR シグナル、IL-2、IL-33 が必須といえる(図 3 右)。ちなみに IL-33 の発現は脳梗塞によって増加し、オリゴデンドロサイトとアストロサイトが主な産生源である。IL-33 を欠損するマウスは、修復性の M2 マクロファージ関連遺伝子の誘導が減少し、神経損傷後の回復ができなくなることが報告されており、これらの IL-33 の修復機能に脳 Treg が関与する可能性は高い。

次になぜ脳 Treg は脳指向性なのかを調べた。通常リンパ球の組織への遊走にはケモカインとその受容体が関与する。Treg はケモカイン受容体のうち CCR6 と CCR8 を高発現し、脳梗塞巣で上昇する CCL20 や CCL1 依存的に脳内に浸潤した。逆に CCL20 や CCL1 を脳室投与すると Treg が増加し、神経症状も改善された(図 3 右)。

遺伝子発現解析からも脳 Treg は他の組織 Treg に類似していることが示された。しかし脳 Treg にはそれらにない特徴的な遺伝子発現も見られた。特に通常 T リンパ球に見られない神経関連遺伝子がいくつか発現している。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。cAMP は Treg の増殖を促進すると同時に機能を増強させることが知られている。予想通り単離された脳 Treg は Htr7 依存的に増殖・活性化された。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。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。

3. 脳 Treg によるアストログリオーシスの制御機構

ではどのような仕組みで脳 Treg は脳機能改善に寄与しているのでしょうか？脳内 Treg を除去、あるいは減少させるとアストロサイトの過剰な活性化が認められ、運動野の神経細胞がアポトーシスを起こしていた。これが Treg 除去による運動機能回復の遅れに繋がっていると考えられる。アストロサイトの活性化は瘢痕形成を誘導し神経細胞を炎症から隔離するために必要であるが、過剰に活性化されたアストロサイトは神経毒性因子を産生し、むしろ神経細胞を傷害したり、神経伸長を阻害したりする⁸⁾。脳 Treg はアストロサイトの過剰な活性化(アストログリオーシス)を抑制していることがわかった。アストロサイトの活性化には IL-6 などの炎症性サイトカインが重要である。試験管内で脳 Treg と活性化したミクログリアやアストロサイトを共培養すると、IL-6 の産生が抑制されることがわかった。また Treg の移入によりアストロサイトの過剰な活性化が抑制され、IL-6 の下流で活性化される STAT3 のリン酸化が抑制され、神経症状が改善した。脳 Treg の特徴のひとつは Areg を強く産生することであるが、Areg はマクロファージにおいて IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を抑制することが知られている。Areg の脳内投与により、アストロサイトの活性化が抑制され、神経症状が改善した。試験管内の実験で抗 Areg 抗体



を投与すると脳 Treg によるミクログリアやアストロサイトからの IL-6 産生抑制が部分的に解除された。さらに個体でも Areg を欠損する Treg では野生型 Treg で認められたアストロサイトの抑制や神経症状の改善が認められなかった。Areg が IL-6 産生を阻害する分子機構は不明であるものの、Areg は脳 Treg の重要な機能分子と言える(図 3 右)。また Areg は神経幹細胞の増殖に直接的に働いている可能性もある⁹⁾。

【考 察】

脳梗塞慢性期の神経症状の回復には脳特異的な制御性 T 細胞が重要な役割を果たしていることがわかった。脳 Treg は何らか脳内自己抗原を認識し増幅している。自己抗原を同定し、脳特異的 Treg を誘導することは、脳梗塞だけでなく他の中枢神経系疾患における症状の緩和にとって有用な治療法となる可能性がある。実験的脳梗塞モデルで全身性に Treg を移入し治療効果を示した研究もあるが、我々の検討では慢性期の Treg の移入では脳への浸潤の増加はほとんど認められなかった。脳 Treg の末梢からの浸潤にはある程度の数的制限があるのかもしれない。将来的には間葉系幹細胞で行われているように自家 Treg を脳内に直接投与する方法も検討されるべきであろう。

組織損傷後の炎症の慢性期に Treg が修復に働いているのは脳だけではない。多くの組織で一見炎症が治まったように見えても Treg が組織修復や恒常性の維持に働いている可能性がある。組織における Treg の生存や増殖をもたらす自己抗原や Treg を刺激するリガンドは、組織特異的な Treg の機能に重要である可能性が高い。抗原やリガンドの探索も含め、Treg の組織特異的なフェノタイプを解析することによって、組織特異的な Treg を誘導、増殖することができれば、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。

脳 Treg はサイトカインなどの神経傷害性因子やグリオシス亢進因子を抑えることによって、脳梗塞後の脳内ホメオスタシスの維持に寄与していると考えられる。今後は、脳梗塞後の制御性 T 細胞が脳抗原を認識しているのかを調べ、脳抗原特異的な制御性 T 細胞を誘導することによって、脳梗塞悪化の予防を目指していきたい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

実際にヒト脳内に Treg が集積しているのかどうかは不明であるが、剖検では脳梗塞部位に T 細胞の集積がみられる。また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¹⁰⁾。セロトントランスポーター阻害剤(SSRI)は脳梗塞により神経症状を改善することが複数報告されている。多発性硬化症患者の Treg がセロトニン刺激によって増殖することも報告されている。したがってヒト脳梗塞慢性期、あるいは広く神経炎症においても脳 Treg が神経修復に働いている可能性は高い。

脳内炎症は脳梗塞だけではなく脊髄損傷などの脳脊髄組織の損傷でも、あるいは多発性硬化症のような自己免疫疾患やアルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患でも起こることが知られている。本研究によって、これらの脳内炎症にも獲得免疫が発動され脳 Treg が浸潤、集積し、神経症状に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【参考・引用文献】

1. Ito, M., M. Iizuka-Koga, M. Ando, and A. Yoshimura. 2018. Development and Functional Modulation of Regulatory T Cells by Transcription Factors and Epigenetics. *Cornea* 37 Suppl 1: S42-s49.
2. Panduro, M., C. Benoist, and D. Mathis. 2016. Tissue Tregs. *Annu Rev Immunol* 34: 609-633.
3. Shichita, T., E. Hasegawa, A. Kimura, R. Morita, R. Sakaguchi, I. Takada, T. Sekiya, H. Ooboshi, T. Kitazono, T. Yanagawa, T. Ishii, H. Takahashi, S. Mori, M. Nishibori, K. Kuroda, S. Akira, K. Miyake, and A. Yoshimura. 2012. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* 18: 911-917.
4. Ito, M., T. Shichita, M. Okada, R. Komine, Y. Noguchi, A. Yoshimura, and R. Morita. 2015. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nature communications* 6: 7360.
5. Shichita, T., Y. Sugiyama, H. Ooboshi, H. Sugimori, R. Nakagawa, I. Takada, T. Iwaki, Y. Okada, M. Iida, D. J. Cua, Y.

- Iwakura, and A. Yoshimura. 2009. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 15: 946-950.
6. Shichita, T., M. Ito, R. Morita, K. Komai, Y. Noguchi, H. Ooboshi, R. Koshida, S. Takahashi, T. Kodama, and A. Yoshimura. 2017. MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nat Med* 23: 723-732.
 7. Ito M, K. 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 and Yoshimura A. 2019. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature* Jan;565(7738):246-250
 8. Liddelow, S. A., K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Munch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens, and B. A. Barres. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541: 481-487.
 9. Kimura, H., and D. Schubert. 1992. Schwannoma-derived growth factor promotes the neuronal differentiation and survival of PC12 cells. *J Cell Biol* 116: 777-783.
 10. Yasuno, F., A. Taguchi, A. Yamamoto, K. Kajimoto, H. Kazui, T. Kudo, A. Kikuchi-Taura, A. Sekiyama, T. Kishimoto, H. Iida, and K. Nagatsuka. 2014. Microstructural abnormality in white matter, regulatory T lymphocytes, and depressive symptoms after stroke. *Psychogeriatrics : the official journal of the Japanese Psychogeriatric Society* 14: 213-221.