

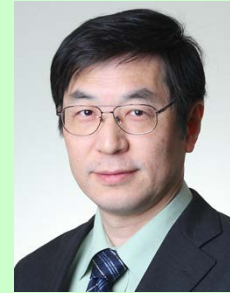
## 炎症の終息と組織修復に関与する免疫細胞システムの解明

Immune systems involved in the resolution of  
inflammation and tissue repair

課題番号：17H06175

吉村 昭彦（YOSHIMURA, AKIHIKO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授



### 研究の概要（4行以内）

脳梗塞などの組織傷害が起きると、主に炎症性マクロファージを中心とした無菌性の炎症が惹起され組織損傷が拡大する。一方で炎症を終息させるメカニズムや発症後慢性期の免疫応答は不明だった。本研究では脳内炎症において炎症終息に寄与するマクロファージと慢性期における制御性T細胞(Treg)による神経修復機構の分子細胞制御機構の解明を目指す。

研究分野：基礎医学 免疫学

キーワード：炎症 免疫制御 マクロファージ 制御性T細胞 神経炎症

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞などによる脳組織破壊によって炎症が惹起され梗塞体積の増大や神経症状の悪化につながるものが古くより指摘されて来た。我々はマウス脳梗塞モデルを用いて、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日以内の急性期に浸潤マクロファージが死細胞由来のペルオキシレドキシシンなどのDAMPs(danger associate molecular patterns)の刺激を受けてIL-23やIL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインを放出することで梗塞巣の拡大と神経症状の悪化に寄与する(Shichita et al. *Nature Med.* 2012, 18: 911-917; Ito et al. *Nature Commun.* 2015, 6: 7360.)こと、さらに発症後2~3日に $\gamma\delta$ T細胞が浸潤し、IL-23の刺激に応答してIL-17を産生し病態の悪化を寄与することを報告した(Shichita et al. *Nature Med.* 2009, 15: 946-950)。しかしながらそれ以降の炎症反応が終息するプロセスや慢性期の炎症や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。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス実験的脳梗塞モデルを用いて炎症の終息と組織修復に関わる免疫応答を明らかにすることである。特に慢性期の獲得免疫応答におけるT細胞の役割についてはこれまで全く不明であった。

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。

### 3. 研究の方法

マウス実験的脳虚血再灌流(MCAO)モデル(脳梗塞モデル)は、60分の一過性の脳虚血を作り、その後、経時的に観察を行う。解析は脳組織の神経細胞免疫染色による梗塞部位の体積測定、免疫細胞の免疫染色のほか脳組織からFlow cytometryを用いて細胞を単離して遺伝子発現解析などを行なった。行動解析は一定時間内のマウスの移動面積を評価することで行なった。

### 4. これまでの成果

#### 1. 脳梗塞後炎症の収束

梗塞発症4日を過ぎるとペルオキシレドキシシンやHMGB1などのDAMPsはマクロファージにより急速に細胞内に取り込まれて、リゾソームによって分解される。このように、DAMPsが分解されてなくなることが炎症の収束に重要であると考えられる。マクロファージがどのような機構でDAMPsを取り込むのか、その受容体は明らかにされていない。我々はペルオキシレドキシシンやHMGB1に特異的な受容体が存在すると考えて、その遺伝子のクローニングを行なった。蛍光標識されたDAMPsを取り込めなくなった変異マクロファージを単離して、もとのマクロファージと比べて発現していない遺伝子を抽出し、それらを

ひとつずつ変異マクロファージに戻して取り込みが回復する遺伝子を同定した。その結果タイプAスカベンジャー受容体と呼ばれるMsr1やMarcoがDAMPsの取り込みに重要な受容体であることがわかった(5)。さらにDAMPsの取り込みを促進する転写因子としてMafbも単離された。Msr1遺伝子のプロモーター領域の解析からMafbがMsr1の転写を引き起こすことがわかった。Msr1/Marco欠損マウス、およびマクロファージ特異的Mafb欠損マウスを用いて脳梗塞モデルを行なったところ、これらのマウスでは通常3~4日で消失するはずのDAMPsが4日目以降も残存し続けた。その結果炎症性サイトカインの発現も低くならず、梗塞体積の増大や神経症状の悪化が認められた。したがってMafbによるスカベンジャー受容体の発現誘導がDAMPsをクリアランスすることで炎症を収束させる重要なメカニズムであることが明らかとなった。

2. 脳梗塞における脳Tregの集積と意義  
実験的脳虚血再灌流では、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(Treg)であった。そこでDEREG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。脳Tregはアンフィレグリン(Areg)を分泌してアストロサイトの活性化を制御し、結果的に神経症状の回復を助けていることを見出した。

遺伝子発現解析から脳Tregは他の組織Tregに類似していることが示された。また脳Tregには脳特異的な遺伝子発現も見られた。特にセロトニン受容体7(Htr7)に注目したところ脳TregはHtr7依存的に増殖・活性化された。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増幅するという非常に興味深い性質を有していた。

## 5. 今後の計画

(1) 実験的脳虚血モデルを用いて亜急性期に

修復性マクロファージを誘導する脳内因子および転写因子を明らかにする。

(2) 脳梗塞マウスよりTregを単離し、再脳梗塞モデルやEAE、アルツハイマーモデルの抑制効果を調べる。またEAEやアルツハイマーモデルにおける脳内Tregの解析を行う。

(3) 浸潤TregのT細胞受容体(TCR)およびその抗原を同定する。TCR遺伝子のクローニングは完了し現在脳抗原との反応を調べている。BCR遺伝子のクローニングも進行中である。今後抗原の同定に向けて実験を進める。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Ito M\*, Komai K, Nakamura T, Srirat T, Yoshimura A\*. 2019. Tissue regulatory T cells and neural repair. *Int Immunol* 31: 361-9

2. Ito M\*, Komai 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, Yoshimura A\*. 2019. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature* 565: 246-50

3. Chen J, Lopez-Moyado IF, Seo H, Lio CJ, Hempleman LJ, Sekiya T, Yoshimura A, Scott-Browne JP, Rao A\*. 2019. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature* 567: 530-4

4. Sekiya T\*, Hibino S, Saeki K, Kanamori M, Takaki S, Yoshimura A. 2018. Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells. *Cell Rep* 24: 1627-38.e6

5. Hibino S, Chikuma S, Kondo T, Ito M, Nakatsukasa H, Omata-Mise S, Yoshimura A\*. 2018. Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance. *Cancer Res* 78: 3027-40

7. ホームページ等

1. [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)

2. [http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical\\_info/science/201710.html](http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/science/201710.html)