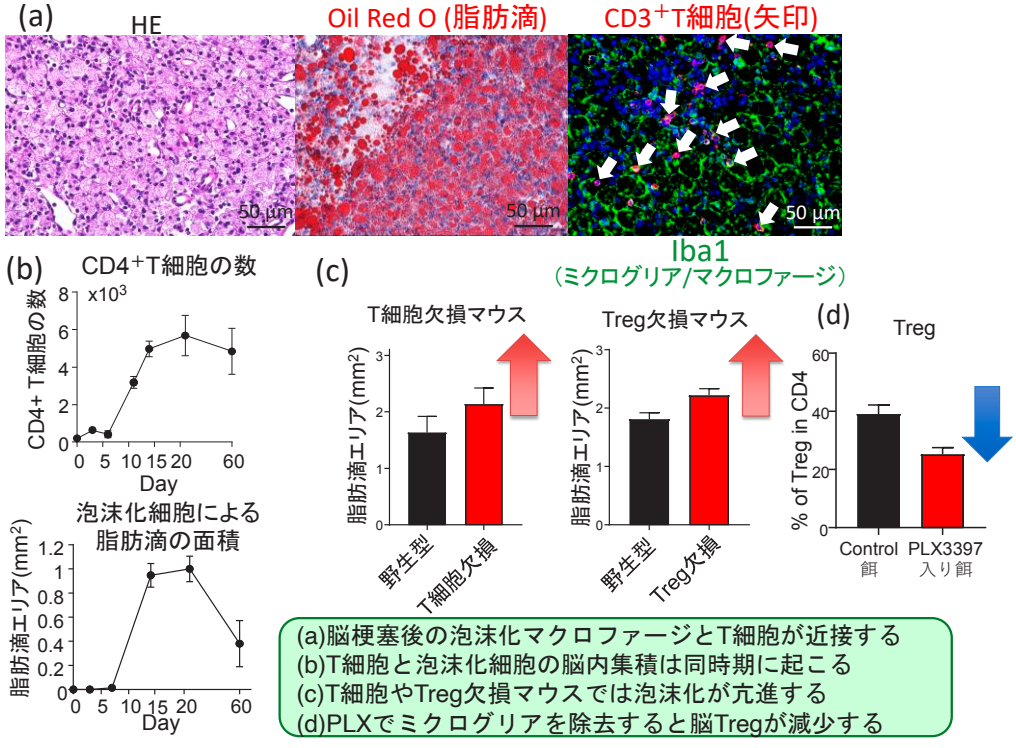
130　脳炎症時の免疫細胞や泡沫化細胞による修復機構の解明	伊藤　美菜子

【目的】泡沫化細胞はアテローム性動脈硬化症の特徴である脂肪蓄積したマクロファージで、マクロファージが酸化された LDL などの脂質を貪食することで生じる。脳組織は脂質の多い組織であるため、脳梗塞後によって死んだ脳細胞や残骸をマクロファージやミクログリアが貪食し、その結果として、脳梗塞慢性期の脳梗塞巣に大量の泡沫化細胞が出現することを見出した。本研究では、この泡沫化細胞と免疫細胞、さらに神経細胞との相互作用を解析し、組織修復機構への関与を解明することを目的とした。

【方法】C57BL/6J マウスに中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルを実施した。具体的には、シリコンコートしたナイロン糸を内頚動脈から中大脳動脈の分岐点まで挿入し、虚血状態を作り 60 分間保持し、その後再灌流させた。フローサイトメトリー解析では、生食灌流後の脳半球をホモジェナイザーで潰し、パーコールグラジエントによりミエリンなどの debris を取り除き、単核球分画だけを分離した後に解析に用いた。組織学的な解析では、脳梗塞 2 週間から 3 週間後に生食灌流、パラホルムアルデヒドによる固定後に、凍結組織を作製し、Oil Red O 染色や免疫組織染色を行った。

【結果】脳梗塞慢性期の脳梗塞巣に大量の泡沫化細胞が出現し、それらは Iba1 陽性のミクログリアであった。また、この泡沫化細胞は CD3 陽性の T 細胞と近接することや、脳 Treg が脂肪細胞のマスター転写因子の Pparg を発現することを見出しており、関連が示唆された（a）。T 細胞の集積と泡沫化細胞による脂肪滴の集積が同じようなタイムコースで起こることが分かった（b）。T 細胞と泡沫化細胞の関連を調べるために、T 細胞や Treg を欠損するマウスを用いて脳梗塞を作製したところ、T 細胞や Treg を欠損すると梗塞巣に泡沫化細胞や脂肪滴が残存しやすいことが分かった（c）。PLX3397 を投与することでミクログリアを除去すると脳 Treg が減少することから、泡沫化細胞と脳 Treg の関与が示唆された（d）。

脳梗塞後の泡沫化細胞と T 細胞の関与



130. 脳炎症時の免疫細胞や泡沫化細胞による修復機構の解明

伊藤　美菜子

九州大学 生体防御医学研究所 附属システム免疫学統合研究センター アレルギー防御学分野

Key words：脳梗塞，制御性 T 細胞，泡沫化細胞

緒　言

脳梗塞急性期、亜急性期にはマクロファージを中心とした自然免疫細胞が脳内に浸潤して炎症の遷延化、神経症状の悪化を引き起こす。また、脳梗塞慢性期における獲得免疫系の意義についても解析を行い、脳梗塞発症後 2 週間以上を経過したマウスの脳内には急性期よりもはるかに多くの T 細胞が浸潤しており、特に制御性 T 細胞（Treg）が大量に蓄積することを明らかにした。また脳 Treg は Areg や IL-33 受容体を発現するなど組織 Treg の性質も有しているが、脳特異的な性質も示していることを以前に報告している［1］。多発性硬化症モデル（EAE）やアルツハイマーモデルマウスにおいても同様の性質を示す Treg の存在を確認することができた。EAE モデルは脊髄と脳の両方に病態を形成するが、同個体でも脊髄と脳に存在する Treg のフェノタイプは異なっており、脳に存在する Treg は脳梗塞の脳内に浸潤した Treg の特徴に近かった。これらの結果より、組織 Treg は病態よりも局在する組織の環境によって性質を獲得している可能性が示唆された。

泡沫化細胞はアテローム性動脈硬化症の特徴である脂肪蓄積したマクロファージで、マクロファージが酸化された LDL などの脂質を貪食することで生じる。脳組織は脂質の多い組織であるため、脳梗塞後によって死んだ脳細胞や残骸をマクロファージやミクログリアが貪食し、その結果として、脳梗塞慢性期の脳梗塞巣に大量の泡沫化細胞が出現することを見出した。本研究では、この泡沫化細胞と Treg、さらに神経細胞との相互作用を解析し、組織修復機構への関与を解明することを目的とした。

方　法

C57BL/6J マウスに中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルを実施した。具体的には、シリコンコートしたナイロン糸を内頚動脈から中大脳動脈の分岐点まで挿入し、虚血状態を作り 60 分間保持し、その後再灌流させた。

フローサイトメトリー解析では、生食灌流後の脳半球をホモジェナイザーで潰し、パーコールグラジエントによりミエリンなどの debris を取り除き、単核球分画だけを分離した後に解析に用いた。

組織学的な解析では、脳梗塞 2 週間から 3 週間後に生食灌流、パラホルムアルデヒドによる固定後に、凍結組織を作製し、Oil Red O 染色や免疫組織染色を行った。

結果および考察

1. 脳梗塞慢性期には大量の泡沫化細胞が蓄積した

脳梗塞慢性期の脳梗塞巣に大量の泡沫化細胞が出現し、それらは Iba1 陽性であり、ミクログリアであると考えられた（図 1a）。現在より詳細に調べるために、ミクログリア特異的に tdTomato を発現するレポーターマウスで検討中である。この泡沫化細胞は CD3 陽性の T 細胞と近接することが分かった（図 1a）。また、脳梗塞後の脳内に局在する Treg は脂肪細胞のマスター転写因子である Pparg を高発現することから、泡沫化細胞が脳梗塞特異的 Treg への分化に関与することが示唆された（図 1b）。

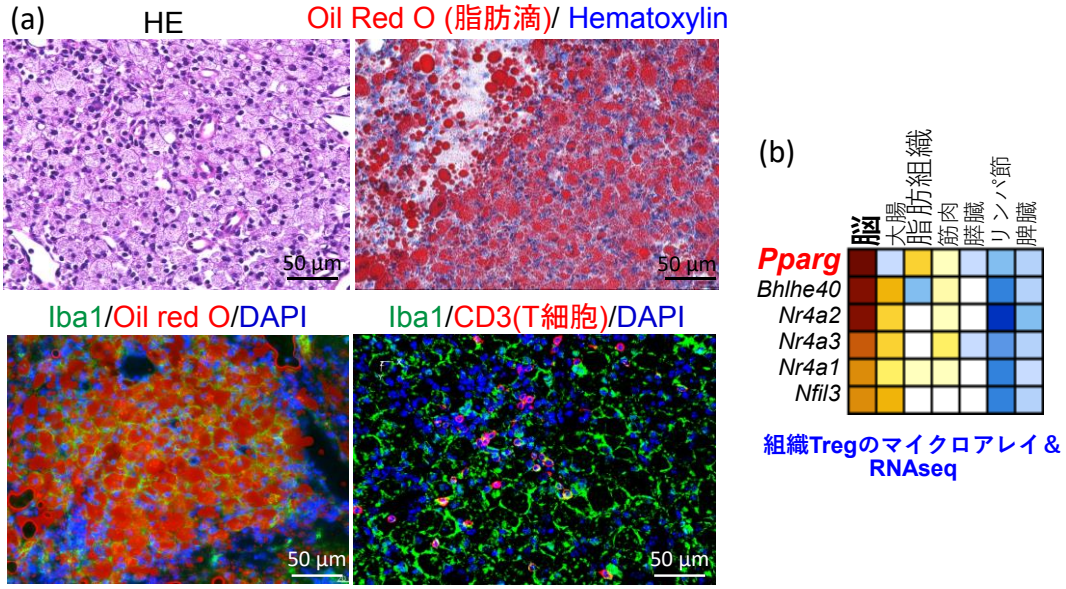


図 1. 脳梗塞慢性期の泡沫化細胞

a) 脳梗塞慢性期の梗塞巣の HE 染色と Oil Red O 染色（脂肪滴）（上図）。泡沫化細胞は Iba1 陽性（緑色）であり、CD3 陽性（赤色）の T 細胞と隣接していた（下図）。

b) 組織 Treg のマイクロアレイと RNAseq 解析。脳 Treg は脂肪組織と同様に Pparg を高発現した。

2. 泡沫化細胞と T 細胞の関与

次に、脳梗塞後の脳内への T 細胞の浸潤と泡沫化細胞による脂肪滴の集積を経時的に解析した。T 細胞と泡沫化の脂肪滴の集積は同じようなタイムコースで起こることが分かった（図 2a）。T 細胞と泡沫化細胞の関連を調べるために、T 細胞や Treg を欠損するマウスを用いて脳梗塞を作製したところ、T 細胞や Treg を欠損すると梗塞巣に泡沫化細胞や脂肪滴が残存しやすい傾向が認められた（図 2b）。PLX3397 を投与することでミクログリアを除去すると脳 Treg が減少することから、泡沫化細胞からの何らかのシグナルが脳 Treg の誘導・維持に必要である可能性が示唆された（図 2c）。

3. 脳梗塞 Treg での脂肪蓄積やコレステロールに関連する遺伝子発現上昇

次に脂肪滴の蓄積と脳梗塞 Treg の誘導との関連について検討した。脳梗塞後には脳内に脂肪滴が大量に蓄積するが、多発性硬化用モデルである EAE やアルツハイマー病モデルでは脳内に脂肪滴の蓄積はほとんど認められないことが分かった。これらのマウスモデルの脳内の Treg を RNAseq 解析し、遺伝子発現を比較した。その結果、脳梗塞 Treg と EAE 脳 Treg は非常に近い遺伝子発現パターンを持つことが分かった。数少ない優位に差がある遺伝子として、ABC（ATP-binding cassette）タンパクで、HDL コレステロールの産生に必須のトランスポーターである Abca1 や Abcg1 が脳梗塞 Treg で高発現していることがわかった。（図 3a）。これらの遺伝子発現は、脳梗塞 Treg に特異的で EAE やアルツハイマー病の脳 Treg には発現していなかった（図 3b）。さらに、脾臓やリンパ節の Treg をミクログリアやアストロサイトの初代培養細胞と共培養することで Abca1 の発現を誘導できることが分かった（図 3c）。

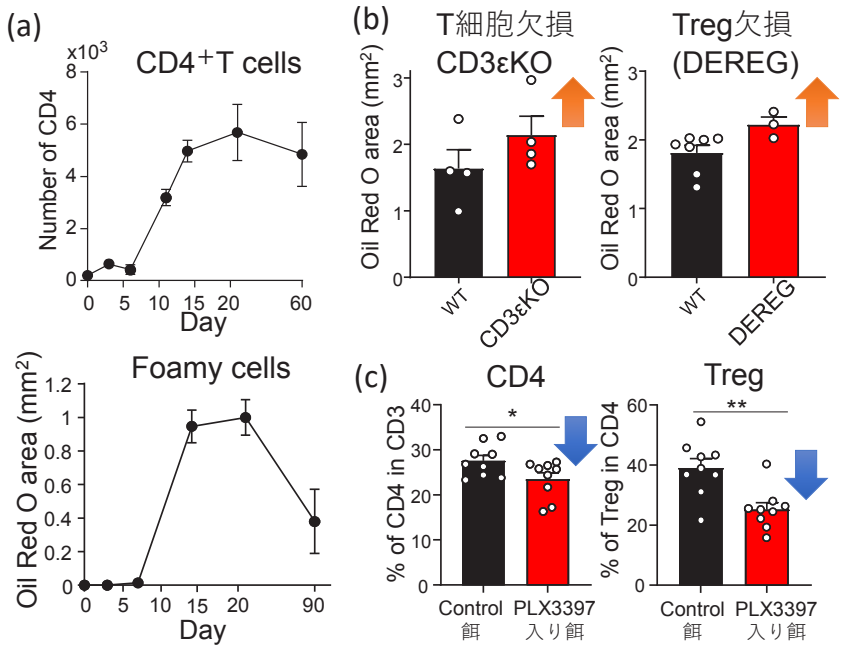


図 2. 泡沫化細胞と T 細胞の関与

a) 経時的な CD4 陽性 T 細胞の蓄積と脂肪滴蓄積。

b) T 細胞欠損マウスと Treg 欠損マウスでの脂肪滴蓄積の亢進。

c) PLX3397 処理でのミクログリア除去による CD4 陽性 T 細胞の減少と Treg の減少（Student's t test、*p＜0.05、**p＜0.001）。

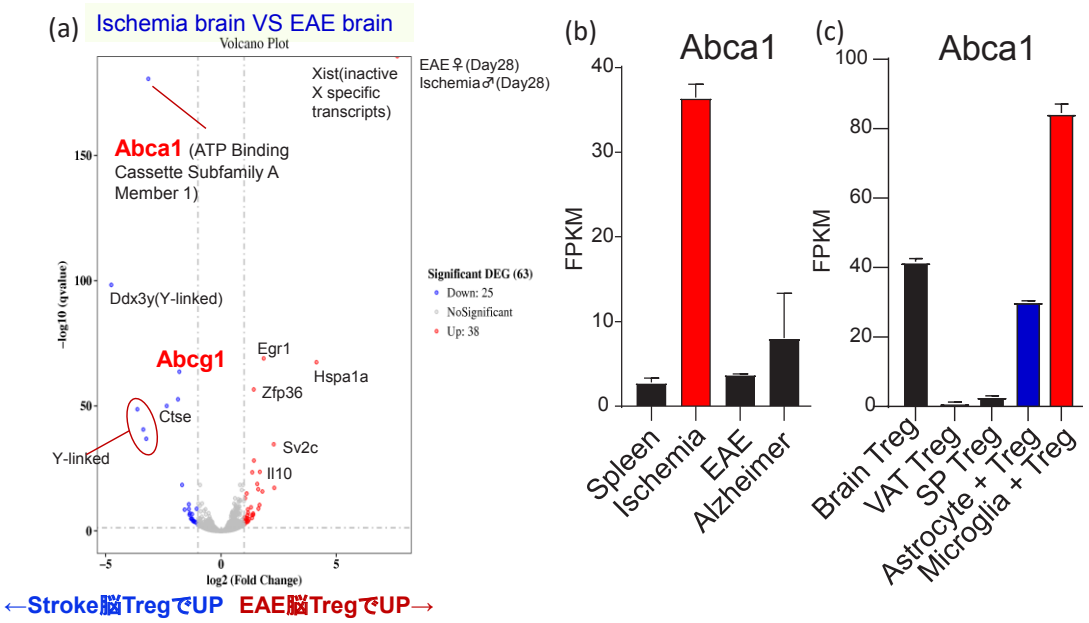


図 3. 脳梗塞 Treg での脂肪蓄積やコレステロールに関連する遺伝子発現上昇

a) 脳梗塞 Treg では EAE の脳 Treg に比べて Abca1 の発現が高かった。

b) 脳 Treg の中でも脳梗塞特異的に Abca1 の発現が高い。

c) 脾臓 Treg をミクログリアと共培養すると Abca1 の発現が上がった。

コレステロールやリン脂質を細胞内に取り込むことで Abca1 の発現が上昇することも報告されているが、脳梗塞後の Treg や脂肪組織の Treg は細胞内に BODIPY 陽性の脂肪滴を取り込んでいることが明らかになった。脳 Treg が直接的、もしくは間接的に脳に溜まった脂質の除去と泡沫化マクロファージの制御に関与することが示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室の吉村昭彦教授である。

文　献

1） 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. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. Nature. 2019 Jan;565(7738):246-250. doi: 10.1038/s41586-018-0824-5.