



Chronic stress alters lipid mediator profiles associated with immune-related gene expressions and cell compositions in mouse bone marrow and spleen

堀川, 伊和

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8973号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492482>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

**Chronic Stress Alters Lipid Mediator Profiles Associated
with Immune-Related Gene Expressions and Cell Compositions
in Mouse Bone Marrow and Spleen**

マウスの慢性ストレスによる骨髄・脾臓での遺伝子発現・細胞組成・脂質メディエーターの変化

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

薬理学

(指導教員：古屋敷 智之 教授)

Io Horikawa

堀川 伊和

(背景)

ストレスやうつ病の病態においては末梢や中枢の炎症が重要であり、その制御には脂質メディエーターの関与が示唆されている。しかし、ストレスによる炎症応答において脂質メディエーターが担う役割や、脂質メディエーターに生じる変化は殆ど明らかでない。本研究では、成体の C57BL/6N 雄マウスを慢性社会挫折ストレスに供し、急性ストレスや慢性ストレス、慢性ストレス後の休息期間の後に骨髄や脾臓を回収し、トランスクリプトーム解析、フローサイトメトリー解析、リピドーム解析を行うことで、ストレスのタイムコースに応じて造血・免疫器官に生じる遺伝子発現、細胞集団、脂質メディエーターの変化を調べた。

(方法)

9-10 週齢の C57BL/6N 雄マウスと交配リタイヤ雄 ICR マウスは日本 SLC より購入し使用した。C57BL/6N 雄マウスは社会挫折ストレスを受けない対照群(N=4)と、社会挫折ストレスを 1 回受けた群(N=4)、4 回受けた群(N=4)、10 回受けた群(N=6)及び、10 回の社会挫折ストレスを受けた後に 1 週間の休息期間を経た群(N=4)の 5 群に分け、2 回の実験を施行した。1 日目に社会行動試験用行動チャンバーへの馴化を行った後、初回の社会挫折ストレスを実施した。なお、対照群の C57BL/6N 雄マウスは行動チャンバーへの馴化後に安楽死させ、組織採取を行った。雄 ICR マウスは後述するように攻撃マウスとして使用した。

社会挫折ストレスは、C57BL/6N 雄マウスを攻撃性の高い雄 ICR マウスのホームケージに入れ、10 分間攻撃させることで実施した。各 10 分間の社会挫折ストレス曝露後、ストレスを受けたマウスは直ちに安楽死させて組織採取を行うか、次のストレス曝露又は社会行動試験まで個別ケージで飼育した。

社会行動試験では、縦 40cm 横 30 cm の行動チャンバーの一端に新奇の ICR ターゲットマウスを入れた金網を設置し、C57BL/6N 雄マウスを 150 秒間探索させた。ICR マウスを取り囲む領域を社会行動ゾーン、その反対側の領域を忌避行動ゾーンと定義し、それぞれの領域での滞在時間を測定することでストレス誘発性社会忌避行動を評価した。

組織採取では、イソフルランを用いた麻酔下で C57BL/6N 雄マウスの大腿骨骨髄と脾臓を採取した。第一コホートでは、各組織をトランスクリプトーム解析とリピドーム解析に使用した。第二コホートではこれらの組織から回収した細胞をフローサイトメトリー解析に供した。

(結果)

急性ストレスや慢性ストレス、慢性ストレス後の休息期間の後におけるトランスクリプトーム解析の結果、骨髄では慢性ストレスにより MHC class II など獲得免疫反応に関わる遺伝子発現の減少が見られ、TLR4 など自然免疫反応に関わる遺伝子の発現の増加が見られた。一方で脾臓では T 細胞寛容誘導に関わる遺伝子発現がストレス後に減少し、慢性ストレスからの休息期間後に部分的に戻った。これらの結果から、慢性ストレス後の骨髄と脾臓では、免疫関連遺伝子の発現に明瞭な変化が見られることが示された。そこで、慢性ストレスの影響を受

けた代表的な遺伝子である MHC クラス II と TLR4 の表面発現をフローサイトメトリー法により評価した。骨髄では、MHC クラス II の表面発現は骨髄系細胞で減少した。一方で、TLR4 の表面発現は骨髄系細胞では減少したが、リンパ系細胞では増加した。脾臓では、MHC クラス II の表面発現は骨髄系細胞で減少した。一方で、TLR4 の表面発現は、骨髄系細胞において 4 回ストレス後に一過性のピークを示した。これらの所見から、慢性ストレスは、骨髄と脾臓の両方において骨髄系細胞の抗原提示能力を減弱させ、組織および細胞種特異的に TLR4 シグナル伝達を制御することが示唆された。

遺伝子発現変化の要因となる細胞を推定するため、骨髄と脾臓のトランスクリプトームデータを用いて xCell 解析による細胞種エンリッチメント解析を行った。骨髄では、慢性ストレスによりナイーブ B 細胞、記憶 B 細胞、赤血球の関連遺伝子エンリッチメントが減少し、骨髄系細胞関連遺伝子エンリッチメントが増加した。また、休息期間後に内皮細胞、巨核球、血小板の関連遺伝子エンリッチメントが増加した。脾臓では、慢性ストレスによりナイーブ B 細胞と記憶 B 細胞、ナイーブ T 細胞と記憶 T 細胞の関連遺伝子エンリッチメントが低下し、赤血球、好塩基球、ヘルパー T 細胞、線維芽細胞などの関連遺伝子エンリッチメントが増加した。また、休息期間後に巨核球及び血小板の関連遺伝子エンリッチメントが増加した。フローサイトメトリー解析においても骨髄と脾臓の両方で、リンパ球の減少と骨髄系細胞の増加が見られた。これらの結果は、慢性ストレスにより骨髄及び脾臓においてリンパ球系から骨髄系へのシフトが誘導されることを示唆する。

さらに、慢性ストレスによる骨髄と脾臓の脂質メディエーターの変化を調べた。骨髄においては、4-HDHA が急性ストレス後に一過性に減少し、15-deoxy-d12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) が慢性ストレス後に減少することを見出した。どちらの脂質メディエーターも PPAR γ に結合し抗炎症作用を示すことから、急性ストレスと慢性ストレスが骨髄中の抗炎症性脂質メディエーターを介して炎症反応を制御することが示唆された。脾臓においては、リポキシン A4 やリポキシン A5、レゾルビン E1、レゾルビン E3、レゾルビン D1、レゾルビン D2 などの炎症収束性脂質メディエーターが急性ストレスにより減少した。さらに抗炎症性脂質メディエーターである 12-HEPE が慢性ストレスにより減少した。これらの結果は、急性ストレスと慢性ストレスの両方が抗炎症性脂質メディエーターと炎症収束性脂質メディエーターの産生を抑制することで脾臓の炎症を延長させることを示唆する。

脂質メディエーターの変化と免疫細胞集団及びトランスクリプトームとの関連を調べるため、脂質メディエーターの量が xCell 解析の細胞種特異的エンリッチメントや遺伝子発現レベルに相関するかを調べた。骨髄においては、15d-PGJ2 がリンパ球及び赤血球のエンリッチメントと正の相関を示し、骨髄系細胞のエンリッチメントと負の相関を示した。また、同脂質と正の相関を示す遺伝子は B 細胞の分化と活性化に関連することが示された。これらの結果は、骨髄において慢性ストレスが引き起こす 15d-PGJ2 の減少が、B 細胞の減少と骨髄系細胞の増加を誘導する遺伝子発現の変化に関連することを示す。脾臓においては、急性ストレス及び慢性ストレス後に減少する炎症収束性脂質メディエーターがエフェクターメモリー

CD8⁺T 細胞及び血管内皮細胞のエンリッチメントと正の相関を示した。慢性ストレス後に減少する 12-HEPE は造血幹細胞及び樹状細胞のエンリッチメントと正の相関を示し、ヘルパーT 細胞のエンリッチメントと負の相関を示した。また、12-HEPE はアクチン細胞骨格の制御に関連する遺伝子と正の相関を示し、DNA 複製とクロマチン形成に関わる遺伝子と負の相関を示した。これらの所見は、脾臓において慢性ストレスが引き起こすレゾルビンや 12-HEPE の減少が髄外造血と炎症の長期化に関与する遺伝子発現に関わることを示唆する。

(考察)

本研究では、骨髄と脾臓における遺伝子発現、細胞組成、脂質メディエーターに対するストレスの影響を経時的に調べた。骨髄では慢性ストレスによりリンパ球の減少と骨髄系細胞の増加が持続的に誘導され、細胞集団の変化と一致した遺伝子発現変化を示した。また、慢性ストレスは骨髄系細胞における MHC クラス II の表面発現を減少させることで、T 細胞に対する抗原提示を低下させることが示唆された。ストレスによる遺伝子発現の変化は、抗炎症性脂質メディエーターである 15d-PGJ2 の減少と相関した。脾臓においても慢性ストレスによりリンパ球の減少と骨髄系細胞の増加が誘導されたが、骨髄と異なり一過性の変化であった。加えて、脾臓においては髄外造血を示す遺伝子発現の変化も認めた。脾臓における細胞集団や遺伝子発現の変化は抗炎症・炎症収束性脂質メディエーターである 12-HEPE やレゾルビンの減少と関連した。脾臓では、遺伝子オントロジー解析により、血管発達に関わる慢性ストレス誘発性の遺伝子発現変化が特定された。xCell 解析により骨髄と脾臓の両方で巨核球と血小板の関連遺伝子エンリッチメントが上昇することが示された。これは、ヒトにおけるストレス誘発性血小板活性化の既知の報告と一致した。ストレス後の血小板媒介性の応答について調べるには、細胞の種類に応じた分析と操作が必要である。さらに、本研究ではストレス関連行動として社会忌避行動を調べたが、遺伝子発現や細胞組成、脂質メディエーターと社会忌避行動との間に関連性は認められなかった。ストレス関連行動変化は快感消失、不安亢進、認知機能低下など多岐に渡り、社会忌避行動と関連しないことも多い。すなわち、本研究で見出した免疫関連遺伝子・細胞組成・脂質メディエーターの変化が認知情動変容に与える影響を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

(結論)

これらの結果は、慢性ストレスが抗炎症性及び炎症収束性脂質メディエーターの制御を介して、自然免疫細胞及び獲得免疫細胞を調節することにより、骨髄及び脾臓における組織特異的免疫反応を誘導することを示唆する。本研究の知見は、内因性脂質メディエーターがストレスやうつ病の免疫機構に果たす役割の解明に資する。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3400 号	氏 名	堀川 伊和
論文題目 Title of Dissertation	マウスの慢性ストレスによる骨髄・脾臓での遺伝子発現・細胞組成・脂質メディエーターの変化 Chronic stress alters lipid mediator profiles associated with immune-related gene expressions and cell compositions in mouse bone marrow and spleen		
審査委員 Examiner	主 査 菱 本 明 豊 Chief Examiner 副 査 平 田 康 一 Vice-examiner 副 査 内 近 遼 Vice-examiner		

（要旨は1, 000字～2, 000字程度）

【背景】

ストレスやうつ病の病態においては末梢や中枢の炎症が重要であり、その制御には脂質メディエーターの関与が示唆されている。しかし、ストレスによる炎症応答において脂質メディエーターが担う役割や、脂質メディエーターに生じる変化は殆ど明らかでない。本研究では、成体の C57BL/6N 雄マウスを慢性社会挫折ストレスに供し、急性ストレスや慢性ストレス、慢性ストレス後の休息期間の後に骨髄や脾臓を回収し、トランスクリプトーム解析、フローサイトメトリー解析、リピドーム解析を行うことで、ストレスのタイムコースに応じて造血・免疫器官に生じる遺伝子発現、細胞集団、脂質メディエーターの変化を調べた。

【結果】

トランスクリプトーム解析の結果、骨髄では慢性ストレスにより MHC class II など獲得免疫反応に関わる遺伝子発現の減少が見られ、TLR4 など自然免疫反応に関わる遺伝子の発現の増加が見られた。一方で脾臓では T 細胞寛容誘導に関わる遺伝子発現がストレス後に減少し、慢性ストレスからの休息期間後に部分的に戻った。これらの結果から、慢性ストレス後の骨髄と脾臓では、免疫関連遺伝子の発現に明瞭な変化が見られることが示された。

遺伝子発現変化の要因となる細胞を推定するため、骨髄と脾臓のトランスクリプトームデータを用いて xCell 解析による細胞種エンリッチメント解析を行った。骨髄では、慢性ストレスによりナイーブ B 細胞、記憶 B 細胞、赤血球の関連遺伝子エンリッチメントが減少し、骨髄系細胞関連遺伝子エンリッチメントが増加した。また、休息期間後に内皮細胞、巨核球、血小板の関連遺伝子エンリッチメントが増加した。脾臓では、慢性ストレスによりナイーブ B 細胞と記憶 B 細胞、ナイーブ T 細胞と記憶 T 細胞の関連遺伝子エンリッチメントが低下し、赤血球、好塩基球、ヘルパー T 細胞、線維芽細胞などの関連遺伝子エンリッチメントが増加した。また、休息期間後に巨核球及び血小板の関連遺伝子エンリッチメントが増加した。フローサイトメトリー解析においても骨髄と脾臓の両方で、リンパ球の減少と骨髄系細胞の増加が見られた。これらの結果は、慢性ストレスにより骨髄及び脾臓においてリンパ球系から骨髄系へのシフトが誘導されることを示唆する。

ストレスによる脂質メディエーターの変化を調べたところ、骨髄においては、4-HDHA が急性ストレス後に一過性に減少し、15-deoxy-d12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) が慢性ストレス後に減少することを見出した。脾臓においては、リボキシシン A4 やリボキシシン A5、レゾルビン E1、レゾルビン E3、レゾルビン D1、レゾルビン D2 などの炎症収束性脂質メディエーターが急性ストレスにより減少した。さらに抗炎症性脂質メディエーターである 12-HEPE が慢性ストレスにより減少した。

脂質メディエーターの変化と免疫細胞集団及びトランスクリプトームとの関連を調べるため、脂質メディエーターの量が xCell 解析の細胞種特異的エンリッチメントや遺伝子発現レベルに相関するかを調べた。骨髄においては、15d-PGJ2 がリンパ球及び赤血球のエンリッチメントと正の相関を示し、骨髄系細胞のエンリッチメントと負の相関を示した。脾臓においては、急性ストレス及び慢性ストレス後に減少する炎症収束性脂質メディエーターがエフェクターメモリーCD8⁺ T 細胞及び血管内皮細胞のエンリッチメントと正の相関を示した。慢性ストレス後に減少する 12-HEPE は造血幹細胞及び樹状細胞のエンリッチメントと正の相関を示し、ヘルパーT 細胞のエンリッチメントと負の相関を示した。

【考察】

本研究では、骨髄と脾臓における遺伝子発現、細胞組成、脂質メディエーターに対するストレスの影響を経時的に調べた。骨髄では慢性ストレスによりリンパ球の減少と骨髄系細胞の増加が持続的に誘導され、細胞集団の変化と一致した遺伝子発現変化を示した。ストレスによる遺伝子発現の変化は、抗炎症性脂質メディエーターである 15d-PGJ2 の減少と相関した。脾臓においても慢性ストレスによりリンパ球の減少と骨髄系細胞の増加が誘導されたが、骨髄と異なり一過性の変化であった。脾臓における細胞集団や遺伝子発現の変化は抗炎症・炎症収束性脂質メディエーターである 12-HEPE やレゾルビンの減少と関連した。

さらに、本研究ではストレス関連行動として社会忌避行動を調べたが、遺伝子発現や細胞組成、脂質メディエーターと社会忌避行動との間に関連性は認められなかった。ストレス関連行動変化は快感消失、不安亢進、認知機能低下など多岐に渡り、社会忌避行動と関連しないことも多い。すなわち、本研究で見出した免疫関連遺伝子・細胞組成・脂質メディエーターの変化が認知情動変容に与える影響を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

本研究は、慢性ストレスが抗炎症性及び炎症収束性脂質メディエーターの制御を介して、自然免疫細胞及び獲得免疫細胞を調節することにより、骨髄及び脾臓における組織特異的免疫反応を誘導することを示唆する。本研究の知見は、内因性脂質メディエーターがストレスやうつ病の免疫機構に果たす役割の解明に資する。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。