



Alteration of COX-1 and TLR4 expression in the mouse brain during chronic social defeat stress revealed by Positron Emission Tomography study

本岡, 弓佳

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2025-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9178号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100496459>

※ 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

**Alteration of COX-1 and TLR4 expression in the mouse brain during chronic social defeat
stress revealed by Positron Emission Tomography study**

ポジトロン断層撮影研究により明らかにした
慢性社会挫折ストレスにおけるマウス脳の COX-1 と TLR4 の発現変化

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 古屋敷 智之 教授)

本岡 弓佳

緒言

慢性ストレスは情動・認知機能に影響を与え、うつ病や PTSD など精神疾患のリスクを高める。これまでに慢性社会挫折ストレスモデルなどげっ歯類のストレスモデルを用い、慢性ストレスによる行動変容にミクログリア活性化を介した神経炎症や骨髄由来細胞動員を介した全身性炎症の重要性が示されてきた。この知見と合致し、うつ病患者の末梢血では炎症性サイトカインや骨髄由来細胞が増加しており、TSPO リガンドによるポジトロン断層撮影 (positron emission tomography, PET) イメージングを用い、うつ病患者の脳内で神経炎症が生じていることも示唆されている。しかし、これらの炎症関連マーカーには炎症病態を可視化・解析する上で限界がある。例えば、炎症性サイトカインや骨髄由来細胞の計測では、炎症の生成部位を同定することはできない。また TSPO は数多くの細胞に発現するミトコンドリアタンパク質で、必ずしも炎症に選択的に働く分子ではないことから、TSPO PET イメージングのシグナルの解釈が容易ではない。これらの問題から、炎症関連細胞に選択性のある分子を標的とした PET イメージングの開発が求められている。

マウスの慢性社会挫折ストレスを用いた先行研究により、ストレスによる行動変容にはプロスタグランジン (PG) E₂ や Toll-like receptor (TLR) 2/4 など自然免疫分子を介した神経炎症の重要性が示されている。すなわち社会挫折ストレスはミクログリアに選択的に発現する PG 合成酵素 COX-1 を介して脳内の PGE₂ 産生を増加し、ドパミン系抑制を介して行動変容を誘導する。また、TLR2/4 は慢性社会挫折ストレスによるミクログリア活性化を介達し、PGE₂ も含む炎症関連分子を介して神経細胞や行動の変容を誘導する。そこで本研究では、新奇プローブも創出して COX-1 と TLR4 の PET イメージングを行い、慢性社会挫折ストレスの複数の時点での COX-1 と TLR4 の発現量の可視化を試みた。

方法

慢性社会挫折ストレスモデルでは、雄性 C57BL/6N マウスを体格が大きく攻撃性の強い ICR マウスからの攻撃に 1 日 10 分間暴露して、社会挫折ストレスを与えた。亜慢性社会挫折ストレスとして 4 日間の社会挫折ストレスを、慢性社会挫折ストレスとして 10 日間の社会挫折ストレスを用いた。対照群では ICR マウスからの攻撃以外の実験操作を同様に行った。社会相互作用試験は 9 日目の社会挫折ストレスの前に行った。金網のケージに入れた別の ICR マウスに対する社会行動を 150 秒間計測し、ICR マウスを含むエリアを社会行動ゾーン、反対側のエリアを忌避行動ゾーンと定義し、慢性社会挫折ストレスによる社会忌避行動を定量化した。

COX-1 PET プローブには、既報の(S)-ケトプロフェンの ¹⁸F ラベル体 ((S)-[¹⁸F]KTP-Me) を用いた。TLR4 PET プローブには、UCSD の研究グループが開発した選択的 TLR4 アゴニスト compound 1 に [¹¹C] を導入した新奇化合物 ([¹¹C]1) を開発し、化合物の比活性を HPLC で確認した上で用いた。

PET イメージングは、亜慢性社会挫折ストレス (4 日目) と慢性社会挫折ストレス (10

日目)の90分後に実施した。実験対象のマウスを麻酔下で小動物用のPETスキャナー上に固定し、尾静脈から20 MBq相当のPETプローブを注入し、COX-1 PETプローブについては45分、TLR4 PETプローブについては60分、3Dモードで撮像した。取得したPET画像はMR T1強調画像もしくはCT画像と並べ、標的の脳領域・臓器に関心領域を設定して活性を計測し、注入した放射能と体重で正規化して解析した。

定量的RT-PCRは、TRIZOLで全RNAを抽出してSYBR Green法で行った。 β -actin mRNAの値で正規化して解析した。

統計解析は、二群の比較には対応のないt検定を、二因子のある二群以上の比較には二元配置分散解析とBonferroni法によるペアワイズ比較を用いた。

結果

まず、慢性社会挫折ストレスを受けたマウスでは、典型的なストレス誘発性行動である社会忌避行動を示すことを確認した。

慢性社会挫折ストレスによる炎症は全身性に生じることから、まず亜慢性社会挫折ストレスと慢性社会挫折ストレスが全身臓器のCOX-1 PET活性に与える影響を調べた。その結果、亜慢性社会挫折ストレスでは左腎におけるPET活性の一時的増加を、慢性社会挫折ストレスでは肝臓におけるPET活性の減少を認めた。しかしPET活性の時間活性曲線は本来予想される指数関数的減衰とは大きく異なっており、薬物動態を反映している可能性が示唆された。従って、これらの臓器ではCOX-1 PETプローブを用いたCOX-1の発現量の評価は難しいと考えた。

次に亜慢性社会挫折ストレスと慢性社会挫折ストレスが脳のCOX-1 PET活性に及ぼす影響を調べた。脳におけるCOX-1 PET活性の時間活性曲線は1分以内の急峻な立ち上がりとその後の速やかな指数関数的減衰を示し、脳内のCOX-1の発現量の指標となると考えた。亜慢性社会挫折ストレスでは脳内のCOX-1 PET活性が増加したが、その増加は一過性であり、慢性社会挫折ストレスでは消失した。亜慢性社会挫折ストレスによるCOX-1 PET活性の増加は大脳皮質、海馬、線条体、視床といった広域の脳領域で認められた。

TLR4 PETイメージングのために新奇プローブを開発し、亜慢性社会挫折ストレスと慢性社会挫折ストレスが脳のTLR4 PET活性に及ぼす影響を調べた。脳におけるTLR4 PET活性の時間活性曲線は1分以内の急峻な立ち上がりとその後の速やかな指数関数的減衰を示し、脳内のTLR4の発現量の指標となると考えた。亜慢性社会挫折ストレスと慢性社会挫折ストレスによるTLR4 PET活性の変化は脳領域選択的であり、小脳では亜慢性社会挫折ストレスと慢性社会挫折ストレスによる減少が、橋-延髄では慢性社会挫折ストレスによる減少が認められた。

さらに、亜慢性・慢性社会挫折ストレスにおけるTLR4やCOX-1のmRNA発現の変化を調べたが、それぞれのPET活性の変化との相関は認めなかった。しかし、TLR4 PET活性の変化を認めた小脳や橋-延髄では、亜慢性社会挫折ストレスや慢性社会挫折ストレ

スにより炎症関連分子の発現が増加しており、これらの脳領域がストレスの神経炎症病態に寄与することが示唆された。

結論

本研究では、COX-1 および TLR4 PET イメージングを用い、社会挫折ストレスにより時空間的特性の異なる複数の神経炎症プロセスが生じる可能性を示した。即ち COX-1 PET イメージングでは、広域の脳領域での変化が亜慢性社会挫折ストレスで一過性に生じるのに対し、TLR4 PET イメージングでは、特定の脳領域での変化が慢性社会挫折ストレスにより持続的に生じた。これらの知見は、COX-1 および TLR4 PET イメージングがストレス関連精神疾患における神経炎症プロセスの理解を深め、新たな診断・治療技術の開発に寄与する可能性を示している。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第3487号	氏名	本岡 弓佳
論文題目 Title of Dissertation	<p>Alteration of COX-1 and TLR4 expression in the mouse brain during chronic social defeat stress revealed by Positron Emission Tomography study</p> <p>ポジトロン断層撮影研究により明らかにした慢性社会挫折ストレスにおけるマウス脳のCOX-1とTLR4の発現変化</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 藤山隆司</p> <p>副 査 沢村 正平</p> <p>副 査 菅原 正和</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】

うつ病など精神疾患の患者では、末梢血の炎症性サイトカインや脳の神経炎症マーカーが増加していることが知られる。しかし、末梢血の炎症性サイトカインでは炎症部位を特定できず、神経炎症マーカーである TSPO の PET イメージングは炎症に選択でなく、結果の解釈が難しい。マウスでは、慢性ストレスがミクログリア活性化による神経炎症や骨髄由来細胞による全身性炎症を介して情動・認知機能障害を誘導することが示されている。特に慢性社会挫折ストレスが自然免疫受容体 TLR2/4 を介してミクログリアを活性化し、プロスタグランジン (PG) 合成酵素 COX-1 により脳内の PGE₂ を産生してドパミン系を抑制して行動変容を引き起こすことが示された。そこで本研究では、COX-1 と TLR4 を標的とした新規プローブを用いた PET イメージングを行い、マウスの慢性社会挫折ストレスの異なる時点における両分子の発現変化の可視化を試みた。

【方法】

慢性社会挫折ストレスモデルでは、雄性 C57BL/6N マウスを ICR マウスからの攻撃に 1 日 10 分間暴露し、亜慢性 (4 日間) および慢性 (10 日間) の社会挫折ストレスを与えた。対照群には同様の操作を行ったが、攻撃は受けさせなかった。社会相互作用試験により社会忌避行動を定量化した。

PET イメージングでは、COX-1 プローブとして(S)-[¹⁸F]KTP-Me を、TLR4 プローブとして[¹¹C]1 を使用し、亜慢性および慢性ストレス負荷後に脳内および関連臓器の活性を測定した。画像データは MR または CT と重ね合わせ、関心領域での放射能活性を定量解析した。

遺伝子発現解析には RT-PCR を使い、TRIZOL で抽出した全 RNA を基に SYBR Green 法で解析、β-actin で正規化した。統計解析には、二群間比較では t 検定、複数因子間では二元配置分散解析と Bonferroni 法を使用し、有意差を検証した。

【結果】

慢性社会挫折ストレスを受けたマウスでは、典型的なストレス誘発性行動である社会忌避行動が誘導された。

まず、全身臓器の COX-1 PET 活性を評価したところ、亜慢性社会挫折ストレスでは左腎における一時的な PET 活性の増加が、慢性社会挫折ストレスでは肝臓における PET 活性の減少が認められた。しかし、これらの臓器の PET 活性の時間活性曲線は、通常の指数関数的減衰とは異なり、PET リガンドの薬物動態に影響を受けている可能性が示唆された。そのため、これらの臓器では COX-1 PET プローブを用いた COX-1 発現量の評価は困難であると考えられた。

次に、脳内における COX-1 PET 活性を調べたところ、時間活性曲線は 1 分以内に急

峻に立ち上がり、その後速やかに指数関数的に減衰する特徴を示した。このことから、脳内 COX-1 PET 活性は COX-1 の発現量を反映する指標となると考えた。亜慢性社会挫折ストレスでは脳内の COX-1 PET 活性が増加し、この増加は大脳皮質、海馬、線条体、視床といった広範な脳領域で観察された。この変化は一過性であり、慢性社会挫折ストレスでは COX-1 PET 活性の増加は消失していた。

さらに、TLR4 PET プローブを新たに開発し、亜慢性および慢性社会挫折ストレスが脳内 TLR4 活性に与える影響を評価した。脳内の TLR4 PET 活性も COX-1 同様に 1 分以内の急峻な立ち上がり、速やかな指数関数的減衰を示し、脳内 TLR4 発現量の指標となると考えた。亜慢性社会挫折ストレスおよび慢性社会挫折ストレスによる TLR4 PET 活性の変化は脳領域選択的であり、小脳では両ストレス条件で活性の減少が、橋-延髄では慢性社会挫折ストレスにより活性の減少が観察された。

これらの PET イメージングの結果と対応する脳領域での TLR4 や COX-1 の mRNA 発現を調べたところ、PET 活性の変化と mRNA 発現の間に相関は見られなかった。しかし、TLR4 PET 活性の変化が確認された小脳や橋-延髄では、亜慢性および慢性社会挫折ストレスによって炎症関連分子の発現が増加しており、小脳や橋-延髄が社会挫折ストレスに起因する神経炎症の病態に関与することが示唆された。

【結論】

COX-1 および TLR4 PET イメージングを用いて、社会挫折ストレスによって異なる神経炎症プロセスが時空間的に生じることを明らかにした。すなわち、COX-1 PET では亜慢性ストレス時に広範な脳領域で一過性の変化が、TLR4 PET では慢性ストレス時に特定の脳領域で持続的な変化が観察された。この成果は、COX-1 および TLR4 PET イメージングがストレス関連精神疾患の神経炎症プロセス解明や新たな診断・治療法の開発に貢献する可能性を示唆している。

以上、本研究は、ストレスによる神経炎症の時空間的多様性を明らかにしたものであり、精神疾患の病態機序を理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。

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。