



## Repeated social defeat stress induces neutrophil mobilization in mice: maintenance after cessation of stress and strain-dependent difference in response

石川, 由香

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8294号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008294>

※ 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。



## 学位論文の内容要旨

Repeated social defeat stress induces neutrophil mobilization in mice:  
maintenance after cessation of stress and strain-dependent difference  
in response

マウス反復社会的挫折ストレスは好中球動員を誘発する  
—ストレス負荷後の維持やマウス系統差に着目した検討—

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)

石川 由香

うつ病は抑うつ気分や興味の消失を主症状とした精神疾患である。ストレス社会と呼ばれる現代において、うつ病の生涯有病率は約 17%と高く、その患者数は年々増加傾向にある。うつ病の治療は抗うつ薬などによる薬物療法が中心であるが、約 3 割の患者は治療抵抗性であることや薬効発現までに時間がかかることが問題となっており、新たな治療薬の開発が求められている。

過度なストレスはうつ病を引き起こしうる主な要因の 1 つである。ストレスは脳神経系のみならず、免疫系にも様々な影響を与えることが報告されている。実際にうつ病患者において、脳内における免疫細胞であるミクログリアの活性化や、末梢血液および脳脊髄液中のサイトカイン、ケモカイン濃度の変化が報告されている。さらに、うつ病患者の末梢血液中では血液像が変化していることが報告されており、中でも好中球/リンパ球比の上昇は精神症状の重症度との正の相関が認められている。げっ歯類において、慢性ストレスは好中球や単球の血液中へ動員を促進することが報告されている。さらに骨髄移植を用いた実験において、血球細胞由来の IL-1 $\beta$  や IL-6 はストレスによる抑うつ・不安様行動の惹起に関与していることが示唆されている。しかしながら、それぞれの血球細胞ごとの動態変化やそのメカニズム、行動学的意義に関して詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では、反復社会的挫折ストレスモデルを用いて慢性ストレスによる血球細胞の動態変化や行動変化との関連を検討した。

マウスの反復社会的挫折ストレスモデルには大きく 2 つのプロトコルが存在する。一方は個別のマウスに 1 日 10 分間のストレスを 10 日間与えるプロトコル（以下、プロトコル 1）、他方は 3 四集団のマウスに同時に 1 日 2 時間のストレスを 6 日間与えるプロトコル（以下、プロトコル 2）である。しかしながら、このプロトコルの違いがストレスによる血液学的変化に与える影響は明らかとなっていない。そこでこの 2 つのプロトコルを用いて両プロトコルが血液学的変化に与える影響を検討した。その結果、骨髄中においてはプロトコルの違いに関わらず、慢性ストレス負荷終了直後において、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞の減少および単球、好中球の増加が確認された。一方で血液中においては、プロトコル 2 では骨髄と同様に T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞の減少および炎症性単球、好中球の増加が確認されたのに対し、プロトコル 1 では炎症性単球と好中球の増加のみが確認された。血液中の炎症性単球と好中球は骨髄だけではなく脾臓における髄外造血によっても供給される。そこでプロトコル 2 を用いて、慢性ストレス負荷後の脾臓中の単球、好中球数の変化を検討した。その結果、脾臓においても炎症性単球と好中球の増加が見られた。次に、慢性ストレスにより単球、好中球が血液中に動員されるメカニズムを検討した。ケモカインシグナルである CCL2-CCR2、および CXCL12-CXCR4 はそれぞれ単球および好中球の骨髄から血液中への動員に深く関与している。そこでこれらのシグナルに着目し、慢性ストレス負荷による骨髄および血液中の CCL2、CXCL12 の変化とそれぞれの受容体（CCR2、CXCR4）の単球または好中球における発現量変化を検討した。まず CCL2-CCR2 シグナルに関して、骨髄細胞外液および血清中において CCL2 の増加が確認された。一方で単球の細胞膜表面上における CCR2 発現量は骨髄、血液中ともに減少していた。CXCL12-CXCR4 シグナルに関して、骨髄細胞外液に

においては CXCL12 の減少が、血清中においては増加が確認された。また骨髓中においてのみ、好中球の細胞膜表面上の CXCR4 の発現量低下を認めた。以上の検討から、慢性ストレス負荷により、骨髓、脾臓、血液中において炎症性単球および好中球が増加すること、血液中へのそれらの細胞の動員には CCL2-CCR2、および CXCL12-CXCR4 シグナルが関与していることが示唆された。

慢性ストレス負荷により骨髓および血液中において血球細胞数の変化が認められたが、この変化がいつまで維持されるのかを検討するため、ストレス負荷終了から 6 日後に骨髓および血液を採取し、血液学的解析を行った。その結果、骨髓においては、T 細胞、B 細胞の減少および単球、好中球の増加が認められ、ほとんどの変化がストレス終了 6 日後まで維持されていた。一方で血液中においては、ストレス直後に見られた T 細胞の減少と単球の増加はほぼ消失していた。B 細胞の減少と好中球の増加はストレス終了 6 日後まで維持されており、特に好中球の増加はストレス終了 6 日後においても顕著であった。

慢性ストレスによる行動学的変化と血液学的変化の関係性を探るため、ストレス感受性のマウス系統差に着目し、慢性ストレスによる血液学的変化がストレス脆弱性の遺伝的多様性に与える影響を検討した。BALB/c マウスは C57BL/6N マウスと比較して、ストレス脆弱性が高いことが報告されている。そこでプロトコル 2 を用いて、C57BL/6N および BALB/c マウスに慢性ストレスを負荷し、行動学的および血液学的解析を行った。その結果、BALB/c マウスにおいてのみ、ストレス負荷後に体重減少が認められた。さらに社会性試験において、C57BL/6N マウスと比較して BALB/c マウスではより顕著な社会的忌避行動が認められた。このことから、BALB/c マウスは C57BL/6N マウスよりもストレス脆弱性が高いことが確認できた。骨髓において、C57BL/6N マウスでは慢性ストレス負荷終了 4 日後に T 細胞、B 細胞の減少および好中球の増加認められたが、BALB/c マウスでは B 細胞の減少および好中球の増加のみが認められ、T 細胞の数の変化は認められなかった。血液中においては、両系統において B 細胞の減少および好中球の増加が認められた。細胞傷害性 T 細胞の減少は C57BL/6N マウスにおいてのみ見られた。興味深いことに、血液中の好中球の増加はストレス脆弱性を示した BALB/c マウスでより顕著に認められた。以上の結果から、慢性ストレスはストレス脆弱性に関わらず、骨髓および血液中の B 細胞を減少させること、さらにストレス脆弱性の高い系統において、より顕著に血液中の好中球を増加させることが示唆された。

本研究において、慢性ストレス負荷は使用したプロトコルに関わらず、骨髓においては T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞を減少させ、一方で単球や好中球を増加させた。これらの変化は少なくともストレス負荷後 6 日間は持続していた。血液中においては両プロトコルとも単球および好中球を増加させたが、ストレス終了 6 日後においては好中球の増加のみが確認された。さらにストレス脆弱性の高い BALB/c マウスにおいて、より顕著な好中球の増加が確認された。以上のことから、慢性ストレスは骨髓および血液中において好中球の持続的な増加を引き起こし、この変化はストレス脆弱性の遺伝的多様性に寄与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3145 号	氏名	石川 由香
論文題目 Title of Dissertation	Repeated social defeat stress induces neutrophil mobilization in mice: maintenance after cessation of stress and strain-dependent difference in response  マウス反復社会的挫折ストレスは好中球動員を誘発する ーストレス負荷後の維持やマウス系統差に着目した検討－		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 副査 Vice-examiner 副査 Vice-examiner	曾良一郎 平田健一 (内匠延)	

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

### 【目的】

過度なストレスはうつ病を引き起こしうる主な要因の1つである。ストレスは脳神経系のみならず、免疫系にも様々な影響を与えることが報告されている。げつ歯類を用いた研究において、慢性ストレスは好中球や単球の血液中へ動員を促進することが報告されている。さらに骨髄移植を用いた実験において、血球細胞由来の IL-1 $\beta$  や IL-6 はストレスによる抑うつ・不安様行動の惹起に関与していることが示唆されている。しかしながら、それぞれの血球細胞ごとの動態変化やそのメカニズム、行動学的意義に関して詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では、反復社会的挫折ストレスモデルを用いて慢性ストレスによる血球細胞の動態変化や行動変化との関連を検討した。

### 【方法】

2種類の異なるプロトコルを用いて、雄性 C57BL/6N マウスを反復社会的挫折ストレスに供し、行動変化を検討した。ストレス負荷後の骨髄や血液中における血球細胞数の変化はフローサイトメトリーを用いて解析した。また、ストレス感受性の異なるマウス系統である C57BL/6N と BALB/c マウスを用いて、ストレスによる行動学的変化と血液学的変化の比較を行った。

### 【結果】

慢性ストレス負荷は使用したプロトコルに関わらず、骨髄においては T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞を減少させ、一方で単球や好中球を増加させた。これらの変化は少なくともストレス負荷後 6 日間は持続していた。血液中においては両プロトコルとも単球および好中球を増加させたが、ストレス終了 6 日後においては好中球の増加のみが確認された。慢性ストレスにより、ケモカインの一種である CCL2 や CXCL12 が血液中において増加しており、それぞれ受容体 (CCR2, CXCR4) の発現量がそれぞれ単球および好中球において減少していた。このことから、慢性ストレスによる骨髄から血液中への単球や好中球の動員には CCL2-CCR2、および CXCL12-CXCR4 シグナルが関与していることが示唆された。また、慢性ストレス負荷後に体重減少やより顕著な社会的忌避行動を示す等、ストレス脆弱性が確認された BALB/c マウスにおいては、骨髄および血液中で B 細胞の減少および好中球の増加のみが認められ、T 細胞の数の変化は認められなかった。さらに興味深いことに、C57BL/6N マウスと比較して、BALB/c マウスではより顕著な血液中の好中球の増加が確認された。

### 【結論】

慢性ストレスは骨髄および血液中において好中球の持続的な増加を引き起こし、この変化はストレス脆弱性の遺伝的多様性に寄与している可能性が示唆された。

以上、本研究は、慢性ストレスによる血球細胞の動態変化と行動変化との関連を明らかにしたものであり、ストレス関連疾患の病態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。