

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08129

研究課題名(和文)糖質コルチコイド受容体遺伝子型の相違によるアレルギー反応への影響

研究課題名(英文)Effect of glucocorticoid receptor genotype on allergy

研究代表者

小柳 円 (Koyanagi, Madoka)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・講師

研究者番号：00543399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心理的ストレス感受性の違いによりもたらされる免疫学的な影響を比較するため、ストレス感受性に関与する因子である糖質コルチコイド受容体(GR)の遺伝子配列が異なるC57BL/6およびBALB/cマウス脾臓細胞での、ストレスにより誘導される遺伝子の発現について検討を行った。マウス系統間での発現誘導の違いは明らかにならなかったが、ストレスを負荷する期間により発現が増加する遺伝子が異なることが明らかになった。短期間のストレスでは*Gilz*、*Rtp801*、*Mkp-1*遺伝子の発現が誘導され長期ストレスではこれらの遺伝子に加え、*Snip3*、*Trp53inp1*の発現も誘導されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会的・心理的ストレスを受けることにより、どのように身体に影響を及ぼすのか、また、その個体差・遺伝的差異は未だ明らかにされていない。それには、ストレスの種類によっても異なると考えられる。身体への影響のなかでも、特に免疫反応への影響というのは重要であり、解明されていないことが多い。さらに、ストレスによる免疫反応への影響の個体差により、アレルギー反応を引き起こす、もしくは、免疫細胞の反応性が下がり感染症にかかりやすい、または感染症が治りにくい状態になるのではないかと予想される。ストレスによる免疫応答の機序を明らかにすることで、アレルギー、自己免疫疾患等の免疫疾患の治療法の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Psychological stress affects the immune system. Upon stress occurrence, glucocorticoid is released that binds to the glucocorticoid receptor and regulates gene expression. Thus, we aimed to examine the stress-induced immunomodulatory mechanisms by investigating the expression patterns of stress-inducible genes in murine immune cells. Short restraint stress induced *Rtp801*, *Gilz* and *Mkp-1* expressions in the spleen of BALB/c and C57BL/6 mice. In contrast, *Snip3* and *Trp53inp1* were only upregulated upon longer restraint events. These results suggest that singular and repetitive bouts of stress lead to differential gene expression in mice and stress-induced gene expression in splenocytes.

研究分野：免疫学

キーワード：心理的ストレス アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代社会は多くの人々が何らかの社会的ストレスを抱え生活している。精神と免疫の関係を我々は身を以て体験しており、一般にストレスがあると風邪を引きやすい(N Engl J Med 325: 606,1991)と言われ、その一方で、気が張っていると病気にならないとも言われ、心理的ストレスは免疫系に様々な影響を与えると考えられる。ストレス時に見られる免疫学的影響には、免疫抑制ないし感染の重症化、アレルギー疾患の増悪、自己免疫疾患の発症、さらに精神的緊張による免疫応答の賦活化などがあり、これらがどのように生じるのか未解明な点が多い。

マウスでは系統によりストレス感受性が異なり、関与する因子として糖質コルチコイド受容体 (GR) が報告されている。GR はマウス系統により 75 番目のグルタミンの繰り返し回数が異なり、グルタミンが 8 個繰り返されている GR^{wt} マウス (BALB/c, AKR, C3H/HeJ, 129x1/SvJ, NOR/Lt 系統) は、16 個繰り返されている GR^{qn} マウス (C57BL/6, C57BR/cdJ, ST/bJ, SWR/J 系統) に比較し、拘束ストレスの後の血中コルチコステロン(糖質コルチコイド)濃度が高いが、新奇ストレスに対する抵抗性が強いと報告されている (FASEB J 20: E1802,2006)。一方、慢性的なストレスを与えた BALB/c マウスは C57BL/6 マウスに比較し、脳側坐核での GDNF(glial cell-derived neurotrophic factor)の発現が低く、鬱状態になりやすいという報告 (Neuron 69:359,2011) もあり、ストレスの種類、ストレス状態の捉え方が重要である。

マウス系統によりストレス感受性が異なると同時に免疫応答の質も異なる。アレルギーの発症にはヘルパーT(TH)細胞の TH1/TH2 細胞の偏向が関わっており、BALB/c マウスは C57BL/6 マウスに比較し、TH2 タイプに偏向しており、アレルギーを発症しやすい。申請者らはこの原因の一つとして、Mina 分子 (Jumonji C protein family) の発現量が C57BL/6 マウスでは BALB/c マウスに比較し高く、この分子が IL-4 promoter に結合することで TH2 分化に重要な免疫反応初期の IL-4 産生を抑制していることを見いだした (PLoS One 8:e80638, 2013, Nat Immunol 10:872-9, 2009)。しかし、その発現機構については未だ明らかになっていない部分が多い。

2. 研究の目的

以上のように、BALB/c マウスではストレス時のコルチコステロン産生量が多いと同時に、アレルギーを起こしやすい体質を持ち、C57BL/6 マウスはコルチコステロン産生量が少なく、アレルギーになりにくいという体質をもつが、これら 2 つの体質の直接的な関連性は明らかにされていない。本研究ではストレス負荷により発現量が増加すると報告のあるいくつかの遺伝子の発現をマウス系統間で比較し、免疫学的な性質の関連性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)GR コンジェニック (Cg) マウス

C57BL/6, BALB/c マウスにおける GR 遺伝子型の違いがストレス感受性、免疫系に与える影響を調べるため、BALB/c マウスに C57BL/6 由来の GR を置換したマウス、C57BL/6 マウスに BALB/c 由来の GR を置換したマウスをそれぞれ作成した。

(2)糖質コルチコイド投与

BALB/c、C57BL/6 野生型マウスを用いて、糖質コルチコイド(デキサメサゾン)をマウス体重あたり 30mg/kg となるように投与し、3 時間後に脾臓を摘出した。

(3)ストレス負荷

拘束ストレス、水浸ストレス、さらに両者のストレスを同時に行う方法でストレス負荷を行った。拘束ストレスは 50ml のプラスチック遠沈管に空気穴を開け、その中に 3~5 時間マウスを閉じ込めた。水浸ストレスは、マウスケージに 1cm ほど、水を入れ 3 時間放置した。両者のストレスを同時に加える場合は、拘束ストレス用の遠沈管にマウスを入れ、ケージに垂直に固定し、水を入れ 3 時間放置した。このストレス負荷を実験に応じて、単回、もしくは 5 日間繰り返し行なった。その後、採血および脾臓を摘出した。

(4) GR および GR 下流遺伝子発現の解析

無処置、デキサメサゾン投与、もしくはストレス負荷後のマウス脾臓から RNA を抽出後、cDNA を作成し、GR および先行実験により遺伝子発現の上昇が認められた Rtp801、GILZ、Mkp-1、Bnip3、Trp53inp1 遺伝子の発現量を RT-qPCR により解析した。hprt 遺伝子を内部コントロールとした。

(5) 拘束ストレス後の脾臓細胞への影響の解析

単回、繰り返しの拘束ストレスを行い、脾臓を摘出し、すりつぶした後、赤血球を溶血させ、脾臓細胞を調製した。脾臓細胞の T、B、NK、Treg (制御性 T 細胞) 細胞数量の変化を比較するため、各種細胞マーカー (CD3、CD19、NK1.1、Foxp3) に対する抗体を用いて脾臓細胞を染色し、フローサイトメータにて解析した。各細胞の割合と全脾臓細胞数より、各細胞の数を算出し、無処置マウスと比較した。

4. 研究成果

(1) GR 発現量の解析

C57BL/6 および BALB/c マウスに合成糖質コルチコイドであるデキサメサゾンを経口投与し、3時間後のグルココルチコイドレセプター (GR) の遺伝子発現量を検討した。その結果、どちらの系統のマウスでもデキサメサゾン投与後に GR 遺伝子の発現上昇は認められなかった (図 1A)。また、拘束ストレス、水浸ストレス、また、それらのストレスを一度に与えた場合においても、ばらつきがあるもののほとんど変化が見られない結果となった (図 1B)。さらに、C57BL/6 (B6) マウスの GR 遺伝子を BALB/c 型に置換したマウスにおいても、拘束ストレスを3時間負荷した後の GR 遺伝子発現には変化が見られなかった (図 1C)。

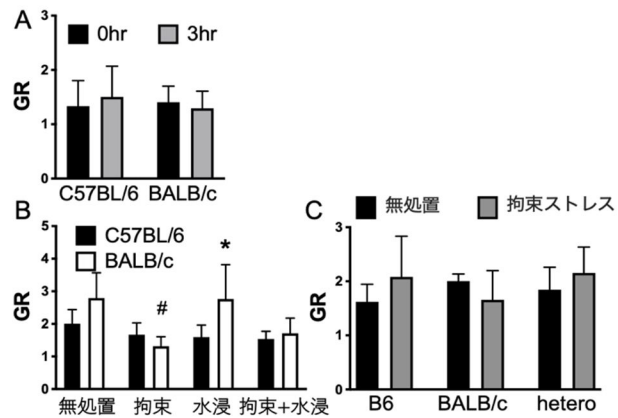


図 1 GR 発現量の解析

(2) 糖質コルチコイド投与後の GR 下流遺伝子発現の解析

デキサメサゾン投与後の C57BL/6 および BALB/c 脾臓細胞におけるストレス関連遺伝子の発現を検討した。これまでにストレスにより増加すると報告のある遺伝子 *Gilz*、*Rtp801*、*Mkp-1*、*Bnip3*、*Trp53inp1* のうち、*Gilz*、*Rtp801*、*Mkp-1*、*Bnip3* について、どちらの系統のマウスにおいてもデキサメサゾン投与後に有意に増加が認められたが、*Trp53inp1* では増加傾向を示すにとどまった (図 2)。

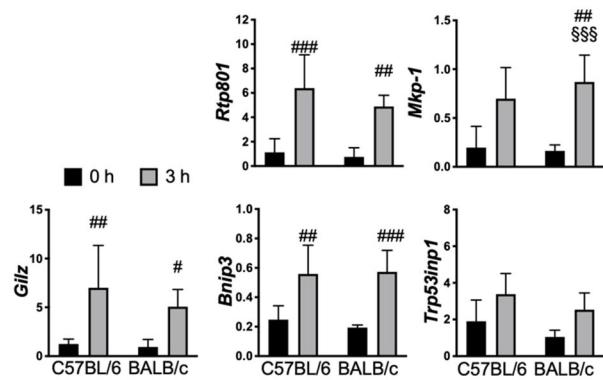


図 2 デキサメサゾン投与による遺伝子発現の変化

(3) in vivo のストレスによる GR 下流遺伝子発現の解析

拘束ストレス、水浸ストレス、さらに両者のストレスを同時に行う方法で C57BL/6 および BALB/c マウスにストレス負荷を行った。ストレス負荷 3 時間後に脾臓細胞を摘出し、ストレス関連遺伝子 (*Gilz*、*Rtp801*、*Mkp-1*、*Bnip3*、*Trp53inp1*) の発現量の変化を検討した。その結果、*Gilz*、

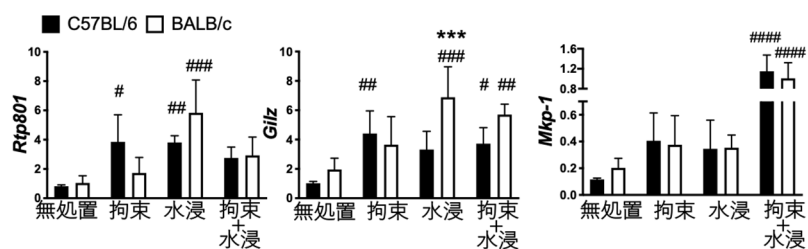


図 3 in vivo ストレスによる遺伝子発現の変化

Rtp801、*Mkp-1* 遺伝子についてはどのストレスの方法でも無処置マウスに比較し発現量の有意な増加、もしくは増加傾向が見られた (図 3)。さらに、水浸ストレスにおいては BALB/c マウスでは C57BL/6 マウスに比較し有意に高い発現量を示していた。興味深いことに *Mkp-1* において、どちらの系統のマウスにおいても、拘束と水浸ストレスを両方加えた場合では単独で加えた場合よりも高い発現が見られ、ストレスの相乗効果が示唆された。

(4) in vivo のストレスによる GR の遺伝型の違いによる GR 下流遺伝子発現の解析

GR 遺伝子配列は C57BL/6 マウスと BALB/c マウスでは異なっており、この配列の違いがストレスにより免疫細胞への異なる影響を及ぼすのではないかと仮説を明らかにするために、まず、GR の下流に位置するストレス関連遺伝子の発現について、GR Cg マウスを用いて検討を行った。図 4 に C57BL/6 背景のマウスに野生型の GR を持つマウス (B6 型)

GR 遺伝子部位を BALB/c の配列に置換したマウス (BALB/c 型) およびそのヘテロ接合型 (hetero) のマウスを用意し、拘束ストレスを 3 時間負荷し、脾臓細胞中のストレス関連遺伝子

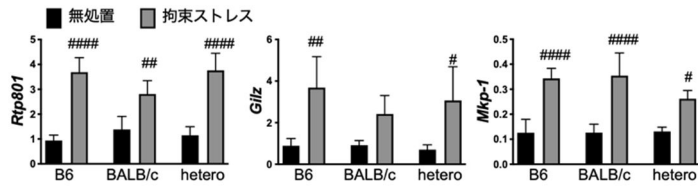


図 4 GR Cg マウスにおける遺伝子発現の変化

の発現量の変化について無処置マウスと比較した結果を示す。その結果、5 種類のストレス関連遺伝子のうち、Rtp801、Gilz、Mkp-1 遺伝子については無処置マウスに比較し有意な発現増加が見られた。しかしながら、GR の遺伝子配列による違いはみられなかった。また、ほかの Bnip3、Trp53inp1 について有意な発現誘導が認められなかった。

(5) in vivo の繰り返しストレスによる GR 下流遺伝子発現の解析

次に、短期間と長期間ストレスでは脾臓細胞へ与える影響が異なるのかを明らかにするために、1 日 5 時間の拘束ストレスを 5 日間繰り返した場合と、1 日負荷した場合を比較した。その結果、3 時間の拘束ストレスでは発現増加がみられなかった Bnip3 や Trp53inp1 の発現増加がみられた (図 5)。また、5 時間の拘束ストレスでは Gilz や Bnip3 の発現量において、BALB/c マウスでは C57BL/6 マウスに比較し有意に高い発現誘導が見られた。

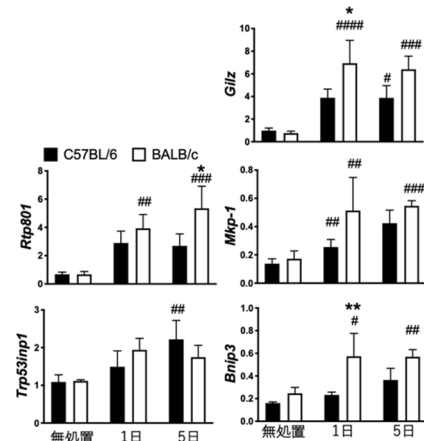


図 5 繰り返しストレスによる遺伝子発現への影響

(6) 拘束ストレスによる免疫細胞への影響

5 日間繰り返し拘束ストレスを負荷した時のマウス脾臓細胞への影響を明らかにするために、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、および Treg 細胞の増減を検討した。全脾臓細胞数は BALB/c、C57BL/6 マウス共に無処置マウスに比較しストレス負荷後では有意に減少していた (図 6)。さらにそれぞれの細胞集団別に見てみると、T 細胞、B 細胞、NK 細胞は両系統ともに、ストレス負荷後に有意に減少していたが、Treg 細胞の割合は C57BL/6 マウスでは減少が見られたが、BALB/c マウスでは変化は見られなかった。

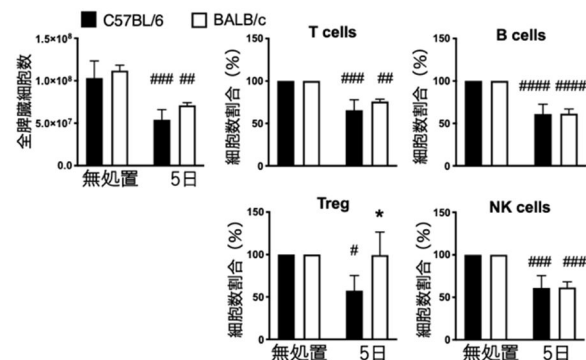


図 6 拘束ストレスによる免疫細胞への影響

(7) コルチコステロンの上流の調節機能の解析

コルチコトロピン放出ホルモン (CRH) の遺伝子欠損マウス (KO) を用いて、コルチコステロンが産生されない条件下でのストレス関連遺伝子の発現について検討を行った。GR の発現量にはコルチコステロンは影響が見られなかった (図 7)。また、拘束ストレスにより有意に増加がみられる Rtp801、Gilz、Mkp-1 は CRHKO マウスでは発現増加がみられず、これら遺伝子の発現はコルチコステロン量に依存していることが確認された。

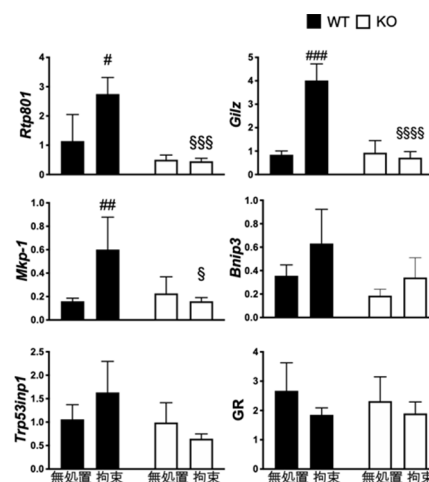


図 7 CRH KO マウスにおける遺伝子発現の変化

以上の結果より、ストレスによるこれまでに報告されているストレス関連遺伝子 (Rtp801、Gilz、Mkp-1) の発現量はマウス系統による違いはみられなかった。しかしながら、Bnip3、Trp53inp1 のように長期ストレス (繰り返しストレス) を負荷しないと増加が認められない遺伝子もあり、さらに検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koyanagi Madoka, Arimura Yutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparative Expression Analysis of Stress-Inducible Genes in Murine Immune Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunological Investigations	6. 最初と最後の頁 1~19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08820139.2019.1702673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川あゆ子 工藤柚佳 戸ヶ崎萌加 小柳円 有村裕
2. 発表標題 グルココルチコイドレセプター多型によるストレス感受性の相違
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----