

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590661

研究課題名（和文）慢性心理ストレス誘発の生体機能異常と骨髄由来ミクログリアの関連検索

研究課題名（英文）Studies of the relationship between organic functional disorders induced by chronic psychological stress and bone marrow-derived microglia

研究代表者

安宅 弘司 (KOJI ATAKA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30563358

研究成果の概要（和文）：慢性心理ストレスでは、骨髄由来ミクログリアが視床下部・室傍核に浸潤し、その骨髄由来ミクログリアは化学遊走因子受容体である CX3CR1、の発現は低く CCR2、CXCR4 の発現が高かった。慢性心理ストレスは室傍核での化学遊走因子 MCP-1（CCR2 がその受容体）が増加し、骨髄内において化学遊走因子 SDF-1（CXCR4 がその受容体）が減少した。CCR2 拮抗剤またはアドレナリン受容体拮抗剤投与で骨髄由来ミクログリア浸潤は抑制された。慢性心理ストレスにおいて、脳はアドレナリン作動性神経を介し骨髄内 SDF-1/CXCR4 相関を抑え骨髄細胞を血中へ移行させ、一方、視床下部内 MCP-1/CCR2 相関増加により骨髄由来ミクログリアを集積させる、脳・骨髄相関が存在することを示唆できた。

研究成果の概要（英文）：Here we show that bone marrow-derived microglia specifically infiltrate the paraventricular nucleus (PVN) of mice that received chronic psychological stress. Bone marrow derived-microglia are CX3CR1<sup>low</sup>CCR2<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup>, as distinct from CX3CR1<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup>CXCR4<sup>low</sup> resident microglia, and express higher levels of interleukin-1 $\beta$  but lower levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ . Chronic psychological stress stimulates the expression of monocyte chemotactic protein-1 in PVN neurons, reduces stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) in the bone marrow and increases the frequency of CXCR4<sup>+</sup> monocytes in peripheral circulation. And a chemokine (C-C motif) receptor (CCR)2 or a  $\beta$ 3-adrenoceptor blockade prevents infiltration of bone marrow-derived microglia in the PVN. In conclusion chronic psychological stress induces the infiltration of bone marrow-derived microglia into PVN, and it is conceivable that the  $\beta$ 3-adrenergic pathway and the CCR2/MCP-1 axis are involved in this mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計			4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：ストレス科学

## 1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは中枢神経系の免疫担当細胞であり、炎症、虚血などの急性傷害に対して神経細胞に保護的に働くと考えられてきたが、最近、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病などの変性疾患にも関与していることが指摘されている。ミクログリアは胎児期や新生児期に脳に移行し、そこで増殖・分化をされると考えられていたが（レジデントミクログリア）、蛍光色素強制発現マウス（GFP マウス）を使った研究によって、傷害脳の修復や神経の変性機転にミクログリアが働く場合、骨髄単球由来のミクログリアが脳血液関門を通過し脳実質内に移行しその機能を果たすことが明らかになっている。一方、研究分担者の藤宮らは、GFP マウスの骨髄細胞を野生株マウスに移植したキメラマウスを高血糖状態にしたところ、骨髄由来（GFP 陽性）単球細胞が後根神経節の神経細胞と細胞融合し、糖尿病性神経傷害を引き起こすことを発見した。そこで我々は GFP キメラマウスを使って脳における骨髄由来細胞について検討したところ、16 時間絶食で GFP 陽性かつミクログリアマーカーである Iba-1 陽性細胞が視床下部室傍核に集積し、再食後 3-4 時間でその集積が消失することを発見し、摂食リズムに応じて短時間で骨髄由来ミクログリアの分布に変化が起きることがわかった。絶食はストレス刺激のひとつと考えられることから、高血糖状態による末梢神経傷害だけでなく、ストレス刺激にตอบสนองして骨髄由来細胞がミクログリアとして脳内に侵入して神経活動に影響を与え、さまざまな生体反応を引き起こすのではないかとこの発想を持つに至った。そこで我々は、コミュニケーションボックス装置による慢性心理ストレスを GFP キメラマウスに与えたところ、視床下部室傍核に GFP 陽性かつ Iba-1 陽性細胞の集積を発見した。

## 2. 研究の目的

視床下部は摂食や消化管機能など生体機能維持に重要な役割を担っていることから、外界からの刺激に対応して骨髄由来ミクログリアが血行性に脳実質内に侵入し、自律神経中枢の機能を変化させるとすれば、ストレス科学の分野において誠に興味深い発見といえる。我々は、コミュニケーションボックス装置で慢性心理ストレスをラットに負荷すると、大腸運動に異常が起こることを別の実験で証明しており、この装置を用いたストレス負荷実験が、過敏性腸症候群を含むヒトのストレス関連疾患の実験モデルになり得ることを確認済みである。消化管機能異常、摂食異常、そして不安などのストレス関連症状に関しては、視床下部ニューロンが産生する

CRF (corticotropin-releasing factor) などの情報伝達物質を中心にさまざまな研究が進められてきているが、その発症機序はまだまだ完全には解明されておらず、副作用が少なく治癒効果の高い治療方法の開発は急務である。

## 3. 研究の方法

(1). 慢性心理ストレスにより誘導された骨髄由来ミクログリアの検索

### ①脳内分布の検索と形態学的解析

蛍光タンパク質強制発現マウスの骨髄細胞

(GFP 陽性骨髄細胞) を放射線照射後の野生株マウスの尾静脈に投与し、骨髄移植マウスを作成する。移植 8 週間後、骨髄移植マウスにコミュニケーションボックス装置で心理ストレスを 1 日 1 時間、5 日間連続で負荷する。5 日目のストレス負荷後、脳切片を作成し、ミクログリアの標識 (Iba-1 抗体) を使って免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、GFP 陽性 (骨髄由来) と GFP 陰性 (レジデント) ミクログリアの脳内分布およびその形態を解析する。非ストレス負荷の骨髄移植マウスとの比較を行い、ストレスにより骨髄由来ミクログリアが集積する神経核を検索する。ストレス処置 1 日と 3 日目でも解析し経時的変化を評価する。

### ②発現する生理活性物質および受容体の解析

慢性心理ストレスを骨髄移植マウスに負荷後、脳を摘出し、ミクログリアが集積している実質部位から細胞懸濁液を調整し、MACS 装置を用いて CD11b (ミクログリア・マクロファージの表面認識抗原) 陽性細胞を分取する。さらに CD45 抗原の発現強度 (中程度がミクログリア) と GFP 発現を利用して FACS 装置で骨髄由来 (GFP 陽性) とレジデント

(GFP 陰性) ミクログリアを分別単離する。非ストレス負荷骨髄移植マウスからも同様に分別単離し、骨髄由来ミクログリアにおける IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 などのサイトカイン、nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) などの神経栄養因子、CX3CR1 などのケモカイン受容体、Tim-4 受容体などの食細胞受容体、GluRs (グルタミン受容体)、P2

purinoceptors の RNA 発現を比較し、骨髄由来ミクログリアにおけるストレス関連分子を検索する。脳切片を作成し免疫組織染色においても確認する。またレジデントミクログリアについても解析し、ストレス関連物質が骨髄由来ミクログリアに特有であることを確認する。

### ③慢性心理ストレス誘発の消化管運動異常および不安との関連

野生株マウスまたはラットに慢性心理スト

レスを負荷する。5 日目のストレス負荷前から消化管内圧測定を開始し、ストレス処置前、中、後の消化管運動（胃、十二指腸、大腸）を連続して観察し、ストレスによる変動を評価する。また不安行動については、5 日目のストレス負荷後に高架式十字迷路装置を使って評価する。

#### ④ストレス指標としての脳内モノアミン濃度と血中 ACTH の測定

骨髄由来ミクログリアが集積する部位にマイクロダイアリス用プローブを留置した野生株マウスまたはラットに慢性心理ストレスを負荷する。5 日目のストレス負荷前、中、後でのストレス強度の指標であるノルアドレナリンの濃度変化をマイクロダイアリス装置で測定し、また末梢血中の副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）についても測定し、コミュニケーションボックス装置でストレスが負荷されているかを確認する。

#### （2）慢性心理ストレスにより誘導された骨髄由来ミクログリアが標的とする神経細胞の検索

##### ①標的となる神経細胞の検索

骨髄移植マウスに慢性心理ストレスを負荷後、脳切片を作成し、集積している部位（神経核）で優位なペプチド含有神経細胞の抗体とミクログリアの標識（Iba-1 抗体）を使って免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、骨髄由来（GFP 陽性）およびレジデント（GFP 陰性）ミクログリアとペプチド含有神経細胞との位置関係を解析する。また、IL- $\beta$ 、IL 1 受容体、リン酸化 NMDA 受容体抗体で免疫染色し、神経管情報伝達が亢進している可能性について検索する。

##### ②ミクログリア誘導物質の検索

骨髄移植マウスに慢性心理ストレス負荷後、骨髄由来ミクログリアが集積した部位（神経核）の切片を作成し、（2）-①で確認できた骨髄由来ミクログリアが密着している神経細胞が含有するペプチドの抗体と CX3CL1、CCL21 などケモカインの抗体を使って免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、ミクログリアが標的とした神経細胞でのケモカイン産生を解析する。また、骨髄よりミクログリア前駆細胞放出に関与する骨髄内 SDF-1 濃度についても検索する。

## 4. 研究成果

### （1）慢性心理ストレスにより誘導された骨髄由来ミクログリアの検索

#### ①脳内分布の検索と形態学的解析

GFP トランスジェニックマウスの骨髄を移植し骨髄細胞のみ GFP 陽性細胞にした GFP キメラマウスに慢性心理ストレスを負荷したところ、視床下部・室傍核に GFP 陽性細胞の集積が確認できた（図 1 A, B）。

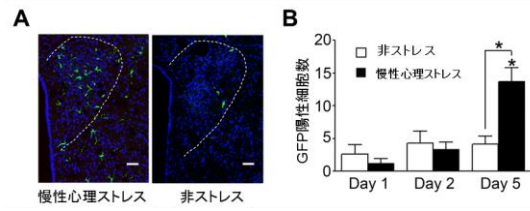


図 1 慢性心理ストレスによる GFP 陽性細胞の集積

GFP キメラマウスを作成する際に全身放射線照射し GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を骨髄移植するが、その放射線照射による脳・血液関門の透過性亢進が懸念されることから、頭部を鉛ブロックで保護し放射線照射および骨髄移植を行い作成した GFP キメラマウスを使った場合においても、室傍核への集積が起ることを確認した。また、集積した GFP 陽性細胞はミクログリアマーカーである Iba-1 抗体陽性であり、アストロサイトマーカーである GFAP 陰性であった（図 2 A, B）。

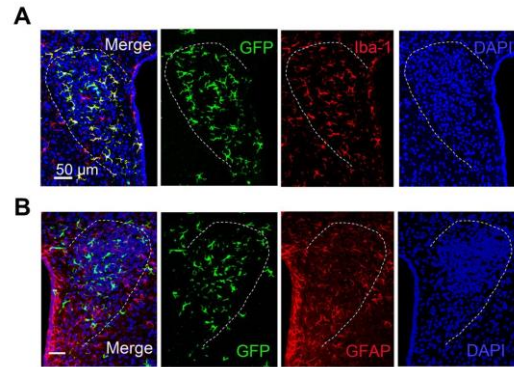


図 2 GFP 陽性細胞は Iba-1 陽性細胞である。

### ②発現する生理活性物質および受容体の解析

	Resident microglia	BM-derived microglia
CCR2	-	+++
CX <sub>3</sub> CR1	+++	+
CXCR4	+	+++
EAAT1	+++	+
P2Y12	+++	+
IL-1 $\beta$	+	+++
TNF- $\alpha$	+++	+
Cells in PVN	+/-	+++

上表のように慢性心理ストレスはレジデントと骨髄由来ミクログリアの mRNA 発現に影響は及ぼさなかった。レジデントミクログリアとは異なる発現様式を持つ骨髄由来ミクログリアが室傍核に集積していることがわかった。

③慢性心理ストレス誘発の消化管運動異常および不安との関連

慢性心理ストレス負荷によって空腹期胃運動が低下し、延期結腸の運動が亢進することを確認した。これはヒトでの上部消化管機能異常、下痢型過敏性腸症候群などストレス関連消化管機能異常に類似していることから、コミュニケーションボックスでの心理ストレスはヒトでのストレスと近いものであることが分かった。また、慢性心理ストレス負荷動物の視床下部において、ウロコルチン3、バソプレッシン、オキシトシンの発現が増加し、ウロコルチン3抗血清の脳室内投与で胃運動抑制が改善でき、バソプレッシン受容体拮抗剤で遠位結腸運動異常胃が改善できた。オキシトシンに関しては、おそらくストレスに対する「慣れ」に関する報告があることから、この実験系においても「慣れ」を起こすように働きかけるが、ストレスに対する反応性が勝っていると考えられる。以上のことから、慢性心理ストレスにおけるバソプレッシン、ウロコルチン3を介した脳・腸相関を提唱するに至った(図3)。

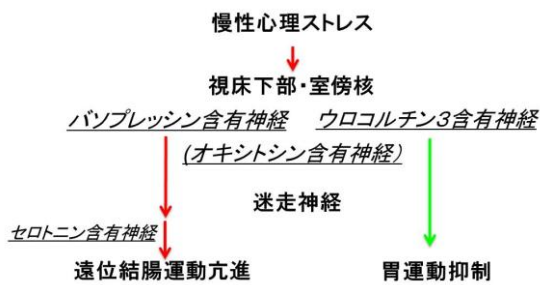


図3 慢性心理ストレスにおける脳・腸相関

また、慢性心理ストレス負荷は高架式十字迷路によるオープンアーム滞在時間で不安行動を評価した結果、不安が惹起していることが分かった(図4、オープンアーム滞在時間が短いほうが不安を示す)。

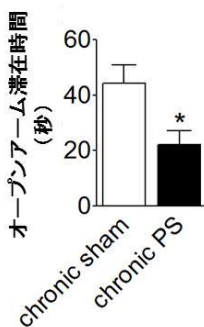


図4 慢性心理ストレスと不安行動

④ストレス指標としての脳内モノアミン濃度と血中 ACTH の測定

慢性心理ストレス負荷では、ストレス指標となる脳内ノルアドレナリンおよび末梢血中 ACTH が、コントロール(飼育のみ)および非ストレス(コミュニケーションボックス装置にだけ)に比較して上昇していることを確認した(図5)。

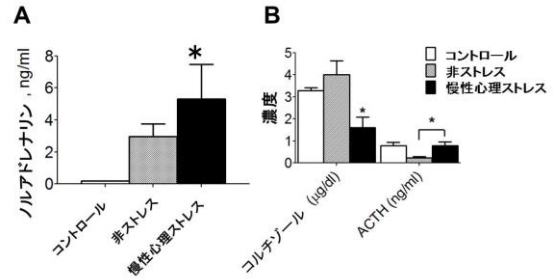


図5 脳内ノルアドレナリン、血中 ACTH 濃度が負荷されているかを確認する。

(2) 慢性心理ストレスにより誘導された骨髄由来ミクログリアが標的とする神経細胞の検索

①標的となる神経細胞の検索

GFP 陽性細胞(骨髄由来ミクログリア)は室傍核のバソプレッシン抗体陽性細胞に密接して集積していることが分かった(図6)。

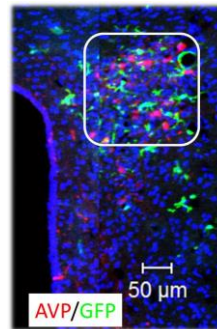
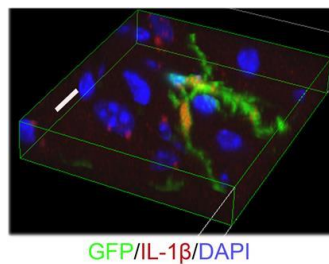


図6 バソプレッシン陽性細胞(AVP)に密接する GFP 陽性細胞

GFP 陽性細胞は IL-1 $\beta$  抗体陽性であり(図6 A)、その GFP 陽性細胞の近傍にリン酸化 NMDA (活性型 NMDA) 受容体または IL-1 受容体抗体陽性神経細胞が存在していることがわかった(図7 B, C)。

A



GFP/IL-1 $\beta$ /DAPI

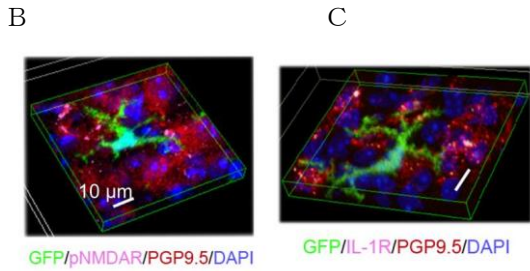


図7 GFP 陽性細胞は IL-1 $\beta$  陽性であり、リン酸化 NMDA 受容体陽性または IL-1 受容体陽性神経細胞 (PGP9.5: 神経細胞マーカー) と密接して存在している

②ミクログリア誘導物質の検索

慢性心理ストレス負荷動物の視床下部において、化学遊走因子である MCP-1 の mRNA 発現が増加し、免疫染色においても MCP-1 抗体陽性神経細胞ならびに MCP-1 陽性 GFP 陽性細胞を確認した (図 8 A, B 矢印)。さらに MCP-1 受容体拮抗剤投与で GFP 陽性細胞の集積が抑制できた (図 8 C)。

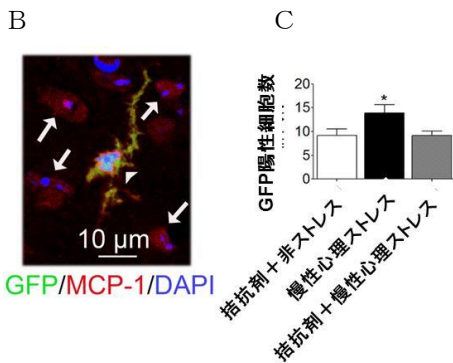
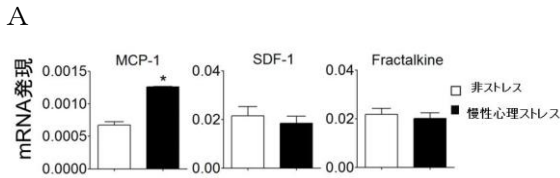


図8 脳内 MCP-1 発現と MCP-1 拮抗剤の効果

慢性心理ストレス負荷動物において骨髄内の SDF-1 濃度が低下し (図 9 A)、骨髄内 SDF-1 濃度を調整する、アドレナリン作動性神経拮抗剤投与により GFP 陽性細胞の集積が抑制できた (図 9 B)。

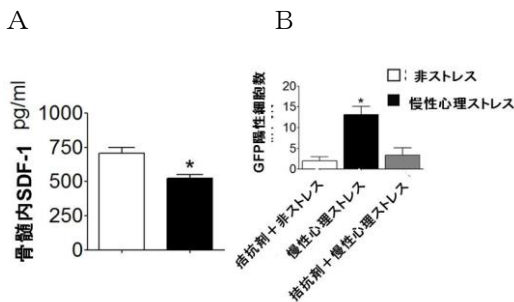


図9 骨髄内 SDF-1 濃度とアドレナリン作動性神経拮抗剤の効果

まとめ

以上のことから、慢性心理ストレスでのウロコルチン 3 およびバソプレッシン含有神経を中心とした新たな脳腸相関を提唱するだけでなくとどまらず、あらたな脳・骨髄相関を提唱するに至った (図 10)。

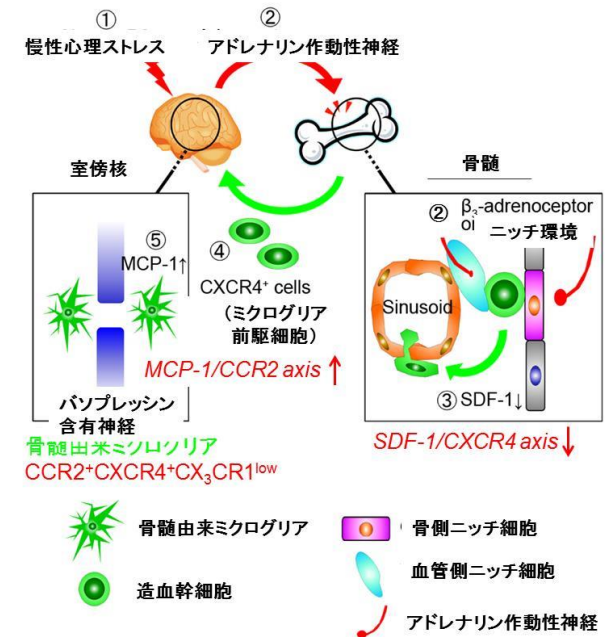


図10 慢性心理ストレスにおける脳・骨髄相関

①慢性心理ストレスが負荷されると、②アドレナリン作動神経を介して脳から骨髄ニッチ環境へ情報が伝えられ、③SDF-1 産生が抑制されることで骨髄内 SDF-1 濃度が低下し、④ミクログリア前駆細胞が末梢血に流出する。⑤一方、慢性心理ストレスは視床下部・室傍核の MCP-1 を増加させ、骨髄由来細胞を引き寄せ、バソプレッシン含有神経近傍へ浸潤させる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ataka K, Nagaishi K, Asakawa A, Inui A, Fujimiya M. Alteration of antral and proximal colonic motility induced by chronic psychological stress involves central urocortin 3 and vasopressin in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 Aug 15;303(4):G519-28. (査読有)
- ② 安宅弘司、藤宮峯子 ストレスと骨髄由

来ミクログリア 医学のあゆみ 238  
2011 961-967 査読無

〔学会発表〕(計3件)

- ① 安宅弘司、藤宮峯子 ストレスと骨髄由来ミクログリア 第3回日本IBS研究会 2013年3月23日 鹿児島市 かがしま県民交流センター
- ② 安宅弘司、永石歆和、藤宮峯子 ストレスと骨髄由来ミクログリア 第117回日本解剖学会 2012年3月27日 甲府山梨大学
- ③ Koji Ataka, Kanna Nagaishi, Mineko Fujimiya Chronic psychological stress accelerates proximal colonic motility via vasopressin V1b receptor in unrestrained conscious rats Digestive Disease Week 2011 May 09, 2011 Chicago USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安宅 弘司 (ATAKA KOJI)  
札幌医科大学、医学部 助教  
研究者番号：30563358

### (2) 研究分担者

藤宮 峯子 (FUJIMIYA MINEKO)  
札幌医科大学 医学部 教授  
研究者番号：10199359  
永石 歆和 (NAGAISHI KANNA)

札幌医科大学 医学部 講師  
研究者番号：30544118

### (3) 連携研究者

浅川 明弘 (ASAKAWA AKIHIRO)  
鹿児島大学 医歯(薬)学総合研究科  
准教授  
研究者番号：10452947