

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461521

研究課題名(和文) 幼若期ストレスが惹起する脳サイトカインネットワークの構築異常の解明

研究課題名(英文) Elucidation of construction abnormality of brain cytokine network caused by juvenile stress

研究代表者

平澤 孝枝 (HIRASAWA, Takae)

帝京大学・理工学部・講師

研究者番号：10402083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生後1日目より7日間母子分離ストレスを与え、マウスの生後7日齢の脳、脾臓等採取した。生後7日齢で母子分離群のミクログリア細胞はコントロール群とは異なり、F4/80陰性細胞のミクログリアであった。ウェスタンブロッティング法によってミクログリア特異的タンパク質の発現量は母子分離群で有意に低下していた。FACS法を用いてミクログリア細胞の細胞特性を解析した結果、純粋なミクログリア細胞を単離した。単離されたミクログリア細胞はFACS解析からその性質が3種類の亜集団に分離することがわかった。以上の結果から幼若期にストレスを与えられるとミクログリアの由来や質が変わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The brain, spleen, liver, and the bone marrow in the mouse gave maternal separation stress for seven days were harvested for this study. As the results showed, the microglia in separation group was the F4/80 negative cell while the microglia cell in control group was F4/80-positive cells. The expression of the microglial specific protein significantly decreased in the brain by the western blotting in separation group. However there were no significant effect in spleen. Moreover, the cell properties of the microglial cells isolated a pure microglial cells by FACS method. As for the isolated microglial cell, the property parts from FACS analysis for three group populations, and it is suggested that the origin of microglia may change by pre or postnatal stress and it may affect to the adult stage brain immunity.

研究分野：神経科学

キーワード：母子分離ストレス ミクログリア

### 1. 研究開始当初の背景

脳内においてこの免疫防御を担っているものはミクログリアであり、通常体内免疫細胞が侵入出来ない様に血液脳関門 (Blood-Brain-Barrier; BBB) で防御されている。脳内免疫を担うミクログリアは骨髄由来を起源としており、他の脳を構築する神経細胞やグリア細胞とは別の起源をもっている。また、末梢のマクローファージや B,T 細胞とは形態が異なり、脳内免疫の発達は末梢のマクローファージが BBB の完成前に浸潤するのを最後に中枢神経独自のサイトカインネットワークを構築している。しかし、一旦虚血や炎症反応が脳内に起こるとマクローファージや好中球の浸潤が起こり炎症性のサイトカインを放出する。これまでに研究代表者は、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアの発生学的解析を行うため、ミクログリアを可視化した遺伝子改変マウス (Iba1-GFP トランスジェニックマウス) を作出し、ミクログリアが発生期に造血幹由来のマクローファージから分化し生後 1 週間で脳梁より浸潤後脳全体に拡散し成熟していく様子を解析している。また、幼若期のストレスが生後の脳機能形成に影響があり、ストレスホルモンが神経細胞の活性化と興奮性の活性化に寄与する神経細胞の同期性やネットワーク構築に関与する知見を得ている。しかし、浸潤、発達する時期の幼若期ストレスが脳内の免疫システムの発達についてどのように関与しているか、生後のミクログリアの発達への影響は不明である。研究代表者は成人後の脳内免疫を担うミクログリアの発達は幼児期に完成され、この時期の異常が成人後の脳内免疫や脳機能の恒常性に関与するのではないかという着想に至った。

### 2. 研究の目的

幼児期の脳機能発達と成人後の精神疾患は密接な関係をもっている。脳内環境の恒常性を司るミクログリアはこれらの精神疾患や発達障害の患者では活性化している事が既に報告されているが、脳機能の発達過程におけるミクログリアの働きは不明な点が多い。

生体内の免疫機構は生後初期の母親から受け継いだ「自然免疫」と生後の過程での「獲得免疫」がつけられ、この時期の養育環境や栄養、ストレスを含む環境因子は成熟後の免疫制御機構や脳内免疫機構に影響があると考えられるが、脳内における小児免疫発達の具体的なメカニズムは不明である。本研究では幼若期ストレスが脳内ミクログリアの発達を遅延、異常を起こすことを見出すのを目的とし、脳発達過程での脳内免疫獲得機構のメカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

幼若期ストレス負荷マウスによるミクログリアの発達の動態・・・1日3時間の母子

分離ストレスを負荷したマウスはストレス感受性の低下や免疫制御組織の発達遅滞がこれまでの実験で分かっている。そこで同様な現象が脳内で引き起こされているのかを確認し、その動態を生後の発達と共に追跡する。具体的には生後 1 日目より 1 日 1 時間の母子分離ストレスを仔マウスに 7 日間負荷する。負荷後経時的に脳、脾臓、リンパ節、胸腺、骨髄をサンプリングし、FACS ソーター、免疫染色、real-time PCR, western blotting, ELISA 法にて関連分子の発現動態と追跡を行う。

### 4. 研究成果

生後 1 日目より 1 時間、生後 7 日齢まで母子分離ストレスを与えたマウスを生後 7 日齢、14 日齢、21 日齢で脳、脾臓、肝臓、骨髄を採取した。形態学的解析において、生後 7 日齢ではミクログリアは脳室内からアメボイド様浸潤するが、F4/80 陽性細胞を持った細胞がコントロール群では確認された。しかし、母子分離群は F4/80 陰性細胞のミクログリアであった。F4/80 陽性のマクローファージは卵黄嚢由来と考えられるが陰性細胞は骨髄由来と示唆され、ストレスによってミクログリアの由来の違いがあることが示唆された。さらに、これらのミクログリアは OX42 陰性細胞であるため活性化型ミクログリアではないと推察された (図 1)。

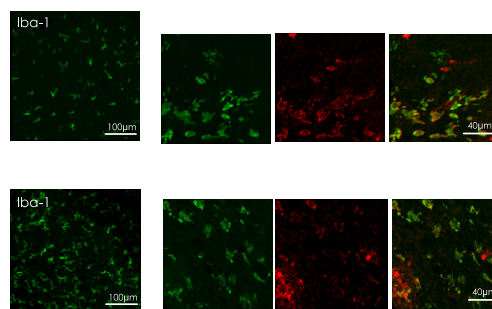


図 1 生後 7 日齢マウス脳内のミクログリアにおける F4/80 の発現 上段：コントロール群、下段：母子分離群

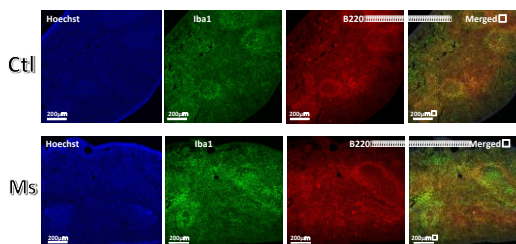


図 2 生後 7 日齢マウス脾臓のマクローファージ細胞における B220 の発現 上段：コントロール群、下段：母子分離群

脾臓において生後7日齢では、胚中心の形成が不完全であることが分かった(図2)。ウェスタンブロッティング法によって各組織のマクロファージ系タンパク質の発現量を測定した結果、脳では生後7日齢でミクログリア特異的タンパク質 Iba1, CD11b/c の発現量は母子分離群で有意に低下していたが、脾臓では、両群ともに差がなかった。したがって、脳内免疫システムは他免疫器官とは別に独自で働いていることを示唆した(図3)。一般的に行われているセルストレイナーによる物理的な分離方法では脳組織では血球マーカーである CD45 陽性群においてほとんどが均一な CD11b の発現を示す細胞であった。一方、免疫組織染色の結果から F4/80 の染色性が均一ではない可能性が示唆された。すなわち、ミクログリアの表面抗原の染色性が均一ではなく、ヘテロな集団であることが示唆された。そこで本研究では FACS (フルオサイトメトリー法) を用いてミクログリア細胞の細胞特性を解析した。その結果、より純粋なミクログリア細胞を単離することに成功し

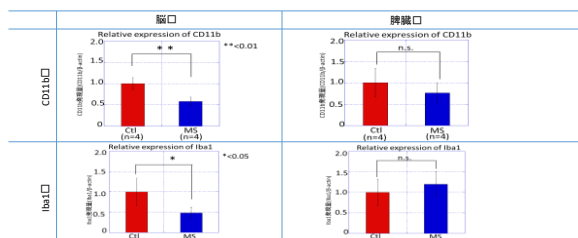


図3 生後7日齢マウス脳、脾臓におけるウェスタンブロッティング法による Iba1、CD11b の発現  
上段：コントロール群、下段：母子分離群

た。単離されたミクログリア細胞は FACS 解析からその性質が3種類の集合に分けることが可能になった。さらに母子分離群において胎生期から生後初期の造血器官である肝臓のマクロファージ系細胞の低下が確認された。このことから、形態学的解析による結果と相関性がみられ、幼若期ストレスにおけるミクログリアの起源が肝臓ではなく、骨髄由来に変化することが分かった。これらの由来の違いが生後のミクログリアの性質にどのような変化を与えるのかが次の課題になると思われる。

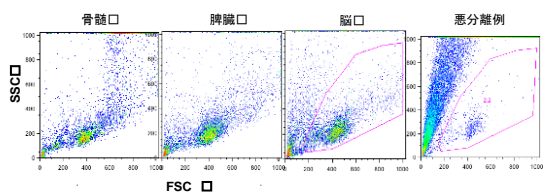


図4 生後7日齢マウス骨髄、脾臓、脳のマクロファージ系細胞における分離調整の結果

## 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9件)

- ① Protein-restricted diet during pregnancy after insemination alters behavioral phenotypes of the progeny. Furuse T, Miyake K, Kohda T, Kaneda H, Hirasawa T, Yamada I, Kushida T, Kashimura M, Kobayashi K, Ishino F, Kubota T, Wakana S. *Genes Nutr.* 12:1. 2017 doi: 10.1186/s12263-016-0550-2. eCollection 2017. (査読有)
- ② Repression of Wnt/ $\beta$ -catenin response elements by p63 (TP63). Katoh I, Fukunishi N, Fujimuro M, Kasai H, Moriishi K, Hata R, Kurata S. *Cell Cycle.* 15(5):699-710. 2016, doi:10.1080/15384101.2016.1148837. (査読有)
- ③ Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, Yamashita A, Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, Moriishi K. *Sci Rep.* Nov 23;5:17047. 2015 doi: 10.1038/srep17047. (査読有)
- ④ Involvement of FKBP6 in hepatitis C virus replication. Kasai H, Kawakami K, Yokoe H, Yoshimura K, Matsuda M, Yasumoto J, Maekawa S, Yamashita A, Tanaka T, Ikeda M, Kato N, Okamoto T, Matsuura Y, Sakamoto N, Enomoto N, Takeda S, Fujii H, Tsubuki M, Kusunoki M, Moriishi K. *Sci Rep.* Nov 16;5:16699. 2015 doi: 10.1038/srep16699. (査読有)
- ⑤ Maternal restraint stress during pregnancy in mice induces 11 $\beta$ -HSD1-associated metabolic changes in the livers of the offspring. Maeyama H, Hirasawa T\*, Tahara Y, Obata C, Kasai H, Moriishi K, Mochizuki K, Kubota T. *J Dev Orig Health Dis.* Apr;6(2):105-14. doi: 10.1017/S2040174415000100. (査読有) 2015 \*corresponding author
- ⑥ Long-term imipramine treatment increases N-methyl-d-aspartate receptor activity and expression via epigenetic mechanisms. Nghia NA, Hirasawa T\*, Kasai H, Obata C, Moriishi K, Mochizuki K, Koizumi S, Kubota T. *Eur J Pharmacol.* 2015 Apr 5; 752:69-77.

doi: 10.1016/j.ejphar.2015.02.010. Epub 2015Feb 19. (査読有) \*corresponding  
autour

- ⑦ Identification of Antiviral Agents Targeting Hepatitis B Virus Promoter from Extracts of Indonesian Marine Organisms by a Novel Cell-Based Screening Assay. Yamashita A, Fujimoto Y, Tamaki M, Setiawan A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Watashi K, Wakita T, Toyama M, Baba M, de Voogd NJ, Maekawa S, Enomoto N, Tanaka J, Moriishi K. Mar Drugs. Nov 6;13(11):6759-73. 2015 doi: 10.3390/md13116759. (査読有)
- ⑧ The epigenome in neurological disorders: a new marker for understanding neuronal dysfunction. Kubota T, Hirasawa T, Miyake K. Brain Nerve. 66(5):591-7. 2014(査読有)
- ⑨ Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepatitis C virus. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K. J Virol. 88(22):13352-66. 2014 doi: 10.1128/JVI.02280-14. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Proteasome Activator PA28 gamma regulates neuronal function of cerebellar Purkinje cells. 中村和純, 天笠太一, 鶴岡直人, 葛西宏威, 森石恆司, 平澤孝枝 第 39 回 日本分子生物学会, 12.01. 2016. パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)
- ② Synaptic dysfunction in the Glp Knockout mouse model of Kliefstra syndrome. ポスター発表, Takae Hirasawa, Ayumi Yamada, Madoka Kato, Yoichi Shinkai, Takeo Kubota. 第 39 回日本神経科学学会, 7.22. 2016 パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)
- ③ 幼若期ストレスにおけるストレス耐性機能の獲得とミクログリア、口頭発表、平澤孝枝、BMB2015 第 38 回日本分子生物学会/第 88 回日本生化学会, 12.2. 2015 神戸ポートアイランド (兵庫・神戸)
- ④ The effects of maternal malnutrition in utero on gene expression, genomic methylation and behavioral phenotypes in mouse. ポスター発表 Tamio Furuse, Takashi Kohda, Kunio Miyake, Takae Hirasawa, Tomoko Kushida et al. (第 38 回日本神経科学学会、神戸国際会議場(兵庫・神戸) 7.28. 2015
- ⑤ 胎児期ストレスとエピジェネティクス変化

平澤孝枝 口頭発表、第 3 回日本 DOHaD 研究会学術集会、国立成育医療センター、(東京・世田谷) 7.24. 2014

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/2408/32>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平澤 孝枝 (HIRASAWA, Takae)  
帝京大学・理工学部・講師  
研究者番号：10402083

### (2) 研究分担者

葛西 宏威 (KASAI, Hirotake)  
山梨大学大学院・医学工学総合研究部・微生物学講座・助教  
研究者番号：20324189

中川 竜介 (NAKAGAWA, Ryusuke)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：10360603

平成 27 年 9 月 24 日より削除。

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )