

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09162

研究課題名(和文) うつ病モデルマウスにおける骨髄単球系細胞の動態制御を標的とした動脈硬化予防戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for atherosclerosis by regulating myeloid lineage cells in socially defeated mice

研究代表者

山田 浩之 (Yamada, Hiroyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00240036

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)：うつ病は心血管病発症の独立した危険因子であり、心血管病患者の予後にも影響することが知られている。申請者らは、うつ様行動を示すモデルマウスを作製し高コレステロール食負荷を加えたところ、対照マウスと比較して動脈硬化形成が有意に増大した。骨髄および末梢血中における好中球分画の増加を認め、動脈硬化巣における好中球細胞外トラップ形成の亢進を認めた。細胞外トラップ形成を阻害するDNase Iを投与したところ、増悪した動脈硬化形成は対照マウスと同等まで抑制された。うつ様行動を示すマウスでは、好中球が細胞外トラップ形成を介して心血管病の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Depression is an independent risk factor of cardiovascular disease (CVD); however, the causal association remains undefined. We exposed mice to repeated social defeat (RSD) to precipitate depressive-like behaviors, and investigated the effects on atherosclerosis. Defeated mice showed higher increase in atherosclerotic lesion areas in the aortic root and entire aorta than control mice. While Ly-6G- and Mac3-positive areas in the aortic root were comparable between the groups, citrullinated histone H3 (Cit-H3)- and myeloperoxidase (MPO)-positive areas, markers of neutrophil extracellular traps (NETs), were significantly increased in the defeated mice. Treatment with DNase I completely diminished the exaggerated atherosclerosis. Our findings demonstrate that exposure to RSD promotes atherosclerosis by augmenting NETs formation within the plaque. This provides new insight into the underlying mechanism of depression-related CVD.

研究分野：内科学

キーワード：うつ病 動脈硬化 好中球細胞外トラップ

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病患者は世界中で近年増加の一途をたどり、2030年には健康な日常生活を脅かす三大疾病の一つに挙げられている。うつ病の発症には、反復ストレスに対する視床下部-下垂体-副腎系や交感神経系の異常応答が関与し、心血管病の発症にも影響していると考えられてきた。近年、うつ病患者における血中炎症性サイトカイン濃度の上昇や、種々の慢性炎症性疾患(慢性関節リウマチ、膠原病等)との高い合併率が報告されており、免疫応答を介した慢性炎症がその基盤病態として注目されている。しかしながら、うつ病の発症と動脈硬化形成との因果関係を慢性炎症の観点から直接明らかにした研究は殆どない。

## 2. 研究の目的

うつ病発症における骨髄単球系細胞の分化・増殖機構に焦点を絞り、動脈硬化形成機序との因果関係を遺伝子改変動物を用いた個体レベルで明らかにするとともに、心血管病発症予防における新たな治療標的を同定することである。

## 3. 研究の方法

### 1) うつ病モデルマウスの作製および動脈硬化形成、末梢血単球系分画の解析

8週齢の雌アポE欠損マウスにアグレッサーマウス(CD-1)を用いてソーシャルデフィートストレスを連日10日間加え、11日目にソーシャルインタラクション試験およびテイルサスペンション試験を実施し、うつ病モデルマウスの基準が満たされていることを確認する。10週齢より普通食または高コレステロール食を6週間与えた後、大動脈および大動脈弁輪部の動脈硬化形成を対照マウスと比較検討する。

### 2) うつ病モデルマウスの骨髄における単球系前駆細胞分画の解析

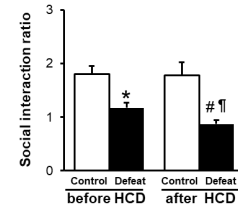
ソーシャルデフィートストレス負荷直後及び4週後の骨髄細胞を用いて、骨髄単球系細胞の表現型を解析する。Lin陽性(CD3e、CD4、CD8a、CD19、B220、Gr-1)細胞をネガティブセレクション後、造血幹細胞(HSCs: Hematopoietic stem

cells、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup>)、骨髄前駆細胞(MP: myeloid progenitors、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup>)、単球前駆細胞(promonocytes、Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>)分画を其々同定し、その発現様式を両群間で比較する。

## 4. 研究成果

### 1) うつ病モデルマウスにおける行動様式評価

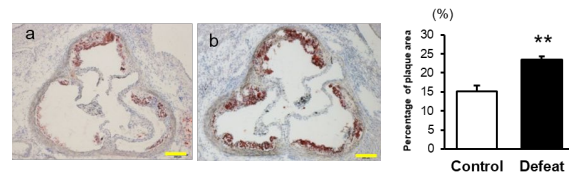
作製したうつ病モデルマウスにおけるソーシャルインタラクション試験をソーシャルデフィートストレス直後および高コレステ



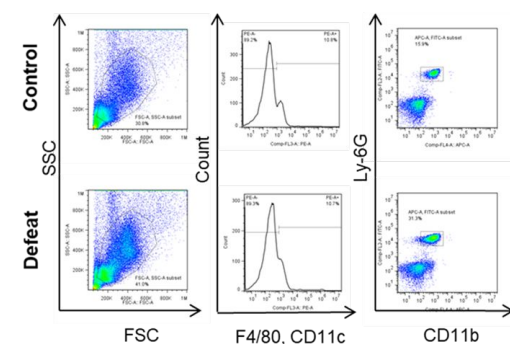
ロール食(HCD)負荷後において実施した。ソーシャルデフィートストレス直後におけるソーシャルインタラクション比はうつ病モデルマウス(Defeat)において有意に低下し、HCD負荷後においてもその効果は持続していた。更に興味深いことに、うつ病モデルマウスにおけるHCD負荷後のソーシャルインタラクション比は、負荷前に比べて有意に低下していた。うつ病モデルマウスでは、HCD負荷がうつ様行動様式を増悪させる可能性が示唆された。

### 2) うつ病モデルマウスにおける動脈硬化形成

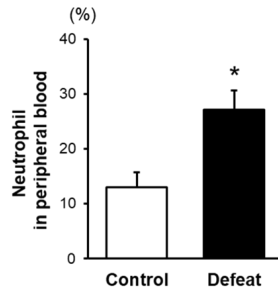
高コレステロール食6W負荷後における動脈硬化領域は、うつ病モデルマウスにおいて有意に増大していた。



### 3) うつ病モデルマウスにおける抹消血好中球解析



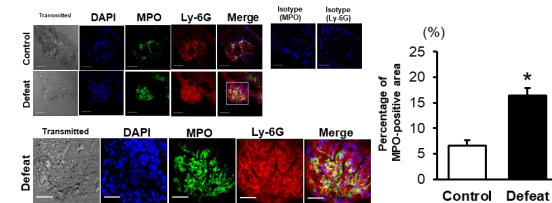
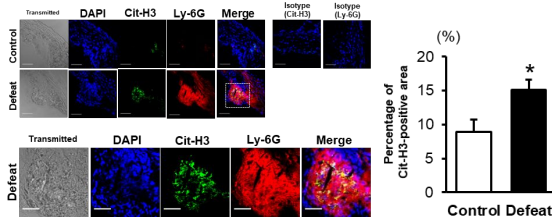
うつ病モデルマウスにおける骨髓単球系前駆細胞および末梢血単球分画の解析を実施したが、予想に反して両群間に差を認め



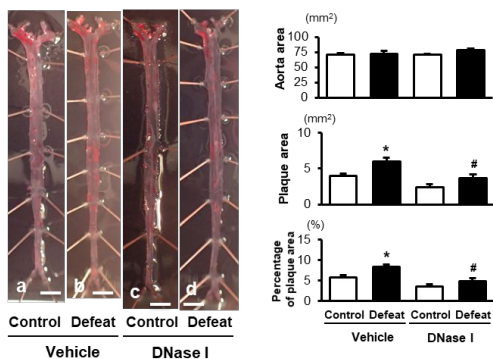
なかった。一方、末梢血好中球分画は、うつ病モデルマウスで有意に増加していた。

）**プラーク内における好中球細胞外トラップ形成**

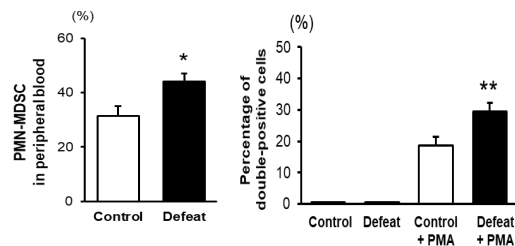
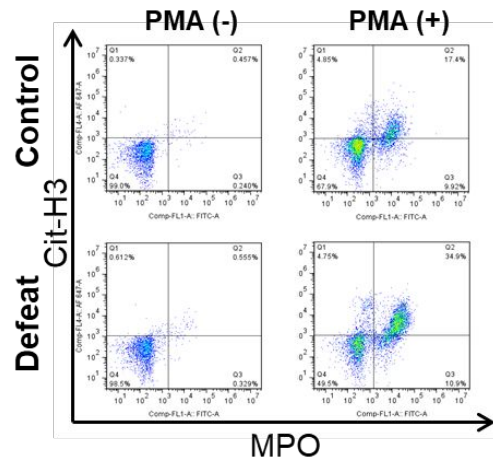
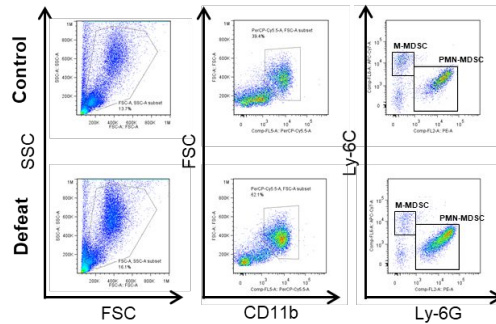
プラーク内における Mac-2 陽性および Ly-6G 陽性領域は両群間で差を認めなかった。一方、好中球細胞外トラップのマーカとなる Cit-H3 および MPO 陽性領域はうつ病モデルマウスにおいて有意に増加していた。



）**DNaseI 阻害薬投与マウスにおける動脈硬化形成** 好中球細胞外トラップ形成を阻害する DNaseI 阻害薬を投与したうつ病モデルマウスでは動脈硬化形成が有意に抑制され、対照マウスとの差が消失した。



）**うつ病モデルマウスにおける好中球 PMN-MDSC (polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells) 分画の解析** うつ病モデルマウスの骨髓 PMN-MDSC 分画は著明に増加し、PMA 刺激による細胞外トラップ形成は有意に亢進していた。



うつ病モデルマウスにおける動脈硬化進展機序に着目し、1) うつ病モデルマウスでは脂質プロファイル、血圧の影響を受けずに動脈硬化形成が増大していること。2) 骨髓単球系前駆細胞や末梢血単球細胞の動態には影響を与えずに動脈硬化が進展していること、3) プラーク内の好中球細胞外トラップ形成が亢進し、DNaseI 投与により抑制されることを報告した (BBRC 2018)。さらに、同モデルマウスの骨髓 MDSC 細胞を用いた機能解析において、ROS 産生、Nox2 発現亢進、PMA

刺激時における好中球細胞外トラップ形成が促進されることを確認している。このことは、ストレスによるうつ病の発症に伴い好中球 MDSC 分画が増加し、好中球細胞外トラップを介して動脈硬化形成が進展する可能性を示唆している。好中球細胞外トラップが、びらん性プラークからの急性冠症候群の発症に関与していることがヒトの病理標本において報告されている。申請者らの今回の研究成果は、うつ病患者における急性冠症候群発症のメカニズムを解明し、その予防に繋がるものと期待できる。

### 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3件)全て査読有り

1. Yamamoto K, Yamada H, Wakana N, Kikai M, Terada K, Wada N, Motoyama S, Saburi M, Sugimoto T, Kami D, Ogata T, Ibi M, Yabe-Nishimura C, Matoba S. Augmented neutrophil extracellular traps formation promotes atherosclerosis development in socially defeated apoE<sup>-/-</sup> mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018;xxx:1-7.
2. Kikai M, Yamada H, Wakana N, Terada K, Yamamoto K, Wada N, Motoyama S, Saburi M, Sugimoto T, Irie D, Kato T, Kawahito H, Ogata T, Matoba S. Adrenergic receptor-mediated activation of FGF-21/adiponectin axis exerts atheroprotective effects in brown adipose tissue-transplanted apoE<sup>-/-</sup> mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018;497:1097-1103.
3. Miyagawa K, Ogata T, Ueyama T, Kasahara T, Nakanishi N, Naito D, Taniguchi T, Hamaoka T, Maruyama N, Nishi M, Kimura T, Yamada H, Aoki H, Matoba S. Loss of MURC/Cavin-4 induces JNK and MMP-9 activity enhancement in vascular smooth muscle cells and exacerbates abdominal aortic aneurysm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017;487:587-593.

[学会発表](計9件)

1. Kikai M, Terada K, Yamamoto K,

Motoyama S, Wada N, Wakana N, Yamada H. Transplantation of brown adipose tissue inhibits atherosclerosis in apoE deficient mice via activation of FGF-21/adiponectin axis. American Heart Association (米国心臓病学会議) 2015 Nov7-11, Orland, USA

2. Kikai M, Yamada H, Terada K, Yamamoto K, Motoyama S, Wada N, Saburi M, Wakana N, Matoba S. Transplantation of brown adipose tissue inhibits atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice via 3 adrenoceptor-mediated activation of FGF-21/adiponectin axis. American Heart Association (米国心臓病学会議) 2016 Nov13-16, New Orleans, USA
3. Yamamoto K, Yamada H, Terada K, Motoyama S, Wada N, Saburi M, Kikai M, Wakana N, Matoba S. Repeated social defeat enhances neutrophil extracellular traps formation in vivo and in vitro: Potential implication in the exaggerated atherosclerosis in chronic social stress-exposed apoE<sup>-/-</sup> mice. American Heart Association (米国心臓病学会議) 2016 Nov13-16, New Orleans, USA
4. Terada K, Yamada H, Kikai M, Yamamoto K, Motoyama S, Wada N, Saburi M, Wakana N, Matoba S. Transplantation of periaortic adipose tissue inhibits atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice by exerting TGF-1-mediated anti-inflammatory response in transplanted graft. American Heart Association (米国心臓病学会議) 2016 Nov13-16, New Orleans, USA
5. Wada N, Yamada H, Motoyama S, Terada K, Yamamoto K, Saburi M, Kikai M, Wakana N, Matoba S. Epigenetic modulation of macrophage polarization toward a proinflammatory phenotype increases the susceptibility to insulin resistance in adult offspring of high-fat diet fed-dams. American Heart Association (米国心臓病学会議) 2016 Nov13-16, New Orleans, USA
6. Yamada H, Terada K, Kikai M, Yamamoto K, Motoyama S, Wada N, Saburi M, Wakana N, Matoba S. Transplantation of periaortic adipose tissue inhibits atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice by exerting TGF-1-mediated anti-inflammatory response in transplanted graft. European Society

of Cardiology (欧州心臓病学術会議)  
2017 Aug26-30, Barcelona, Spain

7. Yamamoto K, Yamada H, Terada K, Motoyama S, Wada N, Saburi M, Sugimoto T, Kikai M, Wakana N, Matoba S. Augmented neutrophil extracellular traps formation promotes atherosclerosis development in socially defeated apoE<sup>-/-</sup> mice. American Heart Association (米国心臓病学術会議) 2017 Nov12-15, Los Angeles, USA
8. Motoyama S, Yamada H, Yamamoto K, Terada K, Wada N, Saburi M, Sugimoto T, Kikai M, Wakana N, Matoba S. Repeated psychosocial stress enhances neutrophil elastase activity in adipose tissue: Possible mechanisms of highly vulnerable to diet-induced insulin resistance. American Heart Association (米国心臓病学術会議) 2017 Nov12-15, Los Angeles, USA
9. Wada N, Yamada H, Motoyama S, Yamamoto K, Terada K, Saburi M, Sugimoto T, Kikai M, Wakana N, Matoba S. Maternal high-fat diet promotes palmitate-induced inflammasome activation of bone marrow derived macrophages from adult offspring: Possible mechanisms of increased susceptibility to insulin resistance. American Heart Association (米国心臓病学術会議) 2017 Nov12-15, Los Angeles, USA

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山田 浩之 (Yamada Hiroyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 00240036