

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06020

研究課題名(和文) 心理的ストレスが免疫系を修飾するメカニズムの可視化の試み

研究課題名(英文) Attempts to visualize mechanisms by which psychological stress regulates the immune system

研究代表者

有村 裕 (ARIMURA, YUTAKA)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：10281677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：心理的ストレスは免疫系に影響を与えるため、その仕組みを理解することを目指した。まず免疫細胞でストレスにより発現が誘導される遺伝子について確認した。つぎに、それらの遺伝子の1つを利用して、ストレスによりGFP(蛍光タンパク)の発現が上昇するレポーターマウスを作成した。さらにこのマウスの性状解析を行った結果、短時間のストレス負荷では、GFP発現は変動しなかったが、長時間になるとGFP発現の上昇が認められた。即ち、ストレスを可視化することで免疫系にストレスがどのように伝わったかを調べるための道具を手に入れたので、今後、様々な実験系を組み合わせることで詳細を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代は高度ストレス社会と言われて久しい。ストレスが免疫系に影響を与える仕組みを理解できれば、対処法を考えるヒントが得られ、社会に還元できると期待される。ストレスと免疫の関係を調べるには、ヒトでは唾液や末梢血を用いているが、生体内の解析は不可能であり、また個人が有する遺伝子の差異の影響を解析するのも難しい。一方、マウスでは体が小さいため、同一個体で繰り返し時間経過を追跡するのは難しい。本研究では、ストレス量に応じて細胞中の蛍光タンパク(GFP)発現が変動するストレス可視化マウスを作成した。生体内の解析、遺伝子の影響、時間経過など新たな視点での解析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Since psychological stress affects the immune system, we aimed to understand how it works. First, we identified genes whose expression is induced by stress in immune cells. Then, using one of these genes, we generated a reporter mouse whose GFP (fluorescent protein) expression was increased by stress. Further analysis of the mice showed that the GFP expression did not change after a short period of stress, but increased after a long period of stress. In other words, we now have the tools to investigate how stress is transmitted to the immune system by visualizing it, and we next clarify the details by combining various experimental systems in the future.

研究分野：免疫

キーワード：ストレス 免疫応答 レポーターマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)社会的・心理的ストレスは生体に様々な影響をもたらすが、免疫系もその1つである。免疫系とストレスの関係をよく表している言葉として“ストレスが溜まると風邪を引きやすい”や、“気が張っていると風邪になりにくい”などがある。これらの一見相反する言葉はどちらが正しいのか、仕組みが異なるだけで両方とも正しいのか？ また過去の疫学調査によれば、極度のストレスに晒されると自己免疫疾患のバセドウ病の発症が増えることが分かっている。ストレス負荷で見られる一般的な免疫現象としては、免疫抑制(感染の重症化)、アレルギー症状や自己免疫疾患の増悪などが挙げられる。これらは多くの人に起きる現象であるが、どのように生じるのかは未解明な点が多い。恐らくストレスの種類、持続時間(短期、長期、断続的、連続的)などにより免疫系への影響は変わると予想される。

(2)しかし、この結びつきを明確に抽出するのは必ずしも容易ではない。心理的ストレスはまず脳で感知され、主に3つの経路を通して処理される。それらは、1)視床下部-下垂体-副腎皮質-糖質コルチコイド産生の経路(HPA軸)、2)交感神経系を伝って直接末梢組織にノルアドレナリンを届ける経路、3)成長ホルモンやプロラクチンなどを介した経路に分けられる。いずれの経路も明らかに免疫応答や疾患を修飾している。心理的ストレスの程度は、ヒトであればアンケートによる辛かった厭な出来事の聞き取り調査を実施して点数付けか、唾液中のアミラーゼやコルチゾルの量からある程度推定できるが、マウスでは唾液の採取は容易ではない。採取量も少ないうえ、もし麻酔を施すと、それだけでストレスホルモンであるコルチコステロン量が上昇する。血液中のコルチコステロン量は測定可能だが、どの組織・細胞にどれくらい影響したかは、推測の域を出ない。実際にストレスがどのように免疫系に影響しているのだろうか、それが本研究の「問い」である。ストレスを可視化できれば、解剖組織学的な解析に加え、免疫分野で最も強力な解析手段であるフローサイトメーター(FACS)でストレス量を測定可能になる。したがって、それぞれの細胞から組織、個体レベルまで視点を自在に移動させながら多角的に解析することが可能になる。

2. 研究の目的

(1)ストレスと免疫の関係を調べるには、ヒトでは末梢血を用いた *in vitro* 解析までは可能だが、*in vivo* の解析は不可能である。また遺伝子の改変もできない。一方、もしマウスにおいてコルチコステロンの代わりにストレス量をモニタリングできる方法があれば、解析は格段に進むはずである。そこで本研究では、ストレスを把握するために可視化を試みる。これまでにストレス時には特定の遺伝子が誘導されることが報告されている。これらの遺伝子の発現を指標にすることでストレスのモニタリングが出来ると考えられる。また、ヒトと同様に、マウスでも系統により性格が異なり、ストレス感受性も異なっており、さらに免疫応答の質も異なることが分かっている。例えば、C57BL/6 マウスの性格は不安症・臆病であり、免疫応答は1型(いわゆる細胞性免疫が主体)に傾いているが、BALB/c マウスの性格は相対的に穏やかで、免疫応答は2型(液性免疫が主体)に傾いてアレルギーに感受性と言われている。両者はストレス伝達の手要である糖質コルチコイド受容体(GR)の配列も異なる。この状況はヒトのストレス感受性の個人差に類似する。性格傾向と免疫応答はどれくらい関連するだろうか。この実験系は、性格が免疫に与える影響を解析するには極めて好都合であり、これを本研究の目的の1つとする。

(2)ヒト・マウスを問わず、従来の方法では、どの組織、どの細胞がどの程度ストレスを受けたかを直接的に知るのとは不可能であった。マウスで組織や細胞が実際にどれくらい心理的ストレスを受

けたかを視覚的にモニタリングできるようになれば画期的なことであり、今回作出を試みるようなストレス・レポーターマウスの前例はなかった。ストレスの経時的な変動量、もしくは蓄積量、免疫系に生じた変化を可視化することで、そのメカニズムを明らかにする。即ち、心理的ストレスと免疫応答の結びつきの詳細を明らかにするのが本研究の目的である。生体、組織、細胞が受けたストレス量と実際の影響を直接つなぐにはストレス・レポーターマウスは強力な武器である。国内外を見渡して現在までにこのようなマウスの報告はない。本研究ではストレス量を可視化することで免疫系に与える影響の分子機構に迫る。

3. 研究の方法

本研究では、ストレスシグナルを可視化するための遺伝子改変マウスを作出する。

(1-1) ストレスにより誘導される遺伝子の解析

そのためにまず、マウスの作出に利用する候補遺伝子として、ストレスにより発現誘導される遺伝子を文献から精査した。その結果、*Rtp80κ* (*Redd1*)、*Gilz* (*TSC22D3*)、*Mkp-1* (*DUSP1*)、*Bnip3* (*NIP3*)、*Trp53inp1* (*TP53INP1*)などが挙げられ、これらのうち、実際にどれがストレス状況下で最も誘導されるかを確認する実験を実施した。脾臓細胞に対し、ストレスの代わりに合成ホルモンのデキサメサゾン (Dex) で刺激した。また *in vivo* でも投与し、数時間後から翌日に、これらの遺伝子が発現誘導されるかを確認した。

(1-2) 異なる系統のマウス、遺伝子改変マウスを用いた解析

本研究の目的にも記載したように、マウスは系統によって免疫応答の方向性が異なる。BALB/c マウスと C57BL/6 マウスは免疫応答の質のみならず、ストレス感受性を含めた性格傾向も異なる。また両マウス系統は糖質コルチコイド受容体 (GR) のアミノ酸配列も異なるので、GR がストレス感受性の相違に関与している可能性が高い。そこで私達は GR を相互に置換した GR コンジェニック (Cg) マウスを用意し実験に使用した。さらに心理的ストレスを感じないコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) ノックアウト (KO) マウスも使用した。

(2-1) アレルギー疾患の増悪はいかにして起きるか？

アレルギー疾患はストレスによって明らかに悪化することが知られている。現在、ヒトでのアレルギー発症には主に 2 つの機序が考えられている。即ち、(i)ヘルパー T 細胞 (Th) 分化の偏向と (ii) 制御性 T 細胞 (Treg) の機能不全である。ストレス負荷はこれら 2 つに働きかけて影響していると予想される。アレルギーでは IgE 抗体と肥満細胞が中心的な役割を果たすが、この IgE 産生に至るためには免疫応答の方向性、特に Th 分化が Th2 側に傾いてサイトカイン産生が IL-4 に向かう必要がある。近年では Th2 の他に濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh) や好塩基球からの IL-4 産生も知られている。一方、ストレスは Treg 分化を促進する報告もあり、一見するとストレスによりアレルギーが悪化することと矛盾しており、その解釈は混乱している。*In vitro*、*in vivo* でのストレス負荷後の細胞を回収し、再刺激することで免疫応答の方向性を見た。また今回作出するレポーターマウスを用いて、ストレスからのシグナルがこれらの過程にどのような作用を及ぼすかを明らかにし、ストレス解釈についての混乱を解決したい。

(2-2) ストレスと疾患発症はどのような関係にあるか

ストレスによる免疫抑制と自己免疫疾患は、免疫応答の強弱としては逆方向に思えるが、ストレスによって両方のことが起こり得ることが分かっている。どちらに向かうのかは、ストレスの種類、強度、時間、遺伝的要因が関与していると考えられる。それらの解析のためにまず、自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス (SLE) を自然発症する MRL-lpr マウスを用いた実験を開始し、抗核 (自己) 抗体の検出、免疫組織染色、FACS 解析の条件を検討した。

さらに、ストレスの影響を検証するために、レポーターマウスと MRL-lpr マウスを掛け合わせ、in vivo ストレスによりその効果を比較する。抗核抗体を産生する細胞などの自己反応性クローンがいかにして生じるか、複合的に解析する。

(3-1) ストレスを可視化できるマウスの作出

始めのうち、インジケータ遺伝子となる *Rtp801* や *Gilz* の下流に IRES (配列内リボゾーム侵入部位) を挟んで GFP 結合することで、インジケータ遺伝子と GFP が、発現レベルは比例するが独立した分子として発現させることを試みた。即ち、GFP 発現によりストレスをモニタリングできるストレス・レポーターマウスである。インジケータ遺伝子の発現、即ち GFP を検出することにより、どの組織または細胞でストレス応答が起きているかをモニターでき、従来利用されてきた方法と組み合わせることにより、多様な解析を可能にする。

(3-2) ストレス量に比例して GFP 発現が変動するか？

マウスに in vitro ならびに in vivo で様々なストレスを与え、GFP 発現量を解析する。(i) マウスから脾臓細胞やリンパ節細胞を取り出し in vitro で Dex やコルチコステロンの濃度と時間を変えて刺激し、GFP の発現変動を FACS 解析する。(ii) in vivo のストレスとしてマウスに水浸ストレスや拘束ストレスを与える。水浸ストレスはケージに深さ 5 mm 程度の水を張り、その中で放置する方法であり、拘束ストレスは身動きが取れない狭いケースに入れて一定時間放置する。この処置を 3 時間を 1 回 (短期)、5 日間 (中期)、それ以上 (長期) それぞれ与える場合に分けられる。軽度の長期間のストレスには、ケージを傾けて飼育する方法も報告されている。ストレスの強弱、期間の違いが、上記の疾患モデルにどう影響するか、GFP から推測できるストレス量との関係を解析する。

4. 研究成果

(1-1) ストレスにより誘導される遺伝子の解析

すでに報告されているストレス誘導遺伝子について免疫細胞で同様の発現誘導が起きるか、その再現性ないし私達の研究手法への適性を検討した。まず Dex を用いて in vitro で脾臓細胞を刺激すると 3 時間で発現が誘導されたが、やや不安定であり、実験を何度か繰り返したところ、*Rtp801* や *Gilz* が誘導される再現性が高かった。刺激時間はこれ以上長くすると mRNA の回収が困難になった。したがって mRNA 合成に必要な培養液中の細胞生存・成長因子などの効果を Dex が完全に抑制してしまうことが考えられた。In vivo の拘束ストレスでは、遺伝子により 3 時間 1 回の拘束ストレスで発現誘導されるものと、5 時間、さらに回数を最大 5 回に増やした後に発現誘導される遺伝子があった。即ち、1 回ストレスでは発現誘導されない遺伝子が繰り返しにより誘導される傾向が見られたことから、遺伝子の種類を見ることで、ストレスの程度の指標になる可能性が示唆された。

(1-2) 異なる系統のマウス、遺伝子改変マウスを用いた解析

つぎに異なるマウスの系統の比較、さらに GR Cg マウス、CRH KO マウスを用いて同様の実験を実施した。ストレス誘導遺伝子の発現レベルにはマウス系統により違いが見られ、BALB/c マウスの方が早めに立ち上がる傾向が見られた。一方 GR Cg マウスは、期待に反して GR 型が異なってもその効果ははっきり見られなかった。今後、ストレスの種類を変えて試みる予定である。CRH KO マウスでは、遺伝子の発現誘導が概ね消失し、今回確認した遺伝子の大部分について CRH が上流に位置していることが判明した。その一方で、CRH KO マウスを用いても発現する遺伝子があり、その誘導経路については今後の課題である。今回安定して誘導された *Rtp801* や *Gilz* などの遺伝子はストレスのインジケータ遺伝子として利用できると思われ、これらの遺伝子の下流に GFP を組み込んでノックイン (KI) によるレポーターマウスを作出することにした。

(2-1) アレルギー疾患の増悪はいかにして起きるか？

ストレスがアレルギー疾患に与える影響を見るために、ストレス前後の細胞を刺激して細胞応答の性状を調べた。In vitro での Dex 刺激、または in vivo 拘束ストレスを施したマウスから脾臓細胞を採取して抗 CD3 抗体または抗原ペプチドで刺激すると、IFN- γ 産生に対するストレスの影響は不明瞭だったが、IL-4 産生は増加する傾向が観察された。したがってストレス経路が働くと IL-4 優位となる可能性が改めて示唆された。今後、なぜそうなるのかについて分子機序を明らかにしたい。

(2-2) ストレスがどのように免疫関連疾患に影響するか？

また自己免疫疾患やアレルギー性皮膚炎などの疾患モデルマウスの用意を行った。例えば、全身性紅斑性狼瘡を生じる MRL-lpr マウス、補助受容体 ICOS の KO マウス、両者を掛け合わせたマウスを用いて自己抗体、免疫組織化学、FACS 解析を試み、各種抗体が検出可能かを確認、研究の足場作りを進めた。同時に、ICOS KO によって MRL-lpr マウスの症状が緩和されるか観察した。脾臓やリンパ節の大きさは KO マウスでもほぼ同程度であり、抗核抗体も大きく減少しなかった。さらにアレルギー性皮膚炎の実験系を利用した。MC903 などの薬剤をマウスの皮膚に塗布し皮膚炎の誘導を試み、実際に細胞浸潤、FACS 解析で発症を確認できた。今後はレポーターマウスを用いて、或いはレポーターマウスと掛け合わせることで、ストレスが疾患の発症、症状の進行などにどのように関与するかを明らかにする。

(3-1) ストレスを可視化できるマウスの作出

まず *Rtp801* 遺伝子の GFP レポーターマウスの作出を試みた。始めに *Rtp801* や *Gilz* の 3' 非翻訳領域の下流に IRES (配列内リボゾーム侵入部位) を挟んで GFP 結合したコンストラクトを用い、*Rtp801* と GFP は mRNA までは共通だがタンパク分子としては独立させることを試みた。しかしながら、DNA サイズが大きいためか、組換えを起こした胚を得られなかった。そこで *Rtp801* の下流にサイズを小さい 2A ペプチドを挟んで GFP 結合した融合コンストラクトに変更した。2A ペプチドはタンパクに翻訳された後で自動切断されるため、*Rtp801* と GFP は独立した分子になる。この結果、組換えを起こした個体が得られた。

(3-2) ストレス量に比例して GFP 発現が変動するか？

Rtp801 のレポーターマウスが作出でき、その解析を開始した。このマウスの脾臓細胞を、in vitro で Dex 刺激すると無処置の細胞よりも GFP は高めにはなったが、顕著に強いわけではなかった。つぎに in vivo で Dex 投与 3 時間後のマウスでは、期待に反して GFP 発現の亢進が認められなかった。そこで mRNA 発現を調べると、*Rtp801*、*Gilz* mRNA レベルは qPCR で確かに上昇が見られたが、GFP mRNA レベルの上昇は顕著ではなかった。したがって GFP タンパクの発現上昇が小さい原因として、mRNA 上昇が小さいことと刺激前の GFP タンパク発現がすでに高いことが考えられた。そこで、Dex 投与の条件改善を試みた。これまでの投与 3 時間後から 1 日後まで延ばすと明らかな上昇が認められるようになった。即ち、タンパクとしての GFP が翻訳・蓄積するには一晩以上の時間がかかることが判明した。つぎに in vivo の拘束ストレスの条件改善を試みた。これまで 5 時間の単回 (1 日) だけでは GFP 上昇がはっきりしなかった。そこで 5 時間拘束を複数回 (2~5 日) に期間を延ばしたら、徐々に GFP 上昇が安定して認められる傾向を示した。つぎに組織切片で GFP を検出できるか試みた。レポーターマウスの脾臓の懸濁細胞では蛍光顕微鏡下で GFP 発現細胞が容易に観察できた。しかし凍結切片を用意した場合、固定強度に反比例して減衰した。そこで現在、固定後の切片を膜透過処理し、抗 GFP 抗体を用いて GFP 発現を検出しようと試みているが、今のところ十分な蛍光強度が得られていない。切片の処理過程を工夫しつつ、別の抗体も試す必要がある。

今後、作出したレポーターマウスと GR Cg マウス、CRH KO と掛け合わせ、ストレス経路のどこに作用点があるかを解析する。また疾患モデルを当てはめることで、ストレスがどのように免疫系に影響を与えるのかを明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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、小柳円、有村裕
2. 発表標題 グルココルチコイド受容体の多型によるストレス感受性への影響
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
研究分担者	藤井 渉 (FUJII WATARU) (40708161)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教 (12601)	

	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
連携研究者	小柳 円 (KOYANAGI MADOKA) (00543399)	日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授 (32669)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------