

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08081

研究課題名（和文）うつ病モデルマウスにおける好中球細胞外トラップ形成を標的とした心血管病予防戦略

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategy for arterial thrombosis by targeting neutrophil extracellular trap formation 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）・准教授

研究者番号：00240036

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：反復性社会的ストレスを与えた鬱マウスを用いて、頸動脈血栓形成モデルを作製した。血栓容積は対照マウスと同等であったが、血栓内のフィブリノーゲン陽性領域、好中球集積および細胞外トラップ（NETs）形成は鬱マウスにおいて増大していた。さらにNETs形成阻害薬を投与したところ、フィブリノーゲン陽性領域およびNETs形成は対照マウスと同等まで抑制された。鬱マウスの好中球に対照マウスより採取した血小板を添加したところ、細胞外トラップ形成が有意に増加した。鬱マウスの好中球は、血小板刺激によるトラップ形成能が亢進しており、フィブリン血栓形成を介して心血管病の発症を促進させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鬱病は心血管病発症の独立した危険因子であることが明らかとなってきたが、その機序は十分解明されていない。申請者らのグループは以前、鬱病モデルマウスにおいて惹起された骨髄由来免疫抑制細胞が、好中球細胞外トラップ形成（NETs）形成を介して動脈硬化形成促進に作用することを初めて報告したが、鬱病における心血管病発症機序を直接解析した報告はない。今回、鬱病モデルマウスを用いて「動脈血栓形成モデル」を作製し、NETs形成が動脈血栓形成に直接関与することを明らかにした。心血管病予防の新たな治療標的に発展させる可能性を示した点において意義深いと考える。

研究成果の概要（英文）：We investigated the impact of repeated social defeat (RSD) on arterial thrombosis in mice. Carotid arterial thrombosis was induced by FeCl<sub>3</sub> application. The volume of occlusive thrombi was comparable between the defeated and control mice; however, fibrinogen/fibrin-positive areas was significantly increased in defeated mice. Further, Ly-6G-positive cells in defeated mice were co-localized with neutrophil elastase, Cit-H3, and CD42b-positive staining, suggesting that neutrophil extracellular traps (NETs) formation was enhanced in defeated mice. Treatment with DNase I completely diminished the exaggerated fibrin-rich clot formation in defeated mice. In vitro NETs formation assessed by Cit-H3/MPO double-positive cells was significantly higher in neutrophils of defeated mice. Our findings demonstrate that RSD enhances fibrin-rich clot formation after arterial injury by enhancing NETs formation, suggesting that NETosis could be a new therapeutic target in depression-related CVD development.

研究分野：動脈硬化

キーワード：好中球 好中球細胞外トラップ うつ病 心血管病 血栓形成

### 1. 研究開始当初の背景

鬱病は心血管病発症の独立した危険因子であることが明らかとなってきたが、その機序は十分解明されていない。申請者は以前、鬱病モデルマウスにおいて惹起された骨髄由来免疫細胞が、好中球細胞外トラップ (NETs) 形成を介して動脈硬化形成促進に働くことを初めて報告したが、鬱病による心血管病発症機序における NETs 形成について解析した報告はない。

一方、ヒトびらん性プラーク病変における内皮細胞アポトーシスの程度は、好中球集積や NETs 形成と有意な相関を示し (Quillard T et al. Eur Heart J. 2015)、ACS 患者の責任病変から採取した血栓内における好中球および NETs 形成の程度は梗塞サイズと有意に相関することが最近報告された (Mangold A et al. Circ Res. 2015)。さらに、Franck G らはマウスを用いてヒトびらん性プラーク類似病変を作製し、NETs 形成を介した血栓形成機序を報告した。 (Franck G et al. Circ Res. 2017)。こうした背景の中、申請者は鬱病における心血管病発症に骨髄免疫関連細胞による NETs 形成が重要な役割を果たしている可能性があるかと予想し、その機序の解明は心血管病予防の新たな治療へ発展する可能性があると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、鬱病モデルマウスにおける骨髄由来免疫細胞の動態制御および、びらん性プラークにおける血栓形成機序への関与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、鬱病における心血管病発症予防の新たな治療標的に発展させることである。

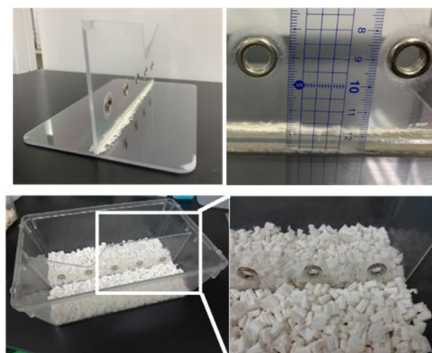
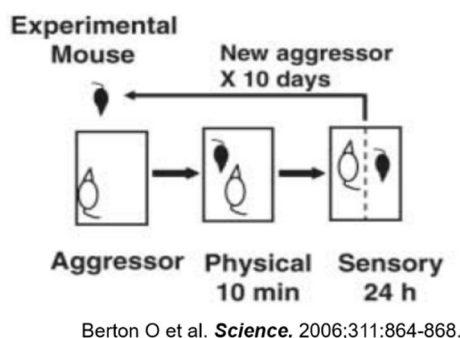
鬱病における心血管病発症メカニズムの研究は、これまでストレスに対する神経内分泌系の異常応答がその解析対象となってきた。一方、急性ストレスによる交感神経亢進は骨髄からの顆粒球系細胞の動員を促すことが知られている。本研究では、動脈硬化形成の発症進展においてこれまであまり注目されてこなかった好中球の動態および NETosis への関与に焦点を絞り、鬱病における好中球の動態調節と心血管病発症の病態基盤として最近注目される「びらん性プラーク血栓形成」への関与を解明する。すなわち、鬱病患者における心血管病の発症メカニズムを好中球による NETosis の視点から捉え、好中球の動態制御に関与する遺伝子を同定し新たな治療標的とする初めての試みである。

### 3. 研究の方法

#### 1) 鬱病モデルマウスの作製

既報の方法を踏襲し、野生型マウス (C57BL/6J) に social defeat stress を加えて鬱モデルマウスを作成した (A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. Nature Protocols 2011;6:1183-1191)。8 週齢の C57BL/6J 雄マウス 1 匹と 20 週齢の予めスクリーニングしておいた CD-1 雄マウス 1 匹を透明な仕切り板により隔てられたゲージを用いて飼育した (方法図)。social defeat stress は連日 10 分間、ゲージ内の仕切り板を除去して C57BL/6J マウスと CD-1 マウスを直接接触させることで実施した。

#### 方法図



コントロールマウスでは、透明な仕切り板で隔てたゲージに CD-1 マウスと飼育するが social defeat stress は与えなかった。上記 social defeat stress を連続 10 日間実施した。その後、social defeat stress による鬱様行動を確認する目的で video tracking system を用いて行動評価を行った。

#### 2) 動脈血栓形成モデルの作製および評価

全身麻酔下に頸動脈周囲を剥離し、ガーゼに染み込ませた 10%FeCl<sub>3</sub> を 3 分間塗布した (Novotny J et al. PLOS ONE. 2018;13 e0190728)。3 時間後に標本採取を行い、動脈血栓病変の免疫組織学的解析を実施し NETs 形成を評価した。

#### 3) DNase I 投与後の鬱病モデルマウスにおける血栓形成および NETs 形成の解析

NETosis 阻害作用を有する DNase I (4536282001, Sigma-Aldrich) を血栓性病変形成前に静脈内

投与し、血栓形成における NETosis の関与を解析した。

#### 4) 鬱病モデルマウスの骨髄好中球を用いた NETs 形成機序の解析

鬱病モデルマウスとコントロールマウスの骨髄から CXCR2 陽性/Ly6G 陽性細胞の好中球をソーティングし、トロンピン刺激により活性化させた血小板および P-セレクチンを用いて NETs 形成を誘導し、鬱病モデルマウスにおける NETs 形成機序について解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) 鬱病モデルマウスにおける血栓形成の特徴

鬱病モデルマウスにおける血栓容積はコントロールマウスと同等であったが (図 1)、フィブリン・フィブリノーゲン陽性領域は、鬱病モデルマウスにおいて有意に増大していた (図 2)。さらに、血管内腔側に集積する好中球は鬱病モデルマウスで増大しており (図 3)、その多くは Cit-H3 陽性であり (図 4)、鬱病モデルマウスの血栓では好中球の NETs 形成が亢進し、強固なフィブリン血栓形成が促進されることが示唆された。

図 1

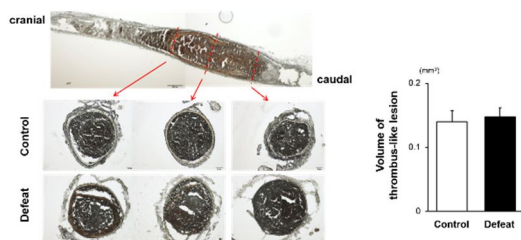


図 2

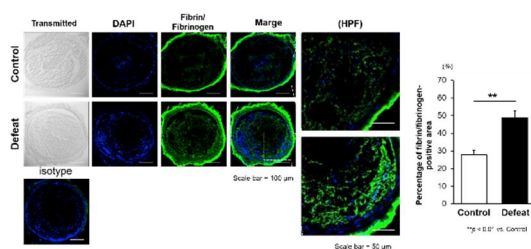


図 3

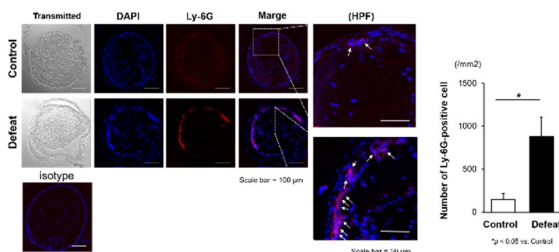
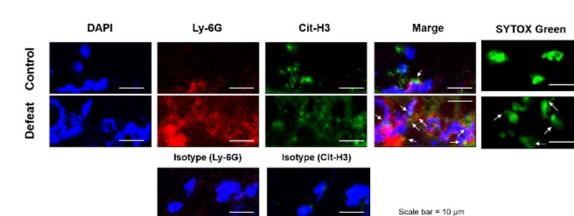


図 4



#### 2) 鬱病モデルマウスにおけるフィブリン血栓形成における NETs 形成の関与

NETosis 阻害作用を有する DNase I を血栓作製前に静脈内投与し、鬱病モデルマウスにおけるフィブリン血栓形成への影響を解析した。DNase I 投与は両群の血栓容積に影響を与えなかった (図 5)。一方、DNase I 投与後のフィブリン・フィブリノーゲン陽性領域は、鬱病モデルマウスの血栓において著明に抑制されコントロールマウスと同等であった (図 6)。

図 5

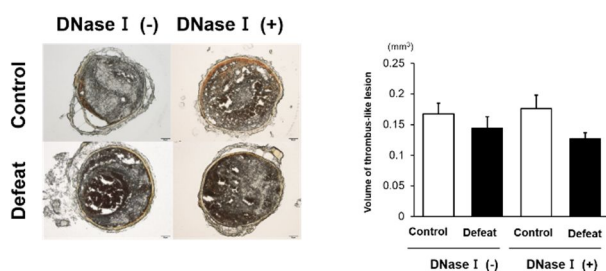
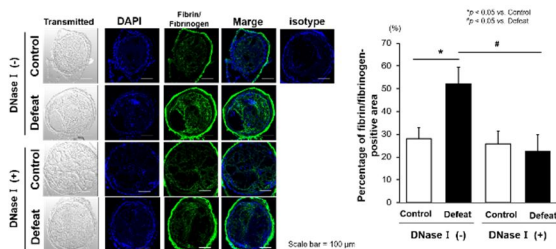


図 6

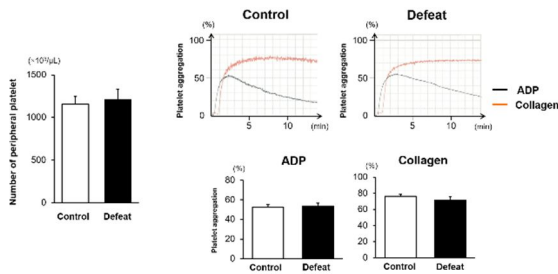


#### 3) 鬱病モデルマウスの好中球における NETs 形成機序

血小板は NETosis の誘導因子として重要な役割を果たしており、血小板由来細胞接着分子と好中球の結合が NET 形成を促進することが示されているため、好中球と血小板の相互作用に注目した。血小板数および血小板凝集能は両群で同等であった (図 7)。



図 7



次に、野生型マウスより採取した血小板にトロンピン刺激を与えて活性化させ、両群の好中球の NETs 形成能を比較した。鬱病モデルマウスの好中球では、活性化血小板による NETs 形成がコントロールマウスの好中球に比べて有意に増大していた (図 8)。さらに、活性化血小板に発現する P-セレクチンを用いて好中球 NETs 形成を解析したところ、鬱病モデルマウスの好中球では NETs 形成が有意に増大しており (図 9)、P-セレクチン・PSGL-1 を介した血小板・好中球の相互作用による NETs 形成が鬱病モデルの好中球では亢進していることが示唆された。

図 8

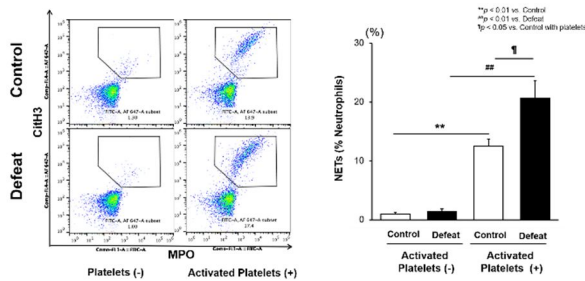
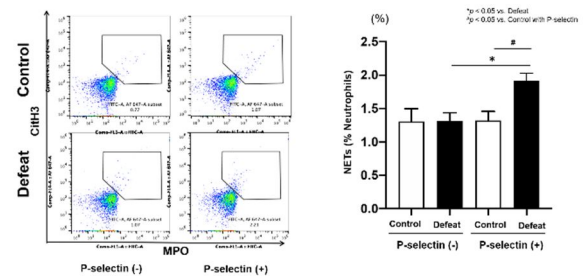
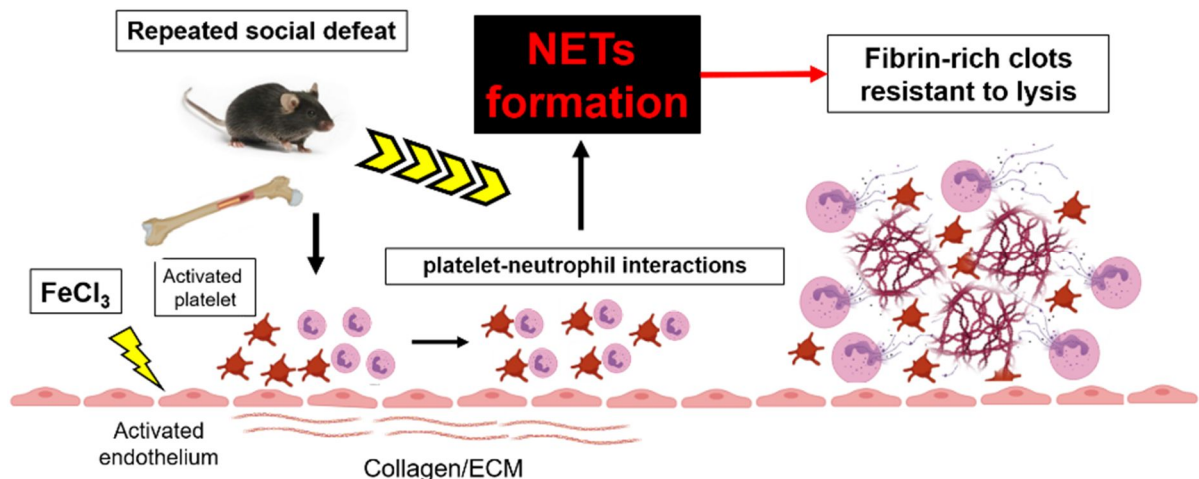


図 9



以上の研究結果より、鬱病モデルマウスの好中球では活性化血小板刺激による NETs 形成能が亢進しており、血栓形成時のフィブリン凝集を促進し、より強固で安定した血栓形成に関与している可能性が示唆された。鬱病患者における急性冠症候群をはじめとした心血管イベントの高い発症率の原因と推測される。鬱病患者における血小板・好中球の相互作用による NETs 形成促進機序の詳細を明らかにすることは、鬱病患者における新たな心血管病予防戦略に発展させる可能性があると考えられる。



5. 主な発表論文等

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

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Wada N, Yamada H, Motoyama S, Saburi M, Sugimoto T, Kubota H, Miyawaki D, Wakana N, Kami D, Ogata T, Matoba S.  | 4. 巻<br>37        |
| 2. 論文標題<br>Maternal high-fat diet exaggerates diet-induced insulin resistance in adult offspring by enhancing inflammasome activation through noncanonical pathway of caspase-11. | 5. 発行年<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Metabolism  | 6. 最初と最後の頁<br>"-" |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.molmet.2020.100988.  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>該当する      |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Motoyama S, Yamada H, Yamamoto K, Wakana N, Terada K, Kikai M, Wada N, Saburi M, Sugimoto T, Kubota H, Miyawaki D, Kami D, Ogata T, Ibi M, Yabe-Nishimura C, Matoba S. | 4. 巻<br>9         |
| 2. 論文標題<br>Social Stress Increases Vulnerability to High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance by Enhancing Neutrophil Elastase Activity in Adipose Tissue.                        | 5. 発行年<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>Cells  | 6. 最初と最後の頁<br>"-" |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/cells9040996.   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する      |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Sugimoto T, Yamada H, Kubota H, Miyawaki D, Motoyama S, Wada N, Saburi M, Wakana N, Matoba S.  |
| 2. 発表標題<br>Repeated social defeat exaggerates fibrin-rich clot formation in FeCl3-induced arterial thrombosis mouse model by enhancing NETs formation via modulation of neutrophil functional properties. |
| 3. 学会等名<br>欧州心臓病学会（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sugimoto T, Yamada H, Kubota H, Miyawaki D, Saburi M, Wakana N, Matoba S.   |
| 2. 発表標題<br>Repeated social defeat exaggerates fibrin-rich clot formation by enhancing NETs formation via platelet-neutrophil interactions. |
| 3. 学会等名<br>American Heart Association（米国心臓病学会）（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kubota H, Yamada H, Sugimoto T, Miyawaki D, Wakana N, Matoba S.   |
| 2. 発表標題<br>Repeated social defeat exaggerates CaCl <sub>2</sub> -induced abdominal aortic aneurysm expansion by suppression of periaortic fibrosis in tissue repair phase. |
| 3. 学会等名<br>American Heart Association (米国心臓病学会) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kubota H, Yamada H, Sugimoto T, Miyawaki D, Saburi M, Wakana N, Matoba S.  |
| 2. 発表標題<br>Repeated social defeat exaggerates CaCl <sub>2</sub> -induced abdominal aortic aneurysm expansion by eliminating periaortic fibrosis in tissue repair phase: Possible involvement of specific subtypes of macrophages. |
| 3. 学会等名<br>欧州心臓病学会 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Miyawaki D, Yamada H, Kubota H, Sugimoto T, Saburi M, Wakana N, Matoba S.  |
| 2. 発表標題<br>Maternal high-fat diet promotes calcified atherosclerotic plaque formation in adult offspring by enhancing transformation of vascular smooth muscle cells to osteochondrocytic-like phenotype. |
| 3. 学会等名<br>欧州心臓病学会 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Saburi M, Yamada H, Sugimoto T, Kubota H, Miyawaki D, Wakana N, Matoba M.   |
| 2. 発表標題<br>Maternal high-fat diet promotes the expansion of abdominal aortic aneurysm in adult offspring by enhancing osteoclast-like macrophage differentiation through down-regulation of IRF8 expression. |
| 3. 学会等名<br>欧州心臓病学会 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|