

ストレスによる病態増悪、臓器機能障害機構の解析

北海道大学遺伝子病制御研究所

講師 上村 大輔

はじめに

心理状態や精神状態が健康と深く関連することは、「病は気から」などと古くからことわざでも良く言われるように、例えばストレスが溜まると胃が痛くなったり持病が悪くなったりするなど病態を変化させることが経験的にも知られている。自己免疫疾患などの慢性炎症性疾患においても、ストレスが症状の再発や増悪に関連している⁽¹⁾。しかし、これら因果関係の分子メカニズムはほとんど理解されていない。またヒトでは、同様のストレスに対して、病態を呈するヒトもいれば全く正常なヒトもいる。このようなストレスに対する感受性の個人差が、どのように生じるのかも完全には理解されていない。

申請者は、中枢神経系の慢性炎症性疾患である多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いて、さまざまな病気の患者にとって生活の質の低下の原因となる痛みやストレスが、特異的な神経回路の活性化による局所血管の機能調節機構「ゲートウェイ反射」を介して炎症病態を悪化させることを報告している⁽²⁻⁶⁾。また、慢性的なストレスは、EAEの病態を大きく変化させるゲートウェイ反射を誘導し、胃や心臓といった末梢の臓器機能を障害してマウスに突然死を引き起こすことも明らかにしている⁽⁴⁾。ゲートウェイ反射が誘導されるためには、特異的な神経回路の活性化のほかに、自己反応性のT細胞が必要であることが判明している。これまでに5つのタイプのゲートウェイ反射が証明されており、そのなかで慢性ストレスによって誘導されるストレスゲートウェイ反射は、“慢性的なストレス”と“病原T細胞依存性の局所免疫応答”の2つの要因にて誘導される脳内特定血管周囲の微小炎症を介した神経回路の異常活性化が、胃腸障害と心不全を引き起こす現象であり、マウスに慢性ストレス（睡眠障害）下で中枢神経系抗原に対する病原T細胞を移入することで実験的に誘導できる。これらの知見から我々は、定常状態でも一定数存在する病原T細胞の数あるいは、それらのT細胞への自己寛容の誘導の差が個人個人のストレス感受性の差を生じているのではないかと仮説を立てている。また、仮説どおりとすれば、末梢血中で自己寛容の破綻した病原T細胞を検出できるマーカーを同定すれば、その分子を標的にすることによって活性化した病原T細胞も除去でき、ストレスゲートウェイ反射を介する突然死を阻害できる。このような背景から、本計画では、ストレスが関連する疾患に対する新規治療標的の同定および新規バイオマーカーの同定を試みた。

結 果

マウスにおけるストレスゲートウェイ反射では、脳内の海馬、視床、第3脳室に囲まれた領域の血管に選択的に微小炎症が誘導され、突然死に至る異常な神経活性化がもたらされる⁽⁴⁾。このことから、この脳内特定血管部位でストレス依存的に発現上昇する分子を同定するために、この脳内特定血管のRNAシーケンスをストレスの有無にて実施した。マウスを睡眠障害作成ケージに入れ、ストレスがかかった状態で、安楽死後に海馬、視床、第3脳室に囲まれた脳内特定血管を採取し、RNAシーケンスを行った。その結果から、発現量と特許性の観点から6つの遺伝子を選別した。これらのうち、*Vstm2a*、*Vstm2l*は、中枢神経系内により選択的に発現する分子であり、睡眠障害ストレス (Sleep deprivation, SD) を与えることで発現上昇する分子である (図1)。

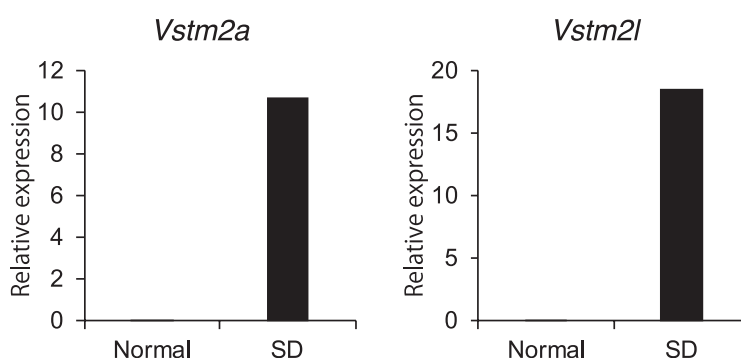


図1 脳内特定血管における*Vstm2a*、*Vstm2l*の発現変化

マウスに睡眠障害ストレス(SD)を与えた後、脳内特定血管における*Vstm2a*、*Vstm2l*の発現を測定した。

これらの分子に対する中和抗体を用いて、脳内特定血管領域での当該分子の阻害を試みると、コントロールIgG投与群では、ストレスゲートウェイ反射が誘導され、EAE臨床スコア5の個体死が突然起きるのに対し、抗VSTM2L抗体および抗VSTM2A抗体の局所投与は、突然死を防ぐ傾向にあった。また、上記6分子に含まれるTMEM5およびC2CD4Dに対する抗体の投与もまた突然死抑制効果が認められた (図2)。

これらの結果は、脳内特定血管部位でのVSTM2LおよびVSTM2Aを含む候補分子の阻害が、ストレスによる病態を緩和できる可能性を示唆している。しかし、脳内投与は臨床的に困難であることから、大量の抗VSTM2L抗体および抗VSTM2A抗体を準備し、これらの抗体の末梢投与によるゲートウェイ反射抑制効果の検討を今後行う予定である。

つぎに、ストレス下では病原体感染に対する抵抗性が減弱すると考えられていることから、マウスの細菌感染時における睡眠障害ストレスの効果を検討した。リステリア菌は、食中毒を引き起こす病原体であり、中枢神経系に侵入し、髄膜炎を発症させることもある。マウスに睡眠障害ストレスを与えると、リステリア菌感染抵抗性が弱まると仮説をたて、これを実施した。予想に反して、睡眠障害ストレスによってリステリア菌感染マウスの生存が延長した (図3)。

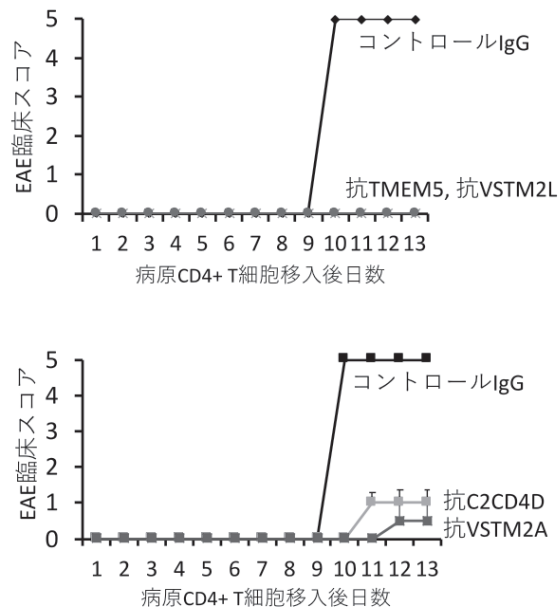


図2 脳内特定血管部位での候補分子の阻害によるゲートウェイ反射の抑制

縦軸にEAE臨床スコア、横軸にEAE誘導後の日数を示す。抗体の脳内接種は7日目に行った。平均値±標準誤差を示す。

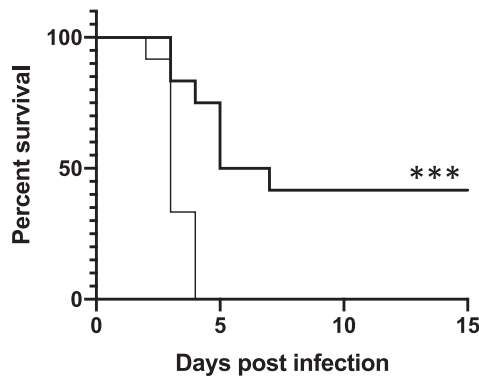


図3 マウスの睡眠障害ストレスは急性細菌感染に対する生存率を向上させる

リステリア菌感染後のマウスの生存率を示す。睡眠障害ストレスは、リステリア菌感染と同時に与え始めた。細線は通常飼育群、太線は睡眠障害ストレスを示す。*** $P < 0.001$ 。

致死感染時には、インターロイキン (IL) -6 などの炎症性サイトカインの発現が急上昇し、致死性ショックを誘導する。リステリア菌感染後の血清IL-6量を測定すると、通常飼育群のマウスと比較して、睡眠障害ストレスを与えたマウスでは、感染後1日目の血清IL-6量が有意に減少していた。

図4の結果は、ストレスによってIL-6産生量が抑制されることを示唆している。ストレスによって産生される免疫抑制因子の1つであるグルココルチコイドが、このIL-6産生抑制を媒介しているかどうかを検討するために、グルココルチコイド受容体阻害剤であるRU486を投与した。その結果、グルココルチコイドの作用を阻害することで、睡眠障害ス

トレスもしくは定常状態においても血清IL-6量が増加傾向にあり、IL-6産生は定常状態においてもグルココルチコイドの制御を受けている可能性が考えられた。

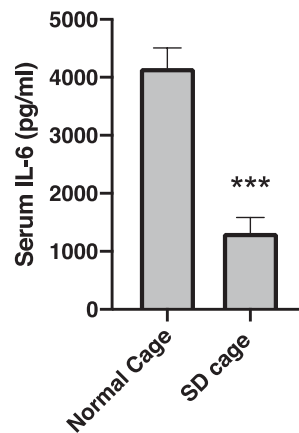


図4 リステリア菌感染後の血清IL-6量

リステリア菌感染1日後の血清IL-6量を示す。血清IL-6はELISA法で測定した。睡眠障害ストレス(SD)は、リステリア菌感染と同時に開始した。データは平均値+標準誤差を示す。*** P < 0.001。

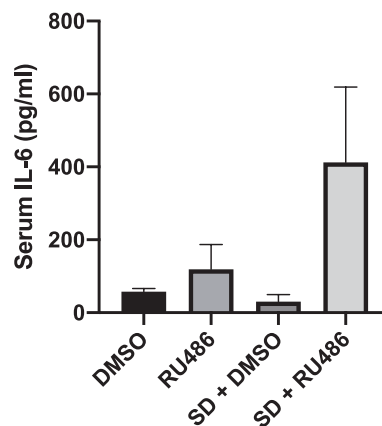


図5 血清IL-6量におけるグルココルチコイド受容体阻害剤の効果

通常飼育もしくは睡眠障害ストレス (SD) ケージに載せたマウスに、グルココルチコイド受容体阻害剤 (RU486) を2日間投与し、3日目に血清IL-6をELISA法で測定した。データは平均値+標準誤差を示す。

考 察

本研究では、ストレスによる病態増悪機構の解析を行った。ストレスによる病態の誘発や悪化は、同様のストレス下にあっても個人個人で異なり、その差異のメカニズムやどのように病態を発症させるかの詳細は明らかになっていない。我々は、ゲートウェイ反射という独自のコンセプトからこのメカニズムの解明に取り組んでいる⁽²⁻⁶⁾。マウスにおけるストレスゲートウェイ反射では、脳内の海馬、視床、第3脳室に囲まれた領域の特定の血管に選択的に微小炎症が誘導され、それが起点となって突然死に至る異常な神経活性化がもたらされる⁽⁴⁾。このことから当該血管領域でストレスゲートウェイ反射に重要な分子を同定することで、ス

トレス性の疾患の予防や治療に貢献できると考えた。マウスに慢性ストレスを加えた後に、VSTM2L、VSTM2A、TMEM5およびC2CD4Dを含む6つの分子が脳の特長血管で発現上昇することがわかった。このうち、VSTM2L、VSTM2Aは、とくに選択的に中枢神経系に発現しており、副作用の観点からも好ましい分子である。VSTM2L、VSTM2Aに対する抗体の脳内投与によって、ストレスゲートウェイ反射が抑制された。今後はこれらの抗体の末梢投与による効果の検証と抑制メカニズムの解明に迫っていききたい。

慢性ストレスはまた、免疫力を低下させると考えられている。リステリア菌感染に対する抵抗性を睡眠障害ストレスの有無の条件下で試験したところ、予想に反して、睡眠障害ストレス群のマウスのほうが生存が延長した。血清中のIL-6を測定すると、睡眠障害ストレス群でIL-6が有意に下がっており、急性の深刻な敗血症ショックには、ストレスによるグルココルチコイド産生が生存に対して有利に働く可能性が示唆された。グルココルチコイドを定常状態で抑制した場合にもIL-6が産生される傾向があり、通常時にストレス経路を遮断することで、免疫系の増強が期待できることが考えられた。

要 約

本研究では、ゲートウェイ反射という独自のコンセプトから、慢性ストレスがどのように病態増悪や臓器機能障害に繋がるのかについて検討した。マウスにおけるストレスゲートウェイ反射では、脳内の海馬、視床、第3脳室に囲まれた領域の特長血管に選択的に微小炎症が誘導され、それが起点となって突然死に至る異常な神経活性化がもたらされる。この特長血管部位に睡眠障害ストレス依存的に発現上昇する分子を網羅的に探索し、VSTM2L、VSTM2Aに対する抗体を介した阻害が、マウスに突然死を引き起こすストレスゲートウェイ反射を抑制した。また、睡眠障害ストレスがマウスのリステリア急性感染による生存性を延長することを見出した。睡眠障害ストレスはリステリア急性感染によるIL-6産生を抑制した。IL-6産生は非感染定常状態においても、グルココルチコイドによって抑制されている傾向があり、通常時にストレス経路を遮断することで、免疫系の増強が期待できることが考えられる。

文 献

1. Sapolsky, R. M. 2015. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nat Neurosci* 18:1344.
2. Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, J. H., Kawano, F., Yull, F. E., Kawamoto, T., Iwakura, Y., Betz, U. A., Marquez, G., Blackwell, T. S., Ohira, Y., Hirano, T., and Murakami, M. 2012. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* 148:447.

3. Arima, Y., Kamimura, D., Atsumi, T., Harada, M., Kawamoto, T., Nishikawa, N., Stofkova, A., Ohki, T., Higuchi, K., Morimoto, Y., Wieghofer, P., Okada, Y., Mori, Y., Sakoda, S., Saika, S., Yoshioka, Y., Komuro, I., Yamashita, T., Hirano, T., Prinz, M., and Murakami, M. 2015. A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. *Elife* 4:e08733.
4. Arima, Y., Ohki, T., Nishikawa, N., Higuchi, K., Ota, M., Tanaka, Y., Nio-Kobayashi, J., Elfeky, M., Sakai, R., Mori, Y., Kawamoto, T., Stofkova, A., Sakashita, Y., Morimoto, Y., Kuwatani, M., Iwanaga, T., Yoshioka, Y., Sakamoto, N., Yoshimura, A., Takiguchi, M., Sakoda, S., Prinz, M., Kamimura, D., and Murakami, M. 2017. Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *Elife* 6:e25517.
5. Stofkova, A., Kamimura, D., Ohki, T., Ota, M., Arima, Y., and Murakami, M. 2019. Photopic light-mediated down-regulation of local alpha1A-adrenergic signaling protects blood-retina barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. *Sci Rep* 9:2353.
6. Kamimura, D. and Murakami, M. 2019. Neural stimulations regulate the infiltration of immune cells into the CNS. *Journal of Internal Medicine* 286:259.