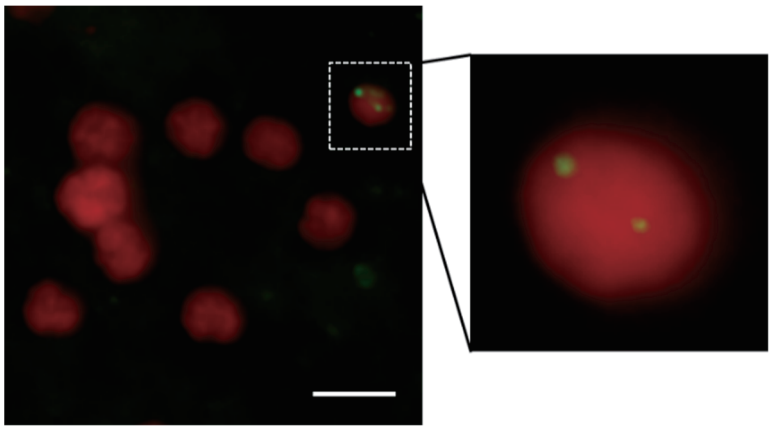
75　DNA損傷によるストレスの解剖とストレスの見える化	中村　麻子

【目的】現代社会において、ストレスをマネジメントし、ストレス緩和策を確立することは我が国の喫緊の課題である。その一方で、「ストレス」と表現される負荷の定義は非常に不明瞭であることに加え、近年ではストレスには、人々にネガティブな影響を与えるストレス（ディストレス：Distress）とポジティブな影響を与えるストレス（ユーストレス：Eustress）が存在することが明らかになってきている。これまで漠然とストレス（負荷）と捉えられていた身体的刺激および社会的刺激が、その程度や、時期、外部環境などによってユーストレスにもディストレスにもなり得ることを示す研究報告が数多くなされるなど、バイオマーカーなどに基づいたストレスの切り分けによる効果的なストレスマネジメントの確立が求められている。そこで本研究では、現代社会におけるヒューマンレジリエンスの確立に貢献することを最終目的として、ストレスの定量的かつ統合的バイオマーカーとしての生体内 DNA 損傷に着目し、DNA 損傷レベルを軸とした良いストレスと悪いストレスを切り分けるためのストレスバイオマーカーパネルを確立することを目指した。

【方法】本研究では、ディストレスとユーストレスの切り分けを可能とする新規ストレスバイオマーカーパネルを確立し、ポジティブ・ネガティブな影響の両面から心身のストレス状態を DNA 損傷モニタリング等により定量的に計測できる手段の確立を目指した。作製したディストレスおよびユーストレスマウスモデルに対して不安様行動解析を含む様々な行動試験を行うとともに、各マウスから血液、肺、肝臓、胸腺、腎臓などの生体サンプルを採取し、DNA 損傷モニタリングを行った。物理的刺激に対するストレスバイオマーカー探索においては、力学的ストレスと DNA 損傷応答の相関性についてリアルタイムイメージングによって解析した。さらに、皮膚などに対する機械的圧縮や、皮下腫瘍形成に伴う腫瘍周辺細胞の局所的な圧縮などを想定した *in vitro* での圧縮実験モデルを検討した。

【結果】慢性的社会的敗北ストレスを暴露したマウスは、うつ様行動等を示すことがすでに報告されているが、DNA 損傷評価を行った結果、一部のリンパ球で明確な DNA 二本鎖切断損傷が検出された。ユーストレスマウスにおける行動試験では、ユーストレスマウス群は標準飼育群と比べて不安様行動の減少が観察された。また、リアルタイムイメージングを用いて細胞の核内空間変化と DNA 損傷修復タンパク質の密度および局在変化を解析した結果、細胞同士の運動による圧縮効果によって核内空間が大きく変化し、それに伴い DNA 損傷修復タンパク質の密度・局在も変化することが示された。ガラスビーズによる細胞への人工的な圧縮実験では、興味深いことに直接圧縮を受けている細胞だけではなく、その周辺の非圧縮細胞においても DNA 損傷修復タンパク質の局在変化が認められた。これらの結果は、細胞への力学的ストレスによって DNA 損傷応答が活性化されることに加え、DNA 損傷活性化に対する力学的刺激のバイスタンダー効果の存在が示唆された。

慢性社会的敗北マウス由来リンパ球における DNA 損傷の検出



75. DNA 損傷によるストレスの解剖とストレスの見える化

中村　麻子

茨城大学 大学院理工学研究科 理学野

Key words：ストレス，DNA 損傷，身体的刺激，心理的刺激，バイオマーカー

緒　言

現代社会において､ストレスをマネジメントし､ストレス緩和策を確立することは我が国の喫緊の課題である。その一方で､「ストレス」と表現される負荷の定義は非常に不明瞭であることに加え、近年ではストレスには、人々にネガティブな影響を与えるストレス（ディストレス：Distress）とポジティブな影響を与えるストレス（ユーストレス：Eustress）が存在することが明らかになってきている［1］。実際にユーストレス環境で飼育されたマウスでは腫瘍成長や炎症反応の抑制が報告されている。これらのデータは、これまで漠然とストレス（負荷）と捉えられていた身体的刺激および社会的刺激が、その程度や、時期、外部環境などによってユーストレスにもディストレスにもなり得ることを示しており、バイオマーカーなどに基づいたストレスの切り分けや分類の必要性を強調するものである。しかしながら、上述したようにストレスの複雑性などから科学的根拠に基づく効果的なストレスマネジメントが確立されていないのが現状である。

一方で近年の研究から、物理的ストレスのバイオマーカーとして考えられていた DNA 損傷が、ストレスの種類によって異なる生体反応を高感度に評価することができるストレスバイオマーカーであることが明らかになってきた［2］。そこで、本研究ではストレスモデル動物や培養細胞モデルを用いて様々なストレスマーカーレベルと DNA 損傷レベルを直接的に結びつけ、良いストレスと悪いストレスを切り分けるためのストレスバイオマーカーパネルを確立することを目指した。

方　法

1. 慢性社会的敗北ストレスモデルの作製および行動解析

BALB/c（オス、7 週齢）を導入後、9 日間、個別飼育したのちにコントロール群、ストレス群の二群に分けた。ストレス群は ICR（オス）と同居させることで 10 日間の慢性社会的敗北ストレス（sMSDS）に暴露し、ストレス期間後、11 日目に社会行動試験（Social Interaction：SI 試験）を行った。15 日目に 3 時間の絶食期間を設けたのち、血液、胸腺、肺、肝臓、腎臓、脾臓、脳などのサンプリングを行った。末梢血サンプルは採取直後に 4%パラホルムアルデヒドにて固定処理をしたのちに、グリセロールを添加し冷凍保存した。腸内細菌解析およびメタボローム解析のためにストレス前日、ストレス 5 日目、サンプリング時に糞便を採取した。

2. ユーストレスマウスモデルの作製および解析

C57BL/6J（オス、3 週齢）を導入後、標準環境飼育（Standard Environment：SE）群、エンリッチメント環境（Enriched Environment：EE）群の二群に分けた。SE 飼育あるいは EE 飼育を 2 週間行った後、目的指向行動や活動量、社会性、記憶、不安様行動、うつ様行動を評価する行動試験を実施した。行動試験の翌日に、血液、胸腺、肺、肝臓、腎臓、脾臓、脳などのサンプリングを行った。末梢血サンプルは採取直後に 4%パラホルムアルデヒドにて固定処理をしたのちに、グリセロールを添加し冷凍保存した。

3. ディストレス・ユーストレスマウス生体内の DNA 損傷評価

上記実験 1、2 で採取したマウス由来血液サンプルを用いて DNA 損傷レベルの評価を行った。血液サンプルを十分に PBS で洗浄したのちに、スライドガラスに塗布し、DNA 二本鎖切断マーカーであるリン酸化 H2AX（γ-H2AX）に対する免疫蛍光染色を行った。

4. 細胞内 DNA 損傷変化のタイムラプス観察系の確立

細胞の運動や密集状態、それに伴う細胞核の形態変化と DNA 損傷修復タンパク質の挙動を同時観察できる実験系を確立した。DNA 損傷修復タンパク質の可視化には蛍光色素タンパク質である mCherry 融合型の 53BP1 を安定発現する培養細胞 BJ1-hTERT を用いた。電動 XYZ ステージ（ProScan、Prior）を組み込んだ倒立型蛍光顕微鏡（IX71、オリンパス）に小型 CO_2インキュベータを設置し、細胞の明視野画像と蛍光画像を長時間連続撮影できるようにした。確立した実験系を用いて、細胞の増殖に伴う細胞核の形態変化と mCherry-53BP1 の局在変化について 10 分間隔で約 66 時間撮影した。

5. 密集細胞組織への圧縮刺激負荷系の確立

皮膚などに対する機械的圧縮や、皮下腫瘍形成に伴う腫瘍周辺細胞の局所的な圧縮などを想定した *in vitro* での圧縮実験モデルを検討した。具体的には、細胞表面への圧子として直径 1 mm のガラスビーズを適用し、ガラスビーズを格子状に並べて固定した圧縮治具を作製した。圧縮治具をガラスボトムディッシュ上で培養して密集化させた BJ1-hTERT 細胞の上にセットし、圧縮刺激を 30 分負荷した（Compression 群）。なお今回は、圧子直下の細胞は部分的な細胞破壊･剥離が発生したために、1 mm 程度周辺の接着細胞を Compression 群とした。また、比較として無負荷の細胞を Control 群とした。

結果および考察

1. sMSDS の作製および行動解析

sMSDS モデル作製において、10 日間のストレス期間後、11 日目に社会行動試験（SI 試験）を行った結果、先行研究同様に対照群と比較して ICR への社会行動が抑制されていた。

2. ユーストレスマウスモデルの作製および解析

目的指向行動である巣作り行動試験において、EE 群は SE 群と比べてネストスコアの個体差が観察された。社会的ストレスは巣作り行動を遅延させることが知られているが [3]、EE 群で個体差が強く見られた本結果は、EE 群の中でも、社会的ストレスへの感受性の違いを反映していることを示唆しており、今後より詳細な解析が必要であると考える。またオープンフィールド試験の結果、EE マウス群では移動距離が増加するなど不安様行動の低減が認められた。このことは、先行研究同様にユーストレス環境による生体影響を評価することのできる EE 飼育環境を確立できていることを示している [4]。今後、採取した生体サンプルに対するバイオマーカー評価を行い、個体の社会行動スコアとの相関性を明確にする。

3. ディストレス・ユーストレスモデルマウス生体内の DNA 損傷評価

sMSDS 群のマウス個体から採取したリンパ球のγ-H2AX レベルを検討したところ、1 細胞あたり 0.049±0.02 個のγ-H2AX レベルが検出された（図 1）。ほとんどのリンパ球では DNA 損傷を示すγ-H2AX のフォーカスが認められない一方で、比較的高レベルの DNA 損傷を有する細胞が認められていることから、今後は DNA 損傷を有している細胞のみで DNA 損傷レベルの比較を行う必要があると考える。

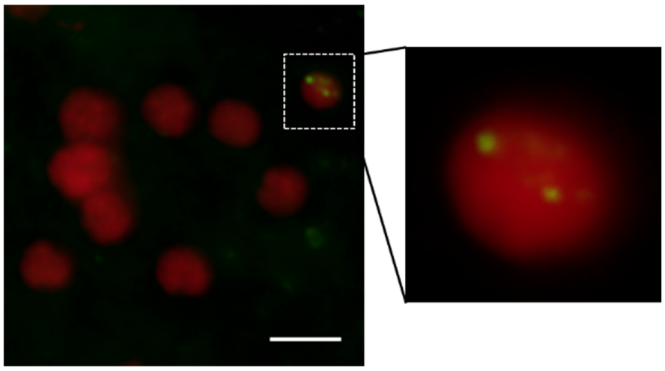


図 1. 慢性社会的敗北マウス由来リンパ球における DNA 損傷の検出
マウス由来リンパ球に対する DNA 二本鎖切断マーカーγ-H2AX 染色の代表的蛍光顕微鏡画像。DNA を propidium Iodide（赤）、γ-H2AX を Alexa488（緑）にて標識している。Scale bar＝10μm。

4. 細胞内 DNA 損傷変化のタイムラプス観察系の確立

mCherry-53BP1 の蛍光輝度と核の形態変化を調べた結果、細胞が密集状態で動き回る様子が確認できた。特に、細胞同士の間に別の細胞が無理矢理進入して移動する時には、核の面積は次第に減少し、急激に細長い形に変化しながら、mCherry-53BP1 の蛍光輝度が上昇する傾向が認められた（図 2）。このことは、細胞同士の運動による圧縮効果によって核内空間が大きく変化し、それに伴い DNA 損傷や修復に関わるタンパク質の密度・局在が大きく変化する可能性を示している［5］。

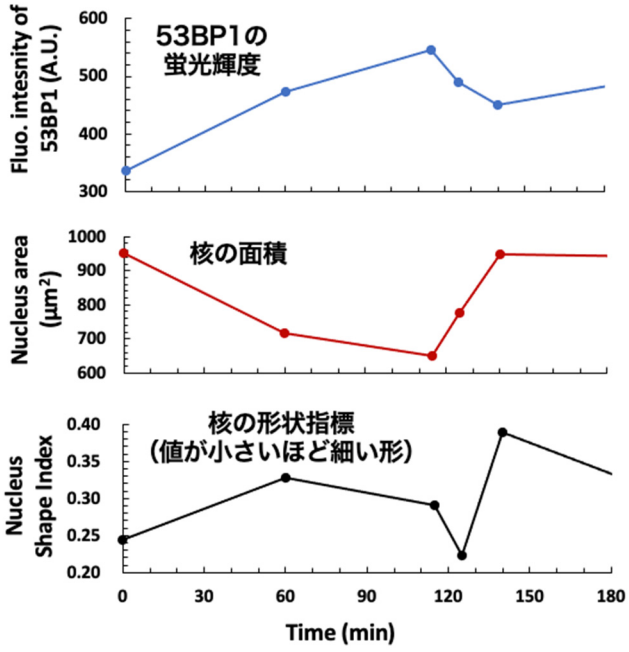


図2. 核内におけるmCherry-53BP1の輝度（核内密度）と核の形態変化との関連
タイムラプス画像から解析した RFP-53BP1 の核内密度変化と細胞核形態の変化との関係性。核の面積減少と連動して 53BP1 の核内密度が上昇し、特に核が著しく細長くなるときに、ほぼピークを迎える傾向が見られている。

5. 密集細胞組織への圧縮刺激負荷系の確立

Control 群細胞では、発達したアクチン細胞骨格が見られて核が滑らかな形態であり、mCherry -53PB1 の輝度は低かった。一方 Compression 群では、圧子に直接的に触れていない周辺の細胞でもアクチンの脱重合が生じており、核の表面が局所的に凹み、mCherry-53PB1 の輝度が著しく高くなる細胞も一部に見られた（図 3)。これらの結果は、密集した細胞組織のある部分に対する機械的ストレスによって、周辺細胞の核にも局所的な変形を与え、核内 DNA に損傷を誘導するといった力学的ストレスのバイスタンダー効果を示唆している。今後は上記実験 4 のタイムラプス観察系と組み合わせて、圧縮ストレス負荷での細胞挙動および核内シグナルの変化を捉えていく。

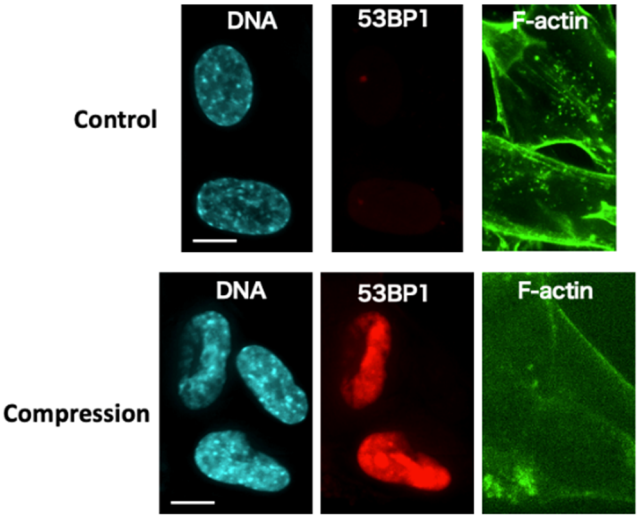


図3. 密集細胞集団への圧縮刺激負荷実験とDNA損傷の評価
代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像。左から核内DNA、mCherry-53BP1、アクチン細胞骨を示す。Scale bars＝10 μ m。

共同研究者・謝辞

本研究は、茨城大学農学部の豊田淳教授、鈴木穂高准教授、茨城大学大学院理工学研究科工学野の長山和亮教授、茨城大学人文社会科学部の加藤敏弘教授を含め、多くの共同研究者にご協力頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。また本研究は、公益財団法人上原記念生命科学財団からのご支援のもと遂行することができました。厚く御礼申し上げます。

文　献

1） Hammen C. Generation of stress in the course of unipolar depression. J Abnorm Psychol. 1991 Nov;100(4):555-61. PMID: 1757669. doi: 10.1037//0021-843x.100.4.555.

2） Sakama S, Kurusu K, Morita M, Oizumi T, Masugata S, Oka S, Yokomizo S, Nishimura M, Morioka T, Kakinuma S, Shimada Y, Nakamura AJ. An Enriched Environment Alters DNA Repair and Inflammatory Responses After Radiation Exposure. Front Immunol. 2021 Oct 22;12:760322. PMID: 34745135. doi: 10.3389/fimmu.2021.760322.

3） Otabi H, Goto T, Okayama T, Kohari D, Toyoda A. Subchronic and mild social defeat stress alter mouse nest building behavior. Behav Processes. 2016 Jan;122:21-5. PMID: 26524409. doi: 10.1016/j.beproc.2015.10.018. Epub 2015 Oct 31.

4) Llorens-Martín MV, Rueda N, Martínez-Cué C, Torres-Alemán I, Flórez J, Trejo JL. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. Neuroscience. 2007 Jul 13;147(3):631-8. PMID: 17570601. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.04.054. Epub 2007 Jun 14.
5) Nagayama K, Kodama F, Wataya N, Sato A, Matsumoto T. Changes in the intra- and extra-mechanical environment of the nucleus in Saos-2 osteoblastic cells during bone differentiation process: Nuclear shrinkage and stiffening in cell differentiation. J Mech Behav Biomed Mater. 2023 Feb;138:105630. PMID: 36565693. doi: 10.1016/j.jmbbm.2022.105630. Epub 2022 Dec 20.