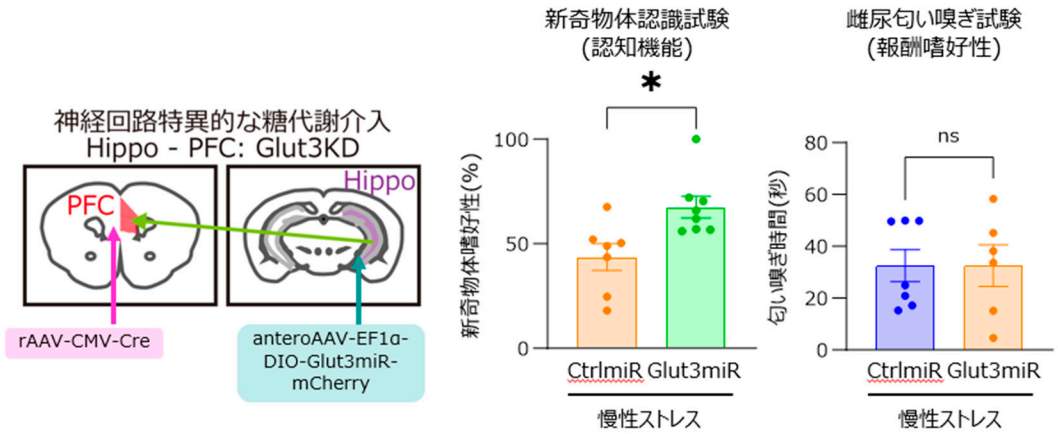
127　脳代謝リモデリングに着目したストレス病態の解明	永井　裕崇

【目的】社会や環境より受けるストレスはうつ病のリスクとなる。うつ病には脳代謝変容の関与が知られるが、その実態や機序、意義については不明な点が多い。我々はこれまで、マウスの慢性社会挫折ストレスを用いて、ストレスが前頭前皮質を中心とした多様な神経回路や代謝を独立に変化させ認知情動変容を招くことを示唆してきた。そこで本研究では、認知情動変容と関連する前頭前皮質の代謝変容の実態やその神経回路機序を明らかにすることを目的とした。さらに、前頭前皮質の機能変化には脳内や末梢の炎症も重要である。そこで前頭前皮質の代謝変化とミクログリアの活性化との間の因果関係解明や、ストレスによる末梢免疫臓器における炎症病像を担う分子機序解明も目的とした。

【方法】マウスの社会挫折ストレスを用いて、前頭前皮質に生じる代謝変化を質量分析イメージングにより調べた。さらに、前頭前皮質において糖輸送体の発現抑制を行い、認知情動変容を抑制した上で代謝変化を調べ、認知情動変容や糖代謝変容と関連する代謝プロファイルを調べた。並行して、ストレスによるミクログリア活性化に対する神経細胞糖代謝変容の関与を調べた。前頭前皮質と海馬がストレスによる共通した代謝物質変化を示すことに基づき、海馬から前頭前皮質に投射する神経回路特異的に糖輸送体を発現抑制し、認知情動変容への影響を調べた。ストレス後に末梢免疫臓器である骨髄や脾臓を回収し、細胞動態や脂質代謝物プロファイルを調べた。

【結果】慢性社会挫折ストレスが前頭前皮質において六炭糖一リン酸と NADH/NAD 比の亢進を生じることを見出した。糖輸送体発現抑制により六炭糖一リン酸の亢進は抑制できなかったものの NADH/NAD 比は抑制されたことから、NADH/NAD 比、すなわち還元ストレスが認知情動変容と関連することが分かった。また、糖輸送体発現抑制によりミクログリア活性化が一部抑制され、そのため、ストレスによる代謝変容がミクログリア活性化に寄与することが分かった。海馬から前頭前皮質神経回路における糖輸送体発現抑制はストレスによる認知機能低下を抑制したことから、ストレスによる海馬―前頭前皮質回路における糖代謝変容がストレスによる認知機能低下を招くことが示唆された。このことは、ストレスによる認知情動変容において、特異的神経回路の代謝変化が重要であることを世界に先駆けて示すものである（下図）。さらに、ストレスにより骨髄や脾臓において抗炎症性脂質メディエーターの減少やリンパ球―骨髄性細胞シフトが生じることを見出した。すなわち、内因性抗炎症性脂質メディエーターの減少がストレスによる末梢炎症病像の形成に寄与する可能性が示唆された。以上の知見は、ストレスによる脳代謝リモデリングの実態や機序、意義の解明に資する。

慢性社会ストレスによる認知機能障害は海馬―前頭前皮質神経回路における糖輸送体依存的である



127. 脳代謝リモデリングに着目したストレス病態の解明

永井　裕崇

神戸大学 大学院医学研究科 薬理学分野

Key words：ストレス，前頭前皮質，糖代謝，脂質代謝，脳内炎症

緒　言

社会や環境より受けるストレスは前頭前皮質の機能・構造変化を伴う認知情動変容を生じ、うつ病のリスクとなる。うつ病は全世界に約 3 億の患者がおり、その三分の一が既存治療薬に抵抗性である。すなわち、病態機序理解に基づく創薬が求められている。うつ病患者は膝下野（マウス前頭前皮質の相同領域）における代謝亢進が報告されており、同領域の代謝正常化が症状の改善に重要であることが示唆されている。

我々はこれまで、マウスうつ病モデルとして知られる慢性社会挫折ストレスを用いて、ストレス感受性の個体差が行動ドメインごとに異なること、前頭前皮質や側坐核においてストレス感受性に応じて異なる脂質代謝物変動を生じること、そして前頭前皮質が担う認知柔軟性が最も障害を受けやすいことを解明してき［1〜5］。これらの知見は、ストレスが前頭前皮質を中心とした多様な神経回路や代謝を独立に変化させ認知情動変容を招くことを示唆する。また未発表ながら、ストレスが前頭前皮質シナプスの中央代謝系変化を介して神経細胞の機能構造変容や認知情動変容を招くことを見出しつつあった。そこで本研究では前頭前皮質の代謝変容を担う分子や神経回路機序を明らかにすることを目的とした。また、神経細胞の機能変化には脳や末梢の炎症状態も重要である。そのため、ストレスによるミクログリア活性化における脳代謝の役割を調べること、さらに末梢免疫を担う脾臓や骨髄において生じる細胞動態変化や、関連して生じる炎症制御性脂質代謝物の変化を調べることも目的とした［6］。

方　法

1. 実験動物

9〜10 週齢の雄 C57BL/6N マウスと 10〜12 週齢の雌 C57BL/6N マウス、交配からリタイヤした雄 ICR マウスを日本 SLC から購入し使用した。全てのマウスは明暗 12 時間おき、且つ水と餌は自由に摂取可能な環境で飼育した。動物の飼育と使用の手順は、全て米国国立衛生研究所の動物実験ガイドラインに準拠し、神戸大学大学院医学研究科の動物実験委員会によって承認されている。

2. 社会挫折ストレス

社会挫折ストレスの前に ICR マウスを新規の雄 C57BL/6N マウスに 1 日 3 分間曝露させ、3 日間の攻撃性を評価した。安定して攻撃性を有する ICR マウスを選別し、実験に用いた。社会挫折ストレスに供するマウスは 10〜11 週齢の雄 C57BL/6N マウスを用いた。1 週間の個別飼育を行った後、1 日 10 分間 ICR マウスからの攻撃に曝露させるストレスを 10 日間連続で実施した。

3. 社会相互作用試験

社会挫折ストレスを開始する前日（Day 0）に、ICR マウスを入れていない空のメッシュケージ（12 cm×5.5 cm）を一端に設置した行動チャンバー（30 cm×40 cm）内をマウスに 150 秒間自由に探索させ、新奇環境にお

ける探索行動を評価すると共に試験環境に馴化させた。さらに、1 回目、4 回目、10 回目の社会挫折ストレスの翌日にメッシュケージに新奇の ICR マウスを入れた条件で社会相互作用試験を実施した。試験中のマウスの行動を録画し、SMART video tracking system により軌跡を調べた。メッシュケージから 8 cm の領域を社会相互作用ゾーン、メッシュケージの反対の端から 9 cm の領域を社会忌避ゾーンと定義し、試験中のこれらの領域におけるマウス滞在時間の割合を社会忌避行動の指標として用いた。

4. 新奇物体認識試験

試験は 2 つのセッションで構成され、最初のセッションでは、2 個の LEGO ブロックを設置した行動チャンバー（30 cm×40 cm）内をマウスに 600 秒間自由に探索させ、試験環境及び同物体に対する馴化を行った。4 時間後に実施した本セッションでは、LEGO ブロックと砂入りフラスコを 1 個ずつ設置した行動チャンバー内をマウスに 600 秒間自由に探索させた。本セッションにおいて、新奇物体（砂入りフラスコ）に対する探索時間を、両物体に対する探索時間の合計で割った値を算出し、それを百分率で示した値を新奇物体嗜好性%とした。

5. 雌尿匂い嗅ぎ試験

試験は 2 つのセッションで構成され、最初のセッションでは、純水を滲み込ませた新たな綿棒を固定した。その後の本セッションでは、10～20 週齢の C57BL/6N 雌マウスから採取した新鮮な尿を 25 μL 滲み込ませた新たな綿棒を固定した。各セッションは 300 秒間とし、その様子はビデオカメラで撮影した。本セッションにおいて、雌尿を染ませた綿棒に対する探索時間を測定し、それを報酬嗜好性行動として評価した。

6. 内側前頭前皮質の Glut3 発現抑制

Glut3 標的配列を有する人工 miRNA（Glut3-miR）もしくは陰性対照配列を有する人工 miRNA（Ctrl-miR）と、緑色蛍光タンパク質（EmGFP）をコードする領域を、Double-floxed Inverted Open reading frame 内に配置した。これらのアデノ随伴ウイルスについては順行性と逆行性のものをそれぞれ作製し、Cre を発現する順行性と逆行性のアデノ随伴ウイルスと合わせて計 4 種類のアデノ随伴ウイルスを用いた。マウスをイソフルランで麻酔した後、脳定位固定装置を用いて左右の内側前頭前皮質（AP：＋1.8 mm、LM：＋－0.4 mm、DV：－2.8 mm from the bregma）に注入した。手術終了後は 4 週間の回復期間を設け、社会挫折ストレス及び各行動試験を実施した。

7. 質量分析イメージング

マウスにペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔を行い、断頭して全脳を回収した。液体窒素により速やかに凍結させ、－80℃で保管した。冠状断脳切片を作製し、iMScope TRIO（Shimadzu）を用いて質量分析イメージングを実施した。得られたデータは IMAGEREVEAL™ MS（Shimadzu）を用いて脳領域毎に興味対象領域を作成し、各興味対象領域内の平均イオン強度値をその領域における代謝物質量とした。各バッチの対照群平均を基準として正規化を行った。

8. ミクログリア特異的 RNAseq 解析

ミクログリアが EGFP を発現する CX3CR1-EGFP マウスを用いた。当該マウスに上述の方法と同様に Glut3 発現抑制を実施し、FACS により前頭前皮質の EGFP 陽性ミクログリアを回収した。その後 RNA を精製し、SMART-seq V4 Ultra Low Input RNA Kit 並びに Nextera XT DNA Library Prep Kit を用いて調製したライブラリを HiSeqX Ten を用いてシークエンシングした。リードカウントはマウス cDNA 配列（Ensemble GRCm38）の参照の上、Kallisto を用いて実施し、発現解析は Sleuth により行った。

9. 脂質メディエーター解析

社会挫折ストレスの後にイソフルランを用いてマウスを深麻酔し、大腿骨骨髄と脾臓を回収した。ホモジナイズ後にメタノール処理を行い、C18 カラムを用いた固相抽出後に LC-MS/MS（Qtrap6500）を用いて解析した。各脂質代謝物質はコントロールマウスの平均値で正規化した。

結果および考察

1. 慢性社会ストレスによる認知情動変容は前頭前皮質の還元ストレス状態と相関した

質量分析イメージングやキャピラリ電気泳動質量分析を用いて低分子代謝物質の解析を行うことで、慢性ストレスが前頭前皮質に六炭糖一リン酸の発現亢進や NADH/NAD 比の亢進を招くことを既に見出しつつあった。また、糖輸送体 Glut3 の発現抑制を前頭前皮質において行うことで認知情動変容が抑制できることも既に見出していた。しかし、六炭糖一リン酸の発現量や NADH/NAD 比が認知情動変容と因果関係があるかどうか未だに不明であった。その問題を解くため、糖輸送体 Glut3 の発現抑制を実施した上で慢性社会挫折ストレス後に質量分析イメージングを行い、前頭前皮質の中央代謝系変容や認知情動変容と関連する中央代謝系関連低分子代謝物質を調べた。糖輸送体発現抑制により六炭糖一リン酸の減少を予想していたものの、実際には糖輸送体発現抑制後に六炭糖一リン酸は減少せず、NADH/NAD 比の低下を認めた（図 1）。NADH/NAD 比は細胞内の還元ストレス状態を反映する指標であり、これらの知見は慢性ストレスが細胞内の糖代謝変容を介して還元ストレスを亢進することで神経細胞の機能構造変容や認知情動変容を招くことを示唆する。さらに、糖輸送体発現抑制によって細胞内の六炭糖一リン酸の枯渇などは生じないことも分かった。

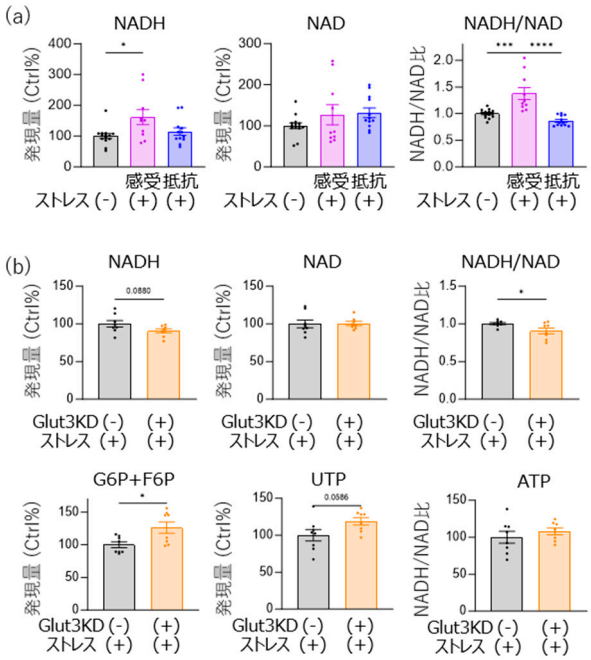


図 1. 慢性社会ストレスによる前頭前皮質還元ストレスは前頭前皮質糖輸送体依存的である

a） 質量分析イメージングによる前頭前皮質の代謝物質測定結果を示す。ストレスにより社会忌避行動を示す個体を感受性個体、示さない個体を抵抗性個体とした。ストレスは感受性個体特異的に還元ストレスを生じた。One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test を実施した。

b） 前頭前皮質特異的に糖輸送体 Glut3 を発現抑制した個体をストレスに供し、質量分析イメージングによる前頭前皮質の代謝物質測定結果を示す。糖輸送体 Glut3 の発現抑制により NADH/NAD 比は低下した。Student's t test を実施した。

*P＜0.05、***P＜0.001、****P＜0001。

2. 慢性社会ストレスは海馬―前頭前皮質神経回路の糖代謝変容を介して認知機能低下を招いた

これまでの検討で、慢性ストレスが前頭前皮質のシナプスにおいて中央代謝系関連タンパク質の発現変動を導くことを見出していた。また、広範な脳領域について代謝物マッピングを実施することにより、前頭前皮質や運動感覚野、海馬においてストレスが脳領域選択的な代謝変化を導くことも見出していた。しかし、神経回路選択的な代謝変化が有する意義は不明であった。前頭前皮質と海馬がいずれも六炭糖一リン酸の亢進を示していたこと、そして海馬から前頭前皮質には一方向性の神経投射があり、記憶や学習など多様な脳機能における重要性が知られていることに基づき、海馬から前頭前皮質への神経投射特異的に糖輸送体を発現抑制し、認知情動変容に対する影響を調べた。その結果、ストレスによる認知機能障害が改善することが分かった（図 2）。一方で、ストレスによる社会忌避行動や報酬嗜好性行動の低下には影響を与えなかった。すなわち、海馬―前頭前皮質神経回路における糖代謝変容がストレスによる認知機能障害を招くことが示唆された。

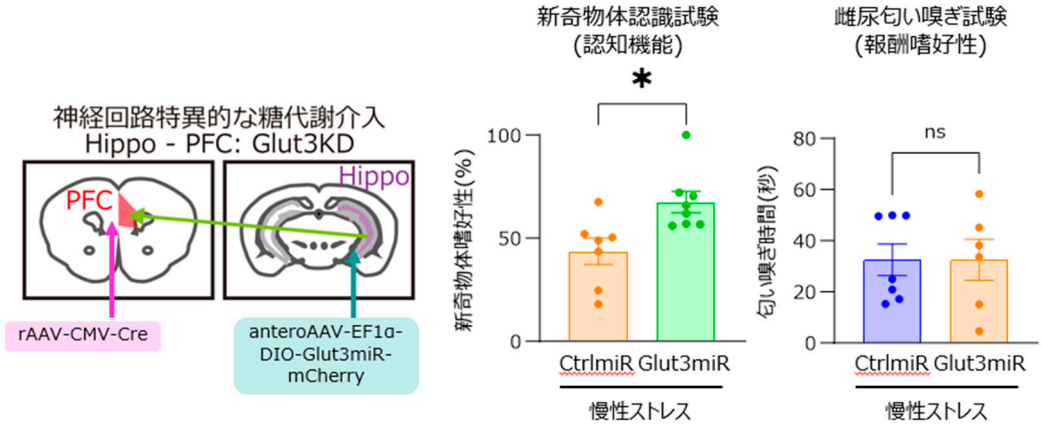


図 2. 慢性社会ストレスによる認知機能障害は海馬―前頭前皮質神経回路における糖輸送体依存的である
海馬から神経細胞に投射する神経細胞特異的に糖輸送体 Glut3 を発現抑制し、慢性ストレスに供した後に行動試験を行った。新奇物体認識試験における認知機能は Glut3 発現抑制により亢進した一方で、雌尿匂い嗅ぎ試験における報酬嗜好性には変化が無かった。Student's t test を実施した。*P＜0.05。

3. 慢性社会ストレスは前頭前皮質神経細胞の糖代謝変容を介して前頭前皮質ミクログリア活性化を招いた

以前の報告では、慢性社会ストレスが自然免疫受容体 TLR2/4 を介して前頭前皮質ミクログリアを活性化し、活性化ミクログリアに由来する炎症性サイトカインが前頭前皮質神経細胞の樹状突起構造退縮を招くことが示されている。すなわちストレスによる前頭前皮質神経細胞の構造退縮には周辺ミクログリアの活性化が重要である。一方、我々は神経細胞における糖輸送体発現抑制により神経細胞シナプスの構造退縮が抑制できることを見出していた。しかし、神経細胞における糖代謝変容と、ミクログリア活性化の間の因果関係は不明であった。この関係性を調べるため、神経細胞の糖輸送体発現抑制を行った上でストレスに供し、ミクログリアを回収した上で RNAseq 解析を行った。その結果、ミクログリア機能に重要な sensome 遺伝子群について、糖輸送体発現抑制によりストレスによる発現変動が減弱することが分かった。すなわち、ストレスによる神経細胞の糖代謝変容がミクログリア活性化に寄与することが分かった（図 3）。

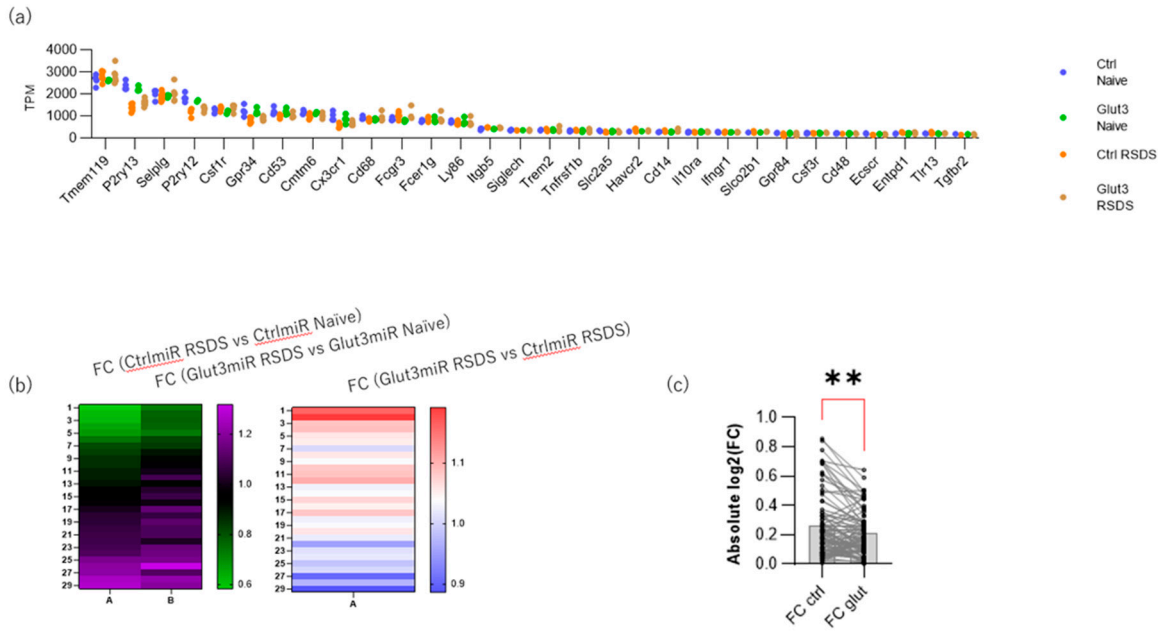


図 3. 慢性社会ストレスによるミクログリア活性化は前頭前皮質の糖代謝変容に部分的に依存する

a）前頭前皮質から単離したミクログリアの RNAseq の結果を示す。ノックダウンコントロール（Ctrl）もしくは Glut3 発現抑制（Glut3）を前頭前皮質に行い、慢性ストレスに供した（RSDS：repeated social defeat stress）か、もしくは非ストレス条件（Naïve）で、ミクログリアを回収し、RNAseq 解析を実施した。Sensome 遺伝子のうち発現上位 30 番までの遺伝子について発現量を示す。

b）左側のパネルにおいて、ノックダウンコントロール個体におけるストレスによる発現量変化をカラム A に、Glut3 発現抑制個体におけるストレスによる発現量変化をカラム B に示す。右側のパネルにおいてはストレスに供した上で Glut3 発現抑制個体と、ノックダウンコントロール個体の間の発現比を示す。

c）ノックダウンコントロール個体におけるストレスによる変化の絶対量と、Glut3 発現抑制個体におけるストレスによる変化の絶対量を比較している。Student's t test を実施した。**P＜0.01。

4. 社会ストレスは骨髄や脾臓における抗炎症性・炎症収束性脂質代謝物質を減少させ、同臓器における細胞集団組成をリンパ球から骨髄性細胞へシフトさせた

ストレスが骨髄や血中における骨髄性細胞の増加やリンパ球の減少を招くこと、末梢血中の免疫細胞が脳内に浸潤し脳内炎症を形成することがこれまで示唆されてきた［7, 8］。しかし、ストレスが免疫臓器である骨髄や脾臓において炎症応答を引き起こす機序は不明な点が多い。そこで急性から慢性にわたるストレスの過程で骨髄や脾臓中の免疫細胞の動態変化や、炎症制御に重要な脂質代謝物変化を調べた（図 4：脂質代謝物変化の結果のみ記載）。その結果、慢性ストレスは骨髄において持続的なリンパ球から骨髄性細胞へのシフトを生じ、関連して抗炎症性脂質メディエーターの一種である 15-deoxy-d12,14-prostaglandin J2 の減少を見出した。また脾臓においては一過的なリンパ球から骨髄性細胞へのシフトを生じ、関連して抗炎症性脂質メディエーターである 12-HEPE やレゾルビン類の減少を示した。すなわちこれらの知見は慢性ストレスが抗炎症性脂質メディエーターの減少を介して末梢免疫臓器における炎症病像を形成する可能性を示唆する。これまでレゾルビン類の抗うつ効果が着目されてきたがストレス病態における内因性レゾルビン類の関与については全く報告が無く、これらの知見は世界に先駆けて内因性レゾルビン類がストレス病態の炎症病像形成に寄与する可能性を示唆したものである。本知見は本研究助成の支援の下、Journal of Pharmacological Sciences に発表した［6］。

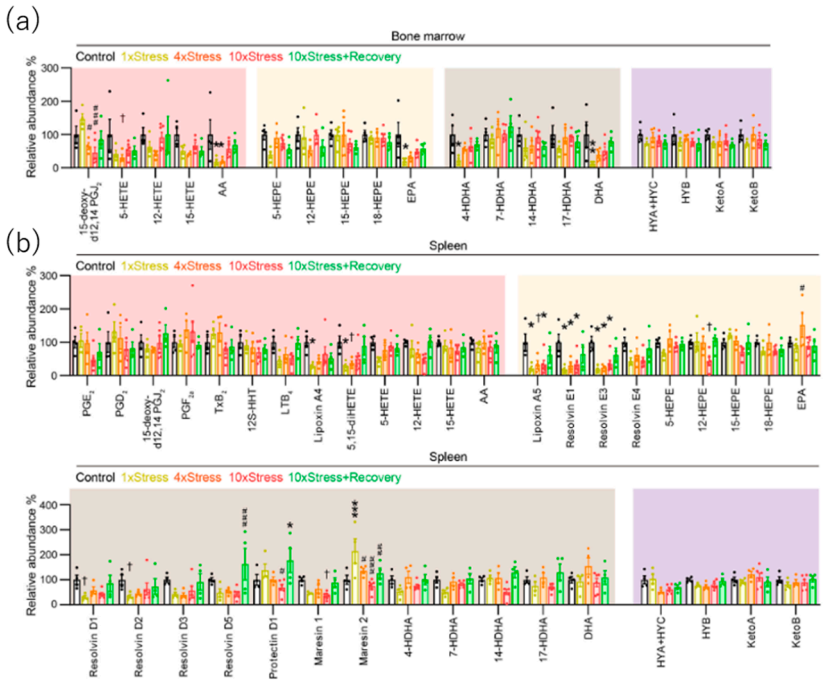


図 4. 社会ストレスによる骨髄・脾臓における脂質メディエーター変化

a）骨髄中の脂質メディエーター測定結果。社会ストレスにより 15-deoxy-12,14 PGJ2 は急性期から慢性期にかけて減少した。

b）脾臓中の脂質メディエーター測定結果。社会ストレスによりレゾルビン類や 12-HEPE の減少が認められた。

Two way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test を実施した。

†P＜0.1、*P＜0.05、**P＜0.01（Control との比較）；#P＜0.05、##P＜0.01、###P＜0.001（1×Stress との比較）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸大学の古屋敷智之博士と谷口将之博士、篠原正和博士、大阪大学の新間秀一博士、慶應義塾大学の曽我朋義博士である。

文　献

1） Akiyama S, Nagai H, Oike S, Horikawa I, Shinohara M, Lu Y, et al. Chronic social defeat stress increases the amounts of 12-lipoxygenase lipid metabolites in the nucleus accumbens of stress-resilient mice. Sci Rep. 2022;12(1):11385. Epub 20220705. doi: 10.1038/s41598-022-15461-7. PubMed PMID: 35790870; PubMed Central PMCID: PMC9256733.

2） Nagai M, Nagai H, Numa C, Furuyashiki T. Stress-induced sleep-like inactivity modulates stress susceptibility in mice. Sci Rep. 2020;10(1):19800. Epub 20201113. doi: 10.1038/s41598-020-76717-8. PubMed PMID: 33188274; PubMed Central PMCID: PMC7666172.

3) Numa C, Nagai H, Taniguchi M, Nagai M, Shinohara R, Furuyashiki T. Social defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial prefrontal cortex. Sci Rep. 2019;9(1):16670. Epub 2019/11/13. doi: 10.1038/s41598-019-52997-7. PubMed PMID: 31723165; PubMed Central PMCID: PMC6854085.
4) Okamura S, Nagai H, Numa C, Nagai M, Shinohara R, Furuyashiki T. Social defeat stress induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in the leptomeninges in mice. Neuropsychopharmacol Rep. 2019;39(2):134-9. Epub 2019/02/14. doi: 10.1002/npr2.12051. PubMed PMID: 30767433.
5) Higashida S, Nagai H, Nakayama K, Shinohara R, Taniguchi M, Nagai M, et al. Repeated social defeat stress impairs attentional set shifting irrespective of social avoidance and increases female preference associated with heightened anxiety. Sci Rep. 2018;8(1):10454. Epub 2018/07/11. doi: 10.1038/s41598-018-28803-1. PubMed PMID: 29993010; PubMed Central PMCID: PMC6041301.
6) Horikawa I, Nagai H, Taniguchi M, Chen G, Shinohara M, Suzuki T, et al. Chronic stress alters lipid mediator profiles associated with immune-related gene expressions and cell compositions in mouse bone marrow and spleen. J Pharmacol Sci. 2024;154(4):279-93. Epub 20240215. doi: 10.1016/j.jphs.2024.02.010. PubMed PMID: 38485346.
7) Ishikawa Y, Furuyashiki T. The impact of stress on immune systems and its relevance to mental illness. Neurosci Res. 2022;175:16-24. Epub 20211001. doi: 10.1016/j.neures.2021.09.005. PubMed PMID: 34606943.
8) Dion-Albert L, Dudek KA, Russo SJ, Campbell M, Menard C. Neurovascular adaptations modulating cognition, mood, and stress responses. Trends Neurosci. 2023;46(4):276-92. Epub 20230217. doi: 10.1016/j.tins.2023.01.005. PubMed PMID: 36805768.