

Title	慢性ストレスが制御性T細胞の分化と分布とに影響を与える経路の検討
Author(s)	川口, 拓都
Citation	令和元(2019)年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書
Issue Date	2020-06
Text Version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/11094/75986
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

2019年度大阪大学未来基金【住野勇財団】学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	かわぐち たくと 川口 拓都	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	3年
ふりがな 共同 研究者氏名	ひらいずみ かおり 平泉 香織	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	3年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	関山 敦生	所属	大学院薬学研究科 先制心身医薬学寄附講座		
研究課題名	慢性ストレスが制御性T細胞の分化と分布とに影響を与える経路の検討				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

【目的】

世界的な長寿化によって人口構成の高齢化が進行しているが、一方で健康長寿の実現には至っておらず、医療費の増大および生産可能な人口の比率低下が社会的課題となっている。そのなかで、生活習慣病、うつ病、認知症、がんといった疾患の重要性は加速度的に増大している。これらの疾患はその発生にエピジェネティックな要素が多く関与する、即ち「生きるなかで自身の体や行動が変化することで起きる病気」と考えられており、その背景に生体防御や免疫機構の制御異常が関与すると推測されている(1)。また、ストレスや抑うつ体験が、前記の疾患群の発症や増悪の強いリスクファクターであることが多くの疫学研究により示されてきた。

本学の先制心身医薬学寄附講座は、ストレスや抑うつが、生体防御や免疫機構の重要なメディエーターであるサイトカイン、IL (interleukin: IL) -18、IL-6 の分泌異常を惹起する経路を明らかにした(2)。一方、生体防御や免疫機構の制御には、ヘルパーT細胞(CD4陽性細胞)を介した経路が極めて重要な役割を果たしていることが知られており、さらに、ヘルパーT細胞の機能制御を制御性T細胞(以下 Treg)が担うこと、Tregへの分化をIL-6が抑制することが明らかにされている(図1. ヘルパーT細胞の分化と相互関係)。

古来、「病は気から」と言われるが、その経路は充分には明らかになっていない(図2. うつやストレスと生活習慣病の関係)。本研究では、ストレスとTregとの関係を明らかにするため、ストレスモデルマウスを用いて、ストレスが組織内Tregの分布に影響を与えるか否かについて検討を行った。

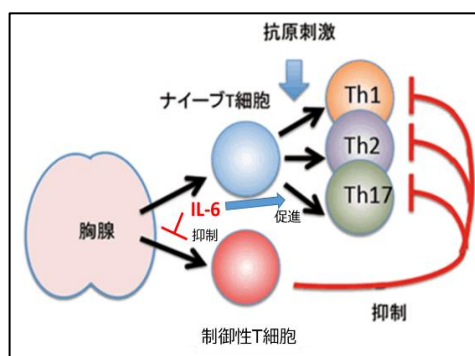


図 1. ヘルパーT細胞の分化と相互関係

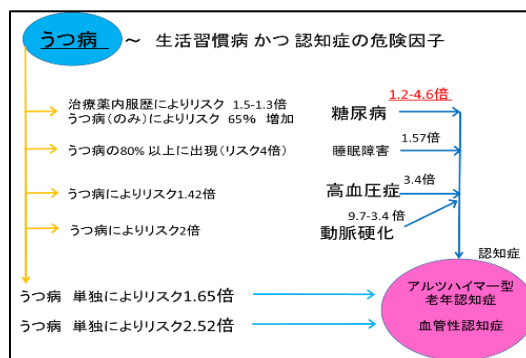


図 2. うつやストレスと生活習慣病の関係

【材料】

動物実験

マウス (SPF) C57BL/6NCr Slc 8 週齢 ♂ 清水実験材料より購入

セボフルラン (富士フィルム和光純薬株式会社 Cat.# 193-17791 Lot# CAN6092)

細胞分離

gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters (Miltenyi Biotec, CAT# 130-096-427)

Lamina Propria Dissociation Kit,mouse (Miltenyi Biotec, CAT# 130-097-410)

Multi Tissue Dissociation Kit 1 (Miltenyi Biotec, CAT# 130-110-201)

Dispase I (Godo Shusei Co, Cat.# 386-02271 Lot# 310325)

Collagenase (Worthington, Cat# LS004176, Lot# 49E19331)

抗体染色

CD3e-FITC (BD Pharmingen, Clone 145-2C11, Cat# 553062, Lot# 8256836)

CD4-PerCP-Cy™ 5.5 (BD Pharmingen, Clone RM4-5, Cat# 550954, Lot# 8067856)

CD4-PerCP-Cy™ 5.5 (BD Pharmingen, Clone RM4-5, Cat# 550954, Lot# 8346562)

CD25-APC (BD Pharmingen, Clone PC61, Cat# 557192, Lot# 8108554)

試薬

HBSS (+) (富士フィルム和光純薬株式会社 Cat# 084-08965, Lot# KCP 7010)

HBSS (-) (富士フィルム和光純薬株式会社 Cat# 085-09355, Lot# KCN 7043)

FACS buffer (1×PBS(-) with 1 % BSA, 0.1 % NaN₃)

Lysing Buffer (BD Pharm Lyse™, CAT# 555899, Lot# 7180899)

Dispase I 溶液 (DISPASE I (Godo Shusei Co., Ltd. CAT# 386-02271, Lot# 310325) 1 バイアルを HBSS (-) 10 mL で希釈した。)

測定機器

FACSAria II セルソーター (BD)

【方法】

1. 動物実験

a. マウス

マウス 雄性 C57BL/6N Cr Slc 8w (清水実験材料より購入) を用いた。

b. ストレス負荷

マウスを SPF 環境 (明暗サイクル: 8 時~20 時点灯、温度: 18~25 °C、湿度: 35~70 %) にて 3 日または 7 日間個別飼育した (単数飼育ストレス)。

6 匹で集団飼育したマウスを対照群とした。

2. 組織採取と単細胞化

a. 麻酔と採血、解剖

セボフルランを用い吸入麻酔後、心臓から採血、左心室より PBS (-) (4 °C) で灌流後解剖を行った。

b. 組織採取

脾臓: 脾臓を採取し、その一部約 20 mg を用いた。

脳: 脳全体を採取し、D-PBS で洗い、スライサー上で脳の位置をあわせ、全体をスライサーで冠状面に 8 つにスライスした。

小腸: 小腸中間部 12 cm を用いた。小腸外側の脂肪を取り除き、内容物を押し出して除いた後、管内を HBSS (-) で洗った。管を長軸方向に切り開き、横軸方向に約 5 mm に切った。

大腸: 虫垂直後から 3 cm 離れたところから 3 cm を用いた。大腸外側の脂肪を取り除き、内容物を押し出して除いた後、管内を HBSS (-) で洗った。管を長軸方向に切り開き、横軸方向に約 5 mm に切った。

直腸: 肛門直前から 4 cm を用いた。直腸外側の脂肪を取り除き、内容物を押し出して除いた後、管内を HBSS (-) で洗った。管を長軸方向に切り開き、横軸方向に約 5 mm に切った。

耳: 両耳を切り取った後、切り口からピンセットを入れて、真皮と表皮に剥がした (図 3 耳の真皮と表皮の分離)。軟骨がついた真皮を 2~4 mm 角に細断した。

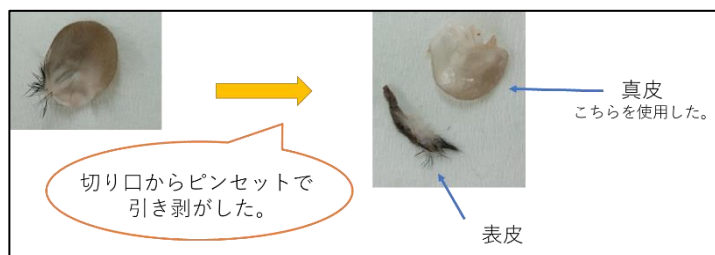


図 3 真皮と表皮の分離

背部皮膚: バリカンで剃毛し、皮膚全体を切り取った。組織内側の脂肪をピンセットで剥がしたのち、皮膚組織を約 1 mm 角に細切した。

c. 単細胞化とフローサイトメトリーのための染色

脳: 細胞分離に、Multi Tissue Dissociation Kit 1 (Miltenyi Biotec, Order no. 130-110-201) を用いた。FACS buffer で細胞懸濁液を作成し (1×10^6 cells / μL 以下となるように調製)、抗 CD3e, CD4, CD25 抗体各 1 μL を加え氷上で 30 分染色した。1 mL の FACS buffer を加えて遠心分離 (300 g,

4 °C, 5 分) し、上清を除き、FACS buffer 1 mL で再懸濁し、氷上静置した。

脾臓：採取した脾臓を、HBSS (-) 1 mL を満たしたプラスチック容器中ですりガラスでつぶし、2 mL チューブに移した。さらに、プラスチック皿を HBSS(-) 1 mL で洗い、同じ 2 mL チューブに移した。細胞懸濁液を小型遠心機で遠心分離 (2,100 g, 室温, 1 分) し、上清を除き、ペレットを FACS buffer 500 μ L で再懸濁した。そのうち 100 μ L に、抗 CD3e, CD4, CD25 抗体各 1 μ L を加え氷上で 30 分染色した。1 mL の FACS buffer を加えて遠心分離 (300 g, 4 °C, 5 分) し、上清を除き、FACS buffer 1 mL で再懸濁し、氷上静置した。

小腸：Lamina Propria Dissociation Kit, mouse (Miltenyi Biotec, Order no. 130-097-410) を用いて分離し、小腸粘膜固有層由来細胞と、小腸上皮細胞間リンパ球 (以下、小腸 IEL) を得た。1 \times 10⁶ cells / μ L 以下となるよう FACS buffer で懸濁した細胞懸濁液に、抗 CD3e, CD4, CD25 抗体各 1 μ L を加え氷上で 30 分染色した。1 mL の FACS buffer を加えて遠心分離 (300 g, 4 °C, 5 分) し、上清を除き、FACS buffer 350 μ L で再懸濁し、氷上静置した。

大腸：Lamina Propria Dissociation Kit, mouse (Miltenyi Biotec, Order no. 130-097-410) を用いて分離し、大腸粘膜固有層由来細胞と、大腸上皮細胞間リンパ球 (以下、大腸 IEL) を得た。1 \times 10⁶ cells / μ L 以下となるよう FACS buffer で懸濁した細胞懸濁液に、抗 CD3e, CD4, CD25 抗体各 1 μ L を加え氷上で 30 分染色した。1 mL の FACS buffer を加えて遠心分離 (300 g, 4 °C, 5 分) し、上清を除き、FACS buffer 350 μ L で再懸濁し、氷上静置した。

直腸：Lamina Propria Dissociation Kit, mouse (Miltenyi Biotec, Order no. 130-097-410) を用いて分離し、直腸粘膜固有層由来細胞と、直腸上皮細胞間リンパ球 (以下、直腸 IEL) を得た。1 \times 10⁶ cells / μ L 以下となるよう FACS buffer で懸濁した細胞懸濁液に、抗 CD3e, CD4, CD25 抗体各 1 μ L を加え氷上で 30 分染色した。1 mL の FACS buffer を加えて遠心分離 (300 g, 4 °C, 5 分) し、上清を除き、FACS buffer 350 μ L で再懸濁し、氷上静置した。

耳：Multi Tissue Dissociation Kit 1 (Miltenyi Biotec, Order no. 130-110-201) を用いて細胞を分離した。1 \times 10⁶ cells / μ L 以下となるよう FACS buffer で懸濁した細胞懸濁液に、抗 CD3e, CD4, CD25 抗体各 1 μ L を加え氷上で 30 分染色した。1 mL の FACS buffer を加えて遠心分離 (300 g, 4 °C, 5 分) し、上清を除き、FACS buffer 350 μ L で再懸濁し、氷上静置した。

背部皮膚：細断した背中皮膚を dispase I 溶液につけて 4 °C で終夜処理し、さらに 37 °C 水浴で 1 時間処理した。真皮と表皮を分離し、真皮を Collagenase 溶液内、37 °C で 2 時間 100 回 / 分振盪処理し、細胞を分離した。1 \times 10⁶ cells / μ L 以下となるよう FACS buffer で懸濁した細胞懸濁液に、抗 CD3e, CD4, CD25 抗体各 1 μ L を加え氷上で 30 分染色した。1 mL の FACS buffer を加えて遠心分離 (300 g, 4 °C, 5 分) し、上清を除き、FACS buffer 350 μ L で再懸濁し、氷上静置した。

3. フローサイトメトリーによる細胞の検出

CD25+CD4+ Treg は、胸腺で産生され、末梢において自己反応性 T 細胞レパトアを抑制することで、免疫自己寛容の維持に重要な役割を果たしている(3)。本研究では、末梢組織中 Treg の数を検討する目的で、CD4+ 細胞中に占める CD25 high CD4+ 細胞割合を観察した。なお、T 細胞ではない CD4 発現細胞を除くため、T 細胞特異的な表面抗原である CD3 でゲーティングを行っている。

すべての実験は、大阪大学大学院薬学研究科動物実験委員会の承認のもと、実験動物の苦痛に最大限の配慮を払って行った。

【結果】

各組織での、CD4+ 細胞中に CD25 high CD4+ 細胞が占める割合 (%) を表 1 に、比較のためのグラフを 図 4 に示した (腸管部分に関しては図 5 に拡大して表示)。

CD25 high of CD4+ (gated on CD3+)(%)	集団飼育	3日間個別飼育	7日間個別飼育
脳	57.4	41.2	45.5
脾臓	11.8	11.4	8.6
小腸	8.4	2.1	1.7
大腸	3.0	1.0	0.8
直腸	2.0	0.8	1.7
小腸 IEL	16.4	40.3	41.9
大腸 IEL	66.7	6.5	14.6
直腸 IEL	19.8	3.0	5.7
耳 真皮	8.0	6.7	3.8
背中 真皮	7.9	1.8	57.8

表 1 各組織での、CD4+ 細胞中に CD25 high CD4+ 細胞が占める割合 (%)

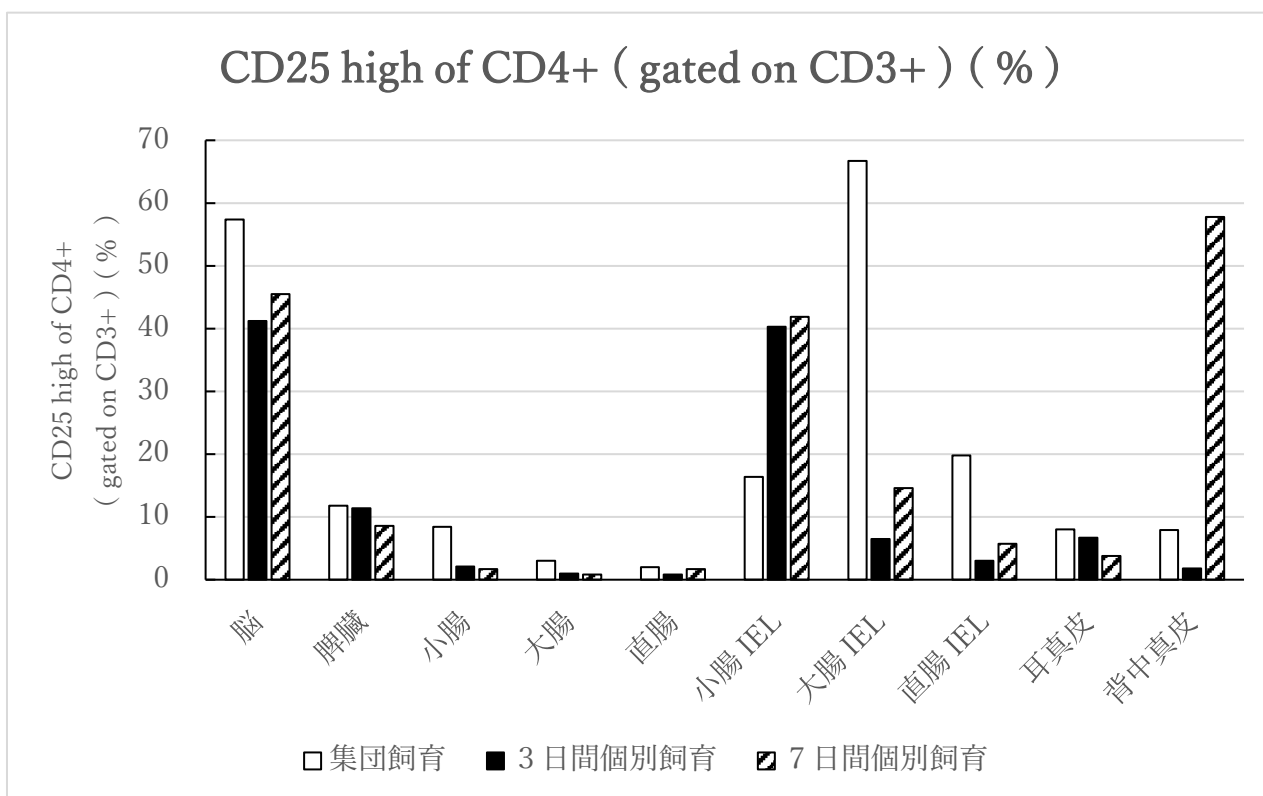


図 4 各組織での、CD4+ 細胞中に CD25 high CD4+ 細胞が占める割合 (%)

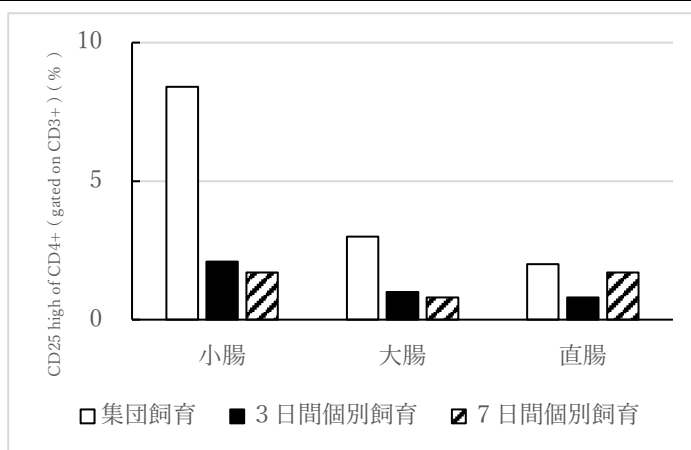


図5 小腸、大腸、直腸 CD4+ 細胞中に CD25 high CD4+ 細胞が占める割合 (%)

【考察】

脳、脾臓、小腸、大腸、直腸、小腸 IEL、大腸 IEL、直腸 IEL、耳真皮、皮膚真皮における CD25 high CD4+ 細胞の CD4+細胞に対する比率 (%) に対する、個別飼育ストレスの影響をフローサイトメトリーによって検討した。その結果、脾臓、脳、小腸、大腸、直腸、大腸 IEL、直腸 IEL、耳真皮においては CD25 high CD4+ 細胞の割合が減少する傾向が見られ、小腸 IEL のみ増加傾向が見られた。

Treg は、自己反応性細胞によって媒介される病原性免疫応答に抑制的に作用する CD4+T 細胞のサブセットであり、免疫の恒常性維持を担うと考えられている(4)。例えば、BALB/c マウスの末梢 CD4+T 細胞から CD25+ 細胞を除去して、同系のヌードマウスに移入すると、自己免疫性胃炎、卵巣炎、甲状腺炎が起きる(3)。BALB/c マウスの CD25-CD4+ T 細胞を同系 T 細胞欠損マウスに移入する際、BALB/c マウス由来の Treg を共移入すると、自己免疫性胃炎や卵巣炎を発症しない(3)。このように、Treg は免疫の恒常性維持を介し自己免疫性および炎症性疾患の発症抑制に深く関与している。

Treg は、胸腺における T 細胞成熟過程で産生され、これを thymic Treg (t Treg) と呼ぶ。一方、Treg は末梢においても観察され、これを peripheral Treg (p Treg) と呼ぶ(4)。tTreg と pTreg とはその分化経路や機能についての異同が議論下にあり、近年は両群にサブタイプが多数報告されている。Treg サブタイプについては、生理的条件下での分化や機能獲得に加え、疾患の発症(5)(6)(7)(8)(9)、投薬(7)、交感神経系を介したシグナル(9)によって増減したり出現したりすることが報告されており、全身および末梢局所の状況に応じて機能を変化させつつ、特に炎症抑制的に機能することで免疫の恒常性を担う細胞群が存在し、それが Treg と総称されていること、その分化、遊走あるいは末梢での機能獲得、制御メカニズムに対する知見はいまだ集積および解明の途上であると考えられる。このように未知の部分が多い Treg ではあるが、本検討で対象とした CD25+CD4+ Treg は、試験管内での抗原刺激に対して低反応で、他の T 細胞の増殖を抑制する(3)ことが示されており、制御性 T 細胞の概念に合致する細胞群と考えられる。

Treg が生じないマウスでは、様々な臓器にリンパ球浸潤を認め自己免疫疾患を生じることや、Treg の異常はヒトにおいて自己免疫疾患の原因となることが報告されている(3)。また、本研究では個別飼育ストレス負荷による腸の Treg 細胞割合の減少が観察されたが、腸内細菌叢が Treg 細胞の割合に影響するとする報告がある(10)。すなわち、Treg の減少は、T 細胞を介した免疫恒常性や炎症制御の破綻のみでなく、腸内細菌叢の変化を介して生体に影響を与える可能性が想定される。

本検討では、組織採取、細胞採取、再現性の確認等の実験条件の設定に研究資源を要したため、現時点（報告書作成時）で同一マウスの全組織の解析に至ったものは各条件1匹ずつとなった（本報告書では、確立した解析条件およびそれに基づく予算範囲内での解析結果を提示した）。予備実験等では本報告書と類似の結果は得られているので、試行回数を増やしさらに傾向を確認したい。

我々は、ストレスによって血中や組織中のサイトカイン量が変化し、生体防御機構にさまざまな影響を与える経路を報告している(2)。Tregの制御には種々のサイトカインが関与するので、サイトカインノックアウトマウス等を用いて、Treg割合の変化との相関関係を明らかにしたい。このことでpTregの増減におけるサイトカインの役割、さらに、ストレスがpTregの増減に影響を与える経路の解明に至る可能性がある。

我々の観察では、個別飼育ストレスが脳CD25 high CD4+細胞を減少させる傾向が観察された。安野ら(11)は、脳梗塞後の、拡張テンソル画像におけるFA値の上昇、末梢血中のTreg細胞数、うつ病発症との間に相関があることを報告。末梢血中Tregから推定される全身の炎症傾向が、脳の白質神経線維の乱れを介して後の行動フェノタイプに影響する可能性を論じた。また、伊藤ら(12)は、脳損傷後亜急性期に損傷局所に出現するTregがグリオーシス制御や損傷回復ばかりか機能回復に関与する可能性を示した。今後は、我々が観察した細胞と、安野らや伊藤らが観察したTreg細胞との異同の検討を進めるとともに、種々のストレスの負荷後に観察される行動フェノタイプの変化と脳および各臓器のCD25 high CD4+細胞との関係性を明らかにしたい。そのことで、ヒトにおけるストレス性の諸障害や精神神経疾患の新たな対処法、治療法を探る一助となると考えられる。

最後に、このような研究の機会を与えてくださった大阪大学大学院薬学研究科・薬学部の先生方、また、大阪大学未来基金（住野勇基金）学部学生による自主研究奨励事業に関わったすべての方に御礼を申し上げ、さらに勉学研究に邁進したいと思っております。ありがとうございました。

【参考文献】

- (1) Gupta SC et al., Inflammation, a Double-Edge Sword for Cancer and Other Age-Related Diseases. *Front Immunol.* 9, 2160. 2018
- (2) Sekiyama et al., A stress-induced, superoxide-mediated caspase-1 activation pathway causes plasma IL-18 upregulation. *Immunity.* 6, 669-77. 2005
- (3) Satoshi Tanaka., Shimon Sakaguchi, Regulatory T cell and autoimmune diseases. *Jpn. J. Clin. Immunol.* 28, 291-299. 2005
- (4) Niwa Ali et al., Regulatory T cells in skin, *Immunology*, 152, 372-381. 2017
- (5) Sumida T et al., Activated β -catenin in Foxp3+ regulatory T cells links inflammatory environments to autoimmunity. *Nat Immunol.* 19:1391-1402. 2018
- (6) Niedźwiecki M et al., CD4+CD25highCD127low/-FoxP3 + Regulatory T-Cell Population in Acute Leukemias: A Review of the Literature. *J Immunol Res.* 2019, 2816498. 2019
- (7) Wang X et al., Downregulation of T-Cell Transcription Factors in Adult Latent Autoimmune Diabetes with High-Titer Glutamic Acid Decarboxylase Antibody. *Diabetes Ther.* 10(3), 917-927. 2019
- (8) Hamari S et al., Analyses of regulatory CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells and observations from peripheral T cell subpopulation markers during the development of type 1 diabetes in children. *Scand J Immunol.* 83(4), 279-87. 2016

- (9) Wang J et al., Cerebral ischemia increases bone marrow CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in mice via signals from sympathetic nervous system. *Brain Behav Immun.* 43, 172-83. 2015
- (10) Koji Atarashi et al., Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species, *Science*, 331, 337-341. 2011
- (11) Yasuno F et al., Microstructural abnormality in white matter, regulatory T lymphocytes, and depressive symptoms after stroke. *Psychogeriatrics.* 14(4), 213-21. 2014
- (12) Ito M et al., Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature.* 565(7738), 246-250. 2019