虐待ストレスにおける胸腺退縮の分子機構解明
―拘束ストレスモデルを用いて―

Elucidating the Molecular Mechanisms of Thymic Involution in Abuse Stress
—Using a Restraint Stress Model—

（日本免疫学会推薦）

代表研究者　和歌山県立医科大学　石田　裕子　Wakayama Medical University　Yuko ISHIDA
協同研究者　和歌山県立医科大学　國中　由美　Wakayama Medical University　Yumi KUNINAKA

Acute stress induces rapid thymic involution characterized by loss of cortical thymocytes and reduced naïve T-cell output; however, the underlying intrathymic mechanisms remain poorly defined. In this study, we investigated the role of the CX3CL1–CX3CR1 chemokine axis in restraint stress (RS)-induced thymic atrophy using wild-type and CX3CR1-deficient mice. RS markedly upregulated CX3CL1 and CX3CR1 expression in thymic macrophages, suggesting activation of a local inflammatory pathway. Importantly, CX3CR1 deficiency significantly attenuated thymic atrophy, preserved cortical architecture, and reduced thymocyte apoptosis. Mechanistically, RS induced Fas ligand expression and increased apoptotic cells predominantly in cortical regions in wild-type mice, whereas these changes were diminished in CX3CR1-deficient mice. In vitro experiments demonstrated that CX3CL1 did not directly induce thymocyte apoptosis, indicating an indirect mechanism mediated by inflammatory cells. Furthermore, RS altered hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis hormone dynamics, and CX3CR1 expression was detected in hypothalamic microglia, suggesting involvement of neuroimmune regulation. Collectively, these findings demonstrate that the CX3CL1–CX3CR1 axis contributes to stress-induced thymic involution through both intrathymic inflammatory signaling and systemic neuroendocrine modulation. Targeting this pathway may provide a novel therapeutic strategy to preserve immune function under acute psychological stress.

研究目的

本研究の目的は，児童虐待などの慢性的かつ強度なストレス環境下において生じる胸腺退縮の分子機構を解明し，その病態を客観的かつ再現性高く評価可能な新規バイオマーカーを確立することである．近年，児童虐待は社会的に極めて深刻な問題となっているにもかかわらず，その診断は依然として外傷所見や生活環境の推定といった主観的要素に依存しており，客観的かつ分子レベルに基づく評価法は確立されていない．したがって，本研究は，虐待の有無を科学的に裏付ける指標の創出という点において，法医学および臨床医学の双方に重要な意義を有する．

本研究では，拘束ストレスモデルを用いて，ケモカインCX3CL1-CX3CR1軸が胸腺内における炎症反応，リンパ球アポトーシス，および組織構造の破綻にどのように関与するかを詳細に解析する．特に，マクロファージを中心とした免疫細胞の動態や，Fas/FasL 系を介した細胞死誘導機構に着目し，ストレス刺激がどのようにして胸腺の構造的・機能的破綻を引き起こすのかを分子レベルで明らかにすることを目指す．

さらに，本研究ではエピジェネティクス機構としてのmiRNAに着目し，ストレス曝露に伴う網羅的なmiRNA発現変化を解析することで，生体内に刻み込まれた「ストレスの分子痕跡」を同定する．miRNAは比較的安定であり，血液や尿などの非侵襲的検体からも検出可能であることから，実用的なバイオマーカーとして極めて有望である．本研究では，動物

モデルにおける miRNA 変動の同定に加え，ヒト剖検試料および生体試料においても同様の変化が再現されるかを検証し，動物とヒトを橋渡しする分子指標の確立を目指す.

加えて，本研究は免疫系のみならず，視床下部-下垂体-副腎（HPA）軸を介した神経内分泌応答との関連にも着目する．ストレス応答は神経系・内分泌系・免疫系が密接に連携する複雑な生体反応であり，胸腺退縮もその統合的な制御のもとで生じると考えられる．そこで本研究では，CX3CL1-CX3CR1 軸がこれらの系にどのように関与するかを明らかにし，ストレスによる免疫機能低下の全体像を統合的に理解することを目指す.

さらに，最終的には，動物実験で得られた知見をヒト試料へと展開し，虐待の有無を客観的に判別可能な分子指標の確立を図る．特に，尿や唾液，鼻上皮などの非侵襲的検体を用いた診断法の開発を視野に入れ，臨床現場や法医学的鑑定において実用可能な技術基盤の構築を目指す.

本研究により，従来困難であった児童虐待の客観的評価が可能となり，虐待の早期発見，介入，さらには再発防止に貢献することが期待される．また，法医学における死因判定の精度向上や，虐待期間・程度の推定といった新たな応用展開も見込まれ，本研究は社会的にも極めて大きな意義を有するものである.

研究経過

本研究では，虐待ストレスに伴う胸腺退縮の分子機構解明およびバイオマーカー同定を目的として，当初の研究計画に基づき段階的かつ体系的に研究を推進してきた．まず，予備的検討により確立していた拘束ストレス（restraint stress: RS）モデルを用い，野生型（WT）および Cx3cr1 欠損マウスに対して反復的ストレス負荷を実施した．本モデルでは，一定時間の拘束を繰り返すことで心理的ストレスを再現し，虐待環境に類似した慢性的ストレス状態を模倣している.

その後, 胸腺重量の測定, 組織学的解析（HE 染色），免疫染色，ならびに遺伝子発現解析を行い，ストレス負荷による形態学的および分子学的変化を包括的に評価した．その結果，RS 負荷により胸腺における CX3CL1 およびその受容体 CX3CR1 の発現が顕著に増加することが明らかとなり，特に F4/80 陽性マクロファージにおいて強い発現が認められた．このことから，ストレス刺激により胸腺内で炎症関連シグナルが活性化されることが示唆された.

さらに，WT マウスでは胸腺重量の有意な減少および皮質構造の破綻が観察されたのに対し，Cx3cr1 欠損マウスではこれらの変化が著明に抑制されていた．この結果は，CX3CL1–CX3CR1 軸がストレス誘導性胸腺退縮の発症および進展において中心的役割を果たすことを強く支持するものである.

次に，細胞死の評価として TUNEL 染色および caspase-3 の解析を行った結果，アポトーシス細胞は主として胸腺皮質に局在しており，ストレス負荷によりその数が顕著に増加することが確認された．さらに，アポトーシス関連分子である Fas および Fas リガンド（FasL）の発現解析を行ったところ，特に FasL の発現が WT マウスで有意に上昇していたのに対し，Cx3cr1 欠損マウスではその増加が抑制されていた．これらの結果から，CX3CL1–CX3CR1 軸が Fas/FasL 経路を介したリンパ球アポトーシス誘導に関与することが示唆された.

加えて，ストレス応答の全身的影響を評価するため, 血中ホルモン（ACTH およびコルチコステロン）の測定を行った. その結果, CX3CR1 欠損により HPA 軸の基礎状態およびストレス応答の動態に変化が認められ，本軸が神経内分泌系の制御にも関与する可能性が示された．さらに，視床下部における免疫染色により CX3CR1 がミクログリアに発現していることを確認し，本軸が中枢神経系を介したストレス応答の調節にも関与している可能性が示唆された．これにより，胸腺退縮が局所的現象ではなく，全身的な神経–免疫連関の中で制御される複合的現象であることが明らかとなった.

一方で, エピジェネティクス機構としての miRNA に着目し，マウス血液・尿・胸腺組織から total RNA を抽出し，miRNA シークエンス解析（miRNA-seq）およびリアルタイム RT-PCR による定量解析を段階的に進めた．その結果，拘束ストレスに応答して発現変動を示す複数の miRNA 群を網羅的に同定することに成功し，虐待のバイオマーカー候補となり得る分子のスクリーニングを行った.

特に，miR-18b-3p はマウス拘束ストレスモデルにおいて顕著な発現上昇を示し，さらにヒト虐待事例の血液試料においても対照群と比較して有意な増加が認められた．この結果は，動物モデルで得られた

知見がヒト病態においても再現される可能性を示すものであり，miR-18b-3p が虐待関連ストレスの分子指標として有望であることを示唆している．

さらに，これら miRNA の標的遺伝子解析およびパスウェイ解析を行った結果，免疫応答，神経機能，膜輸送，リン酸化制御など，ストレス応答に関連する複数のシグナル経路が有意に関与することが明らかとなった．これらの結果は，miRNA が単なるマーカーにとどまらず，ストレスによる生体応答の制御に積極的に関与している可能性を示している．

加えて，動物実験で得られた知見をヒト剖検試料へと展開し，被虐待例および非虐待例の血液・尿・胸腺組織における候補 miRNA の発現解析を進めている．本研究施設では年間約 250 件の法医解剖が実施されており，倫理審査の承認のもとで十分な検体確保が可能な体制が整備されている．これにより，動物モデルとヒトを統合した解析が可能となり，本研究の臨床応用性を高める基盤が確立されている．

以上のように，本研究は，

①CX3CL1–CX3CR1 軸の分子機構解明
②Fas/FasL 経路を介したアポトーシス誘導機構の解析
③神経内分泌系を含めたストレス応答の統合的理解
④miRNA を基盤としたバイオマーカー候補の同定
⑤ヒト試料を用いた検証

という複数の観点から着実に進展しており，当初の研究計画に沿って順調に遂行されている．今後は，候補 miRNA の再現性および特異性の検証をさらに進めるとともに，機能解析を通じて病態への寄与を明らかにし，最終的には非侵襲的診断法の確立に向けて研究を発展させる予定である．

考察

本研究の結果は，ストレス誘導性胸腺退縮の分子機構において，CX3CL1–CX3CR1 軸が中心的かつ機能的な役割を果たすことを明確に示すものである．従来，胸腺退縮は主としてグルココルチコイドを中心とした全身性ストレス応答によって説明されてきたが，本研究により，胸腺内局所における免疫細胞，とりわけマクロファージを介した炎症応答が重要な制御因子であることが明らかとなった．この点は，ストレス応答の理解に新たな視点を与えるものであり，胸腺退縮を単なる内分泌現象としてではなく，局所炎症と全身性応答が相互に作用する複合的病態として捉える必要性を示している．

特に，CX3CL1 および CX3CR1 が胸腺内マクロファージに強く発現し，その遺伝子欠損により胸腺退縮およびリンパ球アポトーシスが著明に抑制されたことは，本軸が病態形成に直接関与する分子経路であることを示唆する重要な知見である．さらに，本研究では Fas/FasL 系の関与が明らかとなり，CX3CL1–CX3CR1 軸がこのアポトーシス経路を介して胸腺皮質リンパ球の消失を促進する可能性が示された．すなわち，ストレス刺激は単にホルモン変化を引き起こすだけでなく，ケモカインシグナルを介して免疫細胞間相互作用を変化させ，結果としてリンパ球の選択的消失を誘導するという新たなメカニズムが考えられる．

さらに注目すべき点として，本研究では CX3CR1 が視床下部ミクログリアにも発現していることが確認され，CX3CR1 欠損マウスにおいて HPA 軸ホルモン動態が変化することが示された．これらの結果は，CX3CL1–CX3CR1 軸が末梢免疫系のみならず，中枢神経系を介した神経内分泌応答にも関与していることを強く示唆するものである．すなわち，本軸は「免疫」と「神経」を結びつける分子基盤の一つとして機能している可能性があり，ストレス応答が神経–免疫クロストークにより統合的に制御されることを支持する重要な証拠となる．

このような観点から，本研究は胸腺退縮という現象を，「局所炎症」「内分泌応答」「神経制御」という三層構造の中で再定義するものである．従来の単一経路モデルでは説明しきれなかった複雑なストレス応答の実態を，多系統連関モデルとして提示できた点は，本研究の大きな意義である．

一方で，本研究ではエピジェネティクス機構としての miRNA に着目し，ストレス応答に伴い発現変動する複数の miRNA を同定した．特に miR-18b-3p は，マウスモデルにおいて顕著な発現上昇を示すとともに，ヒト虐待事例においても同様の傾向が認められたことから，動物モデルとヒト病態を橋渡しする分子指標として極めて有望であると考えられる．

miRNA は転写後遺伝子制御に関与するだけでなく，細胞応答の統合的制御因子として機能することが知られている．本研究において同定された miRNA 群の標的遺伝子解析では，免疫応答，神経機能，膜輸送，シグナル伝達など多様な経路が関与することが示され，ストレス応答の複雑性を反映する結果と

なった．これらのことから，miRNA は単なる「マーカー」ではなく，ストレス応答そのものの制御因子として機能している可能性が高い．

また，miRNA は比較的安定であり，血液や尿といった非侵襲的検体から検出可能であるという特性を有する．この点は，法医学的応用において極めて重要であり，死後変化の影響を受けにくい分子として実用的価値が高い．さらに，臨床現場においても侵襲の少ない検体から評価可能であることから，将来的にはスクリーニング検査としての応用も期待される．

しかしながら，本研究にはいくつかの重要な限界が存在する．まず，拘束ストレスモデルは虐待の一側面を再現したものであり，ヒトにおける複雑な心理的・社会的背景を完全に反映するものではない．児童虐待は身体的要因のみならず，心理的要因，環境要因，社会的要因が複雑に絡み合った現象であるため，単一の動物モデルでその全貌を再現することには限界がある．

また，ヒト剖検試料においては，年齢，性別，栄養状態，基礎疾患などの多様な交絡因子が存在し，結果の解釈には慎重な検討が必要である．特に，miRNA は多くの疾患や生理状態に影響を受けるため，虐待特異性の検証が今後の重要課題となる．すなわち，本研究で同定された miRNA が虐待に特異的な変化であるのか，あるいは一般的なストレス応答の一部であるのかを明確に区別する必要がある．

さらに，CX3CL1–CX3CR1 軸および miRNA の変化が病態形成においてどの程度因果的役割を果たしているかについては，今後の機能解析が不可欠である．特に，遺伝子操作モデルや阻害剤を用いた介入実験により，これら分子の制御が胸腺退縮や免疫機能にどのような影響を与えるかを詳細に検討する必要がある．

それにもかかわらず，本研究は，ストレス誘導性胸腺退縮の分子基盤として CX3CL1–CX3CR1 軸を明確に位置づけるとともに，miRNA を基盤とした新規バイオマーカーの可能性を提示した点で，法医学および免疫学の両分野において重要な意義を有する．特に，虐待という社会的課題に対して，分子レベルからアプローチした点は極めて新規性が高く，今後の研究展開の基盤となる成果である．

今後は，候補 miRNA の再現性および特異性の検証を進めるとともに，大規模検体を用いた解析により統計学的な妥当性を確立する必要がある．さらに，非侵襲的検体を用いた診断法の確立を目指し，臨床現場および法医学実務への応用を視野に入れた研究を推進することが求められる．

最終的には，本研究で得られた知見を基盤として，虐待の早期発見，介入，予防に貢献する新たな診断体系の構築を目指す．これにより，児童虐待という重大な社会問題に対して，科学的根拠に基づく実効性の高い対策の確立に寄与することが期待される．

研究の発表

口頭発表

なし．

誌上発表

なし．