

令和元年6月11日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09271

研究課題名(和文) 自然免疫の機能低下を誘起する慢性ストレスの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular foundation reducing a natural immunity caused by chronic stress

研究代表者

船上 仁範 (FUNAKAMI, Yoshinori)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：70449833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性ストレス状態が免疫系，特に自然免疫に影響を与える可能性を検討した。その結果以下の知見を得た。(1)慢性ストレスにより肺胞マクロファージの貪食能活性および炎症性サイトカインの産生能を低下させる。(2)交感神経緊張低下状態が肺胞マクロファージの貪食能活性低下に関与している。(3)慢性ストレスによる肺胞マクロファージの貪食能活性低下は β 2受容体刺激薬により改善する。すなわち、慢性ストレスは β 2受容体を介して自然免疫能を低下させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究から、慢性ストレスにより破綻した自律神経系を介して自然免疫系に重要な役割を果たしている肺胞マクロファージの機能低下を誘発し、ストレスにより発症及び憎悪する一因に免疫力の低下が様々な疾患に関与している可能性が明らかとなった。また、このメカニズムの一端を解明したことでストレス関連症状の発症や悪化した症状を抑制し、患者のQOLを向上させる一つ的手段となり得ることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect that chronic stress condition gave for natural immunity. As a result, we obtained the following findings.

(1) The chronic stress reduces a phagocytic activity of the alveolar macrophage and a production of inflammatory cytokine. (2) Sympathetic hypotonia is involved in a decrease of the phagocytic activity in the alveolar macrophage. (3) The phagocytic activity decrease of the chronic stress-induced alveolar macrophage is improved by a beta 2 receptor stimulant drug. These results suggest that the chronic stress reduces natural immunity through a beta 2 receptor.

研究分野：生化学・薬理学

キーワード：慢性ストレス 自然免疫 自律神経 肺胞マクロファージ 貪食

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代病であるストレスは日常生活から切り離すことは困難であり、全身にわたる様々な症状の発症や疾患を悪化させる誘因となっている。ストレスに対する応答機構は全身における恒常性の維持に必須である神経系と内分泌系が中心となり制御している。免疫系は神経系、内分泌系と連動しており、ストレスによる影響を受けるが、ストレス関連疾患の発症にどのように関与しているか詳細は不明であった。

2. 研究の目的

慢性ストレス状態が免疫系、特に自然免疫に影響を与える可能性について着目し、慢性ストレス状態にある SART ストレスマウスから直接採取したマクロファージ (M₁) がどのような影響を受けているのかを明らかにすることを目的とし、慢性ストレスによる神経系と内分泌系を介した免疫系への影響を *in vitro* 及び *in vivo* 実験を駆使して研究し、明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SART ストレスマウスおよび正常マウスにおける肺胞 M₁ の免疫機能の評価

リンパ器官への SART ストレスの影響

リンパ球の分化・成熟に関する胸腺および脾臓の湿重量を測定した。

貪食能活性の評価

マウス肺から採取した肺胞マクロファージ (M₁) 5×10^5 cells を播種し、蛍光ビーズを含む培養液に入れ替え、1時間培養する。貪食能活性は、4% paraformaldehyde で固定し、蛍光ビーズを貪食している肺胞 M₁ の割合及び肺胞 M₁ 1個あたりの貪食ビーズ数を算出した。

サイトカイン産生能の評価

BALF より回収した M₁ 1×10^6 cells を播種し、1時間培養する。LPS 添加による 2, 4, 8, 16, 24 および 48 時間後の炎症性サイトカイン (IL-6, IL-1 および TNF- α) を ELISA 法にて測定した。

(2) 慢性ストレスによる M₁ の機能低下と自律神経系の関係を検証

交感神経および副交感神経切除マウスにおける肺胞 M₁ の貪食能活性

実験前 2 日間 6-hydroxy dopamine (6OH-DOPA) 100ng/kg をマウスに腹腔内投与し、交感神経を除去、また、マウスの左総頸動脈横にある左迷走神経を切断することで迷走神経を除去した。これらのマウスから肺胞 M₁ を採取し貪食能活性を測定した。

SART ストレス誘発 M₁ 貪食能低下メカニズムの検証

交感神経活性化薬および遮断薬、副交感神経活性化薬および遮断薬を用いて貪食能活性を測定した

4. 研究成果

SART ストレスマウスでは、T 細胞の分化、成熟に関する胸腺及びリンパ球の成熟や免疫応答の場となる脾臓の湿重量が低下し、萎縮していた。また、肺胞 M₁ の貪食能活性及び炎症性サイトカイン IL-6, IL-1, TNF- α の産生能は低下していた。以上の結果から、慢性ストレス状態が一つの要因となり肺胞 M₁ の機能を低下する環境を誘発し、自然免疫能を低下させることが示唆された。

慢性ストレスの各種症状は、自律神経系の破綻が関与していることから、迷走神経切除術または化学的除神経を施したそれぞれのマウスを使用して、肺胞 M₁ の貪食能を検討した。化学的除神経を施したマウスの肺胞 M₁ は貪食能活性の低下が認められたが、迷走神経切除術を施したマウスではその変化が認められなかった。*in vitro* および *in vivo* 両実験系において慢性ストレス状態における肺胞 M₁ の自然免疫能が低下していることが示唆された。つまり、慢性ストレスによる交感神経緊張低下状態がの関与が肺胞マクロファージの貪食能低下を誘起することが示唆された。

SART ストレスマウスおよび正常マウスから採取した肺胞 M₁ に交感神経作用薬であるノルアドレナリン及びアドレナリン (α_1 作用) イソプロテレノール (β_1 作用) と副交感神経作用薬 (カルバコール (ニコチン及びムスカリン作用)) を適用し貪食能活性を評価したところ、アドレナリンとイソプロテレノールが SART ストレスにより惹起した肺胞マクロファージ貪食能低下を改善した。また、選択的 α_1 受容体遮断薬アテノロールの前処置ではこれらの効果に対して変化は認められなかった (Fig.1) が、選択的 β_1 受容体遮断薬 ICI-118,551 の前処置によりその効果が無効となった (Fig.2) ことから、慢性ストレスによる貪食能活性低下状態には β_1 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。

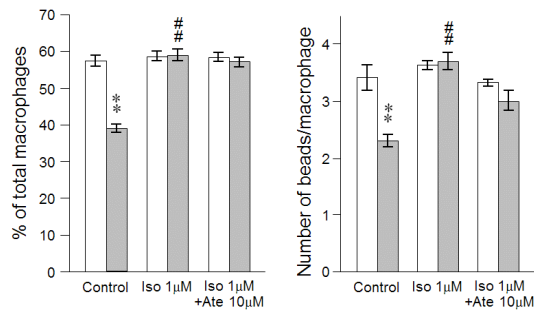


Fig.1 Influence of Atenolol on Isoproterenol-induced phagocytosis activity of isolated alveolar macrophage in SART-stressed mice
Data show the mean \pm S.E.M. from 11-12 Unstressed (\square) and 12-13 SART-stressed mice (\blacksquare).
** $p < 0.01$ v.s. the respective unstressed mice. ## $p < 0.01$ v.s. the vehicle group (Tukey's test).

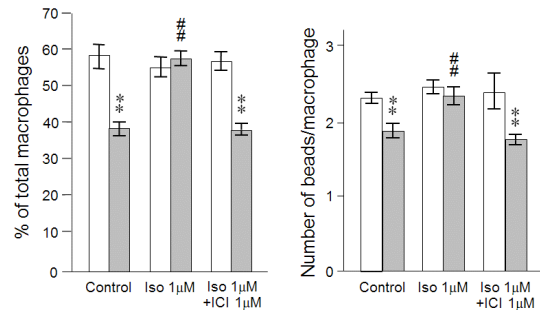


Fig.2 Influence of ICI-118,551 on Isoproterenol-induced phagocytosis activity of isolated alveolar macrophage in SART-stressed mice
Data show the mean \pm S.E.M. from 9-10 Unstressed (\square) and 9-10 SART-stressed mice (\blacksquare).
** $p < 0.01$ v.s. the respective unstressed mice. ## $p < 0.01$ v.s. the vehicle group (Tukey's test).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Otsuka H, Fukao A, Funakami Y, Duncan KE, Fujiwara T. Emerging Evidence of Translational Control by AU-Rich Element-Binding Proteins. *Front Genet.* 2019 May 2;10:332. 査読あり

doi: 10.3389/fgene.2019.00332. eCollection 2019.

Sadahiro A, Fukao A, Kosaka M, Funakami Y, Takizawa N, Takeuchi O, Duncan KE, Fujiwara T. Translation of Hepatitis A Virus IRES Is Upregulated by a Hepatic Cell-Specific Factor. *Front Genet.* 2018 Aug 10;9:307. 査読あり

doi: 10.3389/fgene.2018.00307. eCollection 2018.

Tsubota M, Miyamoto T, Hiruma S, Saeki H, Miyazaki T, Sekiguchi F, Funakami Y, Kawabata A. Repeated Cold Stress Reduces Cyclophosphamide-Induced Cystitis/Bladder Pain and Macrophage Activity in Mice. *Pharmacology.* 2017;99(5-6):286-290.

doi: 10.1159/000461588. 査読あり

Miyamoto T, Funakami Y, Kawashita E, Nomura A, Sugimoto N, Saeki H, Tsubota M, Ichida S, Kawabata A. Enhanced Hyperthermic Responses to Lipopolysaccharide in Mice Exposed to Repeated Cold Stress. *Biol Pharm Bull.* 2017;40(1):11-16. 査読あり

doi: 10.1248/bpb.b16-00343.

Miyamoto T, Funakami Y, Kawashita E, Tomita S, Nomura A, Sugimoto N, Saeki H, Miyazaki T, Tsubota M, Ichida S, Kawabata A. Repeated Cold Stress Enhances the Acute Restraint Stress-Induced Hyperthermia in Mice. *Pharmacology.* 2017;99(3-4):172-178. 査読あり

doi: 10.1159/000454815. Epub 2017 Jan 4.

[学会発表](計20件)

坂村由梨佳, 友廣拓生, 大塚衆志, 深尾亜喜良, 船上仁範, 鈴木亨, 山本雅, 藤原俊伸: 哺乳類における miRISC による翻訳抑制機構の解明.

第41回日本分子生物学会年会, 2018年

石田一希, 貞廣暁利, 安達俊吾, 深尾亜喜良, 船上仁範, 夏目徹, 藤原俊伸: ポリオウイルス組織特異性を生み出す, IRES 依存的翻訳制御機構の解析.

第41回日本分子生物学会年会, 2018年

深尾亜喜良, 西阪皓理, 松木香菜子, 大塚衆志, 船上仁範, 藤原俊伸: ARE 結合タンパク質 AUF1 による遺伝子発現制御機構の解析.

第20回日本 RNA 学会年会, 2018年

坂村由梨佳, 友廣拓生, 大塚衆志, 深尾亜喜良, 船上仁範, 鈴木亨, 山本雅, 足立俊吾, 夏目徹, 藤原俊伸: 哺乳類における miRISC による翻訳抑制機構の新たな知見.

第20回日本 RNA 学会年会, 2018年

石田一希, 貞廣暁利, 安達俊吾, 深尾亜喜良, 船上仁範, 夏目徹, 藤原俊伸: ポリオウイルス組織特異性を生み出す IRES 依存的翻訳制御機構の解析.

第20回日本 RNA 学会年会, 2018年

貞廣暁利, 深尾亜喜良, 小坂実央, 滝沢直己, 船上仁範, 竹内理, Kent E Duncan, 藤原俊伸: A 型肝炎ウイルス IRES 依存的翻訳は肝臓特異的因子により活性化される.

第20回日本 RNA 学会年会, 2018年

武知 美和, 大塚 衆志, 深尾 亜喜良, 船上 仁範, 藤原 俊伸: BRF1 による mRNA 分解と共役した翻訳抑制機構の解析

第40回日本分子生物学会年会 ConBio2017, 2017年

坂村 由梨佳、友廣 拓生、大塚 衆志、深尾 亜喜良、船上 仁範、鈴木 亨、山本雅 雅、藤原 俊伸：哺乳類における miRNA による翻訳抑制機構の解明
 第 40 回日本分子生物学会年会 ConBio2017, 2017 年
 Hiroshi Otsuka, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toshinobu Fujiwara : Elucidation of elementary processes in which RNA-binding protein HuD stimulates the cap-poly(A)-dependent translation.
 Cutting Edge Developments in RNA Biology for the Control of Gene Expression, 2017 年
 Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toshinobu Fujiwara : Mysterious eukaryotic translation initiation factor eIF4H.
 Cutting Edge Developments in RNA Biology for the Control of Gene Expression, 2017 年
 Hiroshi Otsuka, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Kent Duncan, Toshinobu Fujiwara : Elucidation of elementary processes in which RNA-binding protein HuD stimulates the cap-poly(A)-dependent translation.
 Protein Synthesis and Translational Control, 2017 年
 Akira Fukao, Hiroshi Otsuka, Yoshinori Funakami, Kent Duncan, Toshinobu Fujiwara : ZFP36L1 represses translation initiation independently of deadenylation mediated by AU-Rich elements.
 Protein Synthesis and Translational Control, 2017 年
 坂村由梨佳、友廣拓生、大塚衆志、深尾亜喜良、船上仁範、鈴木亨、山本雅、藤原俊伸：哺乳類における miRISC による翻訳抑制機構の解明
 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017 年
 深尾亜喜良、友廣拓生、大塚衆志、青山智彦、船上仁範、足達 俊吾、夏目 徹、藤原俊伸：in vitro 翻訳システムを用いた miRNA による翻訳制御分子機構の解析
 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017 年
 西阪皓理、松木香菜子、大塚衆志、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸：ARE 結合タンパク質 AUF1 による遺伝子発現制御機構の解析
 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017 年
 大塚衆志、武知美和、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸：BRF1 による mRNA 分解と共役した翻訳抑制機構の解析
 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017 年
 武知美和、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸：RNA 結合タンパク質が仲介する mRNA 分解と翻訳との共役
 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
 貞廣暁利、足達俊吾、深尾亜喜良、船上仁範、夏目徹、竹内理、藤原俊伸：ポリオウイルスの細胞種特異的な IRES 依存的翻訳の解析
 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
 青山智彦、大塚衆志、船上仁範、深尾亜喜良、藤原俊伸：PABP interacting protein 1 (Paip1) による翻訳制御機構の解析
 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
 友廣拓生、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸：cap 依存的翻訳における eIF4H の機能解析
 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
 ⑳ 大塚衆志、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸：RNA 結合タンパク質 HuD による翻訳促進機構の素過程の解析
 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP

<https://www.phar.kindai.ac.jp/biochemistry/>