

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：24402
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2008～2011
 課題番号：20249042
 研究課題名（和文） 精神・免疫・内分泌系の統合的制御～ストレス特異的サイトカインカスケードの解明
 研究課題名（英文） Total Control of Psycho-immune-endocrine system; revealing stress specific cytokine cascade
 研究代表者
 関山 敦生（SEKIYAMA ATSUO）
 大阪市立大学・大学院医学研究科・特任准教授
 研究者番号：30403702

研究成果の概要（和文）：本研究により、① ストレスの種類と量のマーカー、②IL18、活性酸素、TNF- α を介する三つのサイトカインカスケード③ミトコンドリアが介するサイトカイン誘導メカニズム（FEBS Letter 2011）④大うつ病の重症度マーカー⑤ストレス後精神障害予測マーカーをそれぞれ発見した。④、⑤に関しては更なる検討を予定。成果は、2011年度後半から東北太平洋沖地震救援活動従事者の健康管理に役立っており、本研究の社会的成果は多大である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have revealed (1) human serological marker to objectify what and how much stress is loaded, (2) a pathway for cytokine induction via interleukin (IL)18, superoxide, and tumor-necrotizing-factor, (3) a pathway for cytokine induction involving mitochondria, (4) a human serological marker that associates with severity of major depressive disease, and (5) a human serological marker that predicts psycho-behavioral disorders after stress. We have reported these results in several academic meeting including plenary lectures. At the same time, our developed technique to objectify post-stress depression have been practically utilized for people participated to rescue operation of the Tohoku Earthquake.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
総計	22,300,000	6,690,000	28,990,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系一般（含心身医学）

キーワード：心身相関、ストレス、免疫学、サイトカイン、うつ病、視床下部下垂体副腎軸、脳・神経、再生医学

1. 研究開始当初の背景

精神、免疫、内分泌系は相互に深く連携し、巨大な生体防御機構を形成している。この生体防御機構は、生体ホメオスタシスの維持とストレス応答において中心的役割を果たしており、ストレスが種々の疾患を惹起する際には、生体防御機構が破綻したと考えられる。

研究代表者は、サイトカインの一つであるインターロイキン(IL) 18（分担研究者、岡村春樹によって発見。Nature 1995）が、拘束ストレス負荷によって血中で爆発的に増加することを示し(Immunity 2005)、ストレス下において IL18 は ACTH によって副腎皮質において産生され、10 時間以上もの間血中で高値を維持、IL6 を含む多様なサイトカインの分泌を惹起する (J Neuroimmunol 2006, J Med Invest 2005) ことを明らかにした。

精神障害者の血中で IL18 が高値を示すこと (Biological Psychiatry 2005)、ストレスで誘導された IL18 が脳に到達し、ストレス反応の中心的役割を果たす視床下部・下垂体・副腎系をさらに活性化すること (米生物学的精神医学会発表済 2007、論文投稿中 in revision)、ストレスが IL18 を介して、能動免疫獲得に主要な役割を果たす樹状細胞の活性を変化させること (米生物学的精神医学会発表済 2007、論文投稿中)、先行する軽微なストレスによって分泌された IL18 が副腎に作用し、以降のストレス応答を大きく変化させること (第 49 回日本神経化学学会大会優秀演題賞受賞) を明らかにしていた。また、ストレスによるループス様腎炎の惹起および増悪を回避する、抗 IL18 レセプター抗体の作成にも成功しており (世界生物学的精神医学会 poster of the day 受賞 2005)、精神、免疫、内分泌系からなる生体防御機構が、生理活性物質によって統御されているメカニズムに注目していた。これらの検討を進める中で、研究代表者は、ストレス下で IL18 によって誘導されるサイトカイン群が、炎症下で IL18 によって誘導されるサイトカイン群と異なることに気付いていた。そこで、2006 年に入り、ストレスモデルマウスおよびヒトボランティアにおいて、IL18 以外のサイトカイン群を含む多数の生理活性分子群を酵素抗体法等 (ELISA 等) によって検討。尿、血中のサイトカイン濃度が、心理テストによって示されたストレス傾向ごと、および種々の実験的ストレスごとに、特有のパターンを示すことを世界に先駆けて見出していた (知見の一部は日本インターフェロン・サイトカイン

学会発表済 2007)。この知見をもとに測定対象分子群を選定し、ヒトとマウスにおいてさらに先行検討した結果、尿、血中のサイトカイン等生理活性分子の濃度によってその生体に過去加わった負荷を判別、しかも負荷強度の評価が可能である強い可能性を得ていた (米生物学的精神医学発表済 2008)。

2. 研究の目的

本研究は、生体防御機構の主要なメディエーターであるサイトカインの分泌様式が、ストレスの種類ごとに異なることに注目し、大きな社会的問題でありながら、生物学的、客観的な把握や評価が困難であった精神的ストレスに特に集中し、ストレスの種類ごとにサイトカイン濃度パターンおよび分泌メカニズムを特に誘導カスケードにおける上流下流関係に注目して明らかにすることを図った。さらにストレス下におけるサイトカインの主要な作用点を解明。健全な生体統御を維持・強化するための分子基盤を確立し、ストレスの悪影響に抗する具体的な方策を提示することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 日周リズム (サーカディアンリズム) によるサイトカイン類の血中濃度変化の解明

本研究ではボランティアヒト 20 名を対象として、1 時間毎に血液と唾液を採取、IL18、TNF-alpha を含む 30 種類以上のサイトカイン、キマーゼ等の血中酵素群、ホルモン (以下サイトカイン類と記述します) を網羅的に測定。同様の検討を同一集団に対して季節を変えて行い、日周リズムによるサイトカイン類パターン変化を明らかにすることを図った。

(2) 労働によるサイトカインパターン変化の検討

本研究では特に医療従事者 80 名を対象に、夜勤の前後で血液、尿、唾液を採取し、同時に生理学的諸指標 (体重、心拍、血圧、歩数ほか) を記録、さらに質問紙による心理テスト (GHQ28、MAS、SDS、自覚症しらべ、FFI、TEG 等) を施行。サイトカイン類レベルと生理学的諸指標および心理状態との相関を検定。有意相関するものについては人格傾向毎に定量的変化を検討。労働内容、強度、性格傾向が、サイトカイン類レベルに与える影響を総合的に明らかにすることを図った。

(3) ストレスハイリスク群における相関パターンの検討

上記 (1) (2) の参加者のうち、心理テストで

一般的に健常とされるスコア以上のものをストレスハイリスク群に分類し、小規模(20名程度)の追跡研究を行った(精神科医のインタビューによる評価も行い、倫理的見地から希望者にはカウンセリングも行う。)心理状態の変化とサイトカイン類レベルの相関を検討し、心理状態に対する State マーカーと Trait マーカーの確立につなげる。

(4) NADPH オキシダーゼ欠損マウスのストレス応答に対する検討

研究代表者は、NADPH オキシダーゼ活性化が、ストレスによるサイトカイン分泌カスケードのトリガーになること、さらに NADPH オキシダーゼタイプ 2 欠損マウスにおいて、ACTH 等の分泌異常があることを見出している(論文投稿中)。そこで、同マウスに対し拘束ストレスと単数飼育ストレスとをそれぞれ負荷。血液、脳、副腎を採取。ストレス下のサイトカイン類の変動および分泌機構を明らかにすることを図った。

(5) ACTH レセプター欠損マウスのストレス応答に対する検討

ストレス下では ACTH がカスパーゼ 1 を副腎に誘導し、サイトカイン分泌カスケードに深く関与することが報告されている

(Immunity 2005)。研究分担者千田らが作出した ACTH レセプター欠損マウス(PNAS 2007 掲載決定)を対象に、2-①と同様の検討を行う。ヘテロ体も用いるが、ホモ欠損個体の生存率が極めて低いため、検討に要する期間を長期間とした。

(6) ストレス下の樹状細胞機能変化の検討

ミトコンドリアが関与するサイトカイン誘導メカニズムを解明。(FEBS Letter 2011)

(7) 計算課題負荷の、サイトカイン相関パターンに対する影響の検討

(8) 運動課題負荷の、サイトカイン相関パターンに対する影響の検討

上記(7)の被験者にエアロバイク課題を 45 分を 1 クールとして負荷。クール毎に唾液、血液を採取。サイトカイン類の濃度を測定、分泌パターンへの影響を明らかにする。以降結果を総合し、別の集団で再現性を確認。精神的負荷と肉体的負荷に対応するマーカーを確立することを図った。

4. 研究成果

(1) 日周リズム(サーカディアンリズム)によるサイトカイン類の血中濃度変化の解明

ボランティアヒト 42 名をつのことに成功。倫理的観点から 1 時間の採血はできず、4 時間毎となった。承認された予算額が当初より少なかったため、一度しか行うことができなかったが、夏季におけるサイトカイン類パターン日周リズムの測定に成功した。

(2) 労働によるサイトカインパターン変化の

検討

医療従事者 120 名を対象にすることに成功、夜勤者におけるサイトカインパターンの偏移、ならびに夜勤による影響を検討。ヒヤリハット事故との関連を検討。生理学的諸指標(体重、心拍、血圧、歩数ほか)に加え、質問紙による心理テスト(GHQ28、MAS、SDS、自覚症しらべ、FFI、TEG 等)の採取に成功した。成果の一部である、血中サイトカイン濃度相関表を以下に示す。

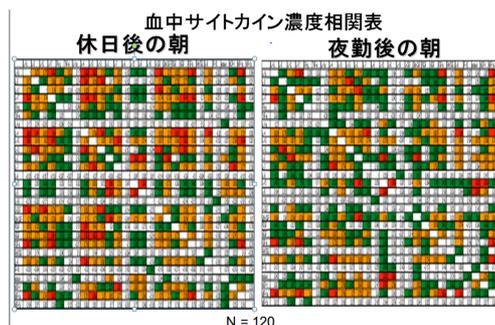


図1 夜勤による血中サイトカインプロファイル変化

(3) ストレスハイリスク群における相関パターンの検討

心理テストで一般的に健常とされるスコア以上のものをストレスハイリスク群に分類し、小規模(20名程度)の追跡研究を行ったこの成果から、ストレス後のうつ病、PTSDの発症を予見するマーカーの選択に成功、**東北太平洋沖地震の救援活動従事者の健康管理ツールとして用いられることとなった。**(成果の一部を以下に示す)。

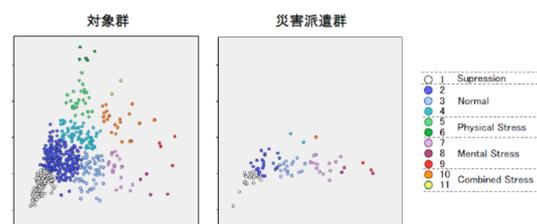


図2 災害救援活動後のサイトカインプロファイル変化(精神的ストレスが突出している)

(4) NADPH オキシダーゼ欠損マウスのストレス応答に対する検討

NADPH オキシダーゼ活性化がストレスによるサイトカイン分泌カスケードのトリガーになること、さらに NADPH オキシダーゼタイプ 2 欠損マウスにおいて、ACTH 等の分泌異常があることを見出し、さらに、iNOS 由来の NO がそれらに対して抑制的に機能していることを発見した(論文投稿準備中)。

(5) ACTH レセプター欠損マウスのストレス応答に対する検討

同マウスのストレス応答を検討、同マウス

では肝臓における運動時グリコーゲン利用に障害があることを発見(論文投稿準備中)。

(6) ストレス下の樹状細胞機能変化の検討

研究分担者 岡村春樹と連携研究者である笠原恵美子、および研究代表者によって、樹状細胞のT細胞活性化能がIL18の制御を受けることが明らかとなっていた。そこで、ストレスがサイトカインを介して樹状細胞の抗原提示能、T細胞活性化能に与える影響ならびにストレスによる免疫(サイトカイン)、内分泌(CRH, ACTH, ステロイド)系の物質が樹状細胞の性質を変化させるメカニズムとに分けて検討、メカニズムの解明を図った。

(7) 計算課題負荷の、サイトカイン相関パターンに対する影響の検討

ボランティアのなかから、内科的、精神医学的診察によって健常と認められる30名を選択。クレペリン課題を45分を1クールとして負荷。クール毎に唾液、血液を採取。サイトカイン類の濃度を測定。分泌パターンへの影響を明らかにすることを図った。

(8) 運動課題負荷の、サイトカイン相関パターンに対する影響の検討

運動、計算課題により、それぞれ異なった血中サイトカインパターンを示すことを明らかにした。

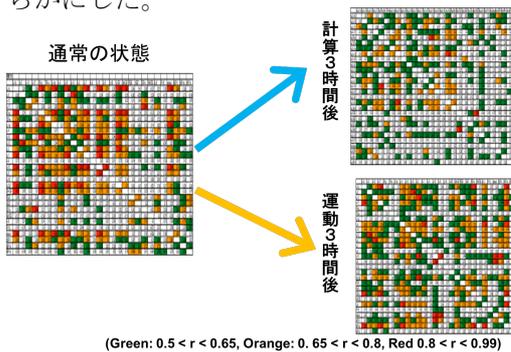


図3. 課題ごとの血中サイトカインパターンの変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計27件:すべて査読あり)

1. Heparan sulfate subdomains that are degraded by Sulf accumulate in cerebral amyloid beta plaques of Alzheimer's disease: Evidence from mouse models and patients. Hosono-Fukao T, Kenji Uchimura et al., *Am. J Pathol*(180). 2056-2067, 2012
2. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and α -melanocyte-stimulating hormones of iNOS origin play important roles in the allergic reactions of atopic dermatitis in mice. Orita K, Hiramoto K, Kobayashi H, Ishii M, Sekiyama A, Inoue M. *Exp Dermatol*. 20(11):911-4. 2011

3. Physiological stress exacerbates murine colitis by enhancing proinflammatory cytokine expression that is dependent on IL-18. Matsunaga H, Hokari R, Ueda T, Kurihara C, Hozumi H, Higashiyama M, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Nakamura M, Kawaguchi A, Nagao S, Sekiyama A, Miura S. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 301(3):G555-64. 2011.
4. Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. Kasahara E, Sekiyama A, Hori M, Hara K, Takahashi N, Konishi M, Sato EF, Matsumoto S, Okamura H, Inoue M. *FEBS Lett*. 585(14):2263-8. 2011
5. The role of glucocorticoids in pregnancy, parturition, lactation, and nurturing in melanocortin receptor 2-deficient mice. Chida D, Miyoshi K, Sato T, Yoda T, Kikusui T, Iwakura Y. *Endocrinology* 152(4). 1652-60. 2011
6. RB4CD12 epitope expression and heparan sulfate disaccharide composition in brain vasculature Hosono-Fukao T, Kenji Uchimura et al., *J Neurosci. Res*, 89, 1840-1848, 2011
7. Mitochondria determine the efficacy of anticancer agents that interact with DNA but not the cytoskeleton. Hara K, Kasahara E, Takahashi N, Konishi M, Kubo S, Okamura H, Sato E, Inoue M. *J Pharmacol Exp Ther*. 337(3):838-45. 2011
8. Abrogation of Treg function deteriorates rheumatoid arthritis. Yamagiwa T, Fukunishi S, Tachibana T, Okamura H, Yoshiya S, Kashiwamura SI. *Mod Rheumatol*. 2011
9. Replication-competent-retrovirus-vector-mediated prodrug activator gene therapy in experimental models of human malignant mesothelioma. Kawasaki Y, Tamamoto A, Takagi-Kimura M, Maeyama Y, Yamaoka N, Terada N, Okamura H, Kasahara N, Kubo S. *Cancer Gene Ther*. 18(8):571-8. 2011
10. Involvement of CD56brightCD11c+ cells in IL-18-mediated expansion of human $\gamma\delta$ T cells. Tsuda J, Li W, Yamanishi H, Yamamoto H, Okuda A, Kubo S, Ma Z, Terada N, Tanaka Y, Okamura H. *J Immunol*. 186(4):2003-12. 2011
11. Adenovirus-retrovirus hybrid vectors achieve highly enhanced tumor transduction and antitumor efficacy in vivo. Kubo S, Haga K, Tamamoto A, Palmer DJ, Ng P, Okamura H, Kasahara N. *Mol Ther*.

- 19(1):76-82. 2011
12. Role of hydrogen generation by Klebsiella pneumoniae in the oral cavity. Kanazuru T, Sato EF, **Kasahara E**, **Inoue M**. *J Microbiol.* 48(6):778-83. 2010
 13. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. Miyamoto K, Sato EF, **Kasahara E**, Hiramoto K, Katsuragi M, Odo S, Utsumi K, **Inoue M**. *Free Radic Biol Med.* 49(4):674-81 2010
 14. The role of endogenous glucocorticoids in lymphocyte development in melanocortin receptor 2-deficient mice. Sato Y, Suzuki H, Sato T, Suda T, Yoda T, Iwakura Y, **Chida D**. *Biochem Biophys Res Commun.* 403(3-4):253-7. 2010
 15. Functional hypothalamic amenorrhea due to increased CRH tone in melanocortin receptor 2-deficient mice. Matsuwaki T, Nishihara M, Sato T, Yoda T, Iwakura Y, **Chida D**. *Endocrinology.* 151(11):5489-96. 2010
 16. Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. Sato T, Abe T, **Chida D**. *FEBS Lett.* 584(4):817-24. 2010
 17. Dynamic aspects of ascorbic acid metabolism in the circulation: analysis by ascorbate oxidase with a prolonged in vivo half-life. **Kasahara E**, Orita K, Hara K, **Sekiyama A**, Sato EF, **Inoue M**. *Biochem J.* 26;421(2):293-9. 2009
 18. Effect of Nitric Oxide on the Oxygen Metabolism and Growth of E. faecalis. Nishikawa T, F Sato E, Choudhury T, Nagata K, **Kasahara E**, Matsui H, Watanabe K, **Inoue M**. *J Clin Biochem Nutr.* 44(2):178-84. 2009
 19. Modulation of innate immunity by IL-18. Li W, Yamamoto H, Kubo S, **Okamura H**. *J Reprod Immunol.* 83(1-2):101-5. 2009
 20. Role of Macrophages in the development of pancreatic islet injury in spontaneously diabetic torii rats. Inokuchi C, Ueda H, Hamaguchi T, Miyagawa J, Shinohara M, **Okamura H**, Namba M. *Exp Anim.* 58(4):383-94. 2009
 21. Immunotherapy with interleukin-18 in combination with preoperative chemotherapy with ifosfamide effectively inhibits postoperative progression of pulmonary metastases in a mouse osteosarcoma model. Yamada N, Hata M, Ohyama H, Kogoe N, **Okamura H**, Terada N. *Tumour Biol.* 30(4):176-84. 2009
 22. RhoH plays critical roles in Fc epsilon RI-dependent signal transduction in mast cells. Oda H, Fujimoto M, Patrick MS, **Chida D**, Sato Y, Azuma Y, Aoki H, Abe T, Suzuki H, Shirai M. *J Immunol.* 15;182(2):957-62. 2009
 23. Characterization of mice deficient in melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background. **Chida D**, Sato T, Yoda T, Suzuki H, Iwakura Y. *Mol Cell Endocrinol.* 300(1-2):32-6. 2009
 24. Juzen-taiho-to, an herbal medicine, activates and enhances phagocytosis in microglia/macrophages. Liu H, Wang J, **Sekiyama A**, Tabira T. *Tohoku J Exp Med.* 215(1): 43-54. 2008
 25. Interleukin-18 prevents apoptosis via PI3K/Akt pathway in normal human keratinocytes. Hosotani Y, Kashiwamura S, Kimura-Shimmyo A, **Sekiyama A**, Ueda H, Ikeda T, Mimura O, **Okamura H**. *J Dermatol.* 35(8):514-24. 2008
 26. Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. Miyoshi K, Obata K, Kondo T, **Okamura H**, Noguchi K. *J Neurosci.* 28(48):12775-87. 2008
 27. Increased fat:carbohydrate oxidation ratio in Il1ra (-/-) mice on a high-fat diet is associated with increased sympathetic tone. **Chida D**, Hashimoto O, Kuwahara M, Sagara H, Osaka T, Tsubone H, Iwakura Y. *Diabetologia.* 51(9):1698-706. 2008
- [学会発表] (計件:多数のため、研究代表者による招待講演等のみ掲示)
1. 大うつ病、統合失調症における、血中サイトカイン・ケモカイン濃度プロファイルの検討 第17回日本精神・行動遺伝学会学術大会 シンポジウム **Sekiyama A**. 2010年2月11日 於 大阪医科大学
 2. ストレス、うつ病を可視化する 日本医科大学 (日本医科大学付属病院内科学講座循環器・肝臓・老年・総合病態部門主催学内セミナー) **Sekiyama A**. 2009年10月21日 於 日本医科大学
 3. ストレスおよび精神疾患下でのサイトカイン・ケモカイン血中濃度の検討 大阪医科大学 精神医学教室主宰 学内セミナー **Sekiyama A**. 2009年11月16日 於 大阪医科大学精神医学講座
 4. うつ病・統合失調症における血中サイトカイン・ケモカインプロファイルの検討 **Sekiyama A**. 第28回南大阪精神医療研究会 2010年2月24日 於 リーガロイヤルホテル堺 4F ダイヤモンド
 5. 精神神経内分泌免疫学におけるサイトカインー心と身体の情報伝達メカニズムー 第73回 日本心理学会 ワークショップ

2008年8月27日 於 立命館大学

6. **Sekiyama A.**, Sekiyama R., **Kasahara E.**, Shimokata H., Sekiyama K., **Inoue M.**, Tabira T., **Okamura H.** Visualizing Mental Disorders; distinct plasma levels of cytokines and chemokines in schizophrenia and major depressive disorders. Days of Molecular Medicine, Cognitive Dysfunction in Disease: Mechanisms and Therapies, Stockholm, Sweden. 2009年4月18日 (招待講演 *Cell Press & Karolinska Institute*)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関山 敦生 (SEKIYAMA ATSUO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：30403702

(2) 研究分担者

笠原 恵美子 (KASAHARA EMIKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：30468269

千田 大 (CHIDA DAI)

国立国際医療センター (研究所)・臨床病理部・組織形態室 室長

研究者番号：90312842

岡村 春樹 (OKAMURA HARUKI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60111043

内村 健治 (UCHIMURA KENJI)

名古屋大学大学院医学研究科生物化学講座・分子生物学分野・特任講師

研究者番号：20450835

井上 正康 (INOUE MASAYASU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

(2011年度より名誉教授)

研究者番号：80040278