

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790476

研究課題名 (和文) 過労定量化を目指したバイオマーカーの探索

研究課題名 (英文) Identification of a biomarker for the chronic fatigue syndrome

研究代表者

池島 信江(獅子王 信江) (IKEJIMA NOBUE (SHISHIOH NOBUE))

大阪市立大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号：50420401

研究成果の概要 (和文)：疲労状態を客観的に定量化することは未だに確立されていない。ラット疲労モデル動物において疲労負荷により下垂体での形態異常が見られることから、疲労負荷を与えたラットの末梢血中における下垂体ホルモン変化を調べたところ、 α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH) の上昇が認められた。この結果をさらにヒトへと発展させ、著しい疲労感を呈する慢性疲労症候群 (Chromatic Fatigue syndrome ;CFS) について α -MSH の血漿中濃度を調べたところ、CFS 群は健常者群より有意に α -MSH の値が高いことが示された。 α -MSH は過労のバイオマーカーの一つになることが明らかにされた。

研究成果の概要 (英文)：Biological markers for chronic fatigue syndrome (CFS) have long been sought. In animal model for chronic stress, hyper-activation of melanotroph in pituitary gland and the increase of alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) level in plasma were demonstrated. In this regard an increase of α -MSH level in plasma of CFS patients who suffer from prolonged stress may be expected. We therefore examined α -MSH levels in CFS patients. CFS patients who suffer less than 5 years had significantly higher levels of α -MSH in their peripheral blood. The α -MSH could be a potent biological marker to diagnose CFS at least during the first 5 years from the onset.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科系一般 (含心身医学)

キーワード：ストレス科学

1. 研究開始当初の背景

現代社会において「過労死」は大きな社会問題となっている。過労死は、疲労回復のため

の休息を取らないまま長期間労働や作業を続けることによって、心疾患および精神疾患によってひきおこされる。このような過労死

を予防するためには事前に疲労蓄積の度合いを把握する必要がある。疲労感、個人の主観的な判断でしかなく、他者の比較が困難なら上に実際の疲労蓄積の程度と必ずしも一致するわけでない。また、運動能力や判断力を測定する現在確立されている疲労定量法では、個々人の健在能力の差の影響を拭えない上に、万人に施せる簡便な方法ではない。ゆえに、疲労蓄積程度を客観的にかつ簡便に定量する方法が必要である。

疲労が生体へもたらす分子生物学的変化の中にバイオマーカーのヒントがあるのではないかと考え、モデル動物を用いた研究に注目した。水の張ったケージにラットを数日間飼育することでラットに疲労負荷を与える疲労モデルラット（以下、疲労ラット）を用いて、形態学的分子生物学的に解析が行われている。疲労ラットでは、疲労負荷が与えられると脳下垂体における顕著な形態異常が観察され、特に下垂体中間葉において過労負荷3日には、著しい分泌促進像が、5日目には細胞死が観察されている。また、中間葉から分泌されるホルモンの前駆体遺伝子プロオピオメラノコルチン (POMC) の発現が負荷日数に従って上昇していることが報告されている (Ogawa et al 2005)。これらの結果から、疲労負荷によって脳下垂体からのホルモン分泌が活発になっている可能性が考えられた。よって、下垂体中間葉から分泌される α -MSH および β -endorphin に注目し、これらについてバイオマーカーとしての可能性を検討するに至った。

2. 研究の目的

- (1) 過労のバイオマーカーとして可能性のある下垂体中間葉から分泌されるホルモン α -MSH および β -endorphin の動態を、疲労ラットを用いて検索する。また、これらホルモンの分泌が疲労特異的であることを確認する。
- (2) α -MSH は末梢において色素合成だけでなく抗炎症作用を持つ事が、 β -endorphin においても免疫応答に関することが知られていることから、疲労ラットにおける LPS 応答性サイトカインの動態および一酸化窒素の濃度変化を調べる。
- (3) ヒトにおいて α -MSH が過労のバイオマーカーとなりうるかを慢性的疲労感を呈する疾患群を対象に検証する。

3. 研究の方法

- (1) 疲労ラットにおける、 α -MSH および β -endorphin の血中濃度を測定した。

① 疲労ラットの作成方法

7週齢雄のSDラットを、深さ2cmの水を張ったケージにて、1日間、3日間、5日間、連続飼育した。以下、これらのラットを1d、3d、5dと呼ぶ。また、5日間の疲労負荷の後、通常のケージで1日間飼育したラットをrecoverと名付けた。

② α -MSH および β -endorphin の測定方法
各ラットを午前10時にエーテル麻酔を行い、腹腔内静脈より採血し、血漿を得た。下垂体中間葉から末梢血中へと分泌されるホルモンとして α -MSH と β -endorphin について、RadioImmunoAssay (以下、RIA) 法により市販のキット (Bachem Peninsula Laboratories, Inc.) を用いて測定した。

③ 疲労特異性の検討

疲労ラットでは体重減少が観察されている。 α -MSH および β -endorphin の変化が体重減少によって引き起こされるのかどうかを調べるため、体重5%質量の食餌制限を5日間行ったラットについても、同様にホルモン濃度を測定した。

また、 α -MSH および β -endorphin は下垂体以外の細胞からも分泌されることが知られている。疲労ラットにドーパミンアゴニスト、Bromocriptine mesylate (10mg /Kg rat /day) を投与することで脳からの分泌であることを、さらに下垂体を切除したラットについて疲労負荷を行い、 α -MSH および β -endorphin が下垂体から分泌されていることを確認した。結果は、平均値±標準誤差で表した。統計学的解析には、一元分散分析法および多重比較検定を用い、P値が0.05以下の時、有意であると判定した。

- (2) 疲労ラットにおける LPS 応答性サイトカインおよび一酸化窒素の濃度を ELISA 法で測定した。

① 疲労ラットへの LPS 投与

疲労負荷を1日間、3日間、5日間かけたラットおよびrecoverラットを作成し、それぞれ最終負荷日の午前10時にLPS100 μ g/kg 体重を腹腔内注射にて投与した。2、4、8時間後に大静脈より採血し、血清を得た。コントロールとして生理的食塩水を投与したラットについては4時間後に採血を行った。

② 免疫応答の評価法

それぞれの血清について、ELISA kit (Becton, Dickinson and Company) を用いて、Tumor necrosis factor (TNF- α)、Interleukin1- β (IL-1 β)、IL-6、およびIL-10の濃度を測定した。また、血中の一酸化窒素濃度は、グリース法を用いNO₂/NO₃の濃度を測定した。統計処理は、一元分散分析法および多重比較検定によって評価した。

(3) 過労を呈したヒトにおける α -MSH 血中濃度の検討。

① 疲労を呈する疾患の罹病患者からの採血
著しい疲労を呈する疾患として、慢性疲労症候群 (Chromatic Fatigue Syndrome; CFS) に注目し、大阪市立大学医学部付属病院倫理委員会の承諾を得、同疲労クリニックセンター医師により午前中朝食前に採血された血漿の中で罹病期間が 10 年以内の 57 検体を用いた。また、健常人サンプルは同センターの協力のもと、性別比年齢分布を揃えた 30 検体を用いた。

② ヒト α -MSH の測定

血漿中の α -MSH 濃度を、RIA キット (Eurodiagnostica, Malmö, Sweden) によって測定を行った。健常人との比較に welch' s t-test を、罹病期間との相関関係については spearman' s rank test を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 動物モデルにおいて疲労負荷をかけると血漿中の α -MSH および β -endorphin が上昇することを明らかにした。

コントロールと比較して疲労ラットでは、疲労負荷 1 日間、3 日間、5 日間と長くなるにつれ α -MSH および β -endorphin の血漿中濃度が増加傾向を示した。 α -MSH は 3d および 5d において有意な濃度上昇が見られ (control; $203.7 \pm 24.2 \mu\text{g/mL}$, 3d; $493.8 \pm 17.1 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.01$, 5d; $513.6 \pm 30.7 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$)、 β -endorphin においては 3 日目に有意な上昇をピークとし (control; $0.72 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$, 3d; $1.46 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$) 5 日目に下降の傾向が見られた (図 1)。また、recover ではコントロールと同じ値まで戻り、食事制限したラットではホルモン濃度の変化が見られなかったことより、これらのホルモン濃度上昇は疲労負荷によって引き起こされたことが示された。また、下垂体を切除したラットに疲労負荷を与えたところ、 α -MSH の濃度上昇は見られず、同様に疲労ラットにドーパミンアゴニストを投与したラットにおいてもホルモン上昇が見られなかったことより、 α -MSH および β -endorphin は他臓器からではなくドーパミン抑制による下垂体からの分泌であることが示された (図 2)。以上のことより、ラットでは疲労負荷をかけることにより下垂体中間葉より α -MSH および β -endorphin を末梢へと分泌し、血漿中濃度が上昇することが示された。これらの結果は、2008 年 2 月の疲労学会において口頭発表し、また、2009 年に J Neurochem において Ogawa らによる論文の一部として発表した。

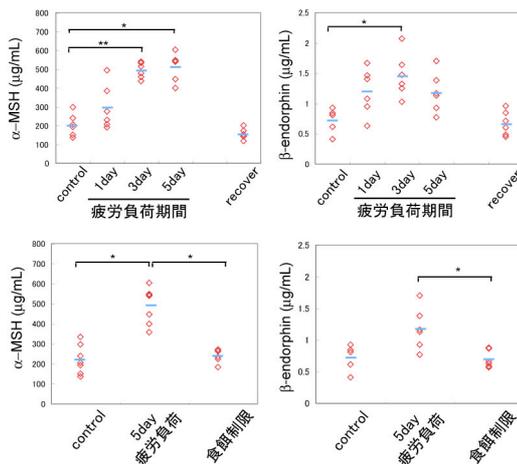


図 1. 疲労ラットにおける血漿中 α -MSH と β -endorphin 濃度 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

Dopamin agonist; BCT = Bromocriptine mesylate (10mg / Kg rat / day)

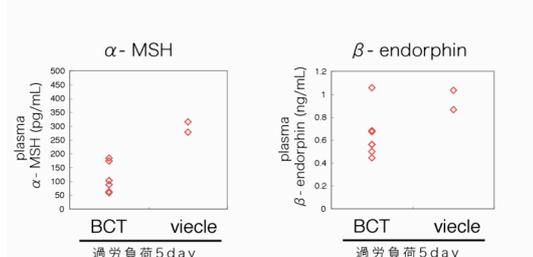


図 2. ドーパミンアゴニストによる下垂体ホルモン分泌の抑制

(2) 疲労負荷がかかると生体における LPS 応答性炎症反応に低下が見られた。

疲労ラットおよび recover ラットへ LPS による炎症反応を起こさせたところ、4 時間後における炎症性サイトカインである TNF- α (control; $351.0 \pm 43.3 \text{pg/mL}$, 3d; $98.8 \pm 32.3 \text{pg/mL}$, $P < 0.01$, 5d; $56.8 \pm 13.9 \text{pg/mL}$, $p < 0.01$)、IL-6 (control; $3212.0 \pm 434.5 \text{pg/mL}$, 5d; $663.7 \pm 455.5 \text{pg/mL}$, $p < 0.05$) に有意な減少が見られ、抗炎症性サイトカインである IL-10 においては逆に増加傾向が見られた。さらに予測に反して、recover ラットではコントロールよりもサイトカインの分泌が増加しており、疲労負荷時にはあまり変化が見られなかった NO_2/NO_3 濃度において非常に有意な増加が見られた (control; $18.9 \pm 5.6 \text{mmol/L}$, recover; $96.3 \pm 22.5 \text{mmol/L}$, $p < 0.01$)。これらの結果より、疲労負荷時には外部からの異物に対する炎

症応答が脆弱化しており、さまざまな感染症にかかりやすい可能性が考えられる。また、疲労回復時における異物侵入にはコントロール群より炎症応答が大きくなるだけでなく NO による血管拡張などが起こるといった重篤な症状を引き起こす可能性が示された(図3)。これらの結果は、2008年沖縄で開催された International Conference on Fatigue Science においてポスターにて発表をした。

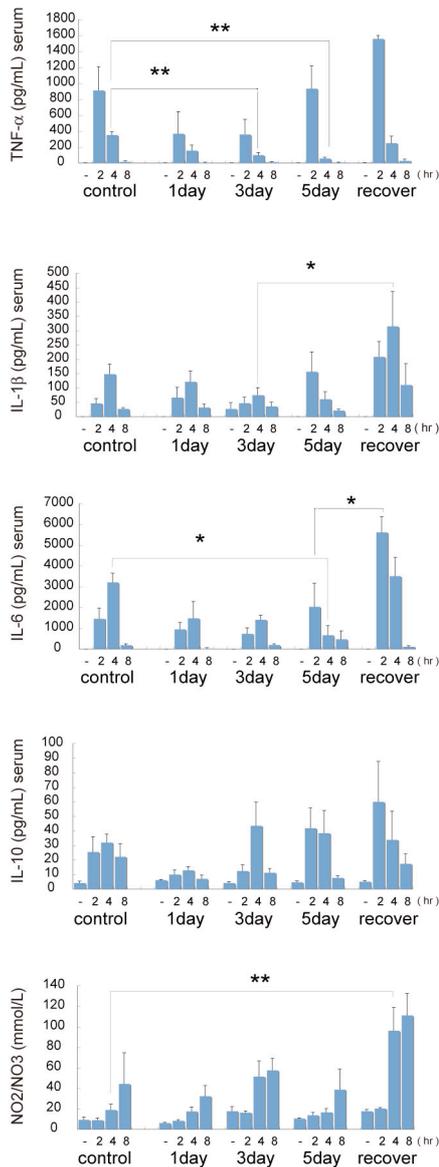


図3. 疲労ラットにおけるLPS投与後、サイトカインとNO₂/NO₃濃度の変化 (*: p<0.05, **: p<0.01)

(3) ヒトにおいて著しい疲労を呈する慢性疲労症候群においても、健常人と比較してα-MSHの血漿中濃度が高いことが明らかとなった。

① 罹病期間10年以内のCFS群における血漿中α-MSH濃度は、健常人群14.5±5.7pg/mLに対して、18.0±7.6pg/mL (p=0.02)と有意に高い値を示したが、図4のようにCFS群は低濃度から高濃度まで広く分布していた。この結果から、CFS群においてα-MSH濃度と相関を示す因子が重要であると考え、罹病期間、性別、年齢、主観にもとづく疲労程度をあらわすパフォーマンススコア、BMI、またその他、CFSで異常が認められているDHEA-S、ACTH、コルチゾールの値、血圧、服薬の有無、身体的/精神的症状についての質問について、これらの相関を調べたところ、罹病期間においてのみα-MSH濃度と逆相関を示した (r_s= -0.27, p<0.05、図5および図6)。

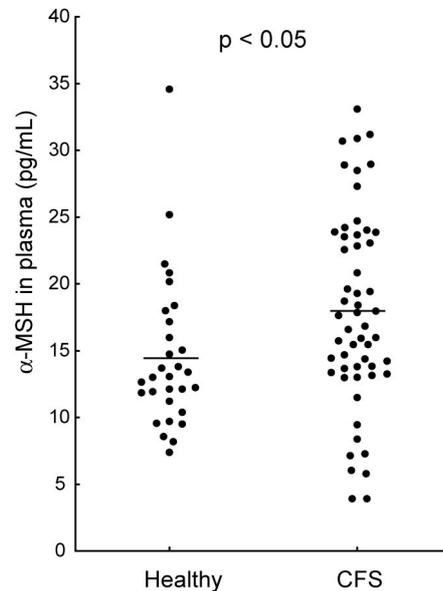


図5. CFS患者におけるα-MSHの上昇

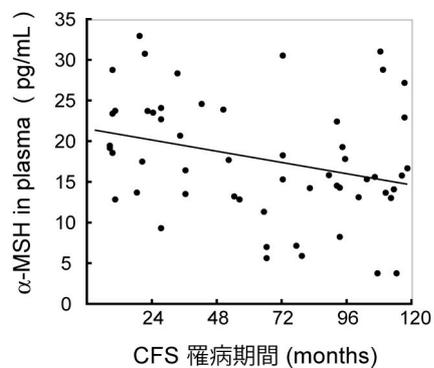


図6. CFS罹病期間とα-MSH血中濃度との逆相関

また、罹病期間と DHEA-S、ACTH およびコルチゾールとの相関を調べたが、いずれも有意な相関は認められなかった (表 1)。

さらに、CFS 群を罹病期間に対して 6-60 ヶ月までと 61-120 ヶ月までの 2 群に分け、健康人群と比較したところ、短期群において α -MSH の血漿中濃度は、 20.7 ± 6.9 pg/mL と非常に有意に ($p < 0.01$) に高かった。これらの結果は、現在、投稿中である。

Spearman rank correlation of stress hormones and CFS duration (months)

	n	r	p value
α -MSH (pg/mL)	57	-0.28	0.04 *
DHEA-S (μ g/dL)	45	0.15	0.33
ACTH (pg/mL)	45	-0.07	0.62
Cortisol (μ g/dL)	45	-0.21	0.17

* $p < 0.05$

表 1. CFS 罹病期間とストレス応答性ホルモンとの相関関係

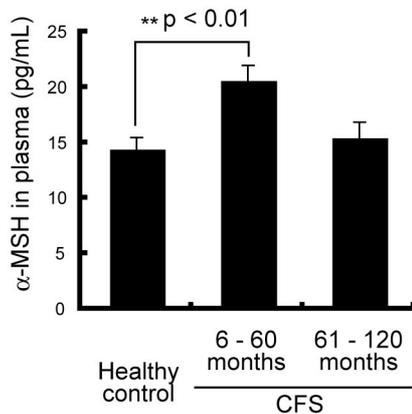


図 7. 罹病期間 5 年以内に見られる α -MSH 高濃度傾向

CFS は原因不明の慢性疲労を長期間呈する疾患で、さらに規定された問診による診断基準においてのみ診断されている。血中 α -MSH の濃度測定が簡易な方法であることに着目し、CFS のみならず、治療を必要とする重度の疲労について判定できるものとし、「疲労度の判定方法および疲労判定キット」として特許申請を行った。

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 2 件)

- ① 小川登紀子、池島(獅子王) 信江、木山博資、疲労ラット下垂体細胞の過労死とその機序、日本疲労学会誌、査読無 (in press)

- ② Ogawa T, Shishioh-Ikejima N, Konishi H, Makino T, Sei H, Kiryu-Seo S, Tanaka M, Watanabe Y, Kiyama H. Chronic stress elicits prolonged activation of α -MSH secretion and subsequent degeneration of melanotroph. J Neurochem. 査読有 2009 Jun;109(5):1389-99.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Ogawa T, Shishioh-Ikejima N, Konishi H, Makino T, Kiryu-Seo S, Tanaka M, Watanabe Y, and Kiyama H. Prolonged stress affects the hypothalamic dopamine system and causes degeneration of the pituitary cells. Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, 2009 年 8 月 27 日、Bussan Korea
- ② 小川登紀子、池島(獅子王) 信江、牧野哲也、小西博之、木山博資、疲労ラットにおける成長ホルモン産生細胞の機能阻害メカニズム、日本疲労学会、2009 年 5 月 16 日、福岡
- ③ 池島(獅子王) 信江、小川登紀子、山口浩二、倉恒弘彦、渡辺恭良、木山博資、慢性疲労症候群早期患者における血中 α -MSH レベルの上昇、日本疲労学会、2009 年 5 月 15 日、福岡
- ④ 木山博資、小川登紀子、池島(獅子王) 信江、牧野哲也、過労モデル動物における脳内変化とその影響、日本疲労学会、2009 年 5 月 15 日、福岡
- ⑤ 池島(獅子王) 信江、牧野哲也、小川登紀子、木山博資、疲労モデルラットにおける炎症応答の変化、日本解剖学近畿支部学術集会、2008 年 11 月 29 日、大阪
- ⑥ Nobue Shishioh-Ikejima, Tetsuya Makino, Tokiko Ogawa, and Hiroshi Kiyama, Alteration of inflammatory responses to LPS in rat fatigue model, International Conference on Fatigue Science 2008, 2008 年 9 月 3-5 日、沖縄
- ⑦ Tokiko Ogawa, Nobue Shishioh-Ikejima, and Hiroshi Kiyama, Prolonged fatigue exhibits the opposed proliferation regulations in the anterior and intermediate pituitary cells, International Conference on Fatigue Science 2008, 2008 年 9 月 3-5 日、沖縄
- ⑧ Hiroshi Kiyama Nobue Shishioh-Ikejima, and Tokiko Ogawa, Disorders of homeostasis centers in fatigued rat, International Conference on Fatigue Science 2008, 2008 年 9 月 4 日、沖縄

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：疲労度の判定方法および疲労判定キット

発明者：木山博資、池島信江、小川登紀子、渡辺恭良、倉恒弘彦

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：特願 2009-115685

出願年月日：2009 年 5 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/anatomy1/works/works-top.html>

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/21coe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池島 信江(獅子王 信江) (IKEJIMA NOBUE (SHISHIOH NOBUE))

大阪市立大学・大学院医学研究科・博士
研究員

研究者番号：50420401