

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 28 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700698

研究課題名（和文）ミトコンドリア代謝制御を介したストレス応答ネットワークの解明

研究課題名（英文）Role of mitochondrial function in stress systems

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、ストレス負荷がエネルギー代謝や自然免疫システムに及ぼす影響についてマウスを用いて解析した。その結果、（1）生体へのストレス負荷はミトコンドリアの代謝動態を著明に変化させ、脂肪肝や肝機能障害を誘発すること。（2）ストレスによるグルココルチコイドの分泌が、ミトコンドリア代謝を変動させて自然免疫を制御していること。等が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effect of stress condition on the energy metabolisms and immune systems using the mouse received restraint stress. Our results suggest that (1) restraint stress induce mitochondrial dysfunction in the liver resulting hepatic steatosis and dysfunction, (2) stress-induced glucocorticoid release affect mitochondrial function and regulate innate immune systems.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：ストレス、ミトコンドリア、自然免疫、マクロファージ、糖・脂質代謝、脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

現代の日本では国民の3人に2人がストレスを感じていると報告されており、物質的に豊かであるにも関わらず、生活満足度及びADL、QOLの低下などが社会的、経済的に大きな問題となっている。本研究代表者はこれまでに、生体の活性酸素代謝変動によってストレス病態が誘起される分子メカニズムに関し研究をおこなってきた（Miyoshi, Kasahara et al. Free Radic. Res. 37, 85-90, 2003., Kasahara et al. Biochem J. 365,

849-56, 2002., Kasahara et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46, 3426-34, 2005.）。その過程で、生体への酸化ストレスがエネルギー産生器官であるミトコンドリアを傷害して様々な病態を誘起する分子メカニズムを解明してきた。ミトコンドリアは糖や脂質を利用してエネルギーを産生するオルガネラである。従ってこれら栄養物質（糖・脂質・蛋白質）のエネルギー動員様式の変動は、ミトコンドリア代謝制御を変化させ、様々な生理機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。

従って、本研究では(1)生体へのストレス負荷による糖・脂質代謝の動的な様相を明らかにし、(2)ストレスによるエネルギー代謝変動が様々な病態を誘起するメカニズムについて研究をおこなった。ストレスにより誘起される病態の分子基盤を確立することは、ストレスの少ない健康的な社会作りに貢献することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、末梢のエネルギー代謝に関与している分子群や、それを利用してエネルギーを産生するミトコンドリアに焦点をあて、生体のストレス応答におけるその役割を解明することを目的とした。

具体的には、

(1) ストレス負荷による、HPA 軸の活性化とそれによる糖・脂質代謝変動の様相を分子レベルで明らかにする。

(2) ストレス負荷によるミトコンドリアのエネルギー代謝制御と活性酸素代謝への影響を分子レベルで明らかにする。

(3) ストレス負荷によるミトコンドリアの機能変化がマウスの自発行動量に与える影響を明らかにする。

(4) ミトコンドリア機能保護による、ストレス病態の改善効果の可能性を検討する。

3. 研究の方法

ストレス負荷が生体に与える影響について以下の方法を用いて解析した。

(1) 糖・脂質代謝変動とミトコンドリア機能への影響

①糖・脂質代謝変動の解析：マウスを50mLのチューブに入れることにより拘束ストレスを負荷(単回あるいは繰返し)し、血糖、中性脂肪、遊離脂肪酸、コレステロール値の経時的な変動を生化学的手法を用いて解析した。各臓器(脂肪組織、肝臓、すい臓、筋肉など)における糖・脂質の異化や同化に関与する分子の発現をタンパク質や遺伝子発現をwestern blotting法およびRealtime PCR法を用いて解析した。

②ミトコンドリア機能の解析：拘束ストレスを負荷したマウスおよび正常コントロールマウスより密度勾配分画法によりミトコンドリアを分離し、酸素電極を用いて酸素消費能を測定した。また、エネルギー産生に関与するタンパク質や遺伝子発現をwestern blotting法およびRealtime PCR法を用いて解析した。

(2) 神経・内分泌の変動とミトコンドリア機能への影響

①HPA軸の活性化：拘束ストレス負荷マウスから経時的に血液を採取し、血中ACTH(adrenocorticotropic hormone)、コルチゾールの濃度をELISA法により検出した。

②グルココルチコイドの関与：上記のストレス応答とミトコンドリア機能変化との関連を明らかにするために、コルチゾールレセプターの阻害剤を投与し、糖・脂質代謝とミトコンドリア機能変化を解析した。

(3) 活性酸素産生への影響

①活性酸素産生量の測定：拘束ストレス負荷マウスの肝臓よりミトコンドリアを分離し、その活性酸素産生量を、検出プローブを用いた化学発光法により経時的に解析した。

②抗酸化物質濃度の変化：細胞の主要な水溶性抗酸化物質であるグルタチオンの変動をELISA法により定量的に解析した。

(4) 自発行動量の解析

①拘束ストレスによる自発行動量への影響：拘束ストレスを負荷したマウスの自発行動量、摂餌量、飲水量の変化を経時的に測定した。行動量は赤外線センサーによりマウスの移動を検出しコンピュータに出力して解析した。

②任意自発行動量への影響：マウスの任意的な自発行動量をWireless Running Wheelにより解析した。

(5) ミトコンドリア機能制御によるストレス病態の回避の検討

①カルニチンのミトコンドリア機能保護作用とストレス改善効果：予めカルニチン水を飲水させたマウスにストレスを負荷し、ミトコンドリア保護作用と自発行動量の変化および糖・脂質代謝への影響を検討した。

②ストレス負荷によるHPA軸活性化と敗血症による生存率への影響：上記拘束ストレスを与えたマウスに内毒素(グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分:LPS)を投与した。免疫応答反応への影響を生存率および血中サイトカイン分泌量(ELISA法)により検討した。

4. 研究成果

本研究では、生体のストレス応答を末梢の糖・脂質エネルギー代謝とミトコンドリア機能に焦点を当てて解析し、ストレスにより誘起される病態の分子メカニズムを解明した。

(1) 糖・脂質代謝変動とミトコンドリア機能への影響：生体へのストレス負荷は脂質代謝を著明に変動させ(図1)、ミトコンドリア機能を障害して(図2)脂肪肝や肝機能障害を誘発することが明らかとなった(図3)。

(2) 神経・内分泌の変動とミトコンドリア機能への影響：ストレスにより分泌が促進されるグルココルチコイドが、ミトコンドリアに作用してATP産生を低下させることが明らかとなった(図4)。

(3) 活性酸素産生への影響：ストレスにより、肝臓のミトコンドリアの活性酸素酸性量が増加し、抗酸化物質であるグルタチオン量が低下することが明らかとなった(図5)。

(4) 自発行動量の変化とカルニチンによる

改善効果：マウス拘束ストレスはマウスの自発行動量および任意行動量を著明に低下させた。ミトコンドリア保護作用のあるカルニチンは、ストレスによる行動量低下の改善を促進した（図6）。

(5) 自然免疫応答が過剰な場合には、免疫担当細胞より分泌されるサイトカインにより、宿主自身の生命が危ぶまれる場合がある（敗血症病態など）。このようなサイトカインによる組織障害において、ストレス応答軸（HPA 軸）の活性化は、生体を保護するために重要な役割を担っていることを証明した。また、ミトコンドリアは、サイトカイン産生制御に重要な役割を担っている事が明らかとなった（図7）。

我々の研究成果から得られた知見は、生体へのストレス負荷がミトコンドリア機能を介して様々な疾患を誘起する可能性を示唆するものである。更に我々は、ミトコンドリアでのエネルギー産生において重要な因子のひとつであるカルニチンが、マウスにおいてストレス病態を改善するという結果を得た。これまでに、このようなミトコンドリア代謝の視点からストレス病態の背景を明らかにした研究は殆どない。これらの研究成果は、ストレスにより引き起こされる様々な疾患の病態機構の解明のための分子基盤となりうる。ストレス病態の背景を分子生物学的に明らかにする研究は、ストレス病態の治療およびストレスの少ない健康的な社会作りに貢献するために非常に重要であると思われる。

図1. ストレス負荷により脂肪分解が促進する

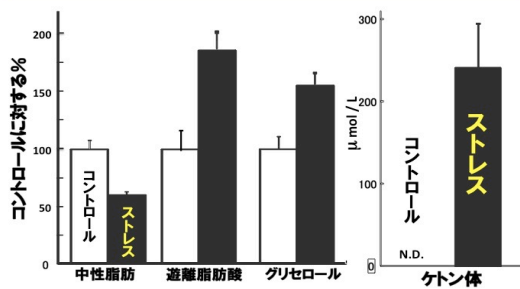


図2. ストレスによりミトコンドリアの、エネルギー産生能が低下する

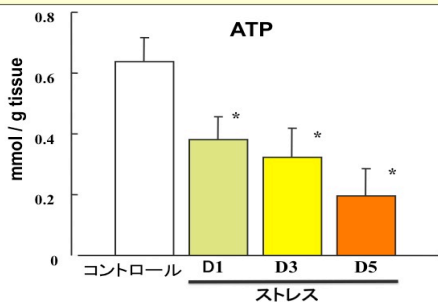


図3. ストレス負荷により脂肪肝が誘起される

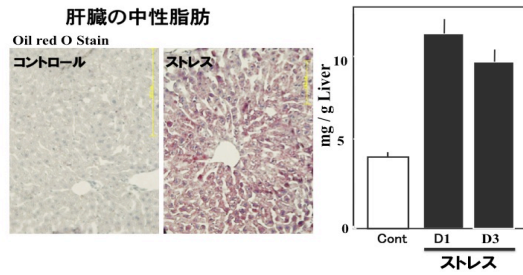


図4. グルココルチコイドはミトコンドリアのATP産生を抑制する

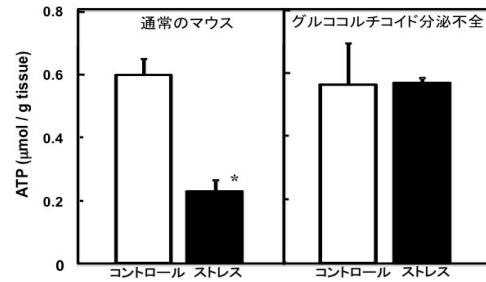


図5. ストレスによりミトコンドリアの酸化障害が増悪する

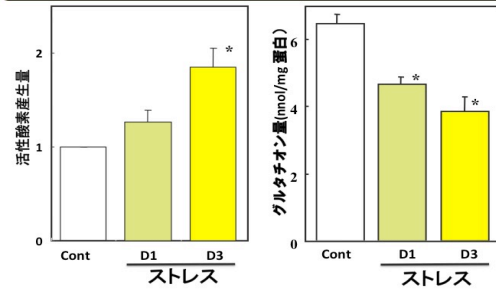


図6. カルニチンは行動量低下からの回復を促進した

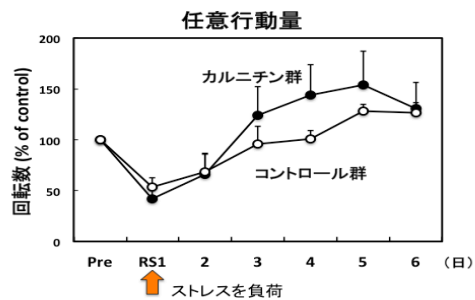
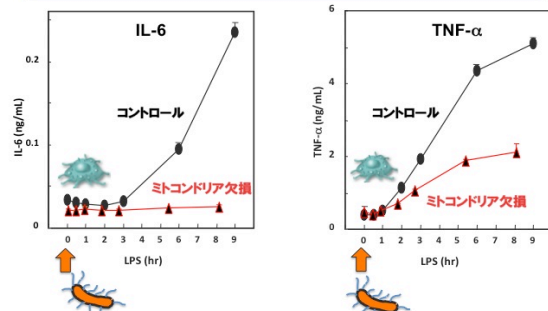


図7. ミトコンドリアがないと、免疫応答が低下する



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 3 件)

①. E. Kasahara, A. Sekiyama, M. Hori, K. Hara, N. Takahashi, M. Konishi, E. F. Sato, S. Matsumoto, H. Okamura, M. Inoue.

Mitochondrial density contributes to immune response of macrophages to lipopolysaccharide via a MAPK pathway. FEBS Letter. (査読有り) 585, 2263-2268, 2011 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.05.049

②. M. Hashimoto, E. F. Sato, K. Hiramoto, E. Kasahara, M. Inoue. Role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the modulation of pollinosis induced by pollen antigens. Allergology International. (査読有り) 59, 201-206, 2010 DOI: 10.2332/allergolint.09-OA-0133

③. K. Miyamoto, E. F. Sato, E. Kasahara, M. Jikumaru, K. Hiramoto, H. Tabata, M. Katsuragi, S. Odo, K. Utsumi, M. Inoue. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. Free Radic Biol Med. (査読有り) 49, 674-81, 2010 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.025,

[学会発表] (計 17 件)

①. E. Kasahara, A. Sekiyama, M. Hori, K. Hiramoto, Y. Yamate, M. Inoue, S. Kitagawa. Role of mitochondrial ROS in response of macrophage to LPS. 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (2011年9月2日, Kagoshima)

②. E. Kasahara, A. Sekiyama, M. Hori, D. Kuratsune, E. F. Sato, M. Inoue. Restraint stress induces mitochondrial dysfunction in the liver. Society of Biological Psychiatry (2011年5月12日, San Francisco)

③. E. Kasahara, A. Sekiyama, M. Hori, D. Chida, M. Inoue. Restraint stress-induced glucocorticoid up-regulates UCP2 expression to suppress mitochondrial ROS generation and increase the resistance of the mice to septic shock. 7th World Congress on Stress (2010年8月25日, Leiden, Holland)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし