

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19590684

研究課題名 (和文) ストレス環境下の血液中サイトカインの変動とその法医学的応用

研究課題名 (英文) Changes in blood cytokine levels under stress conditions and their application to forensic diagnosis.

研究代表者

富田 正文 (TOMITA MASAFUMI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50113197

研究成果の概要(和文):今回対象としたサイトカインは IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, TNF である。まず活性酸素発生剤であるパラコート(Pq)中毒モデルを使ってサイトカインを検討した。その結果, IL-6 と MCP-1 について肺での RNA の発現また血中での蛋白レベルが Pq 暴露 5 日以内に有意に増加することが分かり, とくに前者が中毒初期, 後者が後期のマーカーになることが示唆された。さらに抗 IL-6 抗体で治療効果を検討継続中である。つぎに, マウス水浸拘束ストレス(WRS)を使って, サイトカイン発現に及ぼす覚せい剤(MA)の影響を検討した。その結果, IL-6, IL-10, TNF の血中レベルがストレスで増加し, MA でさらに増加することが分かった。とくに IL-6 の血中レベルは MA 存在下で飛躍的に増加した。またその機序は不明であるが, MA はストレスによる胃粘膜障害を有意に抑制した。さらに, マウスのグルココルチコイドレセプター(GR)多型に焦点を当て研究した結果, GR 多型がマウス個体にみられるストレス反応に重要な役割をもつ可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文): The cytokines investigated were IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1 and TNF. First, we investigated the effect of paraquat (Pq) on cytokine levels using the model of Pq-poisoned mice. As the result, IL-6 and MCP-1 levels, both mRNA in tissues and protein levels in blood, significantly increased within 5 days after Pq exposure. The former may be an early marker and the latter be a late marker for lung acute damage. Now we examine the effect of anti IL-6 antibody to Pq-poisoned damage, which need further investigation. Next, we examined the effects of methamphetamine (MA) on cytokine levels using a water-immersion restraint stress (WRS) mouse model. The levels of the serum cytokines IL-6, IL-10 and TNF were increased by stress, and were markedly increased by MA under stress conditions; in particular, the level of IL-6 was synergistically increased. On the other hand, MA resulted in significant suppression of the stress-induced gastric injury, although further studies are necessary to resolve the mechanism. We investigated the involvement of the GR polymorphism in stress response using ICR mice. Our results suggest that the GR gene polymorphism has a significant impact on the stress-induced output, including cytokines, corticosterone, Hsp70 levels in serum, and the gastric lesion index. These studies provide insights into the role of GR in individual responses to stress.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：中毒，ストレス，サイトカイン，覚せい剤，パラコート，遺伝子

1. 研究開始当初の背景

法医学の対象となるケースでは、様々なストレスが非常に強く関与していることに疑う余地はない。したがって、最も重要な法医学実務である死因の究明についても、死因となる障害の成因や発症機序をストレスという key word を使って解明することは非常に有用であると考えられる。

ところで、サイトカインは、感染防御や免疫系の調節因子として機能すると考えられてきたが、最近では外部から何らかの物理的、精神的ストレスが加わったときのストレス応答、食欲、睡眠、ホルモン分泌などの生体の恒常性維持にも深く関与していることが明らかになってきた。拘束ストレスや環境ストレスなどがあるとサイトカインが脳内で産生されることが報告されている。例えばうつ病の患者では、ストレスによってサイトカインが増え、その結果、前頭前野の機能を低下させるという報告がある。すなわち、サイトカインは感染防御などの調節だけでなく、神経・内分泌系と免疫系との間のクロストークにおいてもストレス応答の情報伝達物質として重要な役割をもつ。

覚せい剤は我が国で最も濫用されている毒物である。その作用は、1つには除草剤パラコート(Pq)と同様に活性酸素による酸化ストレスであるという報告は多い。また覚せい剤そのものもサイトカインの産生に影響するらしい。一方、ストレスと覚せい剤については、いずれもカテコールアミンとの議論に終始しており、環境ストレスまた身体ストレス下におけるサイトカイン産生に及ぼす覚せい剤の影響については未だ明らかでない。しかしながら、強いストレスの下で覚せい剤が使われることが現状であり、それが覚せい剤の急性中毒や依存に大きな影響を及ぼしている可能性は非常に高いと思われる。

一方、ストレス状態下における生体反応は環境因子や遺伝因子が関係した非常に複雑な反応であり、hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axisの活性化によるグルココルチコイドの分泌は最もよく知られている反応の1つである。したがって、そのホルモンレセプター (GR) が生体のストレス反応に大きな影響を与える可能性は非常に高い。このGRには既に多型の存在が知られており、ヒトでのGR多型の臨床的意義については2,3報告があるものの未だ明らかにされていない。一方、マウスのGRにもN末にCAG(グルタミン)を1単位とする反復配列多型の存在が知られており、マウスの行動と多型の関連が報告されている。

2. 研究の目的

覚せい剤と酸化ストレスという関連からまずマウスのPQ肺モデルを使ってPQによるサイトカインの変動と遺伝子発現を調べ、酸化ストレスとサイトカインとの関連を明らかにする。また、PQによる肺線維症の治療への可能性についても検討する。次に、おもに水浸拘束ストレスを使い、ストレス下での血中サイトカインレベルの基礎データを得る。その後、ストレス下において、覚せい剤でみられる致死率など中毒症状と血液中サイトカインとの関連を明らかにする。

一方、マウスに認められるDNA多型とストレス感受性について、とくにグルココルチコイドレセプター (GR) の多型に注目し、水浸拘束ストレス時の胃粘膜障害などの関連を解析する。

3. 研究の方法

(1) 農薬PQについては、すでに報告しているマウスPQ中毒モデルを用いた(Tomita et al. Toxicology, 231: 200-09, 2007)。血中

サイトカインの測定は、IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-12p70、MCP-1 および TNF を Cytometric Bead Array System によるフローサイトメトリーで測定した。一方、組織から常法に従い RNA を抽出し real-time PCR 法でサイトカインをはじめとする各種遺伝子の発現変化を調べた。

(2) ストレスについては、径 2.7 cm、長さ 11.5 cm の遠心管用プラスチックチューブによる水浸拘束ストレスを中心に検討を加えた。尾静脈から経時的に採血を行い、血中サイトカインレベルの変化やストレスの指標としてのコルチコステロン (CORT)、さらに胃粘膜での出血状態の観察を行った。つぎに覚せい剤をマウス腹腔内に投与し、ストレス有る、無しにおける影響を血中サイトカインレベルの変動や遺伝子発現変化を中心に調べた。

(3) 自家繁殖により、ICR 系マウスをグルココルチコイドレセプター (GR) の多型によって分類し、多型によるストレス感受性の違いについて比較検討した。

4. 研究成果

(1) パラコートによる酸化ストレスとサイトカイン：完全な肺線維化にいたるまでの期間、すなわち PQ 暴露 5 日までのマウス血液

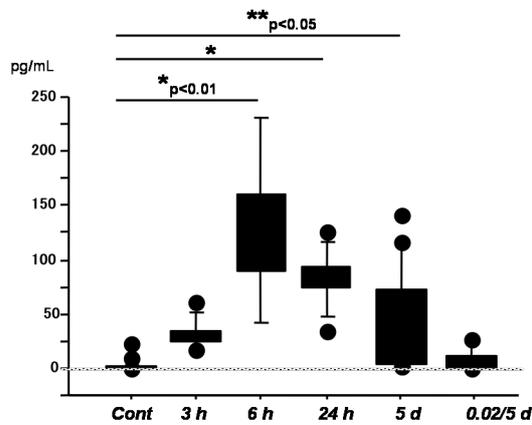


図1 PQ (0.04mg/kg)投与後の血中IL-6の濃度変化

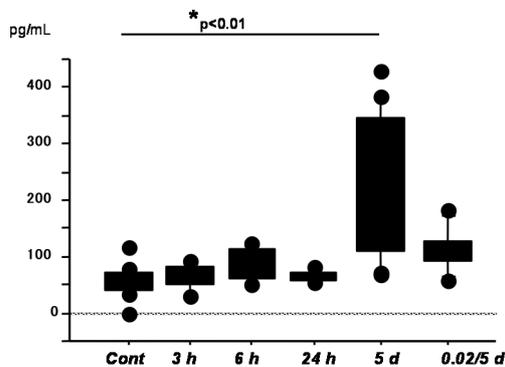


図2 PQ (0.04mg/kg)投与後の血中MCP-1の濃度変化

中サイトカインと肺組織内の mRNA 発現レベルを調べ、PQ による障害との関連について検討した。今回測定の対象とした 6 種類のサイトカインでは、IL-6 および MCP-1 について有意な変化が観察された。IL-6 では PQ 暴露後 6 h、24 h および 0.04 mg/5 d において有意に高値を示し、6 h で最高値となった (図 1)。生食水の点鼻投与でもやや IL-6 は上昇するが 5 日目までには正常値にもどった。一方、MCP-1 では 0.04 mg/5 d においてのみ有意な高値を示した (図 2)。つぎに、変化のみられた IL-6 および MCP-1 について肺での RNA 発現変化を検討したところ、サイトカインレベルの変化を支持する結果が得られた (図 3, 4)。

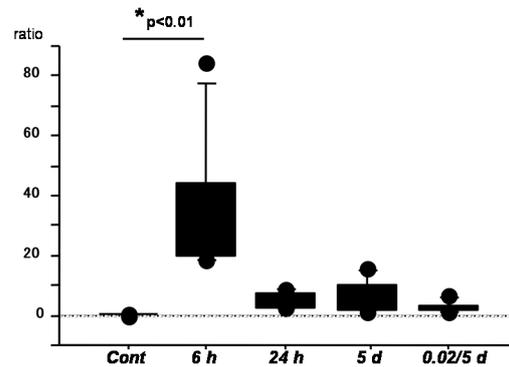


図3 PQ (0.04mg/kg)投与後の肺でのIL-6mRNA発現変化

以上から、IL-6 および MCP-1 が PQ による肺障害に強く関与すること、とくに IL-6 は暴露後にみられる急性期に、また MCP-1 は急性期後半での障害に関与することが示唆さ

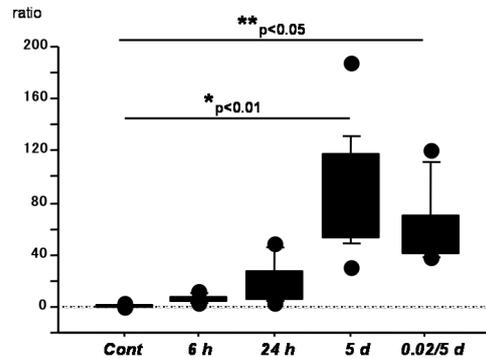


図4 PQ (0.04mg/kg)投与後の肺でのMCP-1 mRNA発現変化

れた。なお、今回は IL-6 および MCP-1 以外では有意な差は得られなかった。次に、抗 IL-6 抗体による治療効果の有無の検討に挑戦したが、抗体溶液のマウス尾静脈からの投与が非常に困難を極め、その成果は残念ながら未だでておらず進行中である。

(2) ストレスと覚せい剤及びサイトカイン：マウスに水浸拘束ストレス (WRS) を負荷し、血中の IL-6、IL-10、IL-2、IL-13、TNF、IFN- γ 、IL-12p70、MCP-1 を測定した。WRS/6 h により

IL-6 (図5), IL-10, TNFは有意に増加し, この値はWRS解放後1日で正常値に戻った。次にこの3種サイトカインについてWRS 6 hにお

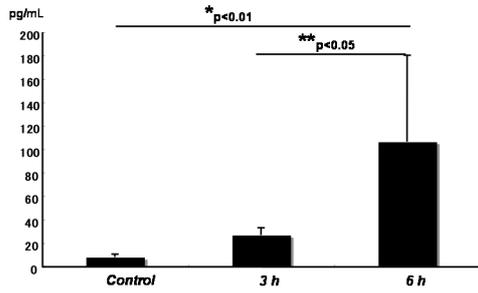


図5 血中IL-6に及ぼすストレスの影響

る 覚せい剤 (MA) の影響を調べた。その結果, とくにIL-6がWRS下のMAで顕著な増加を示した(図6)。IL-10, TNFも同様な結果であった (

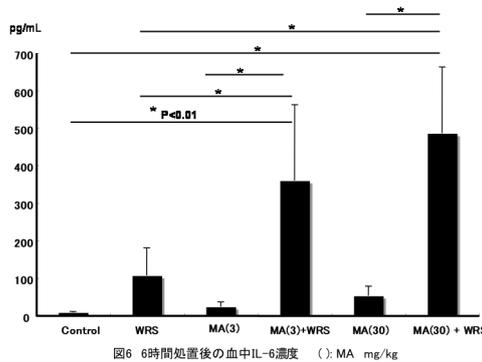


図6 6時間処置後の血中IL-6濃度 (): MA mg/kg

図7, 8)。ところが, 図9に示すように, 血中CORTはWRS単独群とMA + WRS群で同レベルの上昇を示しており, サイトカインにみられる

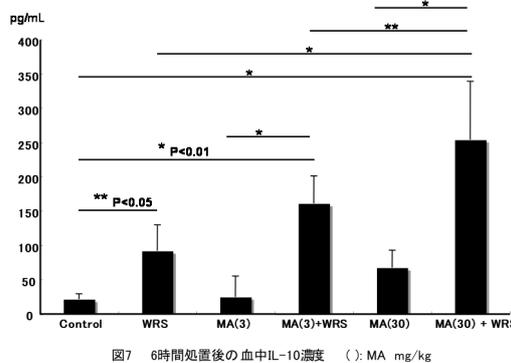


図7 6時間処置後の血中IL-10濃度 (): MA mg/kg

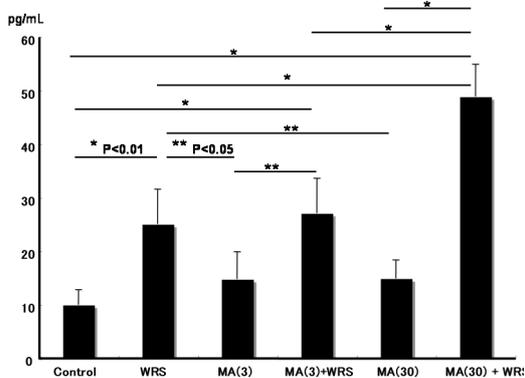


図8 6時間処置後の血中TNF濃度 (): MA mg/kg

血中濃度の増加は血中CORTに関係するものではなくMAの生体に対する影響がストレス下と非ストレス下では大きく異なることを示唆した。

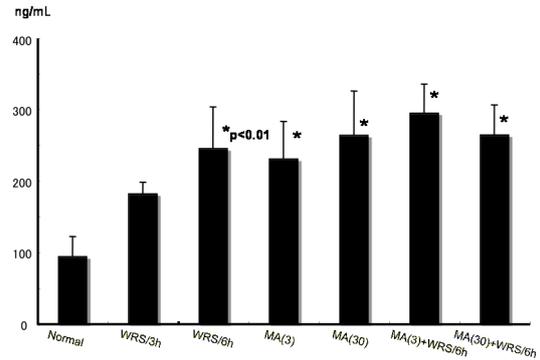


図9 血中のコルチコステロン濃度

一方, WRSによる胃粘膜での出血がMAによって有意 ($p < 0.05$) に抑制されることが分かった (表1)。そこで, 胃粘膜での遺伝子発現レベルをHSP, COX, SODなどの他, 細胞間のタイト結合分子を中心にreal-time PCRで検討した。MA単独の作用が顕著に認められる遺伝子もあったが, WRS群とMA+WRS群との違いで検討すると, HSP-70, COX-2, Cldn-2などに有意な違いが認められ, なんらかの関与が示唆された (表2)。今後, さらに他の遺伝子レベルについても検討する余地があった。一般にWRSとMAの作用機序はoverlapすると考えられるが, このMAでの抑制機序は今後の検討課題である。

表1 胃内出血の評価

| | Total (n) | Severity of gastric hemorrhage | | | |
|-----------------|-----------|--------------------------------|---|---|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Normal | (8) | 8 | | | |
| WRS/3h | (9) | | 1 | 2 | 6 |
| WRS/6h | (17) | 1 | 5 | 2 | 9 |
| MA(3) + WRS/6h | (11) | 9 | 1 | 1 | |
| MA(30) + WRS/6h | (8) | 6 | 2 | | |

表2 胃粘膜の遺伝子発現レベル

| | MA/3h | WRS/3h | WRS+MA /3h | MA/3h | WRS/3h | WRS+ MA /3h |
|--------|-------|--------|------------|---------|--------|-------------|
| HSP-60 | ↑↑↑ | ↓ | ↓ | Cldn-1 | ↓ | ↓ |
| HSP-70 | ↑↑↑ | → | ↑ | Cldn-2 | ↑ | ↑ |
| HSP-90 | ↑↑↑ | → | → | Cldn-3 | ↓↓ | ↓↓ |
| HO-1 | ↑ | ↑ | → | Cldn-4 | ↓ | ↓ |
| SOD-1 | - | ↓ | ↓ | Cldn-5 | ↓↓ | ↓↓ |
| SOD-2 | - | ↓ | ↓ | Cldn-6 | ↓↓ | ↓↓ |
| NOS-1 | - | → | → | Cldn-7 | ↓ | ↓ |
| NOS-2 | → | → | → | catenin | ↓ | ↓↓ |
| COX-1 | → | → | → | IL-6 | - | ↑↑ |
| COX-2 | ↑ | ↑ | ↑↑ | IL-18 | ↓ | ↓ |
| Tjp-1 | → | → | → | TNF | → | ↑↑ |
| Tjp-2 | ↓ | ↓ | ↓↓ | OGRP-α | ↑↑ | ↑ |

MA: 30mg/kg

(3) GR 多型とストレス感受性： GR 多型を示す ICR 系マウスは、その遺伝子型により、GR^{8/8}、GR^{8/16}、GR^{16/16} に分けられる (図 10)。自家繁殖して検討した結果、ストレスの持続

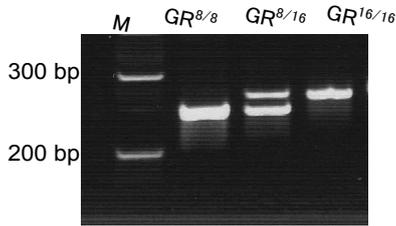


図 10 ICRマウスでのGR多型

時間に比例して各タイプともに胃粘膜での障害が強まり、 Lesion index でみると、WRS 6 h において、GR^{16/16} タイプの雄マウスが GR^{8/8} タイプより有意に大きな値を示した (37.0 ± 5.1 v. s. 22.1 ± 4.8, p < 0.05; (図 11))。

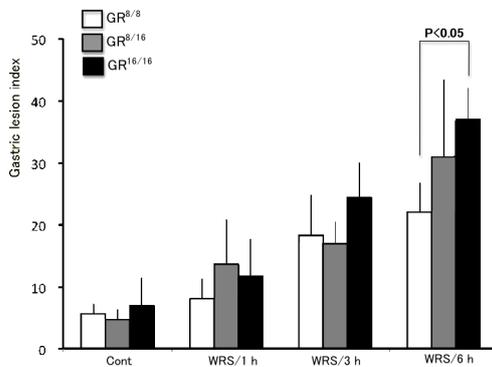


図 11 水浸拘束ストレスによる胃粘膜障害

すなわち、GR¹⁶ アレルのストレス感受性は GR⁸ アレルより強いことが示唆された。血中の CORT を測定したところ (図 12) , 絶食

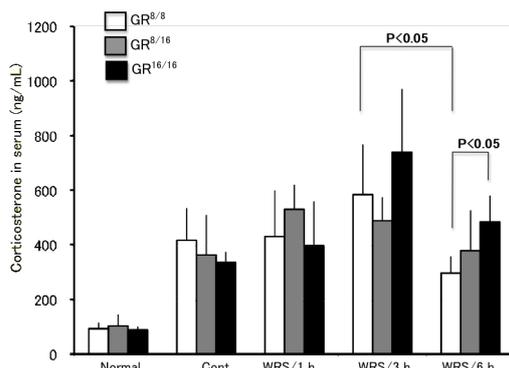


図 12 水浸拘束ストレスによる血中コルチコステロン濃度

のみのストレスでその値はすでに増加し、その程度は GR^{8/8} > GR^{8/16} > GR^{16/16} の順であった。しかし、WRS 6 h での CORT 値は GR^{8/8} < GR^{8/16} < GR^{16/16} と逆転した。すなわち、GR⁸ アレルのストレスに対する CORT 対応への速さが示唆されてお

り、これが WRS 6 h でみられる胃粘膜障害の程度に関係すると思われた。さらに、IL-6 の上昇は各タイプのマウスで観察されたが (3 h & 6 h; p < 0.01), IL-10 は GR 多型によって異なっており、GR⁸ アレルをもつタイプで増加した。すなわち、ストレスによって GR^{8/8}、GR^{8/16} では増加したが、GR^{16/16} では変化がみられず、したがって

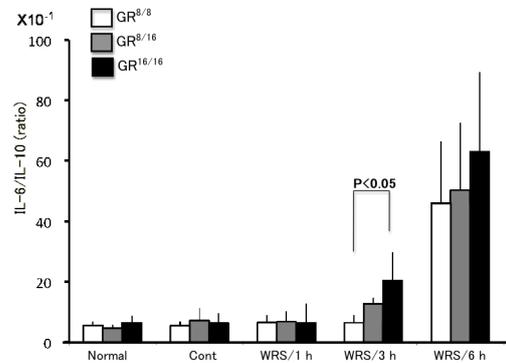


図 13 水浸拘束ストレスによる血中IL-6/IL-10

WRS 3 h および 6 h での IL-6/IL-10 値は、GR^{16/16} > GR^{8/16} > GR^{8/8} であった (図 13)。この事実は、GR アレルがサイトカイン産生レベルに関与することを示唆し、さらに胃粘膜での障害と関連することを示した。

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 6 件)

- ① Tomita M, Katsuyama H, Okuyama T, Watanabe Y, Hidaka K, Otsuki T, Nata M. The effect of CAG repeat polymorphism in the glucocorticoid receptor on stress responses of mice exposed to water-immersion restraint stress. *Int. J. Mol. Med.*, 25(3), 415-20, 2010. (査読有)
- ② Tomita M, Okuyama T, Katsuyama H, Watanabe Y, Hidaka K, et al. (9 人) Methamphetamine protects against stress-induced gastric mucosal lesions in mice. *Legal Med. (Tokyo)*, 11(s1), S437-S439, 2009. (査読有)
- ③ Katsuyama H, Tomita M, Hidaka K, Watanabe Y, et al. (10 人:2 番目) Association between serotonin transporter gene polymorphisms and depressed mood caused by job stress in Japanese workers. *Int. J. Mol. Med.*, 21(4), 499-505, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 27 件)

- ① Tomita Masafumi et al. A polymorphism in

the glucocorticoid receptor gene is associated with responses of mice exposed to stress. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. 2009/10/08 Sapporo, Japan.

- ②富田正文, 他. グルココルチコイドレセプター(GR)遺伝子多型とストレス性胃内出血に関連性はあるのか? 第93次日本法医学会学術全国集会, 2009/05/14, 大阪.
- ③篠根光太郎, 富田正文, 他. 覚醒剤及び身体拘束の心臓における遺伝子発現への影響(第2報) 第93次日本法医学会学術全国集会, 2009/05/14, 大阪.
- ④富田正文, 他. マウスでのストレス感受性とグルココルチコイドレセプター多型の関連. 日本DNA多型学会, 2009/11/20, 久留米.
- ⑤富田正文, 他. 水浸拘束 stress における血中サイトカインレベルに及ぼすメタンフェタミンの影響 第92次日本法医学会学術全国集会, 2008/04/24, 長崎.
- ⑥富田正文, 他. メタンフェタミンによる血中サイトカインレベルの変化-ストレスによる影響について- 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008/06/27, 東京.
- ⑦富田正文, 石川隆紀. パラコートによる肺 destructive phase での遺伝子発現変化 第91次日本法医学会学術全国集会, 2007/05/16, 秋田.
- ⑧富田正文, 他. マウスパラコート肺モデル早期での遺伝子発現とサイトカインレベルの変化 第34回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007/06/27, 東京.

[図書] (計 2 件)

- ①勝山博信, 伏見滋子, 富田正文, 奥山敏子, 日高和夫, 渡辺洋子, 為近美栄, 東洋書店, DNA 多型 17, 2009, 281-283.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:

権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=302>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 正文 (TOMITA NASAFUMI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50113197

(2) 研究分担者

- ①勝山 博信 (KATSUYAMA HIRONOBU)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00289175
- ②日高 和夫 (HIDAKA KAZUO)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00069064
- ③渡辺 洋子 (WATANABE Yoko)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70135945

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

奥山 敏子 (OKUYAMA TOSHIKO)
川崎医科大学・医学部・研究補助員