

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21777

研究課題名（和文）疲労の慢性化プロセスにおける臨界期の同定と抗疲労・健康戦略への挑戦

研究課題名（英文）Challenge to identifying the chronification processes of fatigue and anti-fatigue and health strategies

研究代表者

崔 翼龍（CUI, Yilong）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：60312229

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、日常の疲労蓄積から徐々に慢性化していく過程を再現した慢性疲労モデル動物を用いて、疲労の慢性化を伴う睡眠・体温調節などの生体機能の変化を追跡解析し、日常的な疲労から慢性疲労に陥る臨界期での生体機能の変化や血中バイオマーカーの同定に挑戦した。睡眠・体温調節機能の変化を追跡した検討では、負荷初期には適応反応を示すが、慢性期では低い体温でも放熱反応が促進されるなど、恒常性維持機構の異常を示す所見を見出した。また、血中のバイオマーカーの探索では、疲労の慢性化を伴って、酸化ストレスの上昇やIL-1bなどの炎症性サイトカインが上昇することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疲労は日常生活の中で誰もが経験する主観的な感覚であるが、その実態は未だに不明で詳細な分子神経基盤も明らかになっていない。昨今のコロナ感染後の後遺症として最も頻繁に訴える症状が倦怠感であるが、有効な緩和・治療法は確立されていない。本研究では病的な慢性疲労の背景には、睡眠・体温調節などの恒常性維持機構の異常が関わっていること、また全身性の酸化ストレスや炎症反応の活性化が関与しており、倦怠感惹起には脳内の炎症が深く関わっている可能性を示唆した。これらの結果は疲労の分子神経生物学的な基盤の解明に科学的な根拠を示し、コロナ感染後の倦怠感の緩和・治療法の確立に重要な実験データを提供していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated functional changes in sleep and body temperature regulation systems with chronification processes in a unique chronic fatigue animal model, in which repeated short-term rest periods during the long-lasting fatigue loading were utilized for gradual disruption of homeostatic function and accumulation of fatigue. We found that the sleep- and thermoregulatory functions adaptively changed in the early phase of fatigue loading, but disrupted in the late phase. Especially, the autonomic heat dissipation appeared at a lower body temperature rather than a higher body temperature in the late phase, indicating thermoregulatory dysfunction. Furthermore, we also demonstrated that the chronification of fatigue might be associated with increased oxidative stress and elevated levels of inflammatory cytokines, such as IL-1

研究分野：脳科学、PETイメージング学

キーワード：疲労 ストレス 恒常性 神経・内分泌・免疫 トランスクリプトーム解析 脳内炎症 脳腸相関

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

疲労は日常的に誰もが経験する主観的な感覚で、私たちに休息の必要性を知らせ、過度な活動による身体疲労を防ぐ重要な生体アラームの一つである。痛み、発熱、疲労といった三大生体アラーム機構の中で、痛みや発熱の分子神経メカニズムについては多くの研究が行われており、すでに様々な知見が報告されている。例えば、ウイルス感染やインフルエンザなどによる感染性の発熱に関しては、生体の炎症反応が脳内のプロスタグランジンE2の産生を介して、視索前野でのEP3受容体を持つ抑制性ニューロンに作用した結果、延髄の吻側縫線核での交感神経系の遠心路を活性化し、発熱を誘発するという説が有力である。一方、昨今のコロナ感染でも注目されている倦怠感についてはその実態が不明で、分子神経メカニズムは未だに明らかになっていない。特に、国民の実に約4割が有している原因不明の疲労や倦怠感が6ヶ月以上続く慢性疲労は、著しく日常の生活に支障を来たすにも関わらず、その有効な予防・治療法が確立されていない。

通常、疲労は脳内で認知・統合され、生体内の恒常性維持機構を活性化し、適切な休息や睡眠をとらせることで生体は回復に向かうが、現代社会の中で我々は常にオーバーワークを強いられ、疲れは十分に回復し切れず、時間と共に徐々に蓄積して行くことが多々ある。疲労の蓄積が長期間にわたると生体の恒常性維持機構の機能異常を来し、最終的には神経・内分泌・免疫系の機能異常を特徴とする病的な慢性疲労へと進行して行くと考えられる。しかし、日常的な疲労から病的な慢性疲労への進行に関わる生体機能の変化や、その臨界期における分子プロセスやバイオマーカーは未だに明らかになっていない。

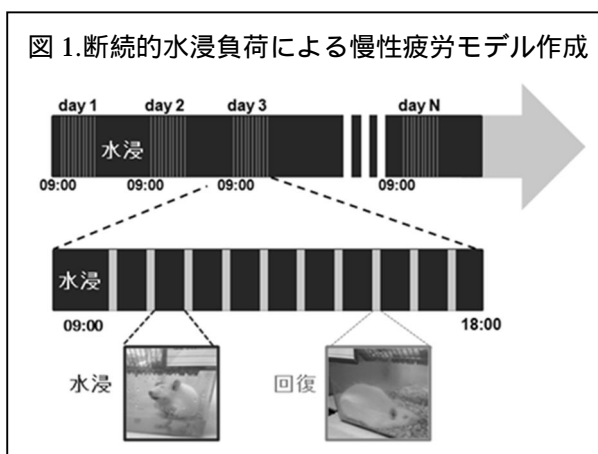
### 2. 研究の目的

本研究では、日常的な疲労蓄積から徐々に慢性疲労に陥る断続的な水浸疲労負荷モデルを用いて、疲労負荷を伴う生体機能調節機能の変化を連続的・経時的に評価し、慢性疲労に陥る臨界期での生体機能の変化を同定する。また、トランスクリプトームなどの網羅的な遺伝子発現プロファイル解析を行い、臨界期での特徴的な分子プロセスやバイオマーカーを探索し、抗疲労・健康戦略の創出に挑戦する。

### 3. 研究の方法

#### 慢性疲労モデル動物の作製：

長い進化を経て、生体は生理機能に最適した内部環境を獲得しており、神経・内分泌・免疫といった恒常性維持機構の巧みな制御によって安定した内部環境を維持している。生体恒常性からの逸脱は、“作業効率の低下”や“作業持続の困難”といった生体機能の低下を引き起こすが、これらの状態は個体の“疲れ”として捉えることができる。そこで、我々は生体恒常性維持機構の機能を徐々に破綻させ、生体機能低下状態の持続—慢性疲労の誘導を試みた。具体的に、短い間隔で“疲労負荷—疲労回復”のサイクルを繰り返し、神経・内分泌・免疫などの生体内の恒常性維持機構の機能異常を誘発することで、意欲の低下に由来すると考える自発行動量の低下が約1週持続する慢性疲労モデルの作製に成功した。疲労負荷としては、既にさまざまな神経・内分泌・免疫機能の異常が報告されている水浸疲労負荷(水を1.5cm入れたケージ内でラットを飼育し、断眠、精神的なストレスおよび筋性疲労を複合的に負荷するモデル、Tanaka M, *et al*, *Neurosci Lett*, 2003)を用いた。水浸疲労負荷期間中に一定の間隔で5~10分間だけ普通のケージに戻して疲労回復させる、断続的な水浸疲労負荷を14日間行った(図1)。生体機能変化の連続・経時的な計測：



#### 上記慢性疲労モデル動物を対象に、自由行動下において生体信号の変化を経時的に長期間連続測定可能なテレメトリー記録装置などを用いて、疲労負荷を伴う睡眠・体温調節や自律神経機能などの生体機能の変化を経時的に解析する。特に、疲労負荷休息期における睡眠や体温の変化に注目して、睡眠調整機能や体温調整機能の変化を解析した。

上記慢性疲労モデル動物を対象に、自由行動下において生体信号の変化を経時的に長期間連続測定可能なテレメトリー記録装置などを用いて、疲労負荷を伴う睡眠・体温調節や自律神経機能などの生体機能の変化を経時的に解析する。特に、疲労負荷休息期における睡眠や体温の変化に注目して、睡眠調整機能や体温調整機能の変化を解析した。

#### 臨界期のバイオマーカーの解析：

上記の睡眠や体温調節機能の動態変化を解析した検討では、疲労負荷3日前後に生体の適応反応を示し、その後9日ごろを境に機能異常を示唆している所見を得ている。そこで、疲労負荷

前、負荷後3日、9日、負荷後(14日)のタイムポイントで、血液サンプルを採取し、ストレス関連ホルモンや酸化ストレス度、炎症性サイトカインなどの動態変化を評価した。また、白血球分画を用いて、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行い、疲労負荷による遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。

#### PET イメージング研究：

慢性疲労症候群の患者を対象としたPET イメージングの臨床研究では、海馬、扁桃体や視床などの脳内領域の局所炎症が倦怠感や身体症状に関わることが報告されている。本研究では脳内の活性化ミクログリアを特異的に認識する[18F]DPA-714 を用いて、疲労負荷による脳内炎症の時空間的なダイナミクスを定量評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 慢性疲労モデルの確立

水浸疲労負荷中に通常のケージに戻して疲労回復させる短い休息を繰り返す(図1)と、疲労負荷と疲労回復に応答する生体機能調節機構が徐々に破綻し、疲労は蓄積して行くと考えられる。夜間の自発行動量の変化を指標に長期間の行動解析を行った結果、明期において30分毎に5分間の短い休息を14日間与えたラットでは、その後夜間の自発行動量が約60%まで低下し、1週間をかけてゆっくり回復することを突き止めた。これらの結果は、短い休息期の繰り返しによって疲労回復が遅延し、疲労は慢性化していることを示唆している。

#### (2) 疲労負荷による生体機能の変化及び臨界期の同定

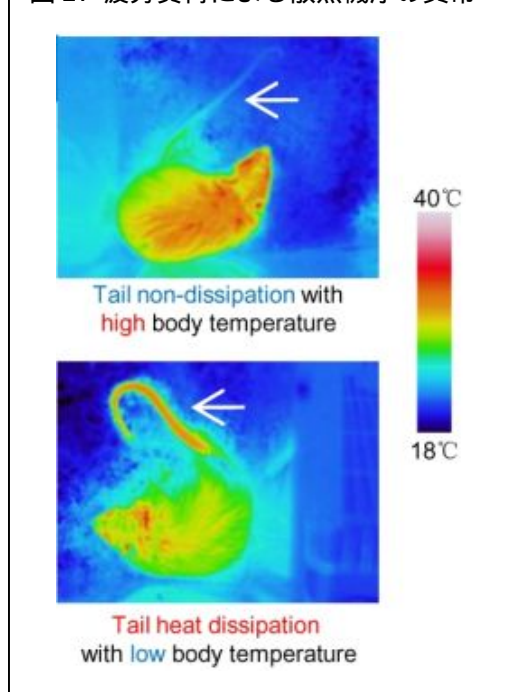
水浸疲労負荷中では、REM睡眠を始めとする断眠負荷や持続的な姿勢維持による過度なエネルギー消費が伴うことから、通常ケージに戻した休息での睡眠と体温の変化に着目し、そのダイナミックな変化を解析した。結果、疲労負荷初期には疲労回復期での睡眠時間が徐々に増加するが、3日目を前後に生体の適応能力に由来すると考えられる睡眠時間の低下が現れ、その11日目頃からはその適応能力が追いつけなくなり再び上昇し始めることを突き止めた。また興味深いことに、ラットの体温調節に重要な役割を果たしている尻尾の発熱回数は負荷開始8-10日目まで徐々に上昇し、その後下降に転じるなど睡眠時間の変化とほぼ同じタイムポイントで逆の変化を示している。これらの結果は断続的な疲労負荷の初期には生体恒常性機能が機能し、適応反応を示しているが、疲労負荷の持続によって、すこしずつ対応し切れなくなっていることを示唆している。

14日間の断続的水浸疲労負荷による体温の変化を詳細に検討した結果、疲労負荷により、平均体温が約2度上昇し、負荷後9日目までは高い体温を維持するが、その後徐々に低下していくこと、負荷初期には体温の上昇を伴って適応的に尻尾の血管拡張を介した散熱現象が現れるが、疲労負荷後半では、尻尾の散熱回数が低下するだけでなく、散熱時の体温が非散熱時の体温より低いなど体温調節機序の異常が観察され、学术论文に発表した(図2)。尻尾の発熱が負荷7-9日では低下し始めること、睡眠時間が負荷後9-11日ごろから再び上昇し始めることなどを考え合わせると負荷9日ごろを境に非可逆的な慢性疲労に進行していく可能性を示唆している。

#### (3) 臨界期のバイオマーカーの探索

疲労の慢性化を伴う血中のバイオマーカーを網羅的に探索して研究では、血中コルチコステロンが疲労負荷を伴って徐々に上昇し、負荷期間中ずっと高値を維持しているのに対して、その上流の副腎皮質刺激ホルモンは、疲労負荷初期に一過性に上昇し、その後一旦低下するが、疲労負荷後半にはコルチコステロンのネガティブフィードバック機能の低下を示唆する有意な上昇が認められた。また、疲労負荷による生体酸化ストレスを評価した検討では、疲労負荷後半には血中の酸化ストレスマーカーであるdROM値が有意に上昇する(図3)ことを明らかにし、コルチコステロンのネガティブフィードバック調整が酸化ストレスによって低下する報告と考え合わせると、疲労負荷の慢性化によって生体内の酸化ストレスが上昇し、ストレス応答に関わるホルモン調整メカニズムの異常を引き起こす可能性が示唆された。また、血中のサイトカインの動態変化を網羅的に探索した結果では、疲労負荷初期にはIL-4、IL-10、IL-13などの抗炎症性サイトカインの上昇傾向が表れ、疲労負荷の後期にはIL-1やINFなどの炎症性サイ

図2. 疲労負荷による散熱機序の異常



トカインが上昇することを突き止め、疲労の慢性化に伴って生体内で炎症反応が活性化される可能性が示唆された。

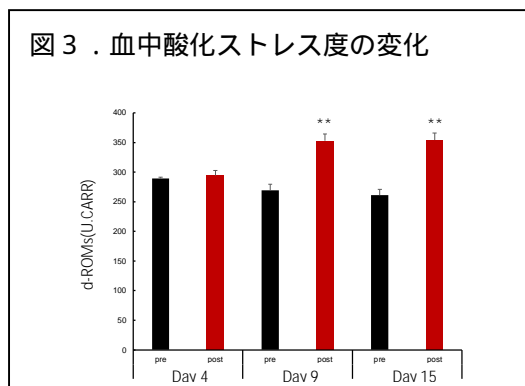
また、疲労の慢性化に関わる詳細な分子プロセスを検討する目的で、疲労負荷3日後、9日後、14日後の血中の遺伝子発現プロファイルについて次世代シーケンサーを用いて網羅的な探索を行った。結果、疲労負荷初期にはクエン酸代謝回路などに関わる遺伝子群の発現が顕著であるが、疲労負荷の慢性化を伴ってこれらの代謝関連の遺伝子群の発現は低下し、疲労負荷後期にはヒトT細胞白血病ウイルス1型や関節リュウマチなどの感染や自己免疫疾患に関わる遺伝子群の発現が活発になることを明らかにした。

これまでの疲労の慢性化を伴う睡眠・体温調節機能の異常、血中の酸化ストレスや炎症性サイトカインの上昇が疲労負荷後期に現れることと考え合わせると、疲労の慢性化には神経・内分泌・免疫の多角的・多階層の恒常性維持機構の機能異常が関わっていることを示唆している。

#### (4) 倦怠感惹起に関わる脳内炎症の解析

身性の炎症反応の活性化によって自発行動量の著しい低下を示す動物を対象に、脳内の活性化ミクログリアを特異的に認識する[18F]DPA-714を用いて、脳内炎症をPETイメージングで定量解析した検討では、末梢の炎症反応の活性化によって上昇したIL-1などの炎症性サイトカインが迷走神経の求心路などを介して、脳内の広範な領域において炎症反応を引き起こすこと、脳内の視床内側腹側核、A11ドーパミン神経核、背側縫線核、A7ノルアドレナリン神経核、A5ノルアドレナリン神経核、結合腕傍核、孤束核などの領域において脳内炎症を引き起こすことを明らかにした。興味深いことに、疲労感の惹起と深く関わっている背側縫線核での脳内炎症は自発行動量の低下と相関しており、末梢感染による倦怠感がこれらの脳内の局所炎症に起因する可能性が示唆された。

図3．血中酸化ストレス度の変化



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hu D., Li D, Shigeta M., Ochi Y., Okauchi T, Neyama H., Kabayama S., Watanabe Y., and Cui Y.L	4. 巻 535
2. 論文標題 Alleviation of the chronic stress response attributed to the antioxidant and anti-inflammatory effects of electrolyzed hydrogen water.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.12.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li Danxi, Hu Di, Shigeta Mika, Ochi Yuta, Watanabe Yasuyoshi, Li Feng, Cui Yilong	4. 巻 165
2. 論文標題 Homeostatic disturbance of thermoregulatory functions in rats with chronic fatigue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 45～50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hu Di, Huang Tianliang, Shigeta Mika, Ochi Yuta, Kabayama Shigeru, Watanabe Yasuyoshi, Cui Yilong	4. 巻 14
2. 論文標題 Electrolyzed Hydrogen Water Alleviates Abdominal Pain through Suppression of Colonic Tissue Inflammation in a Rat Model of Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 4451～4451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu14214451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko Ken-ichi, Irie Satsuki, Mawatari Aya, Igesaka Ami, Hu Di, Nakaoka Takayoshi, Hayashinaka Emi, Wada Yasuhiro, Doi Hisashi, Watanabe Yasuyoshi, Cui Yilong	4. 巻 49
2. 論文標題 [18F]DPA-714 PET imaging for the quantitative evaluation of early spatiotemporal changes of neuroinflammation in rat brain following status epilepticus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging	6. 最初と最後の頁 2265～2275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00259-022-05719-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 崔翼龍、胡迪、渡辺恭良
2. 発表標題 疲労の慢性化およびその分子神経メカニズムについて
3. 学会等名 第17回日本疲労学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 胡迪、李丹溪、重田美香、越智祐太、渡辺恭良、崔翼龍
2. 発表標題 慢性疲労動物を用いた疲労の慢性化機序解析
3. 学会等名 第17回日本疲労学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樺山繁、中山昌明、崔翼龍、渡辺恭良
2. 発表標題 抗疲労・健康と電解水素水
3. 学会等名 第17回日本疲労学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 崔翼龍、胡迪、渡辺恭良
2. 発表標題 疲労の慢性化と神経・内分泌・免疫機能の破綻について
3. 学会等名 第18回日本疲労学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 崔冀龍、胡迪、渡辺恭良
2. 発表標題 擬似感染による疲労および疲労感惹起の分子神経メカニズムについて
3. 学会等名 第19回日本疲労学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 治和  (Suzuki Harukazu)  (80333293)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副センター長    (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------