

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07740

研究課題名(和文) 唾液中のバイオマーカーを指標としたストレス-体内時計-疾病の相互関係の解明

研究課題名(英文) Analysis of interrelationships of stress, biological clock, and health conditions focusing on salivary biomarkers as indicator

研究代表者

横田 伸一 (Yokota, Shin-Ichi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10743239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスはバイオリズムを破綻させ、免疫力の低下や疾患リスクの増大を惹き起こす。本研究の目的は、唾液中のバイオマーカーの観点から、ストレスが生体リズムに与える影響を解析し、動物種の垣根を越えて使用できるストレスマーカーを見出すことである。マウスとサルを用いた検討から、ストレスは唾液中の免疫グロブリンAを低下させ、その日内リズムを破綻させる可能性が明らかとなった。唾液中の免疫グロブリンAは、生体リズムとストレス反応を同時にモニターできるバイオマーカーになり得るかも知れない。

研究成果の概要(英文)：Stress disrupts biological rhythm, and causes various diseases. The aim of this study was to analyze the effect of stress on biological rhythm from the viewpoint of biomarkers in saliva and to find stress markers that can be used in various animal species. Studies using mouse and monkey revealed that the stress decreases immunoglobulin A (IgA) in saliva, and eliminates the circadian rhythm of salivary IgA. Salivary IgA may be a biomarker that can simultaneously monitor biological rhythm and stress response.

研究分野：動物生命科学

キーワード：バイオマーカー ストレス サーカディアンリズム 霊長類

1. 研究開始当初の背景

日常生活のなかの様々なストレスはバイオロジカルリズムを破綻させ、病気への進展を招くことは誰しも想起するところである。家畜や家禽の成長がストレスによって妨げられたり、臨床患畜の病状が急変し悪化に転じたりするのを目の当たりにすることもある。しかし、ヒトはおろか実験動物のレベルでさえ、ストレスとリズム異常、疾病の全体の関連性は未だ解明されていない。運動や痛みなどの肉体的ストレスは血圧や心拍数に現れるが、精神的・社会的なストレスは捉え難く、ストレスに対する適切な処置(ストレスマネジメント)を困難にしている。ストレスを定量化するためのバイオマーカーの探索が重要である。ストレスの種類や強度に応じて血液や尿、唾液中で変動する物質はいずれもマーカーとなり得るが、検体採取が簡便でかつ低侵襲な唾液中の物質は汎用性が高い。

ストレスの応答経路は、身体的ストレスを反映する交感神経-副腎髄質系(アドレナリン系)と精神的ストレスを反映する視床下部-下垂体-副腎皮質系(コルチゾール系)とに分類される。アドレナリンもコルチゾールも体内時計の制御下にあるが、外界からのストレスにも強く連動している。精神的ストレスは解析が難しく、比較的報告も少ないが、唾液中の物質ではコルチゾールとそれに連動して動く免疫グロブリンA(IgA)などが注目され、ヒトや家畜(豚)、ビーグル犬などでほぼ共通することが分かりつつある。

体内時計と疾患との密接な関係は、個々の事例が詳細に検討されている。申請者も時計遺伝子の変異マウスにおいて血清中コルチコステロン分泌の日内変動が消失すること、Th2型の皮膚アレルギー反応が亢進し病態が増悪することを報告した。同研究結果からストレスマーカー、体内時計、疾患の三者の連動が示唆された。しかし、これら三者の関係を網羅して考察し得るような研究は申請者の報告を除くとあまり例がなく、唾液中の物質に着目して体内時計や疾患との積極的な関連性を示している例も見当たらなかった。三者の関係を科学的に証明し、ストレスやリズム異常を簡便に評価できる唾液中マーカーを見出すことが出来れば、ストレスマネジメントの質が向上し、人医、獣医、畜産すべての領域に貢献する知見になり得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、唾液中のバイオマーカーの観点から、ストレスが生体リズムに与える影響を解析し、動物種の垣根を越えて使用できるストレスマーカーを見出すことである。具体的には以下の3つの実験を行った。

(1) マウスの唾液中で測定できる物質の探索と同物質の唾液中での日内リズムの評価。

同物質のストレス負荷による変動の検討。

(2) 昼行性と夜行性の新世界ザルにおける唾液中バイオマーカーの日内リズムの評価。

(3) 旧世界ザルを用いたストレス負荷時の唾液中バイオマーカーの変動の評価。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウスを使用した。Zeitgeber time (ZT) 1, 5, 9, 13, 17, および 21 に唾液を採取し、唾液中のバイオマーカー候補物質を市販のキットで測定した。具体的にはバイオマーカー候補として、コルチコステロン、脳神経由来成長因子(BDNF)、メラトニン、アミラーゼ、およびIgAの5種類の測定を試みた。また、一部の実験においては、マウスへの拘束ストレスの負荷も行った。具体的には、明期に1時間(ZT4-5)拘束衣に入れストレスを負荷した群(およびその対照群)と、暗期に1時間(ZT16-17)拘束衣に入れストレスを負荷した群(およびその対照群)の4群構成とした。

(2) 新世界ザルのリスザル(昼行性)とヨザル(夜行性)を使用した。ZT1, 5, 9, 13, 17, および 21 に唾液を採取し、(1)より見出された唾液中のバイオマーカー候補物質(コルチゾール、メラトニン、アミラーゼ、IgA)の濃度を市販のキットで測定した。

(3) 旧世界ザルのニホンザルとアカゲザルを使用した。なお、これらのサルを使用した理由は、ヒトの感覚に近い複雑な要因を含むストレスを負荷した際の唾液中バイオマーカーの変動の有無を調べるためである。ZT2-7の5時間、サルをホームケージから他室の個別ケージに一時的に移動させるという心理的・社会的要因を含むストレスを負荷した直後と、実験2日前の同時刻に採取した血液および唾液中のコルチゾール、メラトニン、アミラーゼ、IgAの濃度測定を行った。

4. 研究成果

(1) マウスの唾液中においては、コルチコステロン、メラトニン、アミラーゼ、IgAの4物質が測定可能だった。このうち、アミラーゼとIgAについては、コサイナー法の適用により有意な日内リズムが確認された(図1a)。また唾液中IgAは明期にストレスが負荷されるとベースラインまで有意に減少することも明らかとなった(図1b)。なお、アミラーゼについては、ストレス負荷による有意な変動は認められなかった。以上の結果から、唾液中のIgAが生体リズムとストレスの両者を評価し得るバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

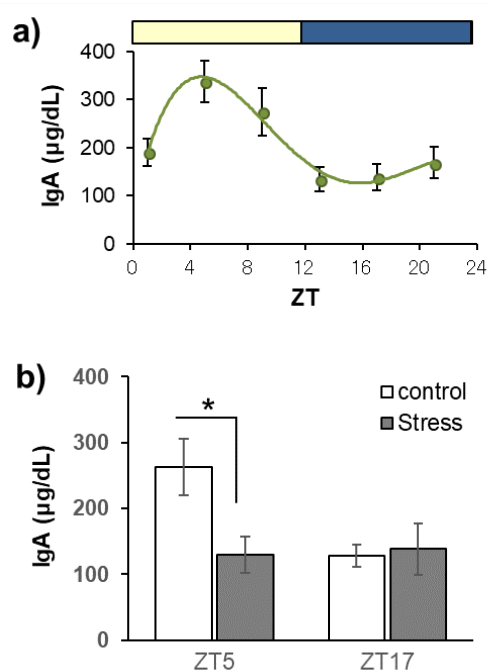


図 1. a) マウスにおける唾液中 IgA の日内リズム. b) マウス唾液中 IgA 濃度に対するストレス負荷の影響. * $p < 0.05$, t test

(2) リスザルおよびヨザルの唾液中では、コルチゾール、メラトニン、IgA が測定可能であった。このうちコサイナー法の適用により有意な日内リズムが確認できたのは、ヨザルにおけるコルチゾールと IgA であった(図 2)。IgA は、マウスのみならず、新世界ザルの唾液中でも明確な日内リズムを示すことから、バイオマーカーとしての有用性が期待される結果となった。

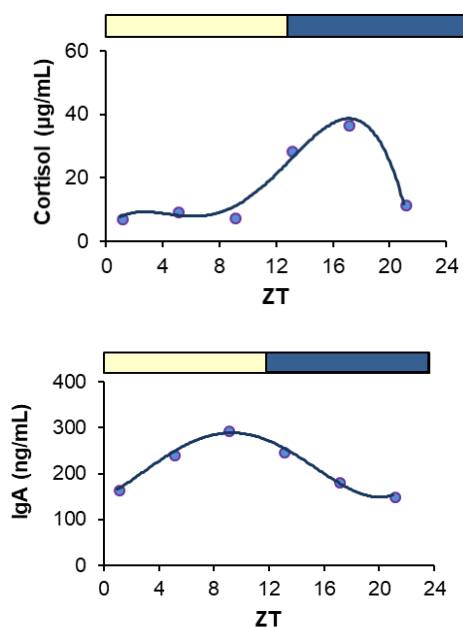


図 2. ヨザルの唾液中コルチゾールおよび IgA の日内リズム.

(3) 旧世界ザルにおいては、ストレス負荷の 2 日前の ZT7 と当日の ZT7 に採取した血漿中と唾液液中のコルチゾール、メラトニン、アミラーゼ、IgA の濃度の変化について解析を行った。その結果、血漿中よりも唾液中でコルチゾール濃度が鋭敏にストレス負荷にตอบสนองして上昇することが明らかとなった(図 3)。また、唾液中のアミラーゼと IgA の濃度が減少することも明らかとなった。アミラーゼ、IgA の変動はアカゲザルでのみ有意差が検出されており、バイオマーカーの観点からニホンザルとアカゲザルのストレス反応性の違いが示唆される結果となった(図 4)。

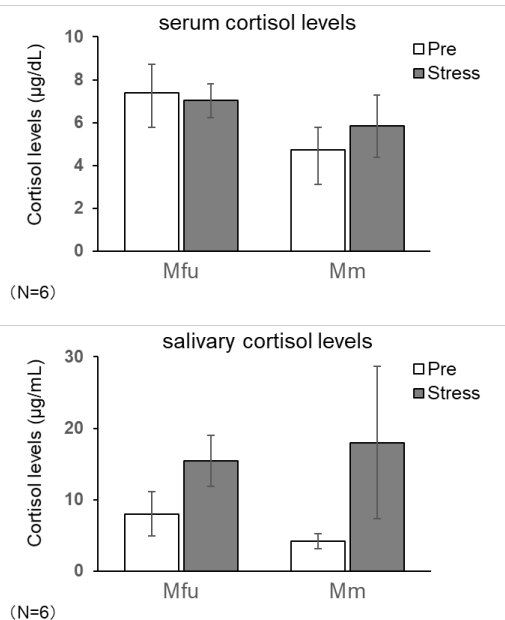


図 3. ニホンザル(Mfu)およびアカゲザル(Mm)に対するストレス負荷による血漿中および唾液中コルチゾール濃度の変化.

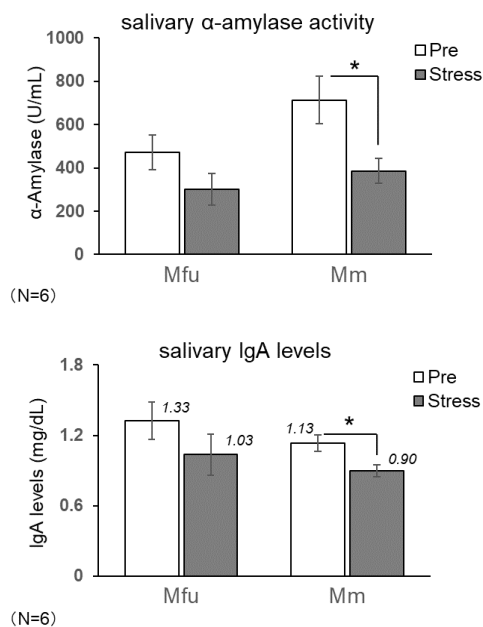


図 4. ニホンザル(Mfu)およびアカゲザル(Mm)の唾液中コ IgA 濃度に対するストレス負荷の影響. * $p < 0.05$, t test

以上のマウスとサルを用いた検討から、種差による若干の違いはあるものの、ストレスは唾液中の免疫グロブリンAを低下させ、その日内リズムを破綻させる可能性が明らかとなった。唾液中の免疫グロブリンAは、生体リズムとストレス反応を同時にモニターできるバイオマーカー候補として有望であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Yokota SI, Ando M, Nakamura K, Shibata S. Combined effect of shortened photoperiod and low crude protein diet on liver triglyceride accumulation and lipid-related gene expression in quail. *Livest Sci.* in press. 査読有

(2) Yokota S, Ando M, Aoyama S, Nakamura K, Shibata S. Leucine restores murine hepatic triglyceride accumulation induced by a low protein diet by suppressing autophagy and excessive endoplasmic reticulum stress. *Amino Acids.* 48:1013-1021, 2016. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 伸一 (YOKOTA, Shin-Ichi)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：10743239

(2) 連携研究者

柴田 重信 (SHIBATA, Shigenobu)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：10162629

松田 浩珍 (MATSUDA, Hiroshi)
東京農工大学・農学研究科・教授
研究者番号：80145820