

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01817

研究課題名(和文) ストレス後のミトコンドリア代謝変動と免疫応答抑制機構の解明

研究課題名(英文) Effect of stress on mitochondrial function and immune responses

研究代表者

笠原 恵美子 (KASAHARA, EMIKO)

大阪大学・薬学研究科・寄附講座講師

研究者番号：30468269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心身への過度なストレス負荷において観察される免疫抑制および行動量の低下において、細胞内小器官のミトコンドリアの関係を検討した。その結果、(1)ストレスを負荷したマウスでは、ストレス関連ホルモンの一つであるグルココルチコイドの上昇が、ミトコンドリアのタンパク質(脱共役タンパク質：UCP2)の発現を上昇させて、免疫担当細胞(マクロファージ)の働きを制御していること、(2)ストレス負荷によるミトコンドリアの機能変化がストレス後の自発行動量の低下に関与していることを明らかにした。これらの研究成果を更に発展させ、ストレスが原因とされる疾患の病態解明や予防・治療法の確立に貢献していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過度のストレス負荷は様々な疾患リスクを高めることは昔から経験的にも知られているが、その詳細なメカニズムやストレス負荷状態の評価法については確立されていない。本研究では、ストレス応答時に生体内で分泌量が増加するホルモンの一つであるグルココルチコイドが細胞のエネルギー産生を司る主要な小器官であるミトコンドリアの代謝を変えて免疫系と行動量に影響を及ぼすことを明らかにした。ミトコンドリア関連分子の生体内での変動を調べることで、生理的・身体的なストレス負荷の評価・管理の為にバイオマーカーの確立に貢献できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of mitochondrial function in psychological/physical stress-related pathology, such as immunosuppression and spontaneous motor activity in mice. As results, (1) under the stress condition, the increased plasma level of glucocorticoids was controlling immune systems via up-regulation of mitochondria uncoupling protein 2 (UCP2), and (2) alteration of mitochondrial energy metabolism participated in a decline of the spontaneous motor activity. These results suggested the possibility that stress-induced mitochondrial alteration determine the physiological condition in individuals. We would like to study further the mechanisms to contribute to establishment of prevention and therapy of stress-related disorder.

研究分野：病態生化学

キーワード：ストレス負荷 ミトコンドリア グルココルチコイド マクロファージ サイトカイン 自発行動量

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過度の身体的・精神的なストレス負荷は、易感染性や免疫力の低下（生体防御能の破綻）、行動量や身体能力の低下などを引き起こす事が報告されている。しかしながら、ストレス負荷が免疫システムや身体活動に影響を及ぼす機序については不明な点が多く、心身のストレス状態の評価・管理方法やその防御法についても確立されていない。

生体のエネルギー代謝において重要な役割を担う細胞内小器官のミトコンドリアは、エネルギー産生のみならず免疫応答においても重要な役割を担っている様相が近年明らかになりつつある。これまでに我々は、マウスを用いた実験系において、ストレス負荷による脳の視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸の活性化がグルココルチコイドの分泌上昇を介してミトコンドリア脱共役蛋白質 2 (uncoupling protein2, UCP2) の発現を上昇させること⁽¹⁾、自然免疫（生まれつき備わっている防御機構）において重要な役割を担うマクロファージ細胞を用いた実験系において、ミトコンドリアの UCP2 の発現や活性酸素代謝が炎症性サイトカイン分泌の制御に関与することを明らかにしてきた^(1,2)。これらの研究結果は、ストレス負荷状態において分泌が上昇するグルココルチコイドが、免疫担当細胞のミトコンドリアの機能を変化させて生体防御能を制御するという新規免疫制御経路の可能性を示唆するものである⁽³⁾。ストレス環境下において、細胞のミトコンドリア機能や代謝の変動が生体に及ぼす影響とその分子的背景が明らかになれば、ストレス状態の評価法の確立やストレスが原因とされる病態の解明に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

ストレス関連ホルモンの一つであるグルココルチコイドは、運動の持久力に必要な糖・脂質・アミノ酸の代謝を変化させてエネルギー利用を制御するが、一方で免疫応答能を抑制することが知られている。本研究では、ストレス負荷において HPA 軸の活性化により分泌が上昇するグルココルチコイドが、免疫系および自発行動量へ及ぼす影響について、ミトコンドリアに焦点を当てて明らかにすることを目的とした。我々はこれまでに、グルココルチコイドがマクロファージの UCP2 発現を上昇させることを示してきた。UCP2 は、免疫担当細胞のミトコンドリア活性酸素産生を負に制御することでサイトカイン分泌を抑制することが報告されている。そこで今回、ストレス負荷におけるマクロファージのミトコンドリア UCP2 の役割を生体レベルで明らかにするために、マクロファージ特異的に UCP2 遺伝子を抑制させたマウスを用いて、ストレス負荷による免疫応答能の制御および自発行動量や運動持久力への影響について検討した。また、ストレス負荷によるマウスの行動様式の変化と血中のサイトカインやミトコンドリア関連因子の変動についての相関を検討した。

3. 研究の方法

マウスへのストレス負荷は、拘束ストレス負荷（3時間/日、連日3日間）およびマウスのうつ病モデルとして広く用いられている慢性社会的敗北ストレス負荷（ICR より直接的な身体的攻撃と精神的な負荷、10日間）を行った。UCP2 ノックダウンマウスは、核酸（siRNA）をマウスの尾静脈より投与する手法（in vivo siRNA）を用いて作成した。マウスへの内毒素（LPS）の腹腔投与による血中サイトカイン濃度（ELISA およびマルチプレックス）、グルココルチコイド分泌量（ELISA）、および行動変化（自発行動量、社交性試験等）をストレス負荷群および非負荷群において比較解析した。また、マウスに2%チオグリコレート溶液を腹腔内投与して腹腔マクロファージを回収して培養し、LPS に対する免疫応答能（サイトカイン産生への影響）について比較解析した。

4. 研究成果

（1）グルココルチコイドがマクロファージのミトコンドリアへ及ぼす影響の検討

マウスの腹腔マクロファージを培養し、培地にグルココルチコイドを添加すると、ミトコンドリアの酸素消費量が上昇し、好氣的解糖系が促進されて糖消費量が増加した。このことより、無刺激のマクロファージにおいては、グルココルチコイドはミトコンドリアによる好氣的解糖系でのエネルギー代謝を促進することが示唆された。LPS をマクロファージの培地に添加するとミトコンドリア呼吸活性が抑制され嫌氣的解糖系の代謝に傾き培地中の乳酸値が上昇したが、グルココルチコイドの共存下では、これら LPS によるミトコンドリアへの作用が抑制された。また、LPS 添加によるミトコンドリア活性酸素の産生上昇と炎症性サイトカイン（IL-6, TNF- α など）の分泌は、グルココルチコイドの共存下では抑制された。LPS 刺激はマクロファージの嫌氣的解糖系を促進して細胞のエネルギー代謝を変換させることにより、細胞の性質を変化させることが報告されている。グルココルチコイドは、LPS 刺激によるミトコンドリア非依存的な代謝への変換を抑制して、マクロファージにおけるサイトカイン分泌を負に制御している可能性が考えられた。

拘束ストレス負荷マウスにおいては、血中グルココルチコイド濃度の上昇に伴い、マクロファージのミトコンドリア UCP2 の発現が上昇した。一方で、グルココルチコイド受容体阻害剤の投与、およびグルココルチコイド分泌不全マウスにおいては、ストレス負荷による UCP2 発現上昇が抑制された。このことより、ストレス負荷マウスにおけるマクロファージの UCP2 の

発現上昇は、グルココルチコイド受容体を介する作用であることが、生体においても明らかとなった。更に、ストレス負荷によるミトコンドリアの呼吸活性の抑制とエネルギー産生能の低下は、グルココルチコイド阻害剤により改善されたことより、グルココルチコイドにより発現が誘導される UCP2 はミトコンドリアの機能を制御する重要な因子であることが示唆された。一方で、ストレス負荷マウスから採取した腹腔マクロファージでは、ストレス非負荷マウスのマクロファージと比較して、LPS に対する炎症性サイトカインの分泌量が増加傾向を示した。これらのメカニズムの詳細は現在のところ不明だが、グルココルチコイド以外のストレス関連ホルモンの関与も検討する必要があると思われる。今後は腹腔マクロファージ以外の生体内マクロファージにおいても更に解析を進めることにより、生体のストレス負荷が原因となる病態の解明に貢献できると考えた。

(2) ストレス負荷マウスの行動変化とミトコンドリア

ストレス負荷マウスにおける血中パラメータの変動：社会的敗北ストレス負荷に対してより感受性が高いマウスとストレス負荷に対して耐性を示すマウスを行動学的な解析により群分けして血液中のパラメータをマルチプレックスにより網羅的に比較解析したところ、ストレス関連ホルモン及びサイトカインの血中濃度変化は、両群間で異なる様相を示していた。また、ストレス負荷マウスにおいては、ヒトのミトコンドリア病との関与が報告されている GDF-15 (growth/differentiation factor15)の血中濃度が高値を示した。

拘束ストレス負荷マウスにおけるミトコンドリア機能変化と運動能への影響：拘束ストレスを負荷したマウスでは、コントロールマウスと比較して自発行動量の低下と持久運動能の低下が観察された。ミトコンドリア機能障害に対して保護効果を示すことが知られているカルニチンをストレス負荷マウスに投与すると、自発行動量の低下が改善された。また、マウスの肝臓からミトコンドリアを分離してミトコンドリアの活性酸素産生量を解析したところ、ストレス負荷マウスではコントロールマウスと比較して活性酸素の産生が増加し呼吸活性が低下していたが、カルニチンの投与により改善されていた。これらのことより、ストレス負荷によるミトコンドリアの機能低下が自発行動量の低下に関与している可能性が考えられた。しかしながら、グルココルチコイド受容体の阻害剤を投与したマウスでは、ストレス負荷による自発運動量の低下を改善しなかった。また、グルココルチコイドの分泌不全マウスではストレス負荷による自発行動量の低下を更に増悪した。一方で、正常マウスへのグルココルチコイドの投与は肝や筋肉のグリコーゲン蓄積量を増やし、トレッドミルによる持久運動能を向上させた。これらの結果より、ストレス負荷による自発行動量の低下については、グルココルチコイドの分泌上昇は関与していないか、あるいは血中グルココルチコイドの濃度や作用時間、および臓器中への分布により運動能への作用が異なる可能性が考えられた。

(3) ストレス負荷マウスにおける UCP2 ノックダウンの影響

免疫応答能への影響

UCP2 の遺伝子発現を抑制させたマウスにおいては、拘束ストレス負荷により同様にグルココルチコイドが上昇するが、UCP2 蛋白の発現は上昇しないことを確認した。マウスに拘束ストレスを負荷すると、LPS に対する応答能(血中の炎症性サイトカインの上昇、体重低下、死亡率)が抑制されるが、グルココルチコイド分泌不全マウス、およびグルココルチコイド受容体の阻害剤を投与したマウスにおいては、ストレス負荷によるこれら免疫応答への影響は軽減されていた。また、グルココルチコイドの上昇に伴いミトコンドリア UCP2 の発現が上昇し、ミトコンドリア呼吸能が低下したが、グルココルチコイド受容体阻害剤によりこれらの変化は消失した。更に、マクロファージの UCP2 ノックダウンマウスでは、ストレス負荷によりグルココルチコイドの血中濃度は上昇していたが、LPS 投与による炎症性サイトカインの分泌上昇は抑制されなかった。これらのことより、グルココルチコイドによるマクロファージの UCP2 の発現誘導は、LPS 投与による炎症性サイトカイン上昇の抑制において重要であることが示唆された。

自発行動量および運動能への影響

拘束ストレス負荷マウスにおける自発運動量の低下や持久運動能の低下において、マクロファージのミトコンドリア UCP2 の関与を検討した。マクロファージ特異的 UCP2 ノックダウンマウスにおいて、拘束ストレス負荷による自発行動量の低下は改善されなかったことより、UCP2 の直接的な関与は低いと考えられる。

(4) 考察

過度の精神的・身体的ストレス負荷による自然免疫応答の低下においては、グルココルチコイドによるマクロファージのミトコンドリア UCP2 の発現上昇が関与している可能性が示唆された。グルココルチコイドレセプター阻害剤は、ストレス負荷による UCP2 の発現上昇を抑制していることより、ストレスによるグルココルチコイドの過剰な分泌が UCP2 の発現上昇に関与していると考えられた。このようなグルココルチコイドによる UCP2 の発現上昇はミトコンドリアの呼吸活性やエネルギー代謝に影響を及ぼす可能性が考えられる。ミトコンドリアはエネ

ルギー代謝にも重要な役割を担っているため、ストレス負荷により誘起されるミトコンドリアの機能変化は身体の活動能にも影響を及ぼすことが考えられる。本研究の結果より、過度のストレス負荷による自発運動量や持久運動能低下においてはミトコンドリア機能の変化が関与していることが示唆されたが、ミトコンドリア UCP2 の直接的な関与は認められなかった。

<引用文献>

- (1) Kasahara E, Sekiyama A, Hori M, Kuratsune D, Fujisawa N, Chida D, Hiramoto H, Li J, Okamura H, Inoue M, Kitagawa S., Stress-Induced Glucocorticoid Release Upregulates Uncoupling Protein-2 Expression and Enhances Resistance to Endotoxin-Induced Lethality. *Neuroimmunomodulation*. 22, 279-292 (2015)
- (2) 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*. 585, 2263-2268 (2011)
- (3) Kasahara E, Inoue M., Cross-talk between HPA-axis-increased glucocorticoids and mitochondrial stress determines immune responses and clinical manifestations of patients with sepsis. *Redox Rep*. 20, 1-10. (2015) Review

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 14 件)

E. Kasahara, A. Sekiyama, M. Hori, M. Inoue
CROSS-TALK BETWEEN HPA-AXIS-INCREASED GLUCOCORTICOID AND MITOCHONDRIAL STRESS DETERMINES LPS-INDUCED IMMUNE RESPONSES
SUMMER SCHOOL ON STRESS, 2018

S. Ito, E. Kasahara, K. morimoto, M. Hori, A. Sekiyama
Difference in behavioral phenotypes after stress are associated with levels of signaling molecules in plasma
SUMMER SCHOOL ON STRESS, 2018

Atsuo Sekiyama
Stress and diseases; do cytokines act behind the scenes?
SUMMER SCHOOL ON STRESS, 2018

関山 敦生, 笠原恵美子
社会的敗北ストレスによる社会的行動低下モデルマウスにおける血中サイトカイン濃度の検討
第 13 回日本臨床ストレス応答学会大会

笠原 恵美子, 村山 真人, 竹中 三月, 野々村 瑞雅, 森本 健揮, 伊藤 史穂, 羽根 雅人, 関山敦生
活性化マクロファージのグルタミン酸産生と免疫応答への影響
第 41 回日本分子生物学会年会 2018

羽根 雅人, 笠原 恵美子, 竹中 美月, 村山 真人, 野々村 瑞雅, 堀 美香, 関山 敦生
マクロファージのアドレナリン受容体を介したシグナルによる免疫応答調節機構の解析
第 41 回日本分子生物学会年会 2018

森本健揮, 笠原恵美子, 堀美香, 伊藤史穂, 関山敦生
社会的行動低下マウスにおける血中サイトカイン濃度の検討
第 36 回サイトプロテクション研究会 2018

関山敦生, 笠原恵美子
うつ病、統合失調症の特異的バイオマーカーを探る
第 36 回サイトプロテクション研究会 2018

森本 健揮, 笠原 恵美子, 伊藤 史穂, 竹中 美月, 村山 真人, 堀 美香, 関山 敦生
ストレスによるうつ形成のトランスレーショナル・バイオマーカーの検討
第 40 回日本分子生物学会年会 2017

笠原恵美子、堀美香、村山真人、竹中三月、関山敦生
マクロファージの自然免疫応答におけるグルタミン酸の影響
第40回日本分子生物学会年会 2017

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：関山 敦生

ローマ字氏名：(SEKIYAMA, Atsuo)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院薬学研究科

職名：寄附講座教授

研究者番号(8桁): 30403702

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。