

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 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32636

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500614

研究課題名（和文）

尿中及び脳内疲労マーカーを用いた肉体疲労および精神疲労に関する研究

研究課題名（英文）

Study on physical and mental fatigue using biomarkers in urine and brain.

研究代表者

大城 聡 (OSHIRO SATORU)

大東文化大学・スポーツ・健康科学部・教授

研究者番号：30160485

研究成果の概要（和文）：

国民の就労人口の約 2/3 が疲労しているといわれ、疲労研究は国民の QOL への貢献が期待される。本研究ではヒトの肉体及び精神疲労の区別、疲労の程度を調べることを目的として、疲労のバイオマーカーについて検討した。肉体或いは精神ストレスを負荷した疲労実験動物では、尿中の一種の活性酸素が少なくとも肉体疲労のマーカーになり得ると考えられた。現在、脳内の疲労マーカー及び疲労に関わる遺伝子の発現についても解析中である。

研究成果の概要（英文）：

It is said that approximately two thirds of working population in Japan may be tired of working. The study of fatigue makes a contribution to the quality of life of the people. In this study, to investigate the difference between physical and mental fatigue, and the degree of both fatigue, we examined these biomarkers. The analysis of urine from physical or mental stress-loaded experimental animals, rats suggests that hydrogen peroxide, a reactive oxygen species is at least a kind of biomarker for physical fatigue. We will also analyze marker proteins and gene expressions related to fatigue using RNA-seq of mRNA from rat brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：スポーツ生化学、肉体疲労、精神疲労、疲労マーカー、活性酸素、過酸化水素

1. 研究開始当初の背景

(1) 尿中疲労マーカーについて

我々はヒトが受けるストレスの影響について生化学、神経科学レベルで過去十数年に渡り研究を重ねてきた。マウスを用いた研究では酸化ストレスを与えると肝、腎、脾にストレス誘導蛋白質が誘導、合成されること (Oshiro ら Cell Biology Int., 1999 年)、神経培養細胞を使用した研究では神経細胞お

よびグリア細胞からの活性酸素の測定実験からグリア細胞が神経細胞よりも活性酸素消去能が高く、酸化ストレスによる活性酸素障害から神経細胞を守ること (Oshiro ら、2000 年 Biochimica et Biophysica Acta)、更にミクログリアは神経細胞との混合培養系において、神経細胞への鉄の取り込みを抑制することにより、アストロサイトは神経細胞を取り巻く環境中から鉄を除去すること

により自己の鉄輸送活性を高め、鉄を触媒とする活性酸素の生成を抑制し、神経細胞を夫々異なるメカニズムで保護することを報告し(Oshiro ら、2008 年 *Biochimica et Biophysica Acta*)、2009 年国際神経科学会においては、ミクログリアは神経細胞とコンタクトすることによって、ある特定の抗酸化酵素の遺伝子を発現させ、神経細胞を保護することを見出した。最近、我々は低酸素ストレス刺激によるヒトの横紋筋培養細胞の遺伝子発現の時系列変化を網羅的に遺伝子の発現を解析できる DNA マイクロアレイ法によって観察し、低酸素刺激による代謝及び細胞内シグナル伝達に関わる遺伝子の発現を解析した。このように我々は活性酸素がもたらす酸化ストレス刺激が細胞に与える影響について分子レベルで解析する方法を確立した。また、ごく最近、我々は高い再現性で尿中活性酸素を測定できる蛍光色素測定法を確立した(大城ら、2009 年早稲田大学スポーツ科学研究科シンポジウム)。更に本法によって年齢、運動歴、性差、運動負荷、抗酸化飲料の摂取、日内の経時変化などを比較研究した結果、尿中活性酸素濃度および尿中活性酸素消去能が疲労度と相関し、尿中疲労マーカーと成り得ることを示唆する結果を得た。疲労については国民の就労人口の 2/3 が疲労を感じているという報告(1999 年厚生労働省疲労研究班)があるように、疲労は生活習慣病やメタボリック症候群に続いて国民の関心事である。疲労の諸問題は国民の健康の質(QOL)および国民総生産に関わる重大な問題であり、科学的根拠に基づいた国家的対策を講ずる必要がある。そのためにも、尿中疲労マーカーの測定法のような、健常人を対象とした非侵襲的な方法によって個々人の疲労度を定量化(疲労の有無)および定量化(疲労の程度)する必要がある。

(2) 脳内疲労マーカーについて

脳内疲労マーカーについては、疲労マウスモデルでは脳内 c-fos タンパク質の発現が減少するとの報告があったが、我々の Reverse transcriptasePCR 法では変化が見出せなかったが、プローブデザインの変更後の Real time PCT では c-Fos 遺伝子の発現の増加が観察され、一つの遺伝子の変動が再現性よく観察できるようになったことより、最終年度はラット間脳の全遺伝子解析の網羅的変動を DNA マイクロアレイ法で解析を実施する予定であった。しかし、本研究計画時点における遺伝子発現解析のデファクトスタンダードは、DNA マイクロアレイであったが、現在では、次世代シーケンサー(NGS)を用いたデジタル発現解析(mRNA-Seq)が主流となりつつある。これらの発現解析方法は、試料を調整する時に、オリゴ dT ビーズを利用して、polyA が付加された mRNA を濃縮する点で一致する。し

かし、マイクロアレイ解析は、既知の mRNA 配列のプローブに結合する mRNA 量を、蛍光強度で検出することで、mRNA 量を間接的に定量するのに対して、mRNA-Seq は、サンプル RNA ライブラリーに存在する mRNA 配列をランダムにシーケンシングすることで、直接 mRNA 量を計測することができる。従って、mRNA-Seq を用いた場合は、定量性に加えて、新規 mRNA や、mRNA の構造的な差異を調べることができる点で、マイクロアレイ解析より優れた遺伝子発現解析方法といえる。従って本研究では、脳内疲労マーカーとして既に知られている c-Fos 遺伝子のような既知の遺伝子発現のみならず、慢性的な疲労状態に関連する遺伝子発現を調べて、新しい疲労マーカーを同定する意味で、mRNA-Seq を用いた発現解析を実施した。我々の知る限り疲労に関するこのような試みは国際的にみても極めて少ない。

2. 研究の目的

疲労には健常人のスポーツなどによる肉体的な疲労、心配や不安、ストレスなどによる精神的な疲労に加えて、最近、このような肉体的疲労や精神的疲労とは全く異なる慢性疲労症候群とよばれる疲労も見出されている。就労人口の少なくとも半分以上が疲労を感じているという報告もあり、疲労は国家的対策を講ずるべき重要な課題である。

本研究は肉体的および精神的な疲労を尿中疲労マーカーおよび脳内疲労マーカーを測定することによって疲労度を定量化(疲労の有無)および定量化(疲労の程度)し、脳細胞のどんな遺伝子群が疲労に関与し、どのような情報伝達系が関与しているか、脳科学的に肉体的疲労や精神的疲労の意義を探り、健常人やアスリートの体調維持や健康管理に対してスポーツ科学的に、また国民の健康維持、過労に陥らない就労管理に対して健康科学的に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

本科研費の研究課題の実施 1~2 年目は実験動物を用いて肉体的疲労及び精神的疲労の条件、そして尿中疲労マーカーとして活性酸素の一種である過酸化水素について検討した。最終年度(平成 24 年度以降)は、水浸拘束による精神的疲労群に対してラット間脳の全遺伝子発現の変動パターンが解析可能な網羅的 DNA マイクロアレイ法に代えて、mRNA-Seq を用いること(その意義については後述)により脳の疲労マーカーの発現や疲労に関わる遺伝子群を解析する。

(1) 実験動物

7 週令雄ウィスターラットを購入後一週間目に肉体的疲労と精神的疲労を負荷した。

(2) 肉体的ストレス負荷による肉体的疲労

肉体疲労の条件としてはLacerdaらの方法によってラットにトレッドミルシステム TMS (メルクエスト社)を使用して運動負荷した。(3)精神ストレス負荷による精神疲労
精神疲労の条件としてはJinらの方法によって水浸拘束法で精神ストレスを負荷した。

(4)疲労度測定

疲労度測定は肉体疲労及び精神疲労負荷後直ちに、飼育ケージ中で運動量測定装置(ミルテニー社製)を用いて連続測定し、コントロール(無負荷群)と比較し、相対評価した。

(5)尿中疲労マーカーの測定

①尿中疲労マーカー用サンプルの採取

尿中疲労マーカーの測定は肉体疲労及び精神疲労負荷後直ちに、12時間継続して尿を採取し、コントロール(無負荷群)から得た尿と共に -80°C に一時保存し、過酸化水素(H_2O_2)測定用サンプルとした。少なくとも保存期間中の H_2O_2 の有意な減少は認められなかった。

②尿中疲労マーカーとしての活性酸素の測定

尿中疲労マーカーとして活性酸素の一種である過酸化水素をLuminol 蛍光法で測定した。(6)脳内疲労マーカーとしての c-Fos 遺伝子発現産物の測定

上記の精神疲労負荷後に、ラット間脳から Isogen (WAKO) を使用して total RNA を抽出し、脳内疲労マーカーの一つとされる最初期発現遺伝子 c-fos 遺伝子断片をプローブとして real time PCR を実施した。

(7)次世代シーケンサー (NGS) を用いたデジタル発現解析 (mRNA-Seq)

①mRNA-Seq 用 total RNA の調製

前項と同様に精神疲労負荷後、ラットを RNase 阻害剤 RNA later 及びリン酸緩衝液を含む生理食塩水でかん流後に間脳を摘出した。Isogen を使用して間脳を可溶化し、直ちに液体窒素中で保存した。得られた RNA の品質を確認するために Bioanalyzer で RIN 値を測定し、脳内疲労用マーカー c-fos 或いは疲労に関わる遺伝子の発現の定量する目的で、RIN 値の高い値を持つサンプルのみを mRNA-Seq のサンプルとした。

(8)動物実験倫理

尚、本研究課題は本学スポーツ・健康科学部及びスポーツ・健康科学研究科動物実験委員会によって承認後に実施された(承認番号: SHA10-0003)。

4. 研究成果

(1)肉体疲労及び精神疲労負荷後の疲労度測定

肉体ストレス負荷では明らかに疲労が認められたが30分後にはコントロール(無負荷群)と同じレベルまで運動量が回復した(図1)が、精神ストレス負荷では運動量の回復が遅く、12時間後で

も半分程度の疲労回復(図2)しか見られず、肉体ストレス負荷でも精神ストレス負荷でも、運動量に影響を与える疲労状態が観察された。

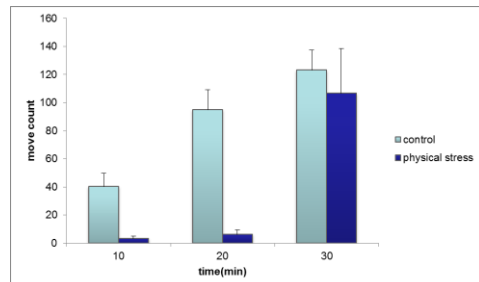


図1 肉体疲労時の運動量の測定

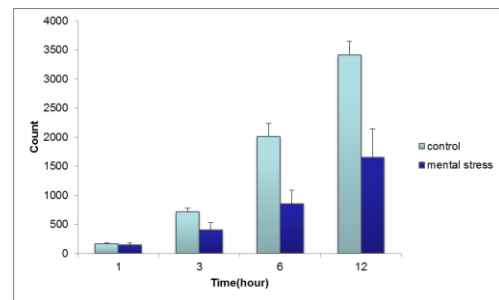


図2 精神疲労時の運動量測定

(2)肉体疲労及び精神疲労時の尿中過酸化水素の測定

肉体ストレス或いは精神ストレス負荷後、直ちに尿を採取し、 -80°C に一時保存した尿サンプル中の過酸化水素(H_2O_2)を測定した。肉体疲労後の尿中 H_2O_2 は対照ラットの約9倍観察された(図3)が、精神疲労時では尿中 H_2O_2 は有意な差が観察されなかった(図4)。今後、更に検討を進めていきたい。

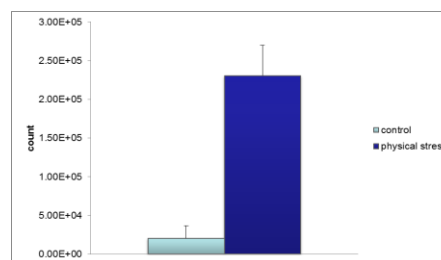


図3 精神疲労負荷時の尿中過酸化水素の測定

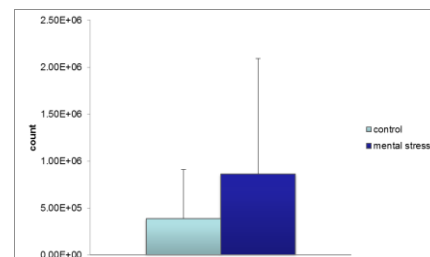


図4 精神疲労負荷時の尿中過酸化水素の測定

(3)脳内疲労マーカーとしての c-fos 遺伝子の発現

精神ストレス負荷後、ストレスの様々な生体反応を引き起こす視床下部を含む間脳を摘出し、最初期遺伝子のうち特に発現動態が示されている c-Fos 遺伝子を疲労マーカーの一つとして、その発現を real time PCR によって測定した所、コントロールの約 9 倍発現が増加していた。

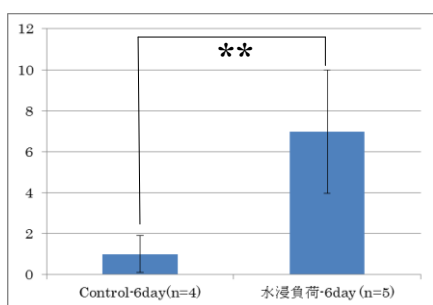


図5 精神疲労時の脳内疲労マーカーの測定

精神疲労負荷後の c-Fos 遺伝子の発現 (コントロール 6 日 と水浸負荷 6 日の t-test 検定、**p<0.01)

(4)疲労に関わる遺伝子の発現解析

精神ストレス負荷群 (N=5) 及び未負荷群 (N=5) について、合計 10 個体の間脳の total RNA について、RNA 品質の評価を行った。その結果、BGIJapan 社への冷凍輸送後の total RNA の 10 サンプル全てにおいて、RNA 品質評価値 (RIN: RNA integration number) が 8 を上回った (表 I)。特に、精神疲労の未負荷群においては、RIN 値のみならず、量的にも mRNA-Seq 解析に必要な十分なサンプルが得られた。精神ストレス負荷群については、全てのサンプルにおいて RIN 値は高いものの、M3~5 及び 8 のサンプルは 5s のピークがみられた。これは、RNA 分解による分解産物の可能性が考えられる。従って、精神ストレス負荷群のサンプルは、M2 および M7 を採用とした。以上の結果に基づいて、現在は、精神ストレス負荷と未負荷群のそれぞれ 2 サンプルについて RNA Sequencing を BGI 社に依頼し進行中である。

No.	Sample Name	Sample Number	Tube No.	Concentration (ng/μl)	Volume (μl)	Total Mass (ng)	RIN	28S/18S	Library Type	Test Result	Remark
1	C-1	ICR000001	1	856	20	1712	9.9	1.8	RNA-Seq Quantification	Level A	
2	C-2	ICR000002	1	840	20	1618	9.6	1.6	RNA-Seq Quantification	Level A	
3	C-3	ICR000003	1	1224	20	2448	9.6	1.6	RNA-Seq Quantification	Level A	
4	C-5	ICR000005	1	906	20	1812	9.7	1.6	RNA-Seq Quantification	Level A	
5	C-6	ICR000006	1	1055	10	1055	9.6	1.6	RNA-Seq Quantification	Level A	
6	M-2	ICR000007	1	440	40	1760	9.8	1.6	RNA-Seq Quantification	Level A	
7	M-3	ICR000008	1	346	19	6574	9.3	1.1	RNA-Seq Quantification	Level C	5S is little high
8	M-4	ICR000009	1	870	36	3132	9.3	1.3	RNA-Seq Quantification	Level C	5S is little high
9	M-5	ICR000010	1	524	25	1310	9.2	1.2	RNA-Seq Quantification	Level C	5S is little high
10	M-7	ICR000011	1	715	32	2288	9.6	1.1	RNA-Seq Quantification	Level A	
11	M-8	ICR000012	1	790	36	2844	9.3	1.3	RNA-Seq Quantification	Level C	5S is little high

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 1 件)

- ① Oshiro, S., Morioka M.S., Iwasawa, Y., Ueda, Y., Ren, J., Yanase, S., Takayama, N. Relation between Physical and Mental Fatigue in Urine Biomarker, Hydrogen Peroxide., J Neurochem (Supple.), 118, 239-240, 2011, 査読無

[学会発表] (計 5 件)

- ① Oshiro, S. et al., Gene expressions related to physical and mental fatigue, 第 86 回日本生化学会、2013 年 9 月 11~13 日 (発表確定)、パシフィコ横浜
- ② Iwasawa, Y. Oshiro, S. Yanase, S. Takayama, S. Morioka, K. Measurement of Biomarkers for Physical and Mental Fatigue in Animal Model (第 54 回日本神経化学会)、2011 年 9 月 26 日、山代温泉 (石川県)
- ③ Oshiro, S. et al., Relation between Physical and Mental Fatigue in Urine Biomarker, Hydrogen Peroxide (The 22nd Biennial Meeting of the International of Society for Neurochemistry (ISN) /Asia-Pacific Society for Neurochemistry (APSN) of Joint Meeting)、2011 年 8 月 アテネ (ギリシャ)
- ④ 大城 聡, 森岡勝樹, 高山成伸, 築瀬澄乃, 「尿中および脳内疲労マーカーを用いた肉体疲労および精神疲労の評価」(日本神経化学会・日本神経科学会合同学会)、2010 年 9 月 4 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県)
- ⑤ 吉越千夏、須賀直博、上田耕久、任 静、岩沢勇也、漆原綾香、下川美奈、米川駿、玉置潤、吉田亜希子、中島昌哉、蕪木智子、小林新、大城 聡、「尿中活性酸素の日内変動」、第 33 回日本分子生物学会年回・第 83 回日本生化学大会合同学会)、2010 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大城 聡 (OSHIRO SATORU)

大東文化大学・スポーツ・健康科学部・教授
研究者番号：30160485

(2) 研究分担者

高山 成伸 (TAKAYAMA SHIGENOBU)

大東文化大学・スポーツ・健康科学部・教授
研究者番号：50407657

築瀬 澄乃 (YANASE SUMINO)
大東文化大学・スポーツ・健康科学部・准教授
研究者番号：90249061

森岡 勝樹 (MORIOKA MASAKI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30351589

(3)研究協力者

岩沢 勇也 (IWASAWA YUYA)
大東文化大学・スポーツ・健康科学研究科・大学院生

菅澤 威仁 (SUGASAWA TAKEHITO)
大東文化大学・スポーツ・健康科学研究科・大学院生

西山 伸夫 (NISHIYAMA NOBUO)
大東文化大学・スポーツ・健康科学研究科・大学院生

上田 耕久 (UEDA YASUHISA)
大東文化大学・スポーツ・健康科学研究科・大学院生

任 静 (REN JING)
大東文化大学・スポーツ・健康科学研究科・大学院生

澁谷 巧 (SHIBUYA TAKUMI)
大東文化大学・スポーツ・健康科学研究科・大学院生

吉越 千夏 (YOSHIKOSHI CHINATSU)
大東文化大学・スポーツ・健康科学研究科・大学院生

須賀 直博 (SUGA NAOHIRO)
大東文化大学・スポーツ・健康科学研究科・大学院生