

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 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650072

研究課題名（和文）社会的・環境的慢性ストレスによる神経・内分泌・免疫系破綻のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms underlying a failure of Neuro-Endocrine-Immune system by chronic stress.

研究代表者

木山 博資 (KIYAMA HIROSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00192021

研究成果の概要（和文）：

慢性的なストレスにより生体に生じる器質的・生化学的変化について慢性ストレスモデル動物を用いて検討した。慢性ストレスモデル動物の下垂体を用いて DNA マイクロアレーを行なったところ、多くの遺伝子変化が観察された。そのうち多くの遺伝子は視床下部により制御されていることが明らかになった。さらに新たに下垂体前葉では成長因子産生細胞の著しい萎縮と分裂増殖の停止が確認された。慢性ストレスは視床下部を起点に下垂体に顕著な影響を及ぼし、さらに多くの末梢臓器に影響を及ぼしている可能性が示された。また、本モデル動物では視床下部のみならず辺縁系の多くの神経細胞の活性化も確認され、脳内の慢性ストレス回路の存在が示唆された。本モデル動物で得られた結果である α MSH の血中の上昇は、ヒトの慢性疲労症候群の罹病 5 年以内の患者でも確認された。本モデルの妥当性を示す成果と考えられ、本モデルをツールとした科学的慢性ストレス研究に新たな道が開かれた。

研究成果の概要（英文）：

Stress is a common aspect of modern life and plays a role in the etiology of many diseases such as chronic fatigue syndrome (CFS) and fibromyalgia (FM). In this research project we attempted to analyze disorders of Neuro-Endocrine-Immune associated organs from molecular and morphological basis. We identified many changes in expression of molecules in pituitary gland and intriguingly most of expressions were elicited by hypothalamic changes such as alterations of expression of releasing hormones. This suggests that changes of neuronal activity and molecular expressions in hypothalamus due to a prolonged stress could affect neuroendocrine system as well as autonomic system, which lead to a failure of integrity of Neuro-Endocrine-Immune systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：解剖学・下垂体・疲労・ストレス・内分泌・自律神経

1. 研究開始当初の背景

社会や環境が作り出す慢性的な社会的環境的ストレスに対して、個体を防御し健康を維持する仕組みは、恒常性の維持と呼ばれ、神経・内分泌・免疫系がその中核をなす。これらの系が正常に機能するかぎり個体は健全性を保つ事ができる。しかし、社会や環境が複雑になるにつれ、この防御システムの破綻が広がりつつあるのが現代社会である。過労やストレスは脳が感じ取り、その結果として発熱や炎症、精神症状など多様な症状が全身に現れる。このような複雑な慢性的ストレスが、恒常性の維持機構にどのような影響を与えているのか、生物学的にそのメカニズムを理解することは、現代社会にとって喫緊の課題である。このような背景のもと、私たちはストレスや疲労の研究を推進するにあたり、新たなモデル動物の必要性を痛感した。ヒトが過労感を覚えるのは、意識の集中状態が長時間にわたり継続する長時間労働の時である。長時間労働は睡眠を欠乏させ、かつ生体リズムを混乱させる。加えてこの間、高いノルマ達成など精神的なストレスが継続すると考えられる。精神的なストレス・睡眠不足・生体リズムの乱れ、これらが慢性的に続く状態のモデル動物の開発が、大阪市立大学の21世紀COEプロジェクトのもと行なわれ、比較的ヒトの慢性疲労症候群に近い慢性疲労モデルラットが提唱された。この慢性ストレスモデルを用いて、過労時に脳をはじめ末梢臓器で、遺伝子発現の変化や組織形態の変化を検討してみると、慢性のストレス刺激に対して脳や下垂体で多くの遺伝子が発現変化を示すことがわかった (Ogawa et al, *J Neurochem* 2005)。また、慢性的なストレス負荷をかけたラットの下垂体を電子顕微鏡にて観察した所、下垂体中間葉においてメラノトロフの過活動による細胞死が起きていることを発見し、この細胞死は視床下部からの異常シグナルによることが明らかになった (Ogawa et al, *J Neurochem* 2009)。このように慢性ストレス下で生じる細胞死などの器質の変化や分子発現の変化がモデル動物で示すことが可能になり、今後慢性ストレス研究を推進するためのツールや環境が整いつつあった。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究は科学的な立証が難しく、しかしその解明が社会的にきわめて強く望まれている疲労や慢性ストレスの分野に、生物学的・基礎医学の見地から挑戦するものである。再現性の良い複合慢性ストレスモデルとして確立されたラットモデルを用い、慢性的ストレス下での神経・内分泌・免疫系からなる恒常性維持のシステムが、どのように破綻してゆくかを分子レベ

ルや細胞レベルから検討することをめざした。また、慢性的ストレス負荷情報が脳内のどのような場所で統合・解析され、視床下部から内分泌系や自律神経系へと送られるか、慢性ストレスの神経回路の解明と他の系へのリレーシステムの解明もめざした。

3. 研究の方法

本実験はすべて大阪市立大学医学研究科 (平成22年度) および名古屋大学大学院医学系研究科 (平成23年度) 内で行われ、動物実験に関しては大阪市立大学及び名古屋大学医学系研究科の動物実験にかかる承認を得、すべて動物実験の指針に基づいて行われた。本研究は遺伝子組換え実験と実験動物の使用、放射性物質の取り扱いを行う。これらの実験についても、実験計画等の機関承認をすべて受けている。また、動物や放射性物質の取り扱いに必要な講習会などについても、研究代表をはじめ参画する連携研究員や大学院生は適切に受講した。ヒト血液検体を用いた研究は大阪市立大学の倫理委員会の承認を得た。

本研究では以前開発された慢性ストレス負荷ラットモデル (Ogawa et al, 2005, 2009) を用い1~5日間のストレス負荷を行なった。ストレス負荷とコントロールの健常動物から各種の臓器を取り出し mRNA 発現や蛋白発現を生化学的あるいは組織学的に検索した。下垂体については、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の網羅的解析を行なった。また、大阪市立大学病院の慢性疲労外来の受診者のうち慢性疲労症候群 (CFS) と診断された患者の血漿検体を用いて、血漿中の α MSH の濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 下垂体での分子発現変化

慢性ストレス動物モデルで末梢臓器の遺伝子変化を予備実験で解析したところ、特に下垂体に多くの変化を見いだすことができた。そこで、慢性ストレス動物と健常動物の下垂体 (中間葉と後葉) を回収し DNA マイクロアレイにて遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。その結果、下垂体中間葉では疲労時に転写活性調節因子である DNA binding (Id) ファミリーの Id1~3 が発現し、これらの発現は視床下部でのドーパミン産生抑制によることが明らかになった (Konishi et al 2010)。また、同じく中間葉には再生や炎症時に発現が見られる PAP-I と PAP-II の発現が観察された (Konishi et al 2011)。PAP-I と PAP-II のいずれも視床下部のドーパミンにより負の制御を受けることが明らかになった。この他前葉の成長ホルモン産生細胞にも変化が生じていることが明らかになり、これらの原因はやはり視床下部の GHRH の変化に

よることが明らかになった (Ogawa et al 投稿中)。以上の結果は下垂体での遺伝子発現は多くが視床下部で生じた変化にตอบสนองして生じていることを示しており。ストレス応答における視床下部の重要性が示された。

(2) 前葉 somatotroph の形態・機能変化

慢性ストレス下での下垂体前葉系の細胞の変化を解析した。その結果 somatotroph の形態に異常が見られた。Somatotroph では細胞体の萎縮と成長ホルモンの分泌抑制、さらに増殖の停止が観察された。しかし、somatotroph 自体の細胞死は見られなかった。また、これらの変化は前述のように中枢視床下部の GHRH ホルモンレベルの低下によること、さらに GHRH 刺激により ERK のリン酸化や核内移行が生じないことも明らかになった (Ogawa et al 投稿中)。

(3) 脳内の慢性ストレス関連回路

下垂体は視床下部から強い制御を受けており、視床下部の神経細胞が慢性ストレスにตอบสนองしていると考えられたので、どのような神経細胞に変化が生じているのかを、神経細胞の活性化の一部指標となる c-Fos などの転写因子をマーカーに検討した。慢性ストレスラットの視床下部では外側領域を中心に c-Fos 発現が見られた。この他梨状葉や帯状回などの辺縁系の一部にも多くの c-Fos 発現が観察された。このことは、慢性ストレス動物では、視床下部のみならず辺縁系などの領域の神経細胞の活性化も生じていることを示している。これらの領域での c-Fos 発現変化がどのような刺激により生じるのか、あるいはどのような神経回路のなかに位置づけられるのかは今後の課題である。

(4) 免疫系臓器の変化

下垂体の下流に位置する末梢の内分泌臓器のうち副腎皮質がやや肥大傾向が見られたが、有意差は得られなかった。免疫系臓器の胸腺では明らかな萎縮が、脾臓でも萎縮傾向が見られた。免疫系では炎症応答性が慢性ストレスによりどのように変化するかについても LPS 刺激を用いて検討した。その結果、免疫応答の TNF α などの発現増加慢性ストレスラットでは見られないことが明らかになった。以上の結果から、本モデル動物では内分泌系と免疫系の器質的異常と機能的異常が生じていることが確認された。今後、慢性ストレスや疲労を研究してゆく上で有効なツールであると考えられる。

(5) 慢性ストレスモデルとヒト CFS との関連性

本研究で用いた実験動物モデルの妥当性を証明するために、動物モデルで得られた疲労マーカーの α MSH の濃度を慢性疲労の患者で計測した。その結果、罹病5年以内の慢性疲労の患者では α MSH が有意に上昇していることを同定した (Shishioh-Ikejima et al,

2010)。このことは、我々が用いている慢性疲労モデル動物の有用性を示唆するものである。

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4件) 全て査読有り

- ① Konishi H, Ogawa T, Kawahara S, Matsumoto S, Kiyama H (2011) Continuous stress-induced dopamine dysregulation augments PAP-I and PAP-II expression in melanotrophs of the pituitary gland Biochem Biophys Res Commun 407(1):7-12
- ② Konishi H, Ogawa T, Nakagomi S, Inoue K, Tohyama M, Kiyama H (2010) Id1, Id2 and Id3 are induced in rat melanotrophs of the pituitary gland by dopamine suppression under continuous stress, Neuroscience 169: 1527-1534
- ③ Shishioh-Ikejima N, Ogawa T, Yamaguti K, Watanabe Y, Kuratsune H, Kiyama H (2010) The increase of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the plasma of chronic fatigue syndrome patients, BMC Neurology 10:73
- ④ Maekawa C, Kitahara T, Kizawa K, Okazaki S, Kamakura T, Horii A, Imai T, Doi K, Inohara H, Kiyama H (2010) Expression and Translocation of Aquaporin-2 in the Endolymphatic Sac in Patients with Meniere's Disease. J Neuroendocrinol 22(11):1157-1164.

[学会発表] (計12件)

- ① 小川登紀子, 木山博資, 持続的ストレス負荷による下垂体の形態変化と機能変調 (シンポジウム: 細胞外シグナルと下垂体細胞の発達、機能発現への形態的アプローチ)、第117回日本解剖学会、2012年3月26日~28日、山梨大学甲府キャンパス、甲府
- ② 小川登紀子, 木山博資, 持続的ストレスラットにおける下垂体ホメオスタシスの破綻、(シンポジウム: 慢性ストレスとホメオスタシスの破綻)、第64回日本自律神経学会総会、2011年10月27日~28日、秋田ビューホテル、秋田
- ③ 木山博資, 小川登紀子, 小西博之, 慢性ストレスによる下垂体の破綻、第71回日本解剖学会中部支部学術集会、平成23年10月15~16日、名古屋大学、名古屋
- ④ 木山博資, 慢性ストレスが引き起こす細胞の過労死、第21回名古屋大学博物館企画展 (一般市民向け講演)、2011年10月4日、

名古屋大学博物館、名古屋

- ⑤ 木山博資、ストレスによる恒常性破綻研究と神経再生研究、第13回 ORIGIN 神経科学研究会 夏のワークショップ 2011、2011年8月20～21日、ホテル竹園、芦屋
- ⑥ 木山博資、小川登紀子、小西博之、慢性ストレスによる脳を起点とした内分泌系破綻のメカニズム。(シンポジウム：疲労・慢性疲労のメカニズム) 第7回日本疲労学会総会・学術集会、2011年5月21日～22日、名古屋大学、名古屋
- ⑦ 小川登紀子、池島(獅子王)信江、小西博之、桐生-瀬尾寿美子、木山博資、持続的ストレスラットでは GHRH 刺激によるソマトトロフ増殖が阻害される。第116回日本解剖学会総会・全国集会合同大会、2011年3月28日～3月30日 パシフィコ横浜、横浜
- ⑧ 木山博資、疲労の分子基盤の解析、旭川医大セミナー、平成23年1月31日、旭川医大、旭川
- ⑨ 木山博資、疲労やストレスを基礎医学の目で研究する、高校生対象、第3回ライフサイエンスセミナー(研究者と語ろう)、2010年7月30日、千里ライフサイエンスセンター、大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木山 博資 (KIYAMA HIROSHI)

研究者番号：00192021

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小川 登紀子 (OGAWA TOKIKO)

(H22)

研究者番号：30382229