

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893252

研究課題名(和文) 分子バイオマーカー検索に基づいた疲労の分子機構の解明とうつ病発症への影響の解析

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of fatigue that are based on searching for molecular biomarkers.

研究代表者

岡 直美 (OKA, Naomi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00704503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：過重労働のストレスによるうつ病や自殺につながる「疲労」のメカニズムの解明は重要であると考えられている。しかし、疲労の原因物質が同定されていないため分子機構は不明な点が多い。本研究では、疲労の原因となる分子(疲労因子)の候補を検索し、マウスへの導入実験により疲労との関連を検証することを目的とした。当研究により、疲労因子Aおよび疲労回復因子X, Yを特定した。興味深いことに、運動疲労と運動を伴わない疲労を比較した結果、両方で疲労因子Aの活性に有意な差が観察され、運動を伴わない疲労は疲労因子Aの活性が持続していた。これは、疲労回復因子Xの発現メカニズムが2種類の疲労で異なることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Recently, Depressive disorder and suicide induced by fatigue has become major social problems. However, the molecular mechanisms that underlie fatigue remain unclear, because it has not identified fatigue factors. In previous study, we found latent human herpes virus 6 (HHV-6) was reactivated by social stress and fatigue. Furthermore, we identified Fatigue Factor (FF) cause HHV-6 reactivation. To find the candidate molecules that cause fatigue, we performed in vivo transfection in mice and observed these mice cause fatigue. In this study, we identified Fatigue Factor A (FF-A), Fatigue recovery factor X (FR-X), and Y (FR-Y). Interestingly, clear differences were observed in the activation of FF-A when we challenged fatigue with or without exercise in mice. The activation of FF-A were maintained in fatigue without exercise, whereas were not maintained in fatigue with exercise. These results suggested that expression mechanisms of FR-X were different in the two types of fatigue.

研究分野：ウイルス学

キーワード：疲労 ストレス うつ病 ウイルス 精神神経科学 精神薬理学 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

近年、過重労働やストレスの蓄積による疲労が、うつ病などの精神疾患を誘発し、自殺の一因となっていることが問題視されている。「疲労」という現象は、「過重労働やストレスの蓄積による肉体や精神の機能低下(心身の疲労)」と「末梢性の疲労を脳が認識する感覚(疲労感)」の2つの要素からなる。心身の疲労は、労働効率の低下をもたらすだけでなく、うつ病などの精神疾患や心血管、脳血管障害の危険因子にもなる。しかし、過重労働やストレスが心身の疲労を生じるメカニズムは未だ明らかとなっておらず、精神疾患や血管障害を誘導する分子機構も不明である。

国内外、特に欧米諸国では、主として慢性疲労症候群(CFS)患者を対象に、疲労メカニズムの解明が試みられている。しかし、CFSは感染によって引き起こされる「易疲労感」が主体の疾患であるため、ストレスや過重労働による「心身の疲労」とは異なる現象である。一方で、疲労に伴う遺伝子発現の網羅的研究も成されているが、変動する遺伝子が多過ぎるため、疲労特異的な因子は見出されていない。このため、現在までに、疲労と免疫、炎症、および酸化ストレスといった各種バイオマーカーとの関係が指摘されるが、心身の疲労の機構解明には至っていない。

2. 研究の目的

申請者が所属する東京慈恵会医科大学・ウイルス学講座では、文部科学省・疲労研究班(代表: 渡辺恭良)と厚生労働省・疲労研究班(代表: 倉恒弘彦)に参加することで、以下の知見を得てきた。

- (1) 過重労働では、労働時間に相関して唾液中に再活性化するヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)とHHV-7の量が増加する。
- (2) 対照的に疲労感の強いCFS患者の唾液中のHHV-6、7量は、増加せず、HHV-6、7の再活性化が心身の疲労のバイオマーカーとなることが示唆された。

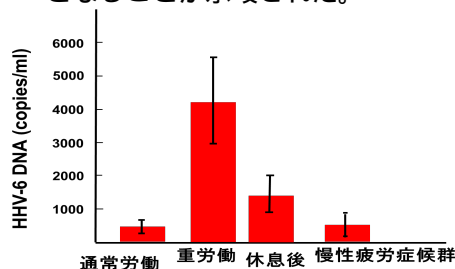


図1: HHV-6の各種労働負荷による再活性化誘導

HHV-6再活性化量は、唾液中のウイルスDNA量で定量した。

- (3) HHV-6の再活性化を誘導する因子を見出し、これが疲労のシグナル伝達と関係す

る有用なバイオマーカー(疲労因子:FF)となることを見出した。

所属研究室のこれまでの研究成果である、心身の疲労とHHV-6、HHV-7の再活性化との関係や、疲労因子(FF)の発見を手がかりに、疲労の原因となる分子(疲労関連分子)の同定や、シグナル伝達機構を中心とした分子機構を明らかにする。さらに、疲労関連分子の長期発現の脳機能への影響、特に、うつ病との関係を動物モデルで検証し、疲労関連分子の発現異常をうつ病患者で検証することで、疲労とうつ病との関係を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

うつ病のrisk factorとなり得る疲労関連分子を同定するために以下の順で検索を行う。

- (1) 疲労で再活性化するHHV-6の、再活性化を誘導する分子を、in vitroのHHV-6潜伏感染系を用いて検索し、これを疲労関連分子の候補とする。
- (2) 過重労働の負荷によって、疲労関連分子候補mRNAがマウスの末梢臓器で増加することを確認し、候補を絞り込む。
- (3) 疲労関連分子候補をマウスに導入し、マウスにおける疲労誘導を検討し、候補分子が疲労関連分子であることを確認する。
- (4) 得られた疲労関連分子をマウスに長期発現させ、脳機能や行動実験によって、うつ病の誘導に関係するかどうかを検討する。
- (5) さらに、うつ病患者末梢血DNAにおいて得られた疲労関連分子のSingle Nucleotide Polymorphism (SNPs)やエピジェネティックな修飾を検討することで、ヒトにおける過重労働とうつ病の関連のバイオマーカーとなり得るかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) 疲労関連分子の候補の抽出

これまでの研究の結果、HHV-6、HHV-7の再活性化に関与する疲労因子(FF)が特定されている。そこで、疲労やストレスなどの分野にかかわらず、様々な分野の報告を調査し、疲労因子(FF)の周囲のシグナル伝達経路の仮説を導き出した(図2)。この仮説経路に含まれる疲労因子A、B、C、疲労回復因子X、Y、および炎症性サイトカインをマウスの疲労負荷試験を通して特定し、その機能の解明を行った。

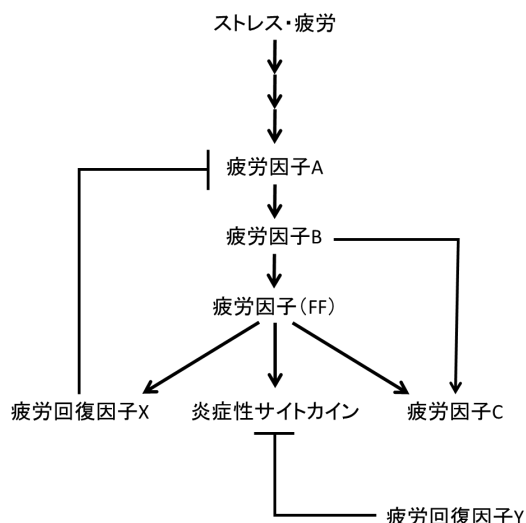


図 2：疲労因子 (FF) のシグナル伝達経路の仮説

(2) マウスの疲労負荷試験

図 2 で示したシグナル伝達経路が機能しているかを検討するために、マウスに疲労を負荷した。私たちが社会生活を営む上で感じる疲労には「運動疲労」と「運動を伴わない疲労」の 2 種類が存在していることから、マウスへの疲労負荷も 2 種類の疲労負荷を与えることにした。「運動疲労」を負荷させるために強制水泳試験を行い、「運動を伴わない疲労」を負荷させるために不眠試験を行った。

運動疲労の負荷 (強制水泳試験)

6 週齢の C57BL/6 雄マウスを用いて、下記要領で強制水泳 (FS) 試験を実施した。

直径 300mm のバケツにマウスの尻尾が底に着かない深さになるよう 24±1 の水を入れ、マウスを中央に投入し、0, 0.5, 1, 2 時間の強制水泳を実施した。強制水泳終了後は速やかに臓器を摘出し、各種臓器の RNA を抽出し、目的因子の遺伝子発現を real-time PCR 法で測定した。

その結果、脳、肝臓、心臓、および血液で疲労因子 FF の遺伝子発現は FS 0.5 時間から有意に増加していた。しかし、疲労因子 FF の下流に存在する疲労因子 C の遺伝子発現は FS 試験では上昇しなかったことから、運動疲労の負荷で機能する疲労シグナル伝達経路に疲労因子 C は関与しないことが示唆された。もう一方の疲労因子 FF の下流に存在する疲労回復因子 X の遺伝子発現は疲労因子 FF と同様に FS 0.5 時間から有意に増加していた。疲労因子 FF が発現を誘導する炎症性サイトカインの遺伝子発現は肝臓および心臓で上昇しており、炎症性サイトカインの発現を抑制する疲労回復因子 Y も同臓器で速やかに遺伝子発現が誘導されていた。

疲労因子 FF の上流に存在する疲労因子 A はリン酸化されることで活性化するタンパク質である。そこで、Western Blot 法により疲労因子 A のリン酸化を解析した結果、FS

0.5 時間以降疲労因子 A のリン酸化は抑制されていた。

従って、FS 試験のような運動疲労の負荷は疲労回復因子 X を強く誘導し、疲労因子 A の活性化を抑制していると考えられる。私たちも経験上、疲労を感じていても運動を行うことにより、疲労回復が早くなることを知っているが、そのメカニズムの一部を示唆している可能性が考えられる。

運動を伴わない疲労の負荷 (不眠試験)

6 週齢の C57BL/6 雄マウスを用いて、下記要領で不眠負荷試験を実施した。

W140×D320×H140 mm のマウス飼育ケージから床敷きを除去し、250ml の水を加え、0, 2, 4, 8, 24, 36 時間飼育した。不眠試験であるため、水を加えて飼育する時間は電灯を点けている時間に合わせた。不眠試験終了後は速やかに臓器を摘出し、各種臓器の RNA を抽出し、目的因子の遺伝子発現を real-time PCR 法で測定した。

その結果、肝臓および心臓で疲労因子 FF の遺伝子発現が誘導されていた。肝臓においては不眠 8 時間以降で疲労因子 FF の発現が上昇しており、心臓においては 2 時間以降で発現上昇していた。さらに、運動疲労負荷と同様に疲労因子 C の遺伝子発現は不眠負荷試験でも上昇しなかったことから、運動疲労と運動を伴わない疲労の両方において疲労因子 C は機能しないことが示唆された。疲労回復因子 X の遺伝子発現は疲労因子 FF と同様に増加していたものの、運動疲労負荷の半分以下の増加にとどまっていた。疲労因子 FF が発現を誘導する炎症性サイトカインの遺伝子発現は殆ど上昇していなかったが、炎症性サイトカインの発現を抑制する疲労回復因子 Y の遺伝子発現は不眠負荷により上昇していた。

Western Blot 法により疲労因子 A のリン酸化を解析した結果、不眠負荷 8 時間までは疲労因子 A のリン酸化が上昇していた。

従って、不眠負荷試験のような運動を伴わない疲労は疲労回復因子 X の誘導が弱いため、疲労因子 A の活性化を十分に抑制することができず、疲労が蓄積していると考えられる。

(3) 疲労関連分子のマウス in vivo トランスフェクション

これまでの研究結果から、運動疲労と運動を伴わない疲労において図 2 の疲労因子 C 以外の因子が機能していることが示された。そこで、これらの因子をマウスに in vivo トランスフェクションすることで、マウスが疲労するかを検討した。

疲労因子 FF の in vivo トランスフェクション

TransIT-QR Hydrodynamic Delivery System (TaKaRa Bio) を用いて疲労因子 FF 発現ベクタープラスミドを尾静脈に注入すること

で6週齢のC57BL/6雄マウスの肝臓に疲労因子FFを一過性過剰発現させ、0, 4, 8, 16時間後に10分間のオープンフィールド試験を実施して自発運動量を測定した。オープンフィールド試験後は速やかに臓器を摘出し、各種臓器のRNAを抽出し、目的因子の遺伝子発現をreal-time PCR法で測定した。

オープンフィールド行動試験を解析した結果、尾静脈注射後4~8時間で自発運動量の低下が観察され、16時間後には自発運動量が回復していた。これは、疲労因子FFが発現することで下流の疲労回復因子Xの発現が誘導されたため、自発運動量が回復したと考えられる。

さらに遺伝子発現を解析した結果、肝臓において内在性疲労因子FFの発現が上昇していたことから、疲労因子FFの発現はポジティブフィードバック経路が存在していると考えられる。また、疲労因子X, 炎症性サイトカイン, および疲労回復因子Yの発現も上昇していたことから、図2で示した経路が機能していることが示唆された。但し、これまでの疲労負荷試験と同様に疲労因子Cの発現上昇は観察されなかった。

以上の結果から、疲労因子FFはマウスの自発運動の低下を引き起こしたことから、疲労に直接関与する因子であることが示された。さらに、本研究で特定した疲労因子A, 疲労回復因子X, Y, および炎症性サイトカインが疲労シグナル伝達経路として機能することが示唆された。

ここまでの研究結果から、疲労因子FFを中心とした疲労シグナル伝達経路を明らかにすることができた。しかし、「運動疲労」と「運動を伴わない疲労」で疲労回復因子の制御メカニズムが異なることが示唆されており、そのメカニズムは未だ不明である。また、疲労因子FF以外の因子の更なる機能解析を今回実施することができなかった。今後はこれらの不明点を明らかにするために、疲労因子Aのリン酸化阻害剤や脱リン酸化阻害剤がマウスに与える影響の解析や、疲労回復因子X, Y および炎症性サイトカインのマウスin vivoトランスフェクションによる一過性過剰発現がマウスに与える影響の解析を行う必要がある。

しかし、今日まで不明とされていた疲労メカニズムの一端を本研究で示唆することができ、尚且つ経験的に知られている「運動による疲労回復」と一致するデータが得られたことは非常に興味深い。今回示した疲労伝達経路が恒常的に活性化することで、うつ病といった精神疾患に関与する可能性も今後検討すべき課題である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 小林伸行, 岡直美, 嶋田和也, 近藤一博. 「唾液中ヒトヘルペスウイルス(HHV-)6, 7による客観的疲労評価に関する検討」第130回成医会総会、2013年10月10日、東京
- (2) 小林伸行, 岡直美, 嶋田和也, 近藤一博. 「アルツハイマー型認知症の前駆段階において単純ヘルペスウイルス1型再活性化が発症に与える影響」第61回日本ウイルス学会、2013年11月10日、神戸
- (3) 小林伸行, 岡直美, 嶋田和也, 近藤一博. 「唾液中ヒトヘルペスウイルス量変化を利用した客観的疲労評価法による、生理的疲労と慢性疲労症候群との鑑別」第10回日本疲労学会総会、2014年5月31日、大阪
- (4) 岡直美, 小林伸行, 嶋田和也, 倉恒弘彦, 杉野友啓, 梶本修身, 近藤一博. 「疲労によるヒトヘルペスウイルス再活性化の分子メカニズムの解明」第10回日本疲労学会総会、2014年5月31日、大阪
- (5) Oka N, Kobayashi N, Shimada K and Kondo K. 「Molecular mechanism of depressive disorder caused by HHV-6 latent infection」International Herpesvirus Workshop 2014, July 19, 2014, Kobe
- (6) Kobayashi N, Oka N, Shimada K, Kondo K. 「Molecular mechanism of depressive disorder caused by HHV-6 latent infection」International Herpesvirus Workshop 2014, July 19, 2014, Kobe
- (7) 岡直美, 小林伸行, 嶋田和也, 近藤一博. 「唾液中に分泌されたHHV-6がうつ病を発症させるメカニズムの解明」第131回成医会総会、2013年10月9日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡直美 (OKA, Naomi)

東京慈恵会医科大学・医学部・ウイルス学講座・助教

研究者番号：00704503