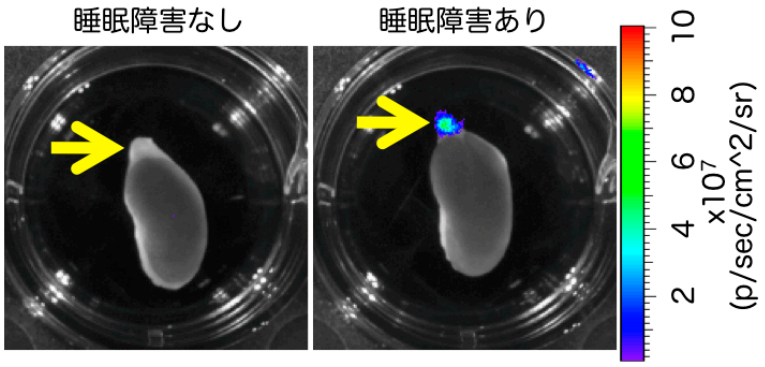
4　細胞ストレス応答の解析から迫る疲労メカニズム	岩脇　隆夫

【目的】「疲労」は「発熱」や「痛み」と共に生体 3 大アラームと言われ、私たちの生命や健康を維持する上でカラダが発する重要なシグナルである。しかしその研究と理解は発熱や痛みに比べて遅れており、科学が進んだ現代でも疲労の実態は掴めていない。そこで本研究では疲労が生じる際や疲労が回復する際のカラダの仕組みを分子生物学および細胞生物学のレベルで解明することに目標を定めている。特に細胞ストレス応答で機能する分子や細胞の働きと疲労との関連性に着眼して研究を進めている。細胞ストレス応答や炎症反応は生体内で生じる異常からカラダを守るために生き物が有する防御反応であり、疲労と密接な関係にあっても不思議ではないと考えている。また重要なのは、この研究から明らかになることが単に基礎的な生命科学へ貢献するだけでなく、疲労が生む社会問題（健康障害から事故・自殺に至るまで）に対する解決への新たな糸口になる可能性を十分に含んでいることである。

【方法】疲労負荷の手段として睡眠障害モデルを採用した。具体的には回転カゴを利用した専用の装置でマウスを飼育して安定した睡眠を妨害した。解析対象のマウスは以下の 3 種類（ERAI-LUC マウス、OKD48-LUC マウス、および UMAI-LUC マウス）とした。睡眠障害に曝されたマウスおよび曝されなかったマウス（対照群）を生体イメージング解析にかけた。さらに同マウスから摘出した臓器から RNA を抽出して細胞ストレス応答遺伝子群の発現変化を定量的 PCR 解析にて評価した。

【結果】採用した装置による睡眠障害は概ね期待通りに機能して、マウスが本来なら寝ている時間帯にも起きていることが確認できた。生体イメージング解析では睡眠障害により副腎の小胞体ストレス応答および統合ストレス応答が活性化されることを見出すことができた。定量的 PCR 解析からは加えて酸化ストレス応答も副腎で活性化されることを確認できた。

UMAI マウスの副腎（矢印）から得られる発光シグナル



4. 細胞ストレス応答の解析から迫る疲労メカニズム

岩脇　隆夫

金沢医科大学 総合医学研究所 生命科学研究領域 細胞医学研究分野

Key words：疲労，睡眠，運動，細胞ストレス，炎症

緒　言

古くから今日に至るまで疲労研究は心療内科学、栄養学、感染学、免疫学、脳神経科学など様々な視点から行われてきた。その甲斐あって疲労を科学的に評価する方法は確立されつつあり、血中の酸化ストレス度や唾液中のヘルペスウイルス数などは疲労の指標となっている。また以前には信じられていた学説も訂正されつつある。例えば、無酸素運動時に筋肉組織中で生じる乳酸は疲労を生じさせると考えられていたが、現在では否定されている。その一方で未だに疲労の実態を理解することはできておらず、誰しもが感じる疲労の発生／回復メカニズムはあまり分かっていない。その大きな理由として疲労研究における分子および細胞生物学的な取り組みが弱いからだと考えている。前述の背景および問題を踏まえ、本研究では疲労が生じる際や疲労が回復する際のカラダの仕組みを分子生物学および細胞生物学のレベルで解明することに目標を定めている。特に細胞ストレス応答や炎症反応で機能する分子や細胞の働きと疲労との関連性に着眼して研究を進めている。細胞ストレス応答や炎症反応は生体内で生じる異常からカラダを守るために生き物が有する防御反応であり、疲労と密接な関係にあっても不思議ではない。また重要なのは、この研究から明らかになることが単に基礎的な生命科学へ貢献するだけでなく、疲労が生む社会問題（健康障害から事故・自殺に至るまで）に対する解決への新たな糸口になる可能性を十分に含んでいることである。

方　法

1. 睡眠障害モデルの作製

睡眠障害モデルの作製は市販の装置（メルクエスト社製＃SW-15-SD）を用いて行った。この装置を利用する前に予め馴化用装置（メルクエスト社製＃SW-15S）でマウスを 7 日間単独飼育して、その後 5 日間睡眠障害用装置で単独飼育した。

2. 使用マウス

自由回転型睡眠障害装置に利用されたマウスは C57BL6 を遺伝的背景とする ERAI-LUC マウス［1］、OKD48-LUC マウス［2］、および UMAI-LUC マウス［3］である。それぞれのマウスは前から順に小胞体ストレス、酸化ストレス、および統合ストレスが生じたカラダの部位でルシフェラーゼ遺伝子が発現するようになっている。そのため発光基質であるルシフェリンを体内に投与すると各ストレスを発光シグナルとして検出できる。

3. 生体イメージング解析

マウス生体を対象とした *in vivo* 解析では、発光シグナル撮影の 10 分前にマウスへルシフェリン（150 mg／体重 g）を腹腔内投与した。摘出した臓器を対象とした *ex vivo* 解析では、臓器をルシフェリン（300 mg/mL）液に浸したまま発光シグナル撮影を行った。発光シグナル撮影には IVIS（パーキンエルマー社製＃Lumina）を使用した。

4. 遺伝子発現解析

解析対象の組織片を ISOGEN（ニッポンジーン社製＃311-02501）により溶解して RNA を抽出した。その RNA から逆転写キット（インビトロジェン＃11904-018）により cDNA を作製した後、各種 Taqman プローブ（後述）を用いて定量的 PCR 解析を行った。それぞれの遺伝子について ABI 社より購入したプローブは以下の通りである（ATF3：

Mm00476033_m1、BiP : Mm00517691_m1、CHOP : Mm01135937_g1、CReP : Mm00551747_m1、GADD34 : Mm00435119_m1、GAPDH : Mm99999915_g1、NQO1 : Mm01253561_m1、HO-1 : Mm00516005_m1、SOD1 : Mm01344233_g1)。なおGAPDHは内部標準として利用された。またXBP1に対するプローブは以前に自作しており［4］、それらを利用した。

結　果

1. 睡眠障害装置内におけるマウス睡眠および覚醒状態

疲労と一口に言っても様々なものがあり、ある人は100 mを何回も走った際の疲労を想像し、別の人は人間関係がこじれた際の疲労を想像するかもしれない。しかし本研究では睡眠により解消される疲労、言い換えれば「睡眠不足が個体としての機能（パフォーマンス）低下に繋がる疲労」を対象にした。そこで睡眠障害装置によるマウスへの影響を評価した。このケージにおいてマウスは餌や水を自由に摂れるが、常に回転カゴ内で過ごすことになる。回転カゴは極めて抵抗の小さい軸で支えられており、少しでも動くと「ゆらゆら」してマウスの不眠時間が増すようになっている。ちなみにマウスを回転カゴに馴化させるために実験直前の1週間は回転カゴに出入り自由なケージで飼育しており、非睡眠障害のコントロール実験でも同じく回転カゴに出入り自由なケージを用いた。これらのケージを用いて得たマウスのアクトグラムから睡眠障害装置内のマウスは寝ているべき昼間も活動させられていることが分かった（図1）。

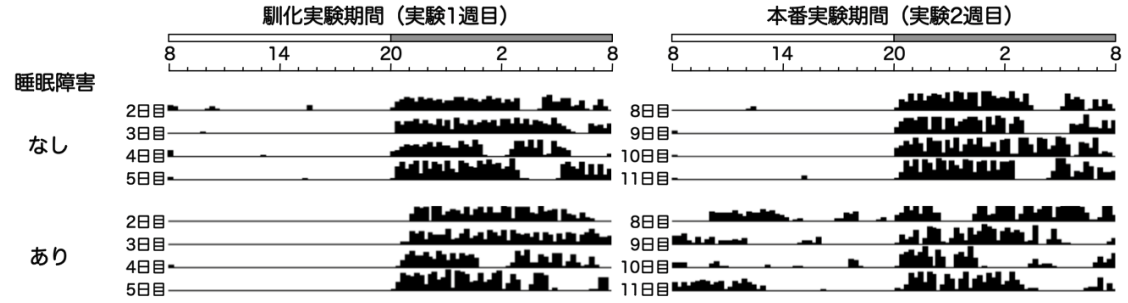


図1. 実験期間中の代表的アクトグラム
睡眠障害なしの実験では明期（8:00～20:00）に回転カゴをまわすことは殆どない。しかし一方の睡眠障害ありの実験では明期でも回転カゴをまわしている時間が顕著に増す。つまり睡眠時間の減少が伺える。

2. マウス生体イメージングから検出された睡眠障害による細胞ストレス応答の活性化

睡眠障害を受けたマウスにおいて細胞ストレス応答で生じる影響を評価するために3種類の遺伝子組換えマウス（ERAI-LUCマウス、OKD48-LUCマウス、およびUMAI-LUCマウス）を用いた。ERAIマウスは、広義的には小胞体ストレスを、狭義的にはIRE1活性をモニターするためのモデルマウスであり、それが睡眠障害でどう変化するのか？このモデルマウスを用いれば生体イメージングにより解析できる。そこで睡眠障害ありの実験となしの実験との間で生じる差を評価した。非侵襲麻酔下のマウス全身から検出される発光シグナルにおいては睡眠障害の有無で目立った差がなかった。一方で摘出した組織で発光シグナルを測定してみると、対照実験に比べて断眠実験を施したマウスの副腎では発光シグナルが12倍高かった。ただ肝臓や腎臓、筋肉、脳での発光シグナルには目立った差を見出せなかった（図2中）。

UMAIマウスは、広義的には統合ストレスを、狭義的にはATF4の翻訳レベルをモニターするためのモデルマウスであり、それが睡眠障害でどう変化するのか？ERAIマウスと同様に評価した。やはり非侵襲麻酔下のマウス全身から検出される発光シグナルにおいては睡眠障害の有無で目立った差がなかった。一方で摘出した組織で発光シグナルを測定してみると、対照実験に比べて断眠実験を施したマウスの副腎では発光シグナルが6倍高かった。ただ肝臓や腎臓、筋肉、脳での発光シグナルには目立った差を見出せなかった（図2右）。

OKD48 マウスは、広義的には酸化ストレスを、狭義的には Nrf2 の安定性および活性をモニターするためのモデルマウスであり、それが睡眠障害でどう変化するのか？ERAI マウスと同様に評価した。やはり非侵襲麻酔下のマウス全身から検出される発光シグナルにおいては極めて弱い上に睡眠障害の有無で目立った差がなかった。また摘出した組織で発光シグナルを測定してみても極めて弱い上に睡眠障害の有無で目立った差がなかった（図 2 左）。

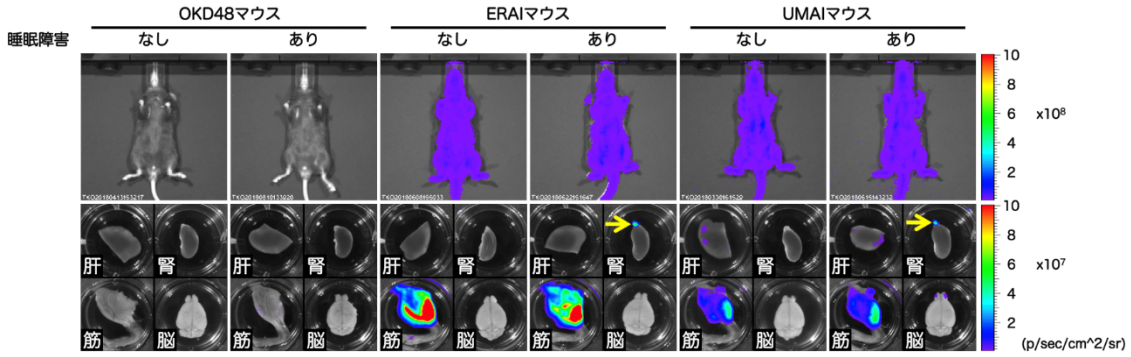


図 2. ストレス可視化マウスから検出される発光シグナル像
ERAI マウスおよび UMAI マウスの副腎（矢印）から得られる発光シグナルは疲労負荷がある場合、その強度が増す。

3. 睡眠障害により発現誘導された副腎の細胞ストレス応答遺伝子

イメージング解析で明らかになった副腎における IRE1 および ATF4 の活性化から内在性の細胞ストレス応答遺伝子の発現動態も確認する必要があると考えた。そこでイメージング解析の直後に副腎から RNA を抽出して、種々の遺伝子発現レベルを定量的 PCR 解析により評価した。その結果、調べたもののうち CReP 以外の遺伝子は睡眠障害が無い場合より有る場合で有意に発現が上昇した（図 3）。

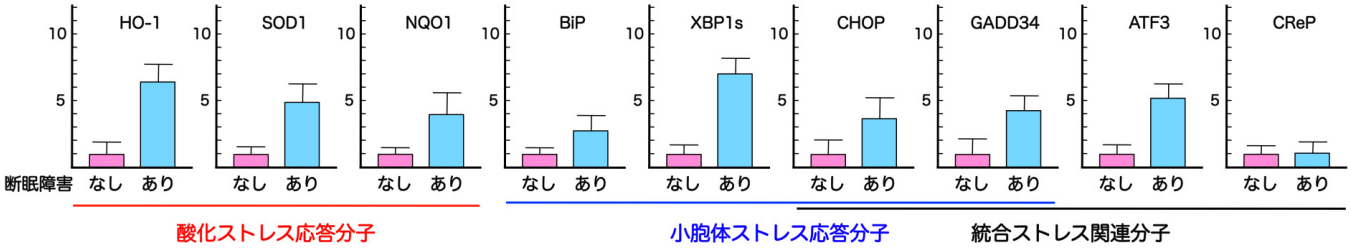


図 3. 副腎における細胞ストレス応答遺伝子の発現レベルと睡眠障害の有無
酸化ストレス、小胞体ストレス、および統合ストレスで発現誘導される遺伝子群はいずれも睡眠障害で発現レベルが上昇していた。一方、CReP は GADD34 と同様に統合ストレス応答の調節に関わるが、ストレスに曝されてもほとんど発現変動しないことが分かっている。なおエラーバーは標準誤差を示す（n=3）。

考　察

本研究において私たちは初めて睡眠障害装置を用いた疲労負荷実験に挑んだ。実際にマウスが疲労を感じていたのかどうかは分からないのだが、その活動サイクルは崩れて睡眠に充てられるべき時間が短くなると確認できた。ただ睡眠障害の程度は解析個体毎に差が大きく、今後は安定した睡眠障害装置の利用が望ましいと感じた。加えて疲労を評価す

る手法の採用も検討すべきだと考えている。

ストレス可視化マウスを用いたイメージング解析からは睡眠障害によって IRE1 を介した小胞体ストレス応答および ATF4 を介した統合ストレス応答が副腎で活性化することが分かった。小胞体ストレス応答および統合ストレス応答が副腎において活性化されることは内在性のストレス応答遺伝子の発現動態からも確かめられた。副腎には多くの自律神経が投射して、副腎からはコルチゾールなどのホルモンも分泌される。自律神経もコルチゾールも疲労やストレスとは密接な関係があり、睡眠障害で副腎の小胞体ストレス応答および統合ストレス応答が活性化したことは非常に興味深い。また図には示さなかったが、対照実験に比べて睡眠障害実験を施したマウスの副腎はわずかに大きくなっていて、この肥大化も含めて疲労と細胞ストレスの関連性については今後さらに研究を進める必要があると考えられる。

一方で酸化ストレス応答についてはイメージング解析と定量的 PCR 解析で異なる結果となった。ただ酸化ストレスは疲労との関連性でも研究が進んでおり、おそらく定量的 PCR 解析の結果が正しく、睡眠障害で Nrf2 を介した酸化ストレス応答も活性化されると思われる。

また副腎以外では小胞体ストレス応答、統合ストレス応答、および酸化ストレス応答の活性化を確認できていないが、当然ながら生体イメージングは万能の解析方法ではないため、影響があったとしても見逃してしまった可能性がある。これらの問題を今後の解析に活かしながら、さらに疲労研究を進めていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究は、金沢医科大学総合医学研究所生命科学研究領域細胞医学研究分野の黒田絵莉子助教、赤井良子助手、および濱嶋尚代研究補助員の協力により行われた。この場を借りて感謝を申し上げたい。

文　献

1) Iwawaki T, Akai R, Yamanaka S, Kohno K. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 29;106(39):16657-62. Epub 2009 Sep 15. PMID: 19805353 DOI: 10.1073/pnas.0903775106

2) Oikawa D, Akai R, Tokuda M, Iwawaki T. A transgenic mouse model for monitoring oxidative stress. Sci Rep. 2012;2:229. Epub 2012 Jan 19. PMID: 22355743 DOI: 10.1038/srep00229

3) Iwawaki T, Akai R, Toyoshima T, Takeda N, Ishikawa TO, Yamamura KI. Transgenic mouse model for imaging of ATF4 translational activation-related cellular stress responses in vivo. Sci Rep. 2017 Apr 7;7:46230. PMID: 28387317 DOI: 10.1038/srep46230

4) Iwawaki T, Akai R, Kohno K. IRE1α disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase of blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level. PLoS One. 2010 Sep 27;5(9):e13052. PMID: 20885949 DOI: 10.1371/journal.pone.0013052