

9 疲労による健康障害の分子機構に基づく予防法の開発

近藤 一博

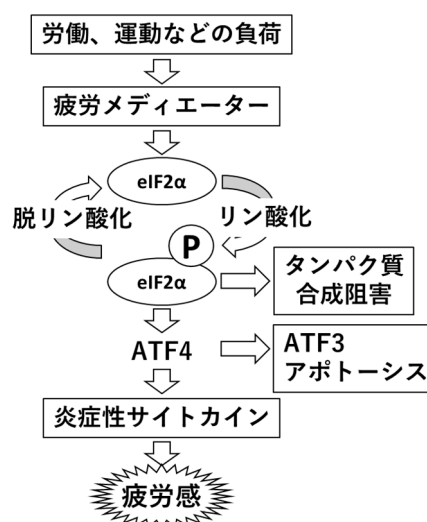
【目的】疲労は労働力の低下を招くだけでなく、うつ病などの重篤な疾患の原因にもなるため、現代社会の大きな問題となっている。疲労という現象は、心身の消耗を脳に疲労感として認識させる生体アラームである。疲労感の発生に炎症性サイトカインが関係することは知られていたが、どのように炎症性サイトカインが誘導されるかなど、疲労のメカニズムはながらく不明であった。我々はウイルス学的研究から、疲労と真核生物翻訳開始因子 2α (eIF2 α) のリン酸化が関係することを見いだしていた。本研究では、この成果を利用して、疲労現象における心身の消耗、すなわち脳や心臓などの臓器や組織の機能低下や、疲労感の発生機構を解明することで、疲労回復や疲労による疾患の予防に寄与する研究基盤を得ることを目的とした。

【方法】労働や運動によって生じる生理的疲労を再現するマウスモデルを作製し、各種臓器における疲労に関わるシグナル伝達機構を検討した。シグナル伝達機構の候補の探索は、eIF2 α のリン酸化や炎症性サイトカインの誘導に関係する因子を中心に、各種の臓器における mRNA 発現を Real-time PCR 法で定量することによって行った。候補となったシグナル伝達機構に関する阻害剤を利用することで、疲労による臓器・組織の消耗や、疲労感の発生に関する分子機構を確定した。

【結果】生理的疲労を生じる負荷によって、脳、心臓、肝臓、腎臓、筋肉といった各種の臓器や組織において、eIF2 α のリン酸化が共通に観察された。このことは、疲労に関係する臓器の消耗や機能低下に eIF2 α のリン酸化が広く関係することを示すものと考えられる。一方、eIF2 α のリン酸化によって誘導される炎症性サイトカインに関しては、肝臓におけるインターロイキン 1β (IL-1 β) の産生が他の臓器に比して圧倒的に多かった。このことは、疲労感の発生には、肝臓における eIF2 α のリン酸化が主要な働きをしていることを示唆する。

疲労を軽減する方法を開発するために、労働や運動の負荷と eIF2 α のリン酸化を結びつける疲労メディエーターの同定と抑制法の検討を行った。この結果、酸化ストレスを抑制すると、肝臓における eIF2 α リン酸化や IL-1 β 産生が抑制されることが分かった。興味深いことに、酸化ストレス抑制剤は、脳、心臓、腎臓、筋肉といった臓器・組織における eIF2 α リン酸化は抑制しなかった。このことは、酸化ストレスの抑制は、生体アラームである疲労感だけを抑制してしまい、疲労現象にともなう心身の消耗を見過ごすことになる可能性があることを示している。実際、抗酸化作用のあるエナジードリンクやカフェインの過剰摂取による健康障害が、最近大きな問題となっている。本研究の結果は、抗疲労物質の開発や使用に関する問題点を浮き彫りにするものであり、疲労の予防・回復法の開発の重要な研究基盤となると考えられる。

疲労と疲労回復の分子機構



9. 疲労による健康障害の分子機構に基づく予防法の開発

近藤 一博

東京慈恵会医科大学 医学部 ウイルス学講座／疲労医科学研究センター

Key words : 疲労, 疲労感, 炎症性サイトカイン, eIF2 α , 酸化ストレス

緒 言

疲労は労働力の低下を招くだけでなく、うつ病などの重篤な疾患の原因にもなるため、現代社会の大きな問題となっている。疲労という現象は、心身の消耗を脳に疲労感として認識させる生体アラームである。疲労感の発生に炎症性サイトカインが関係することは知られていたが [1]、どのように炎症性サイトカインが誘導されるかなど、疲労のメカニズムはながらく不明であった。我々は、これまでの研究で労働や運動による生理的疲労によってヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の再活性化が誘導されることと [2]、HHV-6 の再活性化が真核生物翻訳開始因子 2 α (eIF2 α) のリン酸化と関係していること [3] とを明らかにし、疲労と eIF2 α のリン酸化が関係することを見いだしていた。本研究では、この成果を利用して、疲労現象における心身の消耗、すなわち脳や心臓などの臓器や組織の機能低下や、疲労感の発生機構を解明することで、疲労回復や疲労による疾患の予防に寄与する研究基盤を得ることを目的とした。

生理的疲労を生じる負荷によって、各種の臓器で eIF2 α のリン酸化が共通に観察され、疲労に関係する臓器の消耗や機能低下に eIF2 α のリン酸化が広く関係することが示唆された。一方、eIF2 α のリン酸化によって誘導される炎症性サイトカインは、肝臓におけるインターロイキン 1 β (IL-1 β) の産生が他の臓器に比して圧倒的に多く、疲労感の発生には、肝臓における eIF2 α のリン酸化が主要な働きをしていると考えられた。

疲労を軽減する方法を開発するために、労働や運動の負荷と eIF2 α のリン酸化を結びつける疲労メディエーターの同定と抑制法の検討を行った。この結果、酸化ストレスを抑制すると、肝臓における eIF2 α リン酸化や IL-1 β 産生が抑制されるが、酸化ストレス抑制剤は、脳、心臓、腎臓、筋肉といった臓器・組織における eIF2 α リン酸化は抑制しないことが分かった。このことは、酸化ストレスの抑制は、生体アラームである疲労感だけを抑制してしまい、疲労現象にともなう心身の消耗を見過ごすことになる可能性があることを示している。本研究の結果は、抗疲労物質の開発や使用に関する問題点を浮き彫りにし、疲労の予防・回復法の開発の重要な研究基盤になるものと考えられる。

方 法

1. 疲労マウスモデル

疲労マウスモデルの作製にあたっては、労働や運動によって生じる生理的疲労を再現するマウスモデルを作製した。生理的疲労の定義に易回復性があるので、一晩の睡眠で自発運動量が回復する程度の負荷を与える方法を検討した。その結果、重りを用いない強制水泳を 30 分または 1 時間負荷する強制水泳モデルと、飼育ケージに 1 cm の水を敷くことで睡眠を 4 時間～24 時間妨害した断眠モデルを疲労モデルとして使用することとした。

2. 疲労のシグナル伝達機構の検討

各種臓器における疲労に関わるシグナル伝達機構の候補の探索は、eIF2 α のリン酸化や炎症性サイトカインの誘導に関係する因子を中心に、各種の臓器における mRNA 発現を Real-time PCR 法で定量することによって行った。また、ウェスタンブロッティングによるタンパク質およびリン酸化タンパク質の検出も並行して行った。さらに、候補となったシグナル伝達機構の確認は、候補となったシグナル伝達に関する阻害剤を投与し、自発運動低下などの疲労様行動に影響を与えるかどうかで判定した。

結 果

1. 疲労におけるシグナル伝達機構の同定

生理的疲労負荷を与えたマウスにおける eIF2 α のリン酸化を検討したところ、肝臓、心臓、脳、腎臓において、リン酸化 eIF2 α が検出され、疲労負荷によって eIF2 α がリン酸化されることが分かった。また、eIF2 α のリン酸化は、強制水泳負荷の 10 分後には検出され、疲労に対する反応が非常に短時間で生じることが分かった。さらに、eIF2 α に関連するシグナル伝達において eIF2 α のリン酸化の下流にある activating transcription factor (ATF) 4 タンパク質の増加も観察され、疲労におけるシグナル伝達において eIF2 α リン酸化に関連するシグナル伝達経路が関係することが示唆された。

リン酸化 eIF2 α や ATF4 の検出は感度が低く、定量化も難しかったので、疲労シグナルの定量的な観察には不向きであると考えられた。そこで、ATF4 によって mRNA 発現が促進される ATF3 の mRNA を eIF2 α リン酸化の代理マーカーとなるかどうかを検討した。その結果、ATF3 mRNA の発現は、感度良く eIF2 α リン酸化を検出するのに有用であることが分かった。ATF3 を用いた疲労シグナルの検出では、肝臓、心臓、脳、肝臓、筋肉などの主要臓器で強制水泳による運動負荷の時間に対応して ATF3 mRNA 発現が促進されることが分かった (図 1a, b)。また、肝臓と心臓における ATF3 mRNA 発現は特に強く誘導された (図 1a)。これらのシグナル伝達の阻害剤である ISRIB をマウスに投与すると、強制水泳による運動量の低下が抑制され、このシグナル伝達機構が運動負荷などの生理的疲労にとって重要なシグナル伝達機構であることが示唆された。

疲労負荷による eIF2 α のリン酸化および、その下流にある ATF4 や ATF3 の発現亢進に対応し、リン酸化した eIF2 α を脱リン酸化する酵素のユニットである growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) の発現も亢進した。また、eIF2 α 脱リン酸化酵素の阻害剤である Salubrinal をマウスに投与すると、強制水泳による運動量の低下が促進された。このことは、eIF2 α 脱リン酸化酵素が疲労回復にとって重要な役割を演じていることを示すとともに、eIF2 α のリン酸化と疲労との関係をより強く示すものであると考えられる。

疲労負荷による ATF3 や GADD34 の誘導は断眠モデルによる疲労負荷においても強制水泳と同様に観察され、運動負荷による生理的疲労も、睡眠不足による生理的疲労も、同じシグナル伝達経路が関与していることが示唆された。

2. 疲労における炎症性サイトカイン産生臓器の同定

これまでに報告されている様々な研究から、疲労現象における疲労感、炎症性サイトカインが脳に作用することで発生することが判っていた。実際に、IL-1 β をマウスの腹腔に投与すると、自発運動の抑制が数時間続き、その後自発運動量が回復するという、生理的疲労と同じ行動を示した。

強制水泳によって疲労負荷を与えたマウスの各種臓器における炎症性サイトカイン産生を、mRNA を Real-time PCR 法で定量することで検討した。この結果、肝臓における IL-1 β 産生が、他のサイトカインや他の臓器における IL-1 β 産生に比べて圧倒的に多いことが分かった (図 1c)。

また、ISRIB によって eIF2 α リン酸化にともなうシグナルを阻害すると、疲労負荷マウスの肝臓における IL-1 β 産生が抑制され、疲労負荷の際の肝臓における IL-1 β 産生が eIF2 α リン酸化に関連するシグナル伝達機構によって生じることが示唆された。

3. 疲労メディエーターの同定

有効な疲労の回復法または抑制法を開発するために、疲労負荷と各種臓器における eIF2 α リン酸化をつなぐ、疲労メディエーターの同定を試みた。この結果、酸化ストレス抑制剤である N-acetylcystein (NAC) を投与したマウスでは、強制水泳による運動負荷の際の肝臓における ATF3 と IL-1 β の発現が抑制された (図 2a)。しかし、同様の疲労負荷を与えたマウスの脳、心臓、肝臓、筋肉などの他の臓器・組織においては、ATF3 の発現は抑制されなかった (図 2b)。

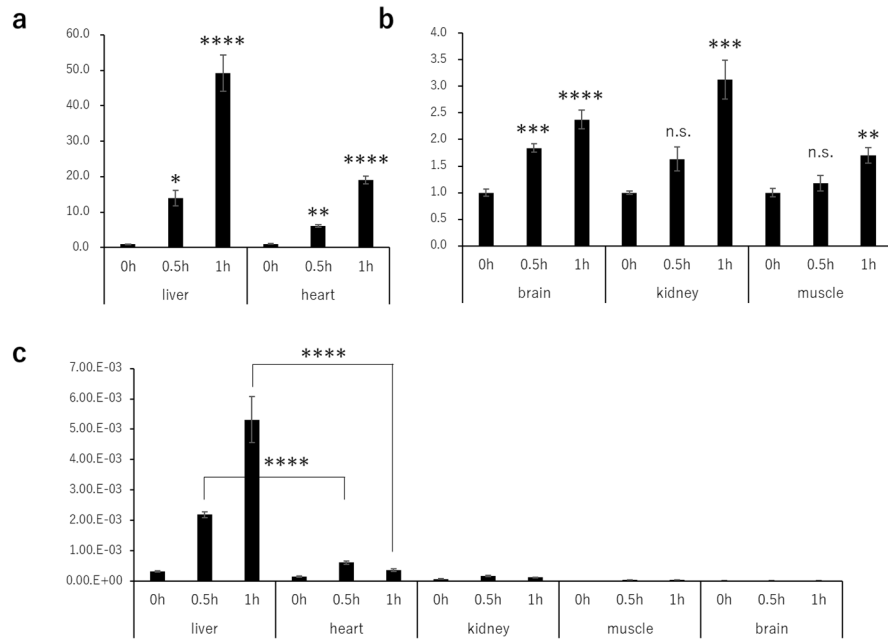


図 1. 運動負荷による各種臓器における ATF3 と IL-1 β の誘導

a, b) 強制水泳なし (0h) および強制水泳 0.5 時間、1 時間の運動負荷をかけた場合の、図に示される臓器における ATF3 の変化率を示す。各臓器とも強制水泳なしの場合の値を 1 とした。

c) 各臓器における負荷時間ごとの、IL-1 β 発現量 (β -アクチンによる補正值)。

統計処理は Dunnett's test (a, b) と unpaired t-test (c) によって行った。

** : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.00001$.

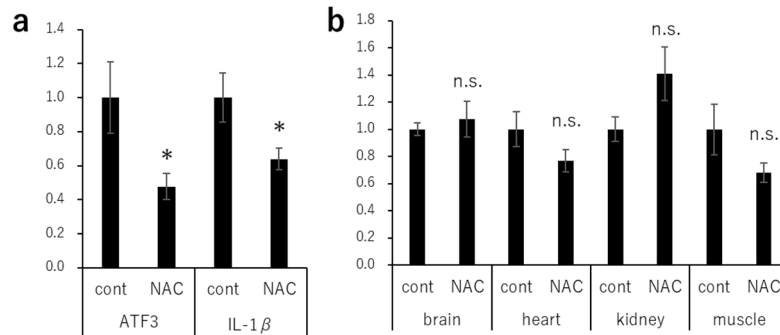


図 2. 酸化ストレス抑制剤の抗疲労効果

酸化ストレス抑制剤 NAC の投与後に 1 時間の強制水泳によって運動負荷を与えたマウスの各種臓器における疲労関連の因子の遺伝子発現変化率を示す。対照群は NAC を投与せずに運動負荷のみを与えたマウスを示す。対照群の遺伝子発現量を 1 とした。

a) 肝臓における ATF3 と IL-1 β の発現変化率を示す。

b) 図に示される各種臓器における ATF3 の発現変化率を示す。

統計処理は対照群との間で unpaired t-test を行った。* : $p < 0.05$, n.s. : not significant.

考 察

本研究において、生理的疲労を生じる負荷によって、脳、心臓、肝臓、腎臓、筋肉といった各種の臓器や組織において、eIF2 α のリン酸化とその下流のシグナル伝達機構が働いていることが観察された。eIF2 α のリン酸化は、本来細胞内で産生されているタンパク質の産生を低下させる作用があり、強い eIF2 α リン酸化が続くとアポトーシスが誘導されることが知られている [4]。このことは、疲労に関係する臓器の消耗や機能低下に eIF2 α のリン酸化が広く関係することを示すものと考えられる。また、リン酸化した eIF2 α の脱リン酸化が疲労回復に重要な役割を演じるという証拠も、生理的疲労が eIF2 α リン酸化と深く関わる現象であることを示している。

一方、疲労感を生じさせる原因分子である炎症性サイトカインに関しては、肝臓におけるインターロイキン 1 β (IL-1 β) の産生が他の臓器に比して圧倒的に多かった。肝臓の IL-1 β 産生のメカニズムに関しては、eIF2 α リン酸化が炎症性サイトカインと誘導することが知られていること [5]、本研究において疲労負荷時の肝臓で eIF2 α リン酸化が強く生じていたこと、eIF2 α リン酸化シグナルの阻害剤である ISRIB によって肝臓での IL-1 β 産生が抑制されていたことから、疲労負荷による肝臓の eIF2 α リン酸化によって IL-1 β が産生され、疲労感が発生すると考えられる。このことは、肝臓が疲労感という生体アラームを発生させるセンサーとなっていることを示唆している。

疲労を軽減する方法を開発するために、労働や運動の負荷と eIF2 α のリン酸化を結びつける疲労メディエーターの同定と抑制法の検討を行った。疲労メディエーターの候補は、eIF2 α をリン酸化する酵素 [4] の性質から、酸化ストレス、二本鎖 RNA、アミノ酸不足などに絞られる。検討の結果、酸化ストレスを抑制すると、肝臓における eIF2 α リン酸化や IL-1 β 産生が抑制されることが分かった。興味深いことに、酸化ストレス抑制剤は、脳、心臓、腎臓、筋肉といった臓器・組織における eIF2 α リン酸化は抑制しなかった。このことは、酸化ストレスの抑制は、生体アラームである疲労感だけを抑制してしまい、疲労現象にともなう心身の消耗を見過ごす可能性があることを示している。

疲労に関係する健康障害の一つとして、エナジードリンクやカフェインの過剰摂取による健康障害が、最近大きな問題となっている。これらは強い抗酸化作用を持っていることが知られており [6]、上記のようなメカニズムによって疲労感のみを抑制してしまい、摂取した人が無理をして労働や運動をしてしまうことで、健康障害を引き起こした可能性がある。今後は、抗疲労剤や抗疲労食品の開発においては、疲労感のみを抑制するのではなく、各種臓器におけるリン酸化 eIF2 α を低減できるような方法を開発することが必要であると考えられる。このように、本研究の結果は、抗疲労物質の開発や使用に関する問題点を浮き彫りにするものであり、疲労の予防・回復法の開発の重要な研究基盤となると考えられる。

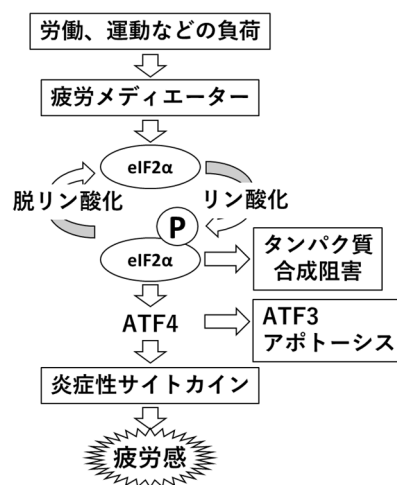


図3. 疲労の発生と回復の分子機構

労働や運動の負荷が炎症性サイトカインの産生と疲労感の誘導するメカニズムに関係する主要な因子を示す。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京慈恵会医科大学・ウイルス学講座において実施されたものであり、ご協力いただいた教室の皆様感謝いたします。また、ご助言とご支援をいただきました、東京慈恵会医科大学の柳澤裕之先生、安保雅博先生、岡部正隆先生、日本疲労学会の渡辺恭良先生、倉恒弘彦先生、梶本修身先生に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究に対しご援助いただきました公益財団法人上原記念生命科学財団に深謝申し上げます

文 献

- 1) Karshikoff B, Sundelin T, Lasselin J. Role of Inflammation in Human Fatigue: Relevance of Multidimensional Assessments and Potential Neuronal Mechanisms. *Front Immunol.* 2017 Jan 20;8:21. eCollection 2017. PMID: 28163706 DOI: 10.3389/fimmu.2017.00021
- 2) Aoki R, Kobayashi N, Suzuki G, Kuratsune H, Shimada K, Oka N, Takahashi M, Yamadera W, Iwashita M, Tokuno S, Nibuya M, Tanichi M, Mukai Y, Mitani K, Kondo K, Ito H, Nakayama K. Human herpesvirus 6 and 7 are biomarkers for fatigue, which distinguish between physiological fatigue and pathological fatigue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep 9;478(1):424-430. Epub 2016 Jul 7. PMID: 27396623 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.010.
- 3) Kondo K, Sashihara J, Shimada K, Takemoto M, Amo K, Miyagawa H, Yamanishi K. Recognition of a novel stage of betaherpesvirus latency in human herpesvirus 6. *J Virol.* 2003 Feb;77(3):2258-64. PMID: 12525662.
- 4) Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljubic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO Rep.* 2016 Oct;17(10):1374-1395. Epub 2016 Sep 14. PMID: 27629041 DOI: 10.15252/embr.201642195
- 5) Janssens S, Pulendran B, Lambrecht BN. Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nat Immunol.* 2014 Oct;15(10):910-9. doi: 10.1038/ni.2991. PMID: 25232821 DOI: 10.1038/ni.2991.
- 6) Zeidán-Chuliá F, Gelain DP, Kolling EA, Rybarczyk-Filho JL, Ambrosi P, Terra SR, Pires AS, da Rocha JB, Behr GA, Moreira JC. Major components of energy drinks (caffeine, taurine, and guarana) exert cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing reactive oxygen species production. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:791795. doi: 10.1155/2013/791795. Epub 2013 May 22. PMID: 23766861 DOI: 10.1155/2013/791795