

学位論文審査結果の報告書

氏 名 宮本 朋佳

生 年 月 日 (昭和)・平成 58年 11月 11日

本 籍 (国籍) 日 本

学位の種類 博 士 (薬 科 学)

学位記番号 第 137 号

学位授与の条件 学位規程第5条該当
(博士の学位)

論 文 題 目 反復寒冷ストレス負荷マウスにおける体温調節能と
炎症反応性の変化に関する研究

学位論文受理日 平成 29 年 1 月 12 日

学位論文審査終了日 平成 29 年 2 月 9 日

審 査 委 員

(主 査) 川畑 篤史



(副主査) 高田 充隆



(副主査) 中山 隆志



(副 査)



(副 査)



論文内容の要旨

現代社会は、ストレス社会と言われ、多くの人が様々なストレスに曝されている。近年、仕事によるストレスから生じる精神障害による労災認定は増加しており、労働者に対するメンタルヘルス対策が問題となっている。厚生労働省は平成27年12月より事業者によるストレスチェックを義務化し、これによってストレスが労働者の精神に及ぼす影響についての社会的な認識が高まっている。ストレスは、精神状態だけでなく循環器系、泌尿器系、消化器系などにも影響を及ぼし、いわゆる心身症を引き起こす。ストレスには、一過性の刺激によって起こる急性ストレスと刺激の持続や反復によって起こる慢性ストレスがある。急性ストレス刺激により、視床下部-下垂体-副腎皮質系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA 系) や交感神経系の活性化が起こることで様々な生体変化が生じ、慢性ストレス時にはそれらがより複雑化する。

急激な気温変化や季節の変わり目に体調不良を訴える人が多いことから、環境温度変化はストレスの1つとして考えられている。喜多らにより考案された反復寒冷 (Repeated Cold ;RC) ストレスは、春先や秋口に見られる気温変動、夏季あるいは冬季に室内外を出入りする場合の急激な気温の変化をシミュレートしたもので、マウスやラットを特殊なスケジュールに従って約1週間、室温と低温に繰り返し曝露することで作製される。本ストレスを負荷した動物は、自律神経失調症モデルとして認められており、痛覚過敏、持続的低血圧や起立性低血圧、心拍数増加などを含む多様な生理的および病態生理的变化を示す。脳内ではアセチルコリン、ノルアドレナリン、セロトニンなどモノアミン類の含量や代謝回転に異常が認められている。本研究では、ヒトにおいて慢性ストレスにより生じる体調変化や関連する疾患を探るため、1週間のRCストレスを負荷したマウスが、新たな急性ストレスや炎症性刺激に対してどのような反応を示すかについて検討した。

第1章ではRCストレスが急性拘束ストレスによって誘発される体温上昇に影響を与えるか否かを検討した。始めに、1時間の急性拘束ストレスにより誘発される体温上昇を調べたところ、RCストレスマウスでは非ストレスマウスに比べて、体温上昇反応が有意に亢進していた。そこで、この変化に熱産生組織である褐色脂肪組織に発現するアドレナリン β_3 受容体が関与するかを選択的拮抗薬であるSR59230Aを用いて検討した。その結果、RCストレスマウスにおける拘束ストレス誘発体温上昇の亢進はSR59230Aにより有意に抑制された。さらに、褐色脂肪組織重量および褐色脂肪組織のマーカーであるuncoupling protein-1のタンパク発現量を調べたところ、どちらにもわずかな増加傾向が認められた。一方、拘束ストレスによるコルチコステロン分泌もRCストレスにより増強されることが明らかとなった。そこで、グルココルチコイド受容体拮抗薬であるミフェプリストンの効果を検討したところ、RCストレスマウスにおける拘束ストレス誘発体温上昇反応の亢進への影響は認められなかった。また抗不安薬ジアゼパムやCOX阻害薬であるインドメタシンもRCストレスマウスにおける体温上昇反応亢進に影響しなかった。これらの知見より、RCストレスマウスにおける拘束ストレス誘発体温上昇の亢進には、褐色脂肪組織に発現するアドレナリン β_3 受容体の活性上昇が関与し、副腎皮質ホルモン、プロスタグランジン、不安状態などの影響は無いことが示唆された。

第2章第1節では、マウスの深部体温を、テレメトリーシステムを用いて無麻酔、無拘束で測定し、lipopolysaccharide (LPS) 誘起発熱反応に対するRCストレスの影響を検討した。始めに、RCストレス負荷最終日の深部体温を確認したところ、低温環境にある夜間の深部体温は有意に低下しており、活動量も低下傾向にあった。次にLPSを腹腔内投与したところ10-30分後および70-140分後をピークとする2峰性の発熱が認められ、これはRCストレスにより増強された。このRCストレスによるLPS誘起発熱反応の増強はcyclooxygenase (COX) 阻害薬ジクロフェナクにより抑制された。しかし、肺および視床下部のCOX-2タンパク発現量は、RCストレスおよびLPS投与により変化しなかった。LPS投与90および150分後に血清コルチコステロン濃度上昇が認められたが、それに対するRCストレスの影響は明確ではなかった。これらの知見から、RCストレスは、LPS刺激によってCOX依存性に産生されたプロスタグランジンによる発熱反応を増強することが明らかとなった。RCストレスマウスは致死量のLPSに対して抵抗性を示すことが報告されており、RCストレスによる発熱反応の増強がこのLPS耐性獲得に寄与している可能性が考えられる。

第2章第2節では、ヒトの間質性膀胱炎に似た症状を示すシクロホスファミド誘起マウス膀胱炎モデルを用いて、RCストレスが膀胱炎症および膀胱痛に与える影響を検討した。RCおよび非ストレスマウスの腹腔内にシクロホスファミドを大量(400 mg/kg)投与すると3時間半から4時間後に膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加が認められ、これらの症状の程度に両群間

で差は認められなかった。マクロファージ/ミクログリア阻害薬ミノサイクリンは、RC および非ストレス群どちらにおいても膀胱湿重量増加に影響することなく、膀胱痛様行動および関連痛覚過敏を強く抑制した。次に、低用量(200 mg/kg)のシクロホスファミドを投与したところ、膀胱痛様行動、膀胱関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加は、RC ストレスマウスにおける方が非ストレスマウスに比較して軽微であった。最後に、腹腔マクロファージにおいて LPS 刺激による TNF- α および IL-1 β の分泌量を測定したところ、RC ストレスマウスのマクロファージでは、非ストレスマウスに比べて、これらサイトカイン分泌量が低下していた。このことより、RC ストレスマウスでは、マクロファージの機能が低下しているため、シクロホスファミド誘起膀胱痛が軽微であった可能性が考えられる。しかし、マクロファージ機能の低下は感染に対する防御能低下に繋がる危険性を秘めており、今後感染性膀胱炎に及ぼす RC ストレスの影響についても調べる必要がある。

以上より、RC ストレスマウスではアドレナリン B $_3$ 受容体が関与する急性拘束ストレス誘起体温上昇反応と、内因性プロスタグランジンに依存する LPS 誘起発熱反応が上昇していることが明らかとなった。一方、RC ストレスによりマクロファージ機能は低下するため、シクロホスファミド誘起膀胱痛はむしろ減弱することが示された。本研究により、RC ストレスが体温調節能や内臓知覚に影響を与えることが明らかとなり、臨床において、ストレスが関係する様々な体調変化・異常を予防する上で、ストレスコントロールを行うことの重要性が改めて裏付けられた。

論文審査結果の要旨

喜多らにより考案された反復寒冷 (Repeated Cold ;RC) ストレスは、春先や秋口に見られる気温変動、夏季あるいは冬季に室内外を出入りする場合の急激な気温の変化をシミュレートしたもので、マウスやラットを特殊なスケジュールに従って約 1 週間、室温と低温に繰り返し曝露することで作製される。本ストレスを負荷した動物は、痛覚過敏、持続的低血圧や起立性低血圧、心拍数増加などを含む多様な生理的および病態生理的变化を示すほか、この動物の脳内ではアセチルコリン、ノルアドレナリン、セロトニンなどモノアミン類の含量や代謝回転に異常が認められている。現在このストレスを負荷したラットやマウスは、自律神経失調症モデルあるいは線維筋痛症のモデルとして認められている。本博士学位論文は、ヒトにおいて慢性ストレスにより生じる体調変化や関連する疾患を探るため、1 週間の RC ストレスを負荷したマウスが、新たな急性ストレスや炎症性刺激に対してどの様な反応を示すかについて検討し得られた結果をまとめたものである。

第 1 章では RC ストレスが急性拘束ストレスによって誘発される体温上昇に影響を与えるか否かを検討している。始めに、1 時間の急性拘束ストレスにより誘発される体温上昇を調べ、RC ストレスマウスでは非ストレスマウスに比べて、体温上昇反応が有意に亢進していることを見出した。そこで、この変化に熱産生組織である褐色脂肪組織に発現するアドレナリン β_3 受容体が関与するかを選択的拮抗薬である SR59230A を用いて検討し、RC ストレスマウスにおける拘束ストレス誘発体温上昇の亢進が SR59230A により有意に抑制されるとの知見を得ている。さらに、褐色脂肪組織重量および褐色脂肪組織のマーカーである uncoupling protein-1 のタンパク発現量がわずかに増加傾向を示すことを認めている。一方、拘束ストレスによるコルチコステロン分泌も RC ストレスにより増強されることも認めている。しかし、グルココルチコイド受容体拮抗薬であるミフェプリストンは、RC ストレスマウスにおける拘束ストレス誘発体温上昇反応の亢進に影響しなかった。また抗不安薬ジアゼパムや COX 阻害薬であるインドメタシンも RC ストレスマウスにおける体温上昇反応亢進に影響しなかった。これらの知見に基づき、RC ストレスマウスにおける拘束ストレス誘発体温上昇の亢進には、褐色脂肪組織に発現するアドレナリン β_3 受容体の活性上昇が関与し、副腎皮質ホルモン、プロスタグランジン、不安状態などの影響は無いとの結論に達している。

第 2 章 第 1 節では、マウスの深部体温を、テレメトリーシステムを用いて無麻酔、無拘束で測定し、lipopolysaccharide (LPS) 誘起発熱反応に対する RC ストレスの影響を検討している。始めに、RC ストレス負荷最終日の深部体温を確認したところ、低温環境にある夜間の深部体温は有意に低下しており、活動量も低下傾向にあった。次に LPS を腹腔内投与したところ 10-30 分後および 70-140 分後をピークとする 2 峰性の発熱が認められ、これは RC ストレスにより増強された。この RC ストレスによる LPS 誘起発熱反応の増強は cyclooxygenase (COX) 阻害薬ジクロフェナクにより抑制された。しかし、肺および視床下部の COX-2 タンパク発現量は、RC ストレスおよび LPS 投与により変化しなかった。LPS 投与 90 および 150 分後に血清コルチコステロン濃度上昇が認められたが、それに対する RC ストレスの影響は明確ではなかった。これらの知見から、RC ストレスは、LPS 刺激によって COX 依存性に産生されたプロスタグランジンによる発熱反応を増強するとの結論に達している。

第 2 章 第 2 節では、ヒトの間質性膀胱炎に似た症状を示すシクロホスファミド誘起マウス膀胱炎モデルを用いて、RC ストレスが膀胱炎症および膀胱痛に与える影響を検討している。RC および非ストレスマウスの腹腔内にシクロホスファミドを大量(400 mg/kg)投与すると膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加が同程度認められ、マクロファージ/ミクログリア阻害薬ミノサイクリンは、RC および非ストレス群どちらにおいても膀胱湿重量増加に影響することなく、膀胱痛様行動および関連痛覚過敏を強く抑制した。そこで、低用量(200 mg/kg)のシクロホスファミドを投与したところ、膀胱痛様行動、膀胱関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加は、RC ストレスマウスにおける方が非ストレスマウスに比較して軽微であった。一方、RC ストレスマウスの腹腔マクロファージでは、非ストレスマウスに比べて、LPS 刺激による TNF- α および IL-1 β の分泌量が低下していた。このことより、RC ストレスマウスでは、マクロファージの機能が低下しているため、シクロホスファミド誘起膀胱痛が軽微であったのではないかと考察している。しかし、マクロファージ機能の低下は感染に対する防御能低下に繋がる危険性を秘めており、今後感染性膀胱炎に及ぼす RC ストレスの影響についても調べる必要があるとの考えに至っている。

以上、本研究により RC ストレスマウスではアドレナリン β_3 受容体が関与する急性拘束ストレス誘起体温上昇反応と、内因性プロスタグランジンに依存する LPS 誘起発熱反応が上昇している

ことが示された。一方、RC ストレスによりマクロファージ機能は低下するため、シクロホスファミド誘起膀胱痛はむしろ減弱することが明らかにされた。本論文は、RC ストレスが体温調節能や内臓知覚に影響を与えることを明らかにし、現代社会において、ストレスが関係する様々な体調変化・異常を予防する上で、ストレスコントロールを行うことの重要性を改めて示唆するもので、博士學位論文として十分な内容を含んでいる。