

## 「東洋大学オリンピック・パラリンピック特別プロジェクト研究」について

Olympic/Paralympic Games Project, Toyo University

川口 英夫\*

### 1. はじめに

本研究の目的は、生体が受ける暑熱ストレスを遺伝子・細胞レベルから動物・人間の個体まで多階層的に解析し、その研究成果を2020年の東京オリンピック・パラリンピック大会までにアスリートの暑熱対策に適用することである。また、副産物として、2020年以降に熱中症対策方法を活用した地域高齢者への社会実装、さらに診断機器等を『ものづくり』として実用化し社会に貢献することも目的とする。この目的を達成するため、①産学連携・社会実装を目指した『具体的な対処（コーピング）方法の開発』、とこれを支える②基盤的生命科学研究に基づく『暑熱によるアスリートのパフォーマンス低下』のメカニズム解析、の両面から研究を進めている。この①、②に対し、これまでに次の研究成果を得た。

### 2. オリパラ事業の成果

1) 血管保護食品の開発とそのメカニズム解析(下記 a) が①、b)が②に相当) :

a) 血管保護食品の開発 :

血管内皮細胞における脂肪酸代謝の重要性に着目し、暑熱ストレスによる細胞障害を抑制する機能成分を探索した。血管内皮細胞に40℃の暑熱ストレスを負荷し、脂肪酸代謝に関係する各種のアゴニスト活性を有する物質(10種類)と共に培養した。その結果、暑熱ストレスによる細胞死を抑制する物質として3種類の物質A、T、Pを見出した。これらは全て植物由来の天然成分である。上記の成果を基に、特許を出願し、企業との秘密保持契約・共同研究契約を進めた。

さらに、2020年にアスリートに実際に使っていたために必須である『ヒト介入試験』、すなわち実際にヒトに上記の物質を食品として摂取していただきその効果を検証する試験を実施する準備を進めた。本試験の実施を最短で実現して研究を加速するため、

まずは外部委託による試験を実行すべく、物質Aを1日16mg摂取できる食品(形状はカプセル:2個/日を経口摂食)を作成するとともに、30ページに及ぶ研究計画書を作成して外部委託機関の倫理審査を受審し認可を得た。

b) 血管内皮細胞の暑熱ストレス応答メカニズムの解析 :

血管内皮細胞から分泌される一酸化窒素(NO)は、血管平滑筋を弛緩させ、血管の拡張に働く因子の1つである。体に暑熱ストレスが加わった際、NOは血管を拡張させ熱を体表から放出させ、体温を下げるため、体が受ける暑熱ストレスを軽減する作用がある。そこで、(i)暑熱ストレスが加わった際、どのような時間経過でNOが血管内皮細胞から分泌されるか、(ii)どのようなメカニズムで、暑熱ストレスはNOの合成・分泌を高めるのか、を検討した。生体内での血管内皮細胞の環境を模擬するため、ベンチャー企業と共同開発した灌流式マイクロチップ細胞培養システムを用いて研究を進めた。その結果、(i)NOの分泌には数十分間で生ずる短期増加と数時間の長期増加の2種類がある、(ii)前者はCa<sup>2+</sup>/CM系、後者はVEGF受容体を介する系であることが分かった。なお、a)の血管保護物質Pは上記(ii)のVEGF受容体を介する系のシグナルを増強するという報告があるため、a)の研究と直接関連する可能性がある。

2) ヒトの暑熱ストレス耐性の獲得とそのメカニズム解析(下記c)が①、d)が②に相当) :

c) ミストサウナを用いたヒトの暑熱環境順化 :

家庭用ミストサウナを用いて暑熱実験環境を構築し、その環境下において被験者に継続的な暑熱負荷を与え、循環調節系・体温調節系に及ぼす影響を検討した。具体的には、温度41.1±0.4℃、湿度88.7±0.5%で30分間の暑熱負荷を10日間与えた。その結果、特に額・体幹部における発汗量が増加して熱放散が促進さ

れ、鼓膜温・心拍数の上昇度が抑制された。したがって、暑熱ストレスの繰り返し負荷により暑熱環境順化が引き起こされたことが分かった。額・体幹部の発汗量の増加は、熱に弱い脳などの重要な臓器の機能低下を防ぐためと考える。

d) 弱熱ストレス負荷による細胞保護効果の発現：

マウスから抽出したグリア細胞およびマウス海馬細胞由来の株化細胞 HT22 に暑熱ストレスを与えた。この時、ヒートショック・プロテインである HSP70・HSP105 が培養温度依存的に mRNA もタンパク量も増えることを見出した。さらに、弱熱ストレスを与えられた際に発現する HSP70 が、その後、強熱ストレスに晒された際に細胞保護効果を示すことを見出した。また、下記の g) に記す通り、暑熱ストレスを負荷したマウス個体の脳でも HSP70 の発現が増加した。

a)の血管保護物質 T もこの HSP70 の発現を誘導することを別途確認している。一方、血管保護物質 A では HSP70 の発現が低下したため、物質 A と T では作用機序が異なると考えられる。これは、物質 A と T の併用により血管保護効果を加算的に増強できる可能性を示唆する。

3) 大学生・高齢者を対象とした具体的な対処（コーピング）方法の開発（下記 e)、f)ともに①に相当)：

e) メンタルヘルス不調のコーピング手段の開発：

アスリートへの適用を念頭に、大学生 113 名を対象としたコホート研究（追跡調査研究）により、メンタルヘルス不調のリスクが高い人に提案するコーピング手段の開発を目的として、生活習慣（運動習慣・食事習慣）および栄養摂取状況を調べた。3年目となった本コホート研究の結果、運動習慣・運動意識、およびいくつかの栄養素の摂取がコーピング手段となり得ることが示唆された。

f) 地域住民の調査実施：ベースライン調査およびラボールの構築：

体力レベルの向上は、生活習慣病予防や健康寿命延伸のみならず熱中症予防にも効果があると考えられる。そこで、運動と食事の観点から体力レベル向上を目指した健康づくり教室を、大学近隣の M 町在住の中・高齢者 21 名を対象に実施した。教室は 2018 年 5 月 11 日～9 月 14 日の隔週金曜 9 時 30 分～11 時 30

分に開催した（全 8 回）。教室の内容は、ウォーキング班と調理班に分かれ、ウォーキング班が約 1 時間のウォーキングを行っている間に、調理班が参加者全員の昼食を準備し、最後に全員で昼食を摂るというものである。なお、ウォーキング班と調理班は、教室ごとにランダムに決定した。その結果、教室前後で食習慣は変化しないものの、体力レベルのうちタイムアップアンドゴー（3 m 歩行）と 600 m 歩行の記録が教室前と比較して教室後に向上することが示された。

4) 動物個体・細胞を用いた暑熱ストレス耐性の獲得とそのメカニズム解析（下記 g)～j)は②に相当)：

g) 動物個体を用いた脳の暑熱ストレス耐性の獲得とそのメカニズム解析：

暑熱ストレスの認知機能への影響を検討するため、マウスの物体識別学習への影響と脳内の遺伝子発現への影響を調べた。60 分間の 45°C の暑熱ストレスを負荷したマウスは、新たな記憶形成過程に不可逆的な障害を負うことが示唆された。さらに、脳内では HSP70 の遺伝子発現が有意に増加していたが、並行していくつかのシナプス可塑性に重要な転写因子の遺伝子発現が増加していることが分かった。

h) 暑熱ストレス応答マイオカインの探索：

暑熱状態下における骨格筋の変化を動物個体・細胞レベルで明らかにすることを目的とし、動物モデルおよび細胞レベルで、(i) 適切な暑熱条件の設定、(ii) 暑熱に応答した骨格筋分泌タンパク（マイオカイン）遺伝子発現量の変動、(iii) 血中マイオカインの測定を完了した。この中で、暑熱ストレス依存的に血中濃度が変動するマイオカインを同定したため、現在、特許申請を準備している。

i) ストレスに強い心臓の作成：

幼若心筋は低酸素状態などのストレスに耐性があり、成熟心筋に幼若心筋の性質をもたらすことができれば、ストレスに強い心臓を作ることが可能になると考える。エピジェネティック因子である SWI/SNF 様クロマチンリモデリング複合体、特に Baf60c は心筋の幼若状態の維持に働いていると考えられている。そこで、Baf60c の心臓での発現を制御する領域をクローニングし、Baf60c の発現が転写因

子 Sall4 によって抑制されること、また、変異型 Sall4 によって Sall4 の機能が打ち消されることを生体と培養細胞を用いて明らかにした。

j) 精神的ストレス（緊張・恐怖）による自律神経系への影響：

競技中の体温の変化は、骨格筋の運動によって起こる物理的かつ局所的な熱産生にとどまらず、精神的緊張からもたらされるストレス性の体温上昇を含んでおり、このストレス性体温上昇の脳内メカニズムの解明は、競技中のパフォーマンスの向上のため重要なテーマである。そこで、競技者が感じると思われる二つの精神的ストレス（周囲からのプレッシャーがもたらす精神的緊張、および「失敗するかもしれない」という恐怖）の脳内メカニズムを検討した。動物実験により、精神的緊張は体温や生体リズムを司る視床下部・背内側野に分布するニューロンの活動を増加させることが分かった。一方、恐怖ストレスは、視床下部より脳内では下位に位置する防衛反応のもう一つの中枢である中脳中心灰白質の活動を増加させることが分かった。

### 3. おわりに

今年度は研究分担者が個別に進めてきた研究について、相互の関連性が明らかになってきたため、その観点からいくつかの研究結果をまとめて報告した。これらの成果を総括すると、ほぼ予定通りの成果を得たと考える。次年度以降、ヒトを対象とした介入試験の実施を始め、着実に成果を積み上げたい。

#### <論文リスト>

1. Sakamoto A, Kato K, Hasegawa T, Ikeda S, An agonistic antibody to EphA2 exhibits antitumor effects on human melanoma cells. *Anticancer Res*, 38, 3273 (2018)
2. Narita Y, Tsutiya A, Nakano Y, Ashitomi M, Sato K, Hosono K, Kaneko T, Chen RD, Lee JR, Tseng YC, Hwang PP, Ohtani-Kaneko R, Androgen induced cellular proliferation, neurogenesis, and generation of GnRH3 neurons in the brain of mature female Mozambique tilapia, *Sci Rep*, Nov 15; 8(1): 16855 (2018) doi: 10.1038/s41598-018-35303-9

3. Iketani M, Sekimoto K, Igarashi T, Takahashi M, Komatsu M, Sakane I, Takahashi H, Kawaguchi H, Ohtani-Kaneko R, Ohsawa I, Administration of hydrogen-rich water prevents vascular aging of the aorta in LDL receptor-deficient mice, *Sci Rep*, Nov 14; 8(1): 16822 (2018) doi: 10.1038/s41598-018-35239-0

4. Yasuda H\*, Kojima N\*, Hanamura K, Yamazaki H, Sakimura K, Shirao T, Drebrin isoforms critically regulate NMDAR- and mGluR-dependent LTD induction, *Frontiers in Cellular Neurosci*, 12:330 (2018)  
\*equally contributed as a first author

5. Bohn T, Rapp S, Luther N, Klein M, Bruehl T-J, Kojima N et al., Tumor immunoevasion via acidosis dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages, *Nature Immunol*, 19:1319-1329 (2018)

6. Hanamura K, Kamata Y, Yamazaki H, Kojima N, Shirao T, Isoform-dependent regulation of drebrin dynamics in dendritic spines, *Neurosci*, 379:67-76 (2018)

7. Ishiuchi Y, Sato H, Komatsu N, Kawaguchi H, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Nedachi T, Identification of CCL5/RANTES as a novel contraction-reducible myokine in mouse skeletal muscle, *Cytokine*, 108:17-23 (2018)

8. Katano W, Moriyama Y, Takeuchi JK, Koshiba-Takeuchi K, Cardiac septation in heart development and evolution, *Dev Growth Differ*, 61(1), 114-123 (2019)

9. Hori Y, Tanimoto Y, Takahashi S, Furukawa T, Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Important cardiac transcription factor genes are accompanied by bidirectional long non-coding RNAs, *BMC Genomics*, 19(1):967 (2018)

10. Moriyama Y, Koshiba-Takeuchi K, Significance of whole-genome duplications on the emergence of evolutionary novelties, *Brief Funct Genomics*, 17(5):329-338 (2018)