

Title	副腎摘出によるストレスとストレス蛋白(HSP 70)の検討
Author(s)	伊藤, 要子; 石口, 恒男; 綾川, 良雄
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 2002, 62(4), p. 161-167
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17441
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

副腎摘出によるストレスとストレス蛋白(HSP 70)の検討

伊藤 要子 石口 恒男 綾川 良雄

愛知医科大学放射線医学教室

Expression of Stress Protein (HSP 70) in Adrenalectomized Mice

Youko H. Itoh, Tsuneo Ishiguchi and Yoshio Ayakawa

We have already reported that the expression of HSP 70 in the adrenal gland was the most apparent among all organs in whole body-heated mice. In this paper, we examined the relation between the induction of HSP 70 and the adrenal gland using adrenalectomized mice.

The expression of HSP 70 in some organs of adrenalectomized mice was significantly lowered in comparison with control mice. Adrenalectomy attenuated whole body heating-induced HSP 70 induction in some organs. Low expression of HSP 70 in adrenalectomized mice was a result to high-mortality caused by endotoxin shock.

These results indicate that the adrenal gland plays an important role in the response to stress, leading to the induction of HSP 70.

Research Code No.: 401.3

Key words: HSP 70, Stress protein, Adrenalectomy, Hyperthermia, Endotoxin shock

Received Jan. 3, 2002; revision accepted Feb. 18, 2002
Dept. of Radiology Aichi Medical University

別刷請求先
〒480-1195 愛知県愛知郡長久手町21
愛知医科大学放射線医学教室
伊藤 要子

緒 言

細胞レベルでのストレスに対応して産生されるheat shock protein (HSP)は、細胞がさまざまなストレスにより傷害を受けたとき、その損傷を修復するため細胞内に産生される一群の蛋白である¹⁾⁻⁴⁾。このうち、HSP 70は温熱ストレスにより最も効果的に誘導され、その機能や機序についてもよく研究されている^{5),6)}。われわれは、従来より温熱ストレスとHSP 70の関連を検討してきた。そして、全身加温によるマウス各臓器でのHSP 70の発現において、副腎が最もHSP 70の発現が高いことを経験・報告してきた⁷⁾⁻⁹⁾。

一方、いわゆる、一般にストレスといわれる環境ストレスにおいては、物理的あるいは心理的にかかわらず、2つの反応、1つは交感神経緊張による副腎髄質からのカテコールアミン放出と、他の1つは視床下部-下垂体-副腎皮質系の活動亢進による副腎皮質ステロイドの分泌を亢進する。即ち、固体・社会レベルでのストレスにおいて副腎は重要な働きをしているとともに、細胞レベルでのストレス応答に対するストレス蛋白(HSP 70)の発現においても高い反応性を示す重要な臓器である。

そこで、副腎が全身におけるストレス蛋白(HSP 70)発現に及ぼす影響を検討するため、副腎摘出マウスを作成し、各臓器およびリンパ球でのストレス蛋白の発現、ストレス応答能を測定し、副腎とストレス蛋白(HSP 70)との関連を検討した。

実験材料および実験方法

1. 副腎摘出マウスの作成

動物は、ddY 6~8週齢の雌マウスを使用した。ネンブター麻酔下で、マウスを腹臥位に固定し、背側から両側腎の位置で切開し、副腎摘出用のピンセット(先端がリング状)を使用して両側の副腎を摘出した後縫合した。副腎摘出1, 3, 7, 14, 28日後に各4~5匹を解剖し、下大静脈よりヘパリン含有下で採血後、脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、胃、小腸、脾臓、腎臓、子宮、下肢骨格筋を摘出し、一部ホルマリン固定し、一部は-80℃で凍結保存した。対照群

では、同週齢のマウスを副腎摘出3日後と同日に解剖した。なお、実験動物は気温； $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ，湿度； $50 \pm 10\%$ ，照明；12時間照明，換気；16回/時間の条件の動物実験室にて愛知医科大学医学部動物実験に関する指針のもと実施した。

2. リンパ球分画の作成

ヘパリン添加で採血した血液0.5mLをリン酸生食緩衝液(PBS)で2倍に希釈し，それと同量のリンパ球分離液(セバレートL；MUTO PURE CHEMICALS Co.)を使用して2,000rpm，30分間室温で遠心し，リンパ球分画を採取し，PBSで2回洗浄して使用した。

3. HSP 70 のELISA法による蛋白定量^{10), 11)}

-80°C で凍結保存しておいた各臓器に10倍量の0.5% SDS [Sodium Lauryl Sulfate；(株)カーク]を加えホモジェネートした後，10,000 rpm 10分間遠心し，その上清の，またリンパ球分画については0.5% SDSを10倍量加えて，リンパ球を可溶化したリンパ球可溶物の蛋白量を測定(Protein Assay；BioRad)するとともにHSP 70の発現量をわれわれの開発したHSP 70 familyに対する抗体(Monoclonal HSP70 protein；Sigma)を使用したELISA法で定量した。

4. HE染色およびHSP 70免疫組織染色

ホルマリン固定した臓器は，パラフィン包埋レブロックを作成後，パラフィン切片を作成し，HE染色，およびHSP 70抗体(3.と同じ)を用いてHSP 70の免疫組織染色を実施した。

5. 副腎摘出および対照マウスの温熱ストレスによる各臓器のHSP 70の発現

副腎摘出28日後に，同週齢の対照マウスおよび副腎摘出マウス各群4匹をネブタールで麻酔し，動物用サーモトン(山本ビニター株)の直径50mmの電極を使用し，直腸温 40.5°C ($40 \sim 41^\circ\text{C}$)で30分間全身加温した。加温2日後に1に記載したごとくマウスを解剖し，血液を採取するとともに，各臓器を摘出し，2，3に示したごとくリンパ球および各臓器でのHSP 70の発現を測定した。

6. 副腎摘出マウスのエンドトキシンショック

副腎摘出7日後のマウスおよびそれと同週齢の対照マウス各群16匹に12mg/kgのLPS (LIPOPOLYSACCHARIDE；BE: coli 055, DIFCO LABORATORIES)を腹腔内注射し，エンドトキシンショックをおこさせ，それらの生存率を比較した。

7. データの統計処理

得られた結果は，mean \pm SDで表示し，統計処理はt検定(対のない検定)により行い，危険率 $p < 0.05$ 以下のものを有意差ありとした。

結 果

1. 副腎摘出3日後および対照マウスにおける各臓器のHSP 70の発現

副腎摘出3日後のマウスおよびそれと同週齢の対照マウスの各臓器におけるHSP 70の発現をFig. 1に示した。その結果，HSP 70の発現は，小腸を除くすべての臓器において，副腎摘出マウスのほうが対照マウスに比べ有意に低下していた。そして，腎臓，筋肉では中程度に，子宮，心臓，脾臓では高度に低下していた。なお，小腸においては有意差は得られなかったが，副腎摘出によりHSP 70の発現レベルは低下傾向を示していた。また，各臓器間の比較では，胸線，子宮，脳，小腸，などはHSP 70の発現レベルが比較的高値を示したのに対し，腎臓，肺では低値を示した。

2. 副腎摘出後の経時変化における副腎摘出マウスの各臓器のHSP 70の発現

副腎摘出，1，3，7，14，28日後における各臓器でのHSP 70の発現をFig. 2に示した。その結果，副腎摘出1日後においてはHSP 70の発現が他に比べ，高い傾向が示されたが有意差はなく，すべての臓器において，副腎摘出1～28日の間でHSP 70の有意な変化は認められなかった。

3. 温熱ストレスによる副腎摘出マウスのHSP 70の発現

副腎摘出28日後に直腸温 40.5°C で30分間全身加温し，加温2日後の各臓器におけるHSP 70の発現を，同週齢の非加温副腎摘出マウスのそれと比較した。その結果，Fig. 3に示したごとく，加温副腎摘出マウスと非加温副腎摘出マウスの両者において，HSP 70の発現レベルは全臓器において有意な変化は認められなかった。即ち，副腎摘出マウスにおいては，温熱ストレスによる有意なHSP 70の発現増強は認められなかった。

4. 副腎摘出マウスおよび対照マウスの温熱ストレスによる腎のHSP 70免疫染色

副腎摘出マウスと対照マウスにおいて直腸温 40.5°C で30分間全身加温による温熱ストレス時における腎でのHSP 70の発現をHSP 70に対する免疫染色で比較した。Fig. 4で示されたごとく対照群では温熱ストレスにより，腎全体にそして特に皮質と髄質境界部の尿細管上皮にHSP 70の発色の明らかな増強が認められたのに対し，副腎摘出マウスでは温熱ストレスによるHSP 70の発現による発色の増強は認められなかった。

5. 対照マウスおよび副腎摘出マウスのリンパ球のHSP 70の発現における摘出後の経時変化

Fig. 5に副腎摘出後の経時変化におけるリンパ球のHSP 70の発現量を示した。副腎摘出1，3，7，14，28日後のマウスのリンパ球は，対照マウスのリンパ球のHSP 70の発現量と

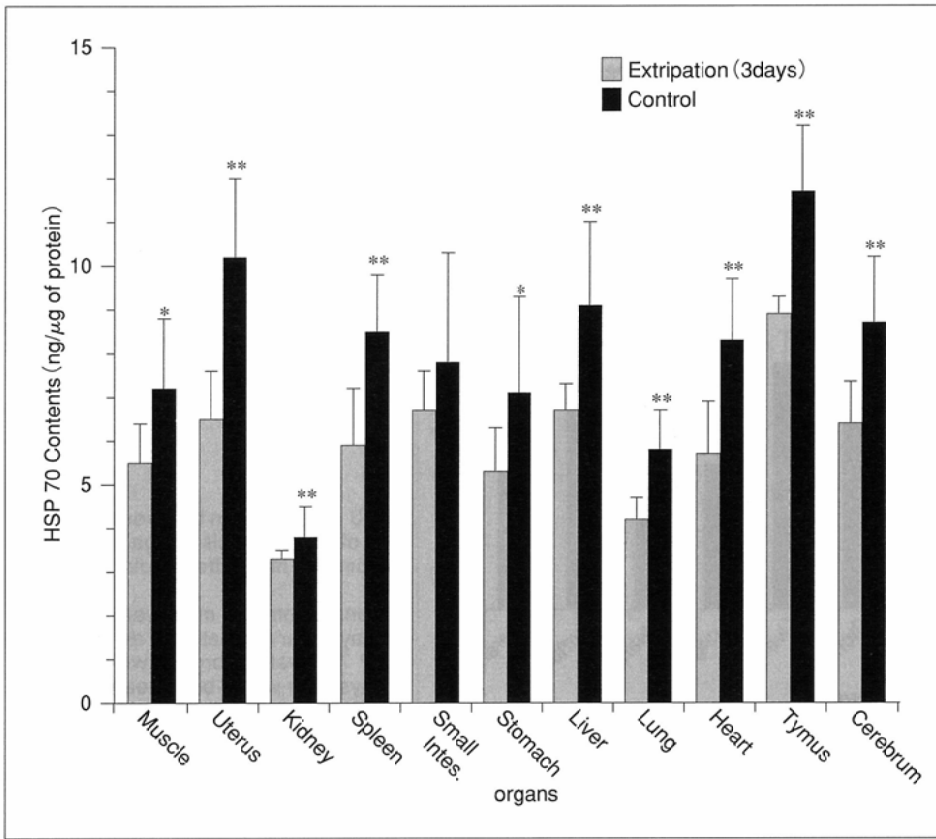


Fig. 1 Comparison between the expression of HSP 70 in organs of control and adrenalectomized mice. HSP 70 levels of organs were assayed 3days after extirpation of the adrenal gland. Details are described in materials and methods. Data represent the means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

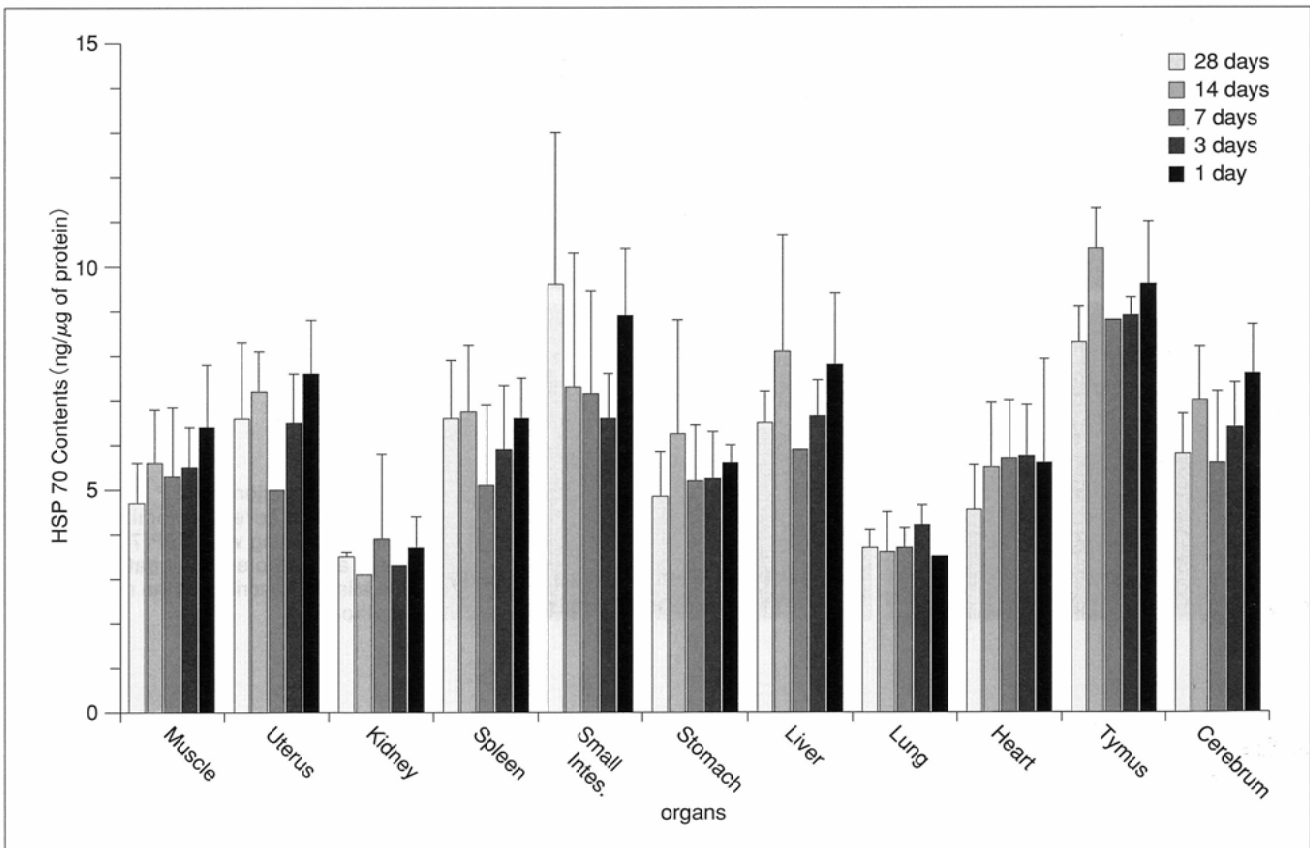


Fig. 2 Time-dependent expression of HSP 70 in some organs of adrenalectomized mice. HSP 70 levels of organs were assayed 1, 3, 7, 14 and 28 days after extirpation of the adrenal gland. Details are described in materials and methods. Data represent the means \pm SD.

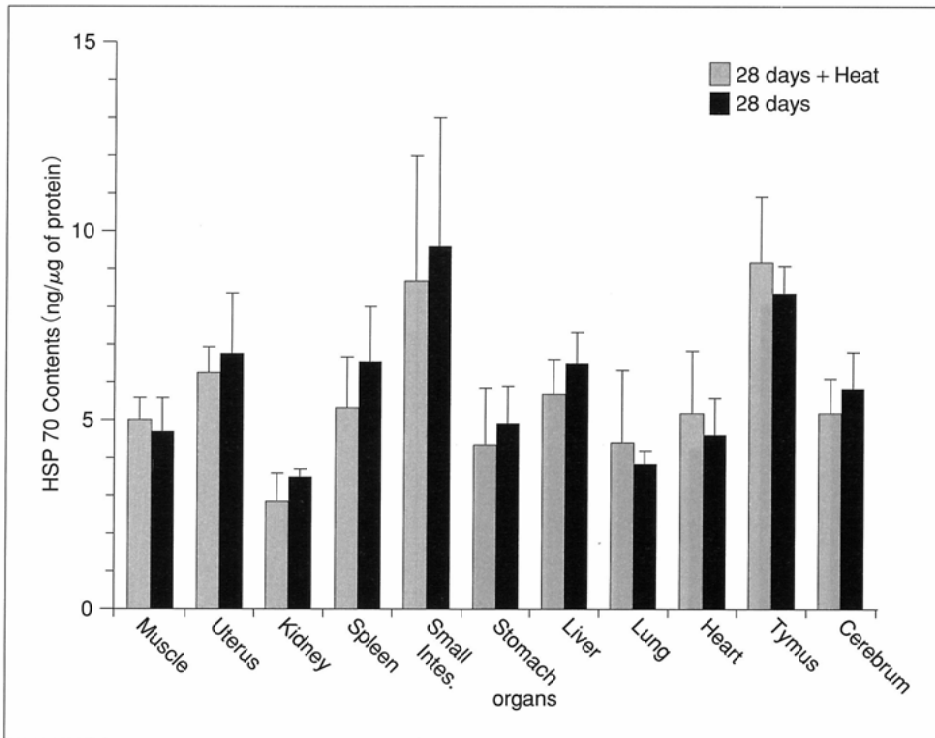


Fig. 3 Comparison between the expression of HSP 70 levels in organs of adrenalectomized mice after whole-body heating.

Adrenalectomized mice were heated on 28 days after extirpation of adrenal gland. HSP 70 levels of organs were assayed 2 days after whole-body heating. Details are described in materials and methods. Data represent the means \pm SD.

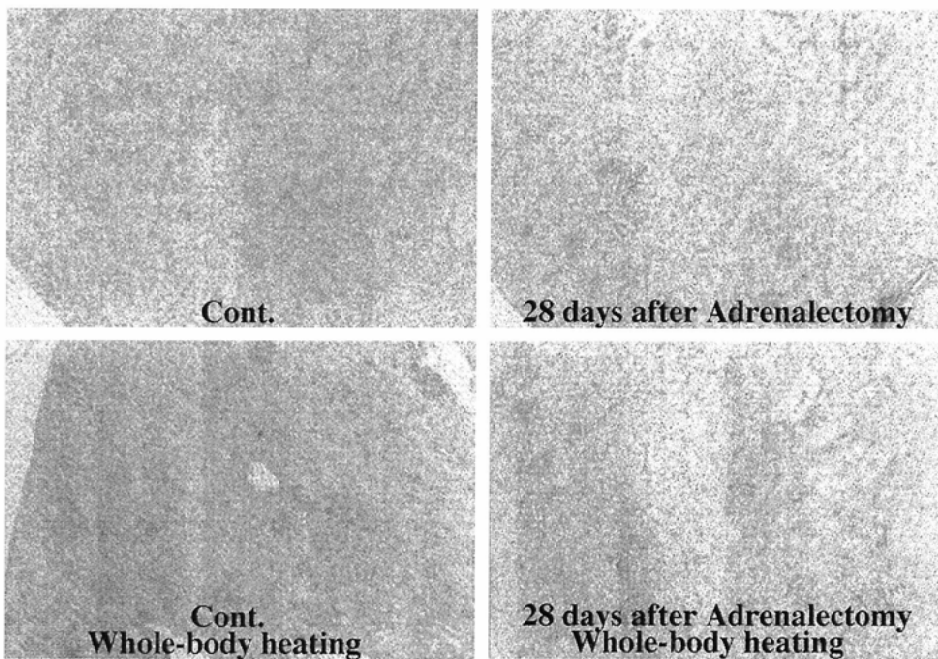


Fig. 4 Detection of HSP 70 in kidney of control and adrenalectomized mice by immunoblotting with HSP 70 antibody 2 days after whole-body heating. Details are described in the materials and methods.

有意な差を認めなかった。即ち、リンパ球のHSP 70においては、副腎摘出による有意な影響はなかった。

6. 対照マウスおよび副腎摘出マウスの温熱ストレスによる各リンパ球のHSP70の発現

副腎摘出28日後のマウスおよびそれと同週齢の対照マウ

スを直腸温40.5°Cで30分間全身加温した2日後において、対照マウスでは温熱ストレスによりリンパ球のHSP 70の発現は、有意な増加を認めた($p < 0.01$)。しかし、副腎摘出マウスにおいては温熱ストレスによりリンパ球のHSP 70の有意な増加を認めなかった(Fig. 6)。

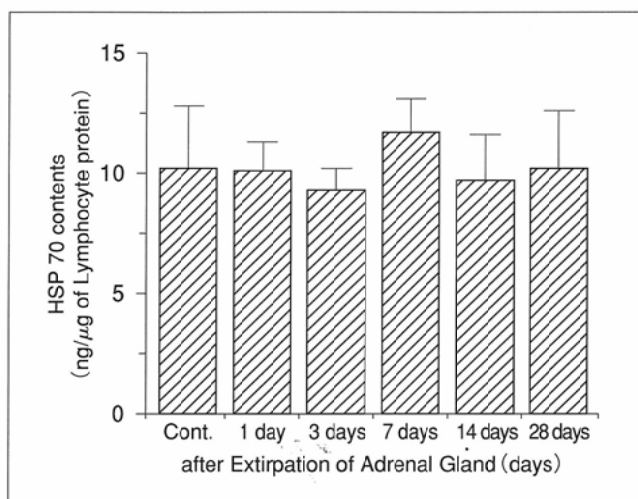


Fig. 5 Comparison between the expression of HSP 70 in lymphocytes of control and adrenalectomized mice. HSP 70 levels of lymphocytes were assayed 1, 3, 7, 14 and 28 days after extirpation of the adrenal gland. Details are described in materials and methods. Data represent means \pm SD.

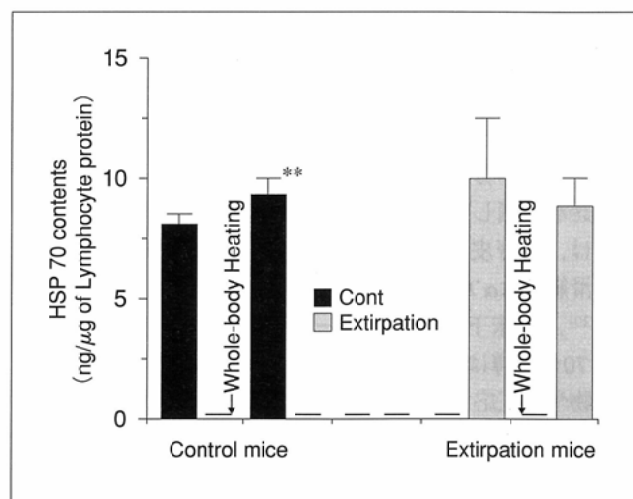


Fig. 6 Comparison between the expression of HSP 70 in lymphocytes of adrenalectomized mice after whole-body heating. Adrenalectomized mice were heated 28 days after extirpation of adrenal gland. HSP 70 levels of lymphocytes were assayed 2 days after whole-body heating. Details are described in materials and methods. Data represent means \pm SD. ** $p < 0.01$ compared with non-heated mice.

7. 対照マウスおよび副腎摘出マウスにおけるエンドトキシンショックに対する影響

副腎摘出7日後のマウスおよび同週齢の対照マウスにLPS 12mg/kgを腹腔内注射し、エンドトキシンショックをおこさせた。その結果、対照マウスでは8/16匹が死亡し、生存率が50%であった。これに対し、副腎摘出マウスでは16/16匹と全例が死亡し、生存率は0%であった。よって、副腎摘出によりストレス・ショックに感受性となったことが示された。

考 察

Ritossaは¹²⁾、ショウジョウバエを高温にさらすと新たなバフが一過性に出現することを認め、高温環境下で発現増加する蛋白をheat shock proteins (HSP)と名づけた。このようなHSPの誘導は大腸菌からヒトまで数多くの生物種に存在する¹³⁾。そして、温熱ストレスのみでなく、酸化剤、金属、虚血、飢餓、感染などさまざまなストレスで誘導されることから、ストレス蛋白とも呼ばれている¹⁴⁾。また、HSPはストレス時のみでなく、正常時においてもシャペロン蛋白¹⁵⁾、¹⁶⁾として蛋白質の生合成、細胞内移送、蛋白分解と生物の最も基本となる機能の担い手であるとともに、さまざまな細胞の環境ストレスに対して蛋白質の機能を維持する分子でもある¹⁶⁾。

このストレスによるHSPの誘導は、直接的な細胞内の蛋白変性(熱などによる)や異常蛋白の生成が誘導要因となる¹⁷⁾。Ananthanらは¹⁸⁾、ショウジョウバエのHSP 70遺伝子のプロモーターの下流につなげたレポーター遺伝子は、それのみでは発現しないが、変性蛋白を同時に入れると発現

誘導されることを報告している。

われわれは全身加温により、多くの臓器でHSP 70が有意に増加することを示し、特に副腎は最もHSP 70の発現が高いことを報告してきた⁵⁾⁻⁷⁾。続いて、胸腺、胃、十二指腸などストレス感受性の臓器においてもHSP 70の発現は高値を示した。そこで、ストレスによるHSP 70の誘導と副腎の関連を検討するため、両側副腎摘出マウスにおける各種臓器とリンパ球におけるHSP 70の発現および全身加温による各種臓器とリンパ球におけるHSP 70の誘導を正常マウスと比較検討した。さらに、エンドトキシンショックに対する影響を検討した。

その結果、副腎摘出3日後のマウスではすべての臓器において対照マウスに比しHSP 70の発現は低下していた(小腸は有意差を認めなかったが、減少傾向を示した)。また、副腎摘出後1~28日までの観察期間中において有意な増加または低下は認めなかった。よって、副腎摘出1日後からHSP 70の発現は低下し、その後も低下を維持しているものと思われた。しかし、リンパ球のHSP 70の発現は副腎摘出によっても変化しなかったことより、副腎摘出によるリンパ球系でのHSP 70への影響は低いと思われた。また、われわれは既にマウス全身加温により各臓器に有意なHSP 70の発現増加を認め報告してきた⁶⁾⁻⁸⁾。しかし、今回の副腎摘出マウスにおいては、全身加温による有意なHSP 70の発現増加がすべての臓器とリンパ球で観察されなかった。これらの結果より、温熱ストレスによるHSP 70の発現には副腎を介する系が存在することが示された。さらに、副腎摘出マウスではエンドトキシンショックに感受性で傷害が強く(死亡率が高い)認められたことは、ショックやストレスに対する生体防御としてのHSP 70の発現が、副腎摘出により低下

していたためと思われた。

一方、一般にストレスといわれる環境ストレスは、交感神経緊張による副腎髄質からのカテコールアミン放出と、視床下部-下垂体-副腎皮質系の活動亢進による副腎皮質ステロイドの分泌の亢進がある。これら神経系によるHSP 70の誘導に関しては、Udelsmanらは¹⁹⁾副腎皮質のHSP 70の誘導は、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を介しており、血管平滑筋では α アドレナリン受容体を介していると報告している²⁰⁾。視床下部-下垂体-副腎皮質系の活性化によるHSP 70の誘導は細胞・臓器のホメオスタシスの維持に重要な生物学的反応であり、Blakeらは²¹⁾、拘束ストレスによる副腎皮質のHSP 70の誘導が下垂体摘出ラットでは発現せず、ACTH投与により回復することから、ACTHは*in vivo*での副腎HSP 70発現の生理的レギュレーターであると報告しているが、温熱ストレスはACTHを介さなくてもHSP 70を発現すると述べている。また、副腎でのHSP 70の発現については多くの報告があり、ドーパミンは副腎および大動脈のHSP 70の発現を刺激するとの報告²²⁾、Blakeらは²³⁾コカインにより、Shimizuらは²⁴⁾温熱ストレスにより、と副腎でのHSP 70の発現を報告している。さらに、荘司らは²⁵⁾、焼死剖検例において、副腎は熱ストレスに対し最も強く反応する臓器の1つであると述べている。しかし、副腎摘出におけるHSP 70の誘導については報告は少なく、Lowyらは²⁶⁾副腎摘出によりカイニン酸により誘導されるHSP 70が減少すると報告しており、Cvoroらは²⁷⁾ラット肝サイトゾルのHSP 70 およびそのリン酸化は副腎摘出により減少すると報

告しており、われわれの結果をも含め副腎摘出によりHSP 70の発現は減少するものと考ええる。河合らも急性ストレス負荷時には、交感神経-副腎髄質を介したアドレナリン分泌が、胃粘膜にHSP 70の誘導シグナルを伝達していると報告している²⁸⁾。

ラット全身加温による各臓器間でのHSP 70 mRNAの発現については臓器間での発現様相の差違が報告²⁹⁾されている。われわれのマウスでの結果においても臓器によりHSP 70の発現には差があり、また副腎摘出によるHSP 70の発現レベルの低下にも臓器によりその程度に差違が認められた。

以上のごとく、種々のストレス(交感神経刺激、脳下垂体-視床下部-副腎系刺激および温熱ストレス刺激など)により副腎には強くHSP 70が誘導され、ストレス応答に重要な役割を果たしている。この副腎を摘出することにより、非ストレス時の各種臓器のHSP 70の発現レベルが低下するとともに、温熱ストレスによる有意なHSP 70の誘導は抑制され、エンドトキシンショックにも非常に感受性となり、生体防御能が低下した。よって、副腎は種々のストレス応答とHSP 70の発現において重要な役割を果たしていることが示された。

謝 辞

本研究の副腎摘出マウスの作成にあたって、御指導・協力いただいた愛知医科大学付属動物実験センター管理長 伊藤美武博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) Lindquist S, Craig EA: The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet* 22: 631-677, 1988
- 2) Lowenstein DH, Chan PH, Miles MF: The stress protein response in cultured neurons; characterization and evidence for a protective role in the excitotoxicity. *Neuron* 7: 1053-1060, 1991
- 3) Itoh YH, Noguchi R: Pre-treatment with mild whole-body heating prevents gastric ulcer induced by restraint and water-immersion stress in rats. *Int J Hyperthermia* 16: 183-191, 2000
- 4) Feder ME, Hofman EG: Heat-shock proteins, molecular chaperones, and stress response; evolutionary and ecological physiology. *Ann Rev Physiol* 61: 243-282, 1999
- 5) Landry J, Bernier D, Chre'tien P, et al: Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Research* 42: 2457-2461, 1982
- 6) 伊藤要子, 相原真理子, 小栗 隆, 他: 血管内皮細胞の温熱耐性とヒートショック蛋白(HSP 70). *日本医放会誌* 54: 1187-1189, 1994
- 7) 伊藤要子, 野口里恵, 綾川良雄, 他: 正常マウス全身加温による10臓器の温熱感受性とアポトーシスおよびその温熱耐性. *癌の臨床* 44: 181-182, 1998
- 8) 伊藤要子: 温熱療法の新しい臨床応用(予備加温療法). *放射線生物研究* 33: 381-398, 1998
- 9) 伊藤要子, 倉部輝久, 綾川良雄, 他: 加温により誘導したストレス蛋白(HSP 70)の生体防御作用. *日本医放会誌* 160: S 148, 2000
- 10) 菊池有純, 伊藤要子, 関 和子, 他: ストレス蛋白(HSP 70)のELISA法による定量. *臨床病理* 44: 351-354, 1996
- 11) 伊藤要子, 菊池有純, 森田松治郎, 他: 熱ショック蛋白(ストレス蛋白: HSP 70)広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査(1)-その数値をどう読むか-. *日本臨床* 57: 266-268, 1999
- 12) Ritossa F: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophira*. *Experientia* 18: 571-573, 1962
- 13) Shlesinger MJ, Ashburner M, Tissieres A, (Eds): Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.1-440, 1982
- 14) Subjeck JR, Shyy TT: Stress protein systems of mammalian cells. *American J Physiology* 250: C1-C17, 1986
- 15) Hartl FU: Molecular chaperons in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-580, 1996
- 16) Gorge L: Folding with two-stroke motor. *Nature* 388: 720-723, 1997
- 17) 矢原一郎: ストレス応答とストレス蛋白質. *生化学* 10: 1244-1261
- 18) Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R: Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232: 522-524, 1986
- 19) Udelsman R, Blake MJ, Stagg CA, et al: Endocrine control of stress-induced heat shock protein 70 expression in vivo. *Surgery* 115: 611-616, 1994
- 20) Udersman R, Li DG, Stagg CA, et al: Adrenergic regulation of adrenal and aortic heat shock protein. *Surgery* 116: 177-182, 1994
- 21) Blake MJ, Udelsman R, Feulner GJ, et al: Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: An adrenocorticotrophic hormone-sensitive, age-dependent response. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9873-9877, 1991
- 22) Blake MJ, Buckley DJ, Buckley AR: Dopaminergic regulation of heat shock protein-70 expression in adrenal gland and aorta. *Endocrinology* 132: 1063-1070, 1993
- 23) Blake MJ, Buckley AR, Buckley DJ, et al: Neural and endocrine mechanisms of cocaine-induced 70-kDa heat shock protein expression in aorta and adrenal gland. *J Pharmacology Exp Therapeutics* 268: 522-529, 1994
- 24) Shimizu K, Nomoto M, Ueta Y, et al: Selective expression of HSP 70-1 gene in the adrenal cortex but not in the medulla of thermally stressed rats. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 550-554, 1997
- 25) 荘司輝昭: 焼死剖検例における熱ショック蛋白質ユビキチンに関する免疫組織化学的検討. *日本法医学雑誌* 51: 70-76, 1997
- 26) Lowy MT, Wittenberg L, Novotney S: Adrenalectomy attenuates kainic acid-induced spectrin proteolysis and heat shock protein 70 induction in hippocampus and cortex. *J Neurochem* 63: 886-894, 1994
- 27) Cvoro A, Dundjerski J, Trajkovic D, et al: The level and phosphorylation of HSP 70 in the rat liver cytosol after adrenalectomy and hyperthermia. *Cell Biol Int* 23: 313-320, 1999
- 28) 河合智子, 六反一仁, 二川 健, 他: 急性ストレス負荷時の胃粘膜におけるストレス蛋白質の誘導メカニズムとその生理作用について. *cyto-protection & biology* 16: 13-16, 1998
- 29) Blake MJ, Gershon D, Fargnoli J, et al: Discordant expression of heat shock protein mRNAs as in tissues of heat-stressed rats. *J Biol Chemistry* 265: 15275-15278, 1990