

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08541

研究課題名(和文)敗血症性ショックにおけるオレキシンの新規中枢神経系制御機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of orexin on the brain in endotoxin shock

研究代表者

入鹿山 容子 (Irukayama, Yoko)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員

研究者番号：90312834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは敗血症性ショックモデルマウスに神経ペプチドであるオレキシンを末梢投与すると、全身性炎症状態で障害を受けた血液脳関門を通過し、中枢作用によりバイタルサイン(体温と心拍数)を回復することを見出した。また、オレキシンの生存率の改善効果に伴いカテコールアミンとコルチコステロンが増加し、炎症性サイトカインが減少することを見出した。オレキシンの標的部位の一つとして延髄縫線核セロトニンニューロンを同定した。オレキシンの効果は延髄縫線核セロトニンニューロンへの抑制性DREADDを用いた介入で抑制され、延髄縫線核セロトニンニューロンへの興奮性DREADDによる介入でバイタルサインの回復が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症の治療法の開発は重要な課題である。敗血症治療は、感染症に対する感染管理と、ショックに対する循環管理を中心とした末梢からのアプローチによるもので、未だに有効性は示されていない。オレキシンによる中枢神経系を標的とした治療法は、これらの病態に対して包括的にアプローチできる可能性がある。また既存の治療法とは作用部位が根本的に異なるために、既知の治療法との併用による相加・相乗効果が期待できる。さらに、オレキシンの標的部位としてのセロトニンニューロンの役割が解明されれば、新たな治療法開発へと繋がる。また、開発中の低分子量オレキシン受容体作動薬が新たな敗血症治療薬となる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Sepsis is a systemic inflammatory response to infection and can lead to a life-threatening medical emergency requiring intensive care. We found that peripheral administration of orexin penetrates the blood brain barrier and improves the survival of mice with lipopolysaccharide induced endotoxin shock. Orexin restored body temperature and cardiovascular function and decreased excessive cytokine production in mice under endotoxin shock. We detected serotonergic neurons in medullary raphe as the central target region of orexin. Then we confirmed that the inhibition of these neurons by inhibitory DREADD suppressed the orexin's thermoregulatory effect in mice with endotoxin shock. Furthermore, activation of serotonergic neurons helped restore body temperature and potentiated cardiovascular function in ePET1-Cre/FloxhM3 mice with septic shock. We concluded that peripheral administration of orexin activated the serotonergic system and helps the mice to survive and recover from septic shock.

研究分野：薬理学

キーワード：オレキシン 敗血症性ショック リポポリサッカライド DREADD 炎症性サイトカイン 体温

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、細菌による感染を発端として、細菌が産生するエンドトキシンなどの毒素が全身に広がり、臓器障害を伴うものを重症敗血症、循環不全を伴うものを敗血症性ショックと重篤化し、死亡率も増加する。主な臓器障害は急性循環不全、血液凝固異常である播種性血管内凝固症候群(DIC)、急性呼吸不全、急性腎・肝障害、敗血症関連脳症などがある。世界では年間2700万人が敗血症に罹患し、そのうち800万人が死亡する。日本においても年間約30万人が敗血症に罹患し、20~40%が死に至る。敗血症の治療法は、感染症に対する抗菌薬、ステロイド、循環不全に対する輸液、昇圧剤投与などが行われるが、死亡率改善を示すエビデンスを持つ治療法はなく、有効な治療法の開発が強く望まれていた。近年、神経内分泌(視床下部-下垂体-副腎系)と自律神経系などの中枢神経系による炎症反応制御機構が明らかにされてきた。オレキシンは睡眠・覚醒や摂食行動を制御する神経ペプチドとして発見されたが、神経内分泌系(視床下部-下垂体-副腎系)や自律神経系を活性化することから、中枢性炎症反応制御作用を持つことが示唆されている。我々は予備的実験で、敗血症性モデルマウスにオレキシンを末梢投与すると、全身性炎症状態で障害を受けた血液脳関門を通過し、中枢作用によりバイタルサインを安定化し、生存率を改善する効果を発見した。さらにオレキシンの標的部位の一つとして延髄縫線核セロトニンニューロンを同定した。

2. 研究の目的

本研究では敗血症性モデルマウスを用いて、オレキシンによる予防・治療効果のメカニズムを解明する

- 1) オレキシンの中枢性作用の検証
- 2) オレキシンの脳内標的部位の検証
- 3) DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs)を用いた薬理遺伝学的方法によりオレキシンの効果の検証
- 4) 抗炎症作用(炎症性サイトカインに対する効果・カテコールアミン、コルチコステロンに対する効果)

3. 研究の方法

オレキシンの中枢性作用の検証

マウスにエンドトキシンショックを誘発するために、ZT10.5(暗期開始1.5時間前)にLPS(10 mg/kg)を腹腔内(IP)注射した。オレキシンの中枢投与の効果調べるためには、ガイドカニューラを左側脳室に取り付けた。体温および心拍数をモニターするために、テレメトリプローブ(TA11TA-F10、Data Science International)を皮下に埋め込んだ。マウスは手術後1週間回復させた。中枢投与したオレキシンの効果を調べるために、まずLPS注射の30分前に麻酔下で3 µlの生理食塩水に溶解した0.06 mgのOXA(または、対照として3 µlの生理食塩水)を5分間でガイドカニューラを通して脳室内(ICV)投与し、輸液として200 µlの生理食塩水を含む浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、8 µl/時間の速度で投与を開始した。さらに、LPS注射と同時に、0.02 mg/µlのOXAを0.5 µl/時間の速度で24時間ICV投与を開始した。全ての生存率実験において、LPS注射後の7日間、体温をモニターした。

1) オレキシンの脳内標的部位の検証

LPSまたは生理食塩水注射の13.5時間後に、100 µlの生理食塩水に溶解した0.1 mg(30 nmol)のOXA(または、対照として100 µlの生理食塩水)を腹腔内投与した。OXAまたは生理食塩水投与の1.5時間後4%PFAで灌流固定した。脳の凍結切片は、ウサギ抗Fos抗体で一晩反応(4)後、二次抗体のビオチン化抗ウサギIgG抗体で1.5時間反応し、アビジン-ビオチン複合体(ABC溶液、Vector Labs)に30分間浸した。免疫反応性生成物の検出は、ニッケルとH₂O₂を加えたジアミノベンジジンを用いてFos陽性細胞の核を暗黒色で標識した。さらに、神経細胞の神経化学的特徴を同定するために、Fosの染色後、縫線核はヤギ抗5HT抗体で反応(4)した。二次抗体は抗ヤギIgG抗体を用いてさらにABC溶液に30分間浸した。免疫反応性生成物の検出は、ニッケルを加えないDABを用いて神経化学的特徴を示す細胞の細胞質を薄い褐色で標識した。核標識細胞(Fos陽性細胞)と細胞質標識細胞は、LSM700顕微鏡(Zeiss)で撮影した写真を用いて、3人の観察者によって盲検した。細胞質標識細胞および二重標識細胞を各領域の切片で数え、細胞質標識細胞中の二重標識細胞の割合を評価した。

2) DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs)を用いた薬理遺伝学的方法によりオレキシンの効果の検証

DREADDによる延髄縫線核セロトニン作動性ニューロンの抑制によるエンドトキシンショックにおけるオレキシンの一過性応答

6～8週齢のマウス（ePet-Cre および同腹野生型）の延髄縫線核に、AAV8-hSyn-DIO-hM4Di-mCherryをマイクロインジェクションした。実験後、mCherryおよび5HTの免疫組織化学によって、延髄縫線核におけるhM4Di発現の局在を可視化した。ウイルスのマイクロインジェクションの2週間後、体温を記録するためにテレメトリプローブをマウスの皮下に埋め込み、1週間回復させた。LPS注射の13.5時間後に、CNO（4.5 mg/kg）または生理食塩水をIP注射した。CNO注射の1.5時間後に、100 μ lの生理食塩水に溶解した0.1 mg（30 nmol）のOXAをIPボラス投与した。体温は、オレキシン投与後6時間測定した。さらに、ePET1-Creマウスとfloxed-hM3Dqマウスを交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作成し、同様に敗血症性ショックを引き起こしたのち、CNOにより体温上昇が見られるかを検討した。

3) 抗炎症作用（炎症性サイトカインに対する効果・カテコールアミン、コルチコステロンに対する効果）

1.と同様のマウスモデルでオレキシン投与後4時間、22時間後で採血し、マルチプレックスにてサイトカイン、ケモカインレベルを測定した。

4. 研究成果

敗血症性ショックモデルマウスに神経ペプチドであるオレキシンを末梢投与すると、オレキシンが全身性炎症状態で障害を受けた血液脳関門を通過しバイタルサイン（体温と心拍数）を回復することを見出した。この効果はオレキシンの脳室内投与によっても確認されたことから、オレキシンの中枢を介する作用であることが考えられた。神経活動の指標であるFosを用いた免疫組織学的手法による探索の結果、オレキシンによる体温の回復作用には延髄縫線核セロトニンニューロンが活性化されることが重要であることがわかった（Ogawa, Irukayama-Tomobe, eLife, 2016）。さらに延髄縫線核にウイルスをインジェクションする技術を確立し、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いて抑制性（hM4Di）DREADD（Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs）を発現させた場合に、オレキシンの体温上昇作用が消失することを確認した。次にePET1-Creマウスとfloxed-hM3Dqマウスを交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作成した。このマウスに敗血症性ショックを起こした後、CNO投与によりセロトニンニューロンを興奮させた結果、低下した体温の回復が認められた。今後はこのマウスに敗血症を引き起こし、延髄縫線核セロトニンニューロンを興奮させた場合に、生存率を改善できるかどうかを検討していく。また、オレキシンの生存率の改善効果に伴いカテコールアミンとコルチコステロンが増加し、炎症性サイトカインが減少することを見出した。このことからオレキシンの生存率改善には抗炎症作用も関連しているのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

1. Ohnishi S, Yamamoto N, Saitoh T, Kutsumura N, Nagumo Y, **Irukayama-Tomobe Y**, Ogawa Y, Ishikawa Y, Watanabe Y, Hayakawa D, Gouda H, Yanagisawa M, Nagase H. “Essential structure of orexin 1 receptor antagonist YNT-707, Part II: Drastic effect of the 14-hydroxy group on the orexin 1 receptor antagonistic activity” *Bioorg Med Chem Lett*. 2018 Feb 15;28(4):774-777. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.12.069. Epub 2017 Dec 30. Refereed
2. Yamamoto N, Ohnishi S, Okada T, Yata M, Saitoh T, Kutsumura N, Nagumo Y, **Irukayama-Tomobe Y**, Ogawa Y, Ishikawa Y, Watanabe Y, Hayakawa D, Gouda H, Yanagisawa M, Nagase H. “Essential structure of orexin 1 receptor antagonist YNT-707, Part I: Role of the 4,5-epoxy ring for binding with orexin 1 receptor” *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Jul 4;27(17):4176-9. pii: S0960-894X(17)30707-2. Refereed
3. **Irukayama-Tomobe Y***, Ogawa Y*, Tominaga H*, Ishikawa Y, Hosokawa N, Ambai S, Kawabe Y, Uchida S, Nakajima R, Saitoh T, Kanda T, Vogt K, **Sakurai T**, Nagase H, Yanagisawa M. “Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 May 30;114(22):5731-5736. (*equally first) Refereed
4. Nagase H, Yamamoto N, Yata M, Ohnishi S, Okada T, Saitoh T, Kutsumura N, Nagumo Y, **Irukayama-Tomobe Y**, Ishikawa Y, Ogawa Y, Hirayama S, Kuroda D, Watanabe Y, Gouda H, Yanagisawa M. “Design and Synthesis of Potent and Highly Selective Orexin1

Receptor Antagonists with a Morphinan Skeleton and Their Pharmacologies” *J Med Chem.* **2017** Feb 9;60(3):1018-1040. Refereed

5. Ogawa Y*, Irukayama-Tomobe Y*, Murakoshi N, Kiyama M, Ishikawa Y, Hosokawa N, Tominaga H, Uchida S, Kimura S, Kanuka M, Morita M, Hamada M, Takahashi S, Hayashi Y, Yanagisawa M. “Peripherally administered orexin improves survival of mice with endotoxin shock” *Elife* **2016** Dec 30;5. pii: **e21055**. doi:10.7554/eLife.21055. (*equally first) Refereed

〔雑誌論文〕(計 5件)

1. Uchida S, Irukayama-Tomobe Y, Ogawa Y, Yamaguchi T, Ishikawa Y, Sakurai K, Soya S, Saito T, Nagase H, Yanagisawa M, Sakurai T. “A synthetic orexin agonist improves inflammation-induced immobility through activating the medullary raphe nucleus” Neuroscience 2018 San Diego, San Diego Convention Center, **2018, November, Refereed • poster.**
2. 雨澤真櫻、堀内淳平、斉藤毅、大下隆一郎、石川有紀子、入鹿山容子、小川靖裕、長谷川恵美、南雲康行、山本直司、沓村憲樹、早川大地、渡邊友里江、合田浩明、櫻井武、柳沢正史、長瀬博 “1,3,5-Trioxazatriquinane 骨格を有するトリマーの合成とオレキシン受容体拮抗活性評価” 薬学会関東部会、**2018年, 9月 oral.**
3. Uchida S, Irukayama-Tomobe Y, Ogawa Y, Yamaguchi T, Ishikawa Y, Soya S, Saito T, Nagase H, Yanagisawa M, Sakurai T. “Orexin agonist improves inflammation-induced immobility” World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, Kyoto International Conference Center, **2018, July Refereed • oral.**
4. Takahashi E*, Enomoto K, Yamaguchi T, Ogawa Y, Fukusumi S, Kawai A, Akari M, Saitoh T, Nakagawa Y, Irukayama-Tomobe Y, Shimano H, Nagase H, Yanagisawa M. “Non-peptidic Orexin receptor type-2 agonist attenuates body weight gain of high-fat fed mice” The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society.* Kobe, Japan, **2018, July Refereed • poster.**
5. 石川有紀子、入鹿山容子、小川靖裕、斉藤毅、長瀬博、柳沢正史 “単一細胞レベルでのカルシウム反応計測における最適化条件の確立” 日本生理学会大会、**2018年, 3月, Refereed • poster.**
6. 山本直司、大類彩、岡田卓大、谷田誠浩、斉藤毅、沓村憲樹、南雲康行、入鹿山容子、小川靖裕、石川有紀子、平山重人、渡辺友里恵、早川大地、黒田大祐、合田浩明、柳沢正史、長瀬博 “モルヒナン骨格を有するオレキシン1受容体(OX₁R)特異的拮抗薬の設計・合成とOX₁R結合の活性立体配座” 第35回メディシナルケミストリーシンポジウム、名古屋大学豊田講堂(名古屋市)、2017年10月
7. 堀内淳平、大下隆一郎、南雲康行、山本直司、沓村憲樹、斉藤毅、入鹿山容子、石川有紀子、小川靖裕、柳沢正史、長瀬博 “キャップトリマー骨格を有するオレキシン受容体拮抗薬の設計・合成1” 第35回メディシナルケミストリーシンポジウム、名古屋大学豊田講堂(名古屋市)、2017年10月
8. 大下隆一郎、堀内淳平、南雲康行、山本直司、沓村憲樹、斉藤毅、入鹿山容子、石川有紀子、小川靖裕、柳沢正史、長瀬博 “キャップトリマー骨格を有するオレキシン受容体拮抗薬の設計・合成2” 第35回メディシナルケミストリーシンポジウム、名古屋大学豊田

講堂（名古屋市） 2017年10月

9. Ohru S, Yamamoto N, Yata M, Okada T, Saitoh T, Kutsumura N, Nagumo Y, Irukayama-Tomobe Y, Ishikawa Y, Ogawa Y, Hirayama S, Yanagisawa M, Nagase H “ Design and synthesis of orexin 1 receptor selective antagonists ” Tsukuba Global Science Week (TGSW) 2017, つくば国際会議場（つくば） 2017年9月
10. 大類彩、山本直司、岡田卓大、谷田誠浩、斉藤毅、沓村憲樹、南雲康行、入鹿山容子、石川有紀子、小川泰裕、渡邊友里恵、早川大地、合田浩明、柳沢正史、長瀬博 “ オレキシン1受容体拮抗薬 YNT-707 の必須構造部位検討 ” 第61回日本薬学会関東支部大会、慶應薬（東京） 2017年9月
11. 内田俊太郎、入鹿山容子、小川靖裕、富永拓、石川ゆい、木山麻衣子、斉藤毅、長瀬博、柳沢正史 “ 新規低分子量オレキシン受容体作動薬 YNT-185 の全身炎症後の活動回復作用の検討 ” 第90回日本薬理学会年会、長崎、2017年3月
12. 石川ゆい、村越伸行、入鹿山容子、小川靖裕、内田俊太郎、富永拓、田尻和子、長瀬博、柳沢正史 “ オレキシン高発現マウスにおける心筋梗塞の予後改善 ” 第90回日本薬理学会年会、長崎、2017年3月
13. 小川靖裕、入鹿山容子、富永拓、細川直人、斉藤毅、長瀬博、柳沢正史 “ 低分子量オレキシン2型作動薬 YNT-185 の組織学的、及び電気生理学的解析 ” 第90回日本薬理学会年会、長崎、2017年3月
14. 関知範、中嶋龍、斉藤毅、入鹿山容子、小川靖裕、石川有紀子、柳沢正史、長瀬博 “ YNT-707 の OX1R アンタゴニスト活性発現のための必須構造の検討 ” 第34回メディシナルケミストリーシンポジウム、つくば国際会議場（つくば市） 2016年12月
15. 大類彩、山本直司、谷田誠浩、岡田卓大、斉藤毅、沓村憲樹、南雲康行、入鹿山容子、石川有紀子、小川靖裕、平山重人、柳沢正史、長瀬博 “ モルヒナン骨格を有するオレキシン1受容体選択的拮抗薬の設計・合成とその薬理作用 ” 第34回メディシナルケミストリーシンポジウム、つくば国際会議場（つくば市） 2016年11月
16. 関知範、中嶋龍、斉藤毅、入鹿山容子、小川靖裕、石川有紀子、柳沢正史、長瀬博 “ YNT-707 の OX1R 拮抗作用発現のための必須構造の検討 ” 第60回日本薬学会関東支部大会、東京大学、2016年9月
17. 岡田卓大、山本直司、谷田誠浩、大類彩、斉藤毅、沓村憲樹、南雲康行、入鹿山容子、石川有紀子、小川靖裕、平山重人、柳沢正史、長瀬博 “ モルヒナン骨格を有する新規オレキシン1受容体選択的拮抗薬の設計・合成 ” 第60回日本薬学会関東支部大会、東京大学、2016年9月
18. 大類彩、山本直司、谷田誠浩、岡田卓大、斉藤毅、沓村憲樹、南雲康行、入鹿山容子、石川有紀子、小川靖裕、柳沢正史、長瀬博 “ モルヒナン骨格を有する新規オレキシン1受容体選択的拮抗薬の設計・合成 ” 第60回日本薬学会関東支部大会、東京大学、2016年9月

〔学会発表〕(計 20 件)

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201701271147.html

<https://wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/uploads/sites/2/2017/01/20170130.pdf>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 櫻井 武
ローマ字氏名： Takeshi Sakurai

所属研究機関名： 筑波大学

部局名： 医学医療系

職名： 教授

研究者番号（8桁）： 60251055

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 小川 靖裕
ローマ字氏名： Yasuhiro Ogawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。