

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08583

研究課題名(和文) アナパイレキシア(能動的な低体温)における熱産生抑制機構

研究課題名(英文) Central mechanisms of fever and anapyrexia

研究代表者

大坂 寿雅(Osaka, Toshimasa)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部・客員研究員

研究者番号：30152101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：発熱およびアナパイレキシアには視床下部の吻側腹内側視索前野におけるプロスタグランジン(PG)E2受容体が重要な役割を果たしていると考えられている。4種類存在するPGE2受容体サブタイプの何れがこの現象を担っているかについて麻酔下ラットを用いて調べた。EP3またはEP4受容体作動薬をこの部位に注入すると発熱反応が起き、EP3またはEP4受容体拮抗薬を前投与しておくことでPGE2発熱が減弱した。発熱にはこの部位のEP3およびEP4受容体の両方が関与しており、アナパイレキシアの一機構としてEP3またはEP4受容体のいずれかを抑制する機構が含まれる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発熱の最重要機構は免疫系の活性化により産生が促進されたプロスタグランジンE2が脳の視床下部に作用することと一般的に理解されている。その受容体サブタイプがEP3およびEP4の両方である可能性を本研究では見いだした。これまでの研究が示唆してきたEP3受容体の重要性を確認するとともに、EP4受容体が発熱およびアナパイレキシア機構において重要であるという可能性を脳によるエネルギー消費調節機構の理解にもたらし、解熱薬や抗肥満薬の作用点として新たな視点を提示するものである。

研究成果の概要(英文)：Prostaglandin E2 (PGE2) receptor subtypes that mediate fever and anapyrexia were examined in the rostral ventromedial preoptic area (rvmPOA) of the hypothalamus in anesthetized rats. The EP3 agonist sulprostone mimicked, whereas its antagonist L-798,106 reduced, the febrile effects of PGE2 microinjected into the same site. Similarly, the EP4 agonist rivenprost mimicked, whereas its antagonist ONO-AE3-208 reduced, the effects of PGE2 microinjected into the same site. In contrast, microinjection of the EP1 agonist iloprost induced a very small thermogenic effect but did not have significant influences on the heart rate and colonic temperature, whereas its antagonist, AH6809, did not affect the PGE2-induced responses. Microinjection of the EP2 agonist butaprost had no effect. The results suggest that the EP3 and EP4 receptor subtypes are both involved in the mechanisms of fever and anapyrexia in the rvmPOA.

研究分野：生理学

キーワード：発熱 熱産生 プロスタグランジンE2 ラット 体温調節

## 1. 研究開始当初の背景

アナパイレキシア(anapyrexia)とは熱放散促進と熱産生抑制とにより能動的に体温が低いレベルに調節される生理反応であり、能動的体温上昇である発熱とは正反対の現象である。アナパイレキシアは主に脳によって調節されており、様々な神経伝達物質の関与が報告されている。私は麻酔下で非動化したラットにおいて人工呼吸器の給気を通常大気から一時的に10%酸素90%窒素の混合ガスにすることにより熱放散促進と熱産生抑制をともなった低体温反応が再現性良く誘起されることを見いだした(Osaka, 2011)。低酸素刺激に対する熱放散増大反応の少なくとも一部は頸動脈小体の化学受容器からの求心性神経を介しており、視床下部吻側部の正中視索前野(rostral ventromedial preoptic area: rvmPOA)での1アドレナリン受容体の活性化と一酸化窒素(NO)放出を介していた(Osaka, 2010, 2011)。さらに、この部位から外側視索前野へのグルタミン酸作動性投射が熱放散促進を引き起こし(Osaka, 2012 a, b)、外側視索前野からは延髄の淡蒼縫線核・傍錐体路領域へのGABA作動性入力により皮膚交感神経プレモーターニューロンが抑制されることで熱放散が制御されていることが分かった(Osaka, 2014)。様々な原因によって発熱は誘起されるが、共通した最も重要な機構はrvmPOAでのプロスタグランジンE2(PGE2)受容体であることが知られている。ノルアドレナリンをrvmPOAに注入すると熱産生も低下するうえに、PGE2発熱も抑制され(Osaka, 2009, 2010)、NO放出薬の注入によって熱産生が低下し、NO合成酵素阻害薬の前投与によってノルアドレナリンによる熱産生低下も阻止されたので熱産生抑制もNOを介していた(Osaka, 2010)。しかし、低酸素刺激時に熱産生を抑制する経路は熱放散促進の場合とは異なって外側視索前野のグルタミン酸伝達機構は介していない(Osaka, 2012)。

これまでアナパイレキシア研究のほとんどが無麻酔動物で行われてきたのに対して、本研究では麻酔下動物での実験モデルを確立しており、麻酔下でなければ困難な実験操作ができることが強みである。アナパイレキシアでは熱放散促進と熱放散抑制とが協調的に制御されている。その神経機構は正常体温調節・発熱機構に作用することによると想定される。本研究ではこの想定を検証しつつ、平熱維持や発熱の神経機構をより詳しく理解する視点を獲得する意義があるという背景がある。

## 2. 研究の目的

発熱は様々な原因による炎症時や感染時における体温上昇反応であり、その共通の原因として免疫系の活性化現象としてインターロイキン1に代表されるようなサイトカインの誘導とそれに続く発熱の最終メディエータとされるPGE2の産生増加がおき、それが中枢神経系に作用することが発熱の最も根本的な機構であり、解熱機構にはその抑制過程が含まれていると考えられている。その中枢機構を明らかにするため、発熱におけるPGE2感受性の最も鋭敏な部位であるrvmPOAでのPGE2受容体のサブタイプを同定することを目的とした。

PGE2受容体は4つのサブタイプEP1, EP2, EP3, EP4が知られている。これらは元々は様々なサブタイプ選択的な作動薬や拮抗薬に対する反応に基づいて分類されていたが、後にこれらの遺伝子は全てクローニングされ、従来からの命名法が適切であったことが確認されている。このなかで、EP2受容体を除くEP1, EP3, EP4の3受容体のmRNAはrvmPOAで発現しているが、その分布パターンはこの部位の中で異なっている。PGE2受容体のなかで、EP3受容体が発熱の中枢機構において主な役割を果たしていることはよく知られている。例えば、EP3受容体欠損マウスでは発熱物質投与に対しての発熱反応が損なわれ、とりわけrvmPOA中の正中視索前核(MnPO)特異的にEP3受容体を欠損させたマウスでは発熱しないことが示されている。また、脳室内にEP3受容体作動薬を投与すると体温が上昇することも報告されている。EP3受容体を発現している細胞は遠心性に熱産生を増加させるとともに熱放散を抑制する遠心性体温調節機構を常時抑制しており、EP3受容体活性化による脱抑制によって発熱が誘起されると考えられてきた。しかしながら近年の研究によるとEP3受容体発現細胞の少なくとも一部はグルタミン酸作動性であり、興奮性に体温調節系に関わっているということも指摘されている。これらの報告はEP3受容体の重要性を支持してはいるが、その他のPGE2受容体の関与の可能性を排除するものではない。

EP4受容体に関してはインターロイキン1の静脈内投与によりEP4mRNAの上方調節および細胞活動活性化の指標であるFos様のタンパク質の免疫活性の上昇がrvmPOAを含むいくつかの脳領域の同一細胞でおきる。また、EP4受容体を発現するrvmPOAニューロンの大部分にはバクテリア由来の発熱物質であるlipopolysaccharide(LPS)を全身性に投与するとFosタンパク質が発現する。EP1受容体欠損マウスではLPS投与による高体温反応の最初期相が減弱し、EP1受容体作動薬をrvmPOAに注入すると高体温反応がおき、EP1受容体拮抗薬を脳室内にあらかじめ投与しておくことでrvmPOAにPGE2注入して誘起される高体温反応が抑制される。以上のような報告からPGE2発熱にはEP4受容体やEP1受容体も関与している可能性が示唆されている。

しかしながら、上述の受容体作動薬や拮抗薬の脳内微量注入の効果はPGE2に最も感受性の高い部位であるrvmPOAにおいて系統的に調べられてはいない。そこで、本研究では微量のPGE2の局所注入により熱産生の指標である全身の酸素消費率増大や、頻脈、体温上昇をおこす

rvmPOA の部位を同定した上で、同一の局所部位に PGE2 受容体作動薬や拮抗薬を微量注入することにより、発熱に関与する PGE2 受容体サブタイプを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

東京実験動物株式会社より購入したウイスター系雄ラット、体重 340-400g を室温 23℃、照明時刻 07800 から 1900 の飼育環境で、日本農産工業株式会社の固形飼料 MR stock および水道水を自由摂取させて、一週間以上飼育した後に実験に用いた。

環境空気にイソフルレンを 2-3%混入することでラットを導入麻醉し、大腿静脈にカニューレを挿入した後に、ウレタン(550 mg/kg)および クロラロース(55 mg/kg)を静脈内投与して深麻醉した。その後にイソフルレンは停止し、通常の空気呼吸に戻した。ラットは脳定位固定装置に頭部を固定した。結腸温度が 37℃程度になるように電気保温装置を用いた。始めの麻醉開始から 60-70 分後にウレタン(70-100 mg/kg/h)とクロラロース(7-10 mg/kg/h)の混液をシリンジポンプを用いて連続的に静脈内等して麻醉深度を維持した。ラットの頭蓋骨は十字縫合を中心として削り、直径 3-4 mm の大きさの穴を開けた。高周波パイポラー電気ピンセットを用いて開口部にある矢状静脈洞の吻および尾側部を閉塞し。その後に静脈洞中央を 2-3 mm の部分を除去することにより、正中部にガラスピペットを垂直刺入できるようにした。

ラットの頭部はフローズルー型のマスクで覆い、室内空気を 1 l/min の定速で換気した。マスクへの流入空気と流出空気との酸素濃度差を差動型酸素分析装置 (LC700E, 東レエンジニアリング)を用いて分析することにより、全身の酸素消費率を経時的に記録した。深部体温の指標としての結腸温度を肛門から 5 cm 程度挿入した熱電対センサーを用いて記録し、別の熱電対センサーを尾部中央側面に接着して尾部皮膚温度を測定して皮膚温度の代表とした。四肢に針電極を刺入して心電図を導出し、瞬時心拍計(AT-601G, 日本光電工業)を用いて R 波を検出することにより心拍数を求めた。全ての信号は PowerLab システム(ADInstruments, Australia)を介してコンピュータに 5 秒ごとに記録するとともにオンラインで LCD に表示した。実験後に、データは 1 分間隔の平均値を求めた。

全ての薬物は Cayman Chemical (MI, USA)から購入した。スルプロストン, リベンプロスト, イロプロスト, プタプロスト(free acid) はメチルアセテートに溶解されて供給されたが、この溶媒は窒素ガスを吹きかけて蒸発させ、エタノールで置換した。PGE2, L-798,106, ONO-AE3-208 (sodium salt)および AH6809 は結晶状態で供給されたが、これらは始めにエタノールで溶解した。全ての薬物は 10-50  $\mu$ l の量で分注し、-30℃で保管した。これらの薬物は使用日の朝に溶媒であるエタノールを窒素ガスを用いて揮発させた後に、生理食塩水に溶解した。ただし、L-798,106 は DMSO に溶解した後に生理食塩水で希釈したが、最終溶液は 10%DMSO を含んでいたもので、対照溶液として 10%DMSO を含む生理食塩水を用いた。他の薬物に関しては溶媒である生理食塩水は rvmPOA に微量注入しても記録している生理学的指標や PGE2 注入によって誘起される発熱反応に影響しないことを以前報告している(Osaka 2008)ので、今回は調べなかった。

先端部の外径が約 30  $\mu$ m の三連ガラス微小ピペットを用いて rvmPOA の同一部位に薬物を投与した。ピペットの各管には 8.4  $\mu$ M PGE2, 0.1 mM スルプロストン, 1.2 mM リベンプロスト, 0.4 mM プタプロスト, 0.9 mM イロプロスト, 0.4 mM ONO-AE3-208, 0.5 mM L-798,106, 0.4 mM AH6809, 10%DMSO または 2%アルシアン青の溶液を充填しており、圧投与システム(Picosprizer, General Valve, NJ, USA)を用いて 50 nl または 100 nl 注入した。注入部位は 420 fmol/50 nl PGE2 の注入により酸素消費率が投与前に比べて 50%以上増加した部位とした。PGE2 拮抗薬は PGE2 投与の 5 分前に注入した。薬物投与部位を組織学的に同定するために、実験終了時にガラスピペットにアルシアン青が含まれていた場合には、これを同部位に注入した。10%ホルマリンを頸動脈から灌流して脳を固定し、凍結マイクロトームを用いて厚さ 40  $\mu$ m の前額断切片を作成し、スライドガラスに載せた非染色の水濡れ状態の切片を顕微鏡に装着したデジタルカメラで撮影した。画像はアルシアン青が強調されるようにコンピュータ上で Canvas X 2018 (Canvas GFX, Inc., Canada)を用いて明度と彩度を調整した後に印刷のためにグレースケールに変換した。

データの統計解析は Sigma Plot version 14.0 (Systat Software, CA, USA)を使い、データの正規分布性は Shapiro-Wilk 検定、等分散性は Brown-Forsythe 検定を行った。データは平均  $\pm$  標準誤差で表し、有意差検定には繰り返し測定による分散分析法を用い、多重比較には Holm-Sidak 検定を行った。

### 4. 研究成果

EP3 作動薬スルプロストン 5 pmol/50 nl を微量注したところ、同部位に PGE2 を注入した場合と同様に投与時点での値に比べて酸素消費率、心拍数、体温がそれぞれ 5 分、3 分、8 分後には有意に上昇し、観測期間の 40 分後まで有意差があった。(F<sub>2,50</sub> = 25.0, 23.8 および 143.4 全ての項目で p < 0.001)。EP3 拮抗薬 L-798,106 (25 pmol/50 nl) を投与しても、それ自体では酸素消費率、心拍数、体温に影響はなかったが、その後に PGE2 を投与することによって誘起される反応は大きく減弱した。溶媒である 10%DMSO の投与では PGE2 反応に影響しなかった。

EP4 作動薬リベンプロスト 120 pmol/100 nl 投与によっても酸素消費率、心拍数、体温がそれぞれ 5 分、3 分、8 分後には有意に上昇した。(F3,50 = 21.6, 16.5 および 7.1 全ての項目で  $p < 0.001$ )。EP4 拮抗薬 ONO-AE3-208(20 pmol/50 nl)を投与した場合にもそれ自体では酸素消費率、心拍数、体温に影響はなかったが、その後に PGE2 を投与することによって誘起される反応は有意に減弱した。

EP1 作動薬イロプロスト(45 pmol/50 nl,  $n = 6$ )を投与すると酸素消費率が投与後 13-14 分の間に有意に上昇したが、心拍数と体温は変化しなかった。イロプロスト(90 pmol/100 nl,  $n = 3$ )投与では有意な変化は見られなかった。拮抗薬 AH6809 (20 pmol/50 nl)の投与では何ら反応はおきず、PGE2 による反応にも影響しなかった。

EP2 作動薬ブタプロストを 20 pmol ( $n = 4$ )または 40 pmol/100 nl ( $n = 3$ ) 投与しても酸素消費率、心拍数、体温に変化は生じなかった。

薬物投与部位に色素のアルシアン青を注入して組織学的に部位を検討したところ、投与中心は終板器官内またはそのごく近傍の rvmPOA にあったが、色素はしばしば脳室周囲部に拡散し、正中視索前核、視索前野腹内側核や視索前野の前腹側脳室周囲核にも色素は及んでいた。

PGE2 投与によって誘起される熱産生増大、頻脈、体温上昇と同じような反応が EP3 受容体作動薬のスルプロストンや EP4 受容体作動薬リベンプロストを PGE2 感受性部位に投与したときにも誘起された。また、EP3 受容体拮抗薬の L798,106 または EP4 受容体拮抗薬である ONO-AE3-208 を前投与しておくことで PGE2 による発熱反応は減弱した。したがって、PGE2 による発熱反応には EP3 受容体と EP4 受容体の両方が関与している可能性が考えられる。しかし、本実験に用いた受容体作動薬や拮抗薬は一つの種類の受容体サブタイプに完全に特異的な訳ではなく、他のサブタイプにもある程度は作用するので結果の解釈には慎重にならねばならない。視床下部の他部位の PGE2 受容体に関する研究に基づくと EP3 受容体は抑制性 GABA 作動性のシナプス前細胞に存在して、EP3 受容体の活性化により細胞内 cAMP 減少を介してその細胞活動を抑制することによるシナプス後細胞の脱抑制を介して発熱がおきることが考えられる。一方、EP4 受容体はシナプス後細胞に存在して、細胞内 cAMP 増大を介することによってそのニューロンの興奮により発熱が誘起されるとすれば、EP3 と EP4 受容体の両方が協調的に作用して PGE2 発熱をおこしていると考えすることは矛盾はない。したがって、アナパイレキシアの一機構として EP3 または EP4 受容体のいずれかを抑制する機構が含まれる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Toshimasa Osaka   | 4. 巻<br>494         |
| 2. 論文標題<br>The EP3 and EP4 Receptor Subtypes both Mediate the Fever-producing Effects of Prostaglandin E2 in the Rostral Ventromedial Preoptic Area of the Hypothalamus in Rats | 5. 発行年<br>2022年     |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience  | 6. 最初と最後の頁<br>25-37 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neuroscience.2022.05.001.  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|