

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0190

研究課題名（和文）性周期依存的な感染性低体温モデルマウスを用いた中枢性体温調節機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of central thermoregulatory system using mice with estrus stage-dependent infectious hypothermia

研究代表者

松脇 貴志（Matsuwaki, Takashi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：20447361

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳内熱源因子PGE2の誘導型合成酵素を欠損するマウスにおいて発情前期の雌特有に見られた、感染性体温低下の発生機構について検討した。その結果、脳内には感染時に活性化して体温を低下させる機構が雌雄に共通して存在すること、その神経回路の刺激への感受性はエストロゲンにより亢進されること、またこの機構ではIFN- γ が重要な働きを果たすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の体温低下制御機構に関する知見は、体温上昇すなわち発熱に関するそれと比較して圧倒的に不足している。一方で、低体温症は呼吸循環器系を始めとして全身性に重篤な悪影響をもたらすため、その制御機構の理解は学術的にも医学応用的にも極めて重要である。我々はこの機構の中核で働くIFN- γ と、機構の反応性を高めるエストロゲンという2つの重要な因子を特定しており、体温低下誘導機構の全容解明という目的に大きく近づいていると言える。さらに、我々が作製したmPGES-1 KOラットはマウスで得られた中枢性低体温制御機構に関する知見を神経内分泌学的により詳細に解析していく上で非常に有用なモデルであると期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism underlying the development of hypothermia induced by infectious stimuli, which was observed specifically in females in the proestrus period in mice lacking the inducible synthase of PGE2, a strong pyrogen in the brain. We found that a mechanism that is activated during infection and drives hypothermia exists in the brains of both sexes, that the sensitivity of the neural circuit to stimulation is enhanced by estrogen, and that IFN- γ plays an important role in this mechanism.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：低体温 エストロゲン プロスタグランジン

1. 研究開始当初の背景

温度は酵素活性や細胞増殖速度など様々な生理機能に影響を与えるため、正常な体温の維持は生体の恒常性にとって最も重要な因子の一つである。哺乳類の体温は、間脳視床下部を中心とした中枢神経系によって一定の温度で厳密に保たれている。しかし我々の体が感染や過度の緊張、ショックなどのストレスに曝された場合、この範囲外の体温上昇(発熱)もしくは低下が起こる。この現象は、中枢神経系には体温を上昇させる機構(発熱中枢)と低下させる機構(体温低下中枢)が存在することを示唆している。発熱中枢としてはすでに視床下部視索前野が同定されており、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) が視索前野に作用して体温が上昇することは古くから知られている。一方で体温低下中枢に関する研究は少なく、視床下部背側内核や青斑核などの候補は挙げられているが、統一した見解は得られていない。哺乳類の体温調節機構の詳細を明らかにするには、体温低下中枢とその活性化機構の解明が不可欠である。

本研究課題の共同研究先である Blomqvist グループは過去に、野生型 (WT) マウスに感染刺激として細菌毒リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) を投与すると、一過性の発熱を呈するが、PGE₂ の誘導型合成酵素 mPGES-1 の雄 KO マウスでは体温が変化しないことを報告している (Engblom *et al.*, 2003)。一方で申請者は近年、発情前期の雌 mPGES-1 KO マウスは、LPS 投与により強度の体温低下を呈することを見出した。発情前期以外の雌や雄のマウスではこのような体温低下は見られず、過去の報告の通り発熱が消失するにとどまった。これは体温低下中枢の存在を改めて支持する結果である。

これらの結果から、申請者は以下の仮説に至った。

- (1) 脳内には発熱中枢だけではなく体温低下中枢が存在し、両者は同時に活性化する。
- (2) 卵巣由来の因子が体温低下中枢の反応性を亢進させる。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では脳内体温低下中枢の活性化機構を明らかにすることで、体温の恒常性が維持される仕組みを解明することを目的とした。

3. 研究の方法：大きく分けて以下の4つの実験を実施した。

(1) 体温低下中枢の感受性を亢進させる卵巣由来因子の特定

発情前期は齧歯類の性周期中で最もエストロゲン濃度が高まる時期である。そこでまずは、mPGES-1 KO マウスの卵巣を摘出し、LPS を投与した際の体温変化を観察した。同様に、卵巣摘出マウスに発情前期と同等の高濃度エストロゲンを処置し、体温の LPS 反応性を確認した。さらに、雄動物にも潜在的に同様の機構が存在することを想定し、mPGES-1 KO 雄マウスにも同様のエストロゲン処置後に LPS を投与し、体温の変化を観察した。体温の測定には腹腔内埋め込み型のテレメーターを用い、埋め込み手術から1週間の回復期間を置いた後に実験に供し、1分毎に体温を測定した。板状の受信機上に飼育ケージを置くことで、無ストレス非拘束下で自由行動状態の動物の体温を測定することが可能である。本研究課題では、全ての体温測定実験でこのシステムを使用した。

(2) mPGES-1 KO ラットの作出

マウスと比較して性周期判別が簡便かつ正確に行うことが可能なラットで、mPGES-1 KO 動物を作製した。Exon2 を標的として CRISPR/Cas システムを利用したゲノム編集溶液を作成し、近年開発された受精卵の採取や移植を必要としない簡便な遺伝子組換え動物作製法である improved-Genome editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (*i*-GONAD) 法を用いて KO 動物を作出した。交配翌日の雌ラットの卵管を顕微鏡下で観察し、受精卵が滞留している膨大部に、ガラスピペットを用いてゲノム編集溶液を注入した。その後卵管膨大部全体に通電することで、受精卵へのゲノム編集液のエレクトロポレーションを実施した。卵巣および卵管を体内に戻して切開口を縫合し、妊娠を継続させた。出産で得られた F0 世代のラットの DNA の標的周囲領域について、PCR により変異の有無を確認した。

(3) 体温低下中枢に作用する感染刺激伝達物質の同定

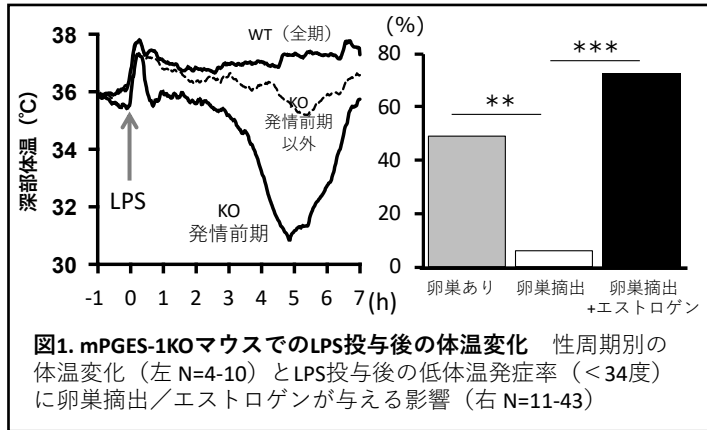
mPGES-1 KO 雌マウスに LPS を投与し、体温が低下した群と非低下群に分けて、体温の低下がピークを迎える LPS 投与 5 時間後で視床下部を採取した。次世代シーケンサーでの RNA シークエンスにより、採取した視床下部内での各遺伝子の発現量について、野生型マウスも加えた 3 群での比較を行った。特に変化が見られた因子について、二次スクリーニングとして saline 投与群も含めて qPCR による遺伝子発現量の解析を行った。

(4) 感染性体温低下機構におけるインターフェロン (IFN) - γ 1 の役割の検討

RNA シークエンスで得られた結果(次項参照)から、IFN- γ の役割に焦点を当て、研究を行った。IFN- γ の唯一の機能的受容体である 1 型受容体 (IFN- γ R1) について、全身性もしくは血管内皮細胞特異的に欠損するマウスを用い、これらの動物に LPS を投与して体温の変化を野生型マウスと比較した。

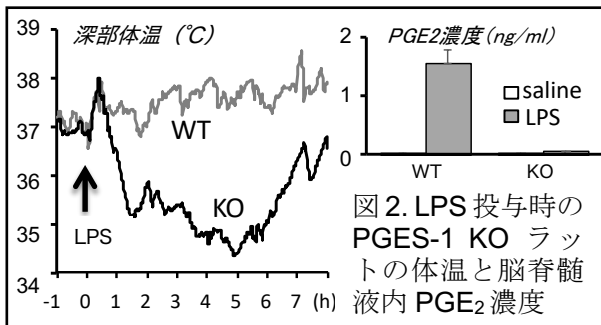
4. 研究成果

(1) 体温低下中枢の感受性を亢進させる卵巣由来因子の特定



mPGES-1 KOの雌マウスでは、LPS投与後に体温が34度を下回る個体の割合が卵巣摘出によって顕著に低下した。さらに、同KOマウスの卵巣摘出個体に発情前期と同等の高濃度エストロゲンを事前に処置した状態でLPSを投与すると、体温低下個体発生率が回復した。このことから、KOマウスにおける感染性低体温傾向はエストロゲンの血中濃度に依存することが明らかとなった。

(2) mPGES-1 KO ラットの作出



i-GONAD法を用いて、mPGES-1 KOラットを作製した。このラットではターゲットとしたexon2のスプライスアクセプター領域を欠損しているため、mRNAではexon2全領域が欠落している。

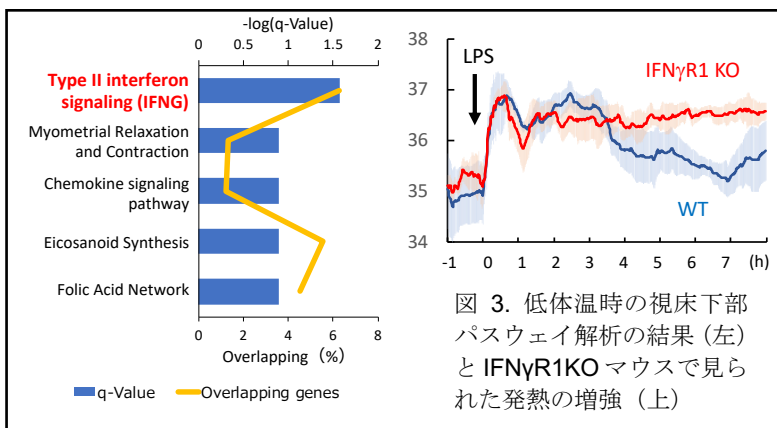
このラットにLPSを投与して体温および脳脊髄液内のPGE₂濃度の測定を行なった。その結果、KOマウスと同様な体温の低下が確認された。また、このラットではWTでLPS投与により誘導される脳脊髄液内PGE₂濃度上昇が消失していた。このことから、我々

が今回作製したmPGES-1 KOラットは確かに誘導性のPGE₂合成能を欠損していることが確かめられた。本ラットは性周期および内分泌的な環境に関連した感染性体温変化の制御機構を解析するための有用なモデル動物であると考えられる。

(3) 体温低下中枢に作用する感染刺激伝達物質の同定

既述の通り、間脳視床下部は中枢神経系の中でも体温制御に特に重要な働きをもつ領域であると考えられている。そこで本実験では、LPSを投与されたmPGES-1 KOマウスを体温が低下した群と変動しなかった群に分け、これにLPS投与で体温が上昇したWTマウスを加えた3群の動物について、体温低下上昇のいずれもピークを迎える、LPS投与5時間後の視床下部についてRNAシーケンスおよびその後の解析を行った。発現変動遺伝子を元に実行したパスウェイ解析の結果、WTマウスおよび低体温を示さなかったKOマウスと比較して、低体温を示したマウスではIFN γ シグナリングのパスウェイにおける遺伝子発現量の変化が有意に示された。そこで我々は感染性体温低下の制御機構におけるIFN γ の強い関与を想定し、受容体欠損動物を用いて4の実験を行った。

(4) 感染性体温低下機構におけるIFN- γ の役割の検討



全身性に機能的な受容体を欠損することでIFN γ シグナリングが働かないマウスにLPSを投与すると、発熱の強い亢進が観察された。さらに、非感染条件下で雄の野生型マウスにIFN γ を投与した結果、強度の体温低下が見られた。一方、血管内皮細胞特異的に同受容体を欠損するマウスでも、有意ではないものの同様の傾向が観察された。この実験については現段階では使用動物

物数が少ないため、追加実験を実施中である。

以上のように、本研究では脳内に感染時に活性化して体温を低下させる機構が存在すること、その神経回路の刺激への感受性はエストロゲンにより更新すること、またこの機構ではIFN- γ が重要な働きを果たすことを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 松脇貴志、大西正倫、藤澤彩乃、黒田万智、塩野谷紀聖子、Anders Blomqvist、片山幸枝、大松勉、水谷哲也、西原真杉、山内啓太郎
2. 発表標題 プロスタグランジンE2合成酵素遺伝子欠損マウスを用いた優位型感染性体温低下機構の検討
3. 学会等名 第164回 日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松脇貴志、大西正倫、山藤あかり、山内啓太郎
2. 発表標題 性周期依存的な感染性低体温モデルマウスを用いた中枢性体温調節機構の解析
3. 学会等名 第47回 日本神経内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuwaki T, Sando A, Kakuta S, Yamanouchi K.
2. 発表標題 Establishment of mPGES-1 deficient rats lacking LPS-inducible hyperthermia.
3. 学会等名 Society for Neuroscience, 50th annual meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuwaki T, Onishi M, Fujisawa A, Yamanouchi K, Blomqvist A, Nishihara M
2. 発表標題 Hypothermic responses under infectious condition depend on estrous stages in microsomal prostaglandin E synthase-1-deficient mice.
3. 学会等名 The 49th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2019), Chicago, Illinois, U.S.A (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田万智、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 神経細胞の興奮性調節に対するプログランニューリン及びIL-1の関与
3. 学会等名 第3回プログランニューリン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西正倫、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 プロスタグランジンE2合成酵素欠損マウスにおける性周期依存的な感染性低体温
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Matsuwaki, Kiseko Shionoya, Robert Ihnatko, Anna Eskilsson, Shigeru Kakuta, Sylvie Dufour, Markus Schwaninger, Ari Waisman, Werner Muller, Emmanuel Pinteaux, David Engblom, and Anders Blomqvist
2. 発表標題 Involvement of interleukin-1 receptors in sickness responses to lipopolysaccharide
3. 学会等名 11th FENS (Federation of European Neuroscience Society) Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Matsuwaki and Keitaro Yamanouchi
2. 発表標題 mPGES-1 deficient rats lack LPS-inducible suppression of pulsatile secretion of luteinizing hormone
3. 学会等名 FENS Forum 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	藤田 直己 (Fujita Naoki) (10554488)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教 (12601)	
研究 分担者	藤澤 彩乃 (Fujisawa Ayano) (10624885)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任助教 (12601)	

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			
その他の国・地域	国立台湾大学			