

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月 31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590225

研究課題名（和文） 環境ストレスによる情動および学習行動の変化と脳内グリア細胞の役割

研究課題名（英文） Changes in emotional and learning behavior evoked by environmental stress; role of microglia in the brain

研究代表者

片渕 俊彦（KATAFUCHI TOSHIHIKO）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80177401

研究成果の概要（和文）：

(1)末梢の感染ストレスによる疲労や学習行動障害が、ミクログリアの活性化を特異的に抑制するミノサイクリンによる抑制されること、(2)アストロサイトで IL-1 β がセロトニントランスポーターの発現を誘導すること、(3)海馬の IL-6 の過剰発現が学習障害の重要な要因であること、および(4)感染ストレスによって海馬や前頭前野へ β アミロイド蛋白が沈着することなどを示し、それらの機序について検討した。

研究成果の概要（英文）：

(1) Impairment of learning and memory and fatigue in rats induced by peripheral infection stresses were blocked by minocycline, which is known to suppress activation of microglia. (2) Application of IL-1 β to primary culture of rat astrocytes induces expression of serotonin transporters. (3) Poly I:C-induced impairment of water maze test in rats was due to IL-6, which expressed in the hippocampus. (4) Everyday injection of LPS (i.p.) in adult mice for 7 days induced accumulation of β amyloid protein in the hippocampus and prefrontal cortex, which was attenuated by co-application of plasmalogens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：感染インストレス、疲労、学習記憶、海馬、インターロイキン 1 β 、インターロイキン-6、poly I:C

1. 研究開始当初の背景

末梢での感染ストレスが脳内の神経炎症を惹起し、種々の高次脳機能障害を生じることが示唆されていたが、ウイルス感染モデルである polyriboinosinic:polyribocytidylic

acid (poly I:C) 投与、および細菌感染モデルである Lipopolysaccharide (LPS) 投与によっておこるグリア細胞の活性化と、学習記憶障害および疲労などの関連を詳細に検討した研究はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、感染ストレスによって惹起された情動や、学習行動への影響のメカニズムを、脳内におけるサイトカインの主たる産生源であるグリア細胞に焦点を当て、グリア細胞の活性化による神経炎症の発現機序を形態学および分子生物学的に明らかにし、グリア細胞と情動や学習行動との関連を行動学的に解析するとともに、初代培養グリア細胞を用いてこれらの機序を検討することであった。具体的には、以下の4項目について検討を行った。

- (1) poly I:Cによる疲労の発現機序における脳内ミクログリアの関与
- (2) 初代培養グリア細胞におけるセロトニントランスポーター (5-HTT)の発現機序
- (3) poly I:Cによる学習行動障害におけるIL-6の関与
- (4) LPSによる脳内βアミロイド蛋白の沈着とプラズマローゲン(P1s)による改善機序

3. 研究の方法

(1) poly I:Cによる疲労の発現機序における脳内ミクログリアの関与

感染ストレスモデルとして、合成2重鎖RNAであるpoly I:C (3 mg/kg)をラットに腹腔内投与し、1、3、6、12、24、48時間後にラットを灌流固定し、大脳皮質前頭前野の脳薄切片をミクログリアおよびアストロサイトのマーカーであるIba-1や、GFAPなど、およびサイトカインを免疫染色し、グリア細胞の活性化を検討した。また、これらの形態学的変化が、ミクログリアの活性化を特異的に抑制するミノサイクリンの前投与 (40 mg/kgを3日間連続腹腔内投与) によってどのように影響を受けるかを検討した。

(2) 初代培養グリア細胞における5-HTT発現機序

poly I:Cによる大脳皮質での5-HTT発現細胞とその機序を明らかにするため、新生児ラットの脳から初代培養したミクログリア、アストロサイト、および混合細胞系を用いて、検討した。

(3) poly I:Cによる学習行動障害におけるIL-6の関与

poly I:C (3 mg/kg)をラットに腹腔内投与し、24、48時間後に回避試験、恐怖消去試験、およびモリスの水迷路学習行動実験を行った。また、poly I:C投与24、48時間後にラットを灌流固定し、海馬のCA1や歯状回(DG)領域のミクログリアおよびアストロサイトの形態学的変化を観察した。さらに、poly I:C投与24時間後に脳を取り出し海馬領域のmRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRによってIL-1β、IL-6、IFN-α、TNF-α、c-fos mRNAの発現を定量した。また、poly I:C処

置3日前からミノサイクリン (MC) (40 mg/kg)を3日間連続で腹腔内投与し、その効果を検討した。最後にIL-6の中和抗体を側脳室に前投与し、poly I:Cによる水迷路学習障害に対する効果を検討した。

(4) LPSによる脳内βアミロイド蛋白の沈着とP1sによる改善機序

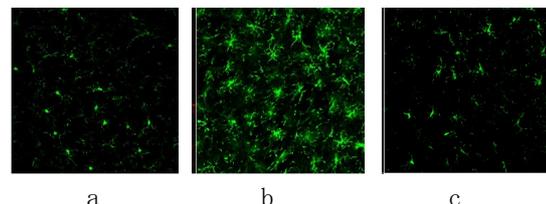
マウスにLPS (250 μg/kg)を7日間連続腹腔内投与し、前頭前野および海馬のミクログリアの形態学的変化、サイトカイン産生、βアミロイド蛋白の沈着、および膜リン脂質の一つであるP1sの含量の変化などについて検討し、さらにこれらの変化に対するP1sの末梢投与の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) poly I:Cによる疲労の発現機序における脳内ミクログリアの関与

本研究では、合成2重鎖RNAであるpoly I:Cをラットに末梢投与すると、回転かごによる自発運動量が数日間低下し、その機序として前頭前野の5-HTTの過剰発現とその機能亢進による皮質内のセロトニン (5-HT)濃度の低下が考えられることを報告している (Katafuchi et al., 2003, 2005)。本研究では、poly I:C投与によって視床下部、前頭前野および海馬において、アメーバ状および肥大した活性化ミクログリアが多数見られ、またアストロサイトの活性化も観察された。この時、既に報告しているように、疲労や不安に関与する5-HTTの発現が増強していた。さらにさらにミクログリアでIL-1βの産生が増強していることが明らかになった。これらすべての変化は、ミクログリアの活性化を特異的に抑制するミノサイクリンの前投与によって抑制された(図1)。また、poly I:Cによる疲労や水迷路などの学習行動障害もミノサイクリンによって減弱した。以上から、感染ストレス時の脳内グリア細胞の活性化は、情動や学習への影響のメカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。

図1 poly I:Cによるミクログリアの活性化とミノサイクリン(MC)の前投与による抑制



a、対照群の大脳皮質前頭前野のミクログリア (Iba-1染色)

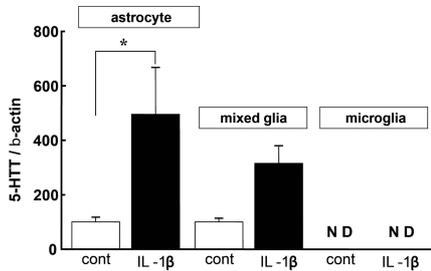
b、poly I:Cによるミクログリアの活性化

c、MCの前投与によるpoly I:Cによるミクログリア活性化の抑制

(2) 初代培養グリア細胞における 5-HTT 発現機序

poly I:C 投与で脳内で発言が増強することが明らかになっている IFN- α 、および IL-1 β (Katafuchi et al., 2003, 2005) をマイクログリア、アストロサイト、および混合細胞の初代培養系に直接投与したところ、アストロサイトに IL-1 β を投与した場合のみ、5-HTT 蛋白の発現が見られた(図 2)。IFN- α はいずれの細胞系においても 5-HTT を誘導しなかった。すでに述べたように、poly I:C 投与によって IL-1 β はマイクログリアで産生される。従って、poly I:C による 5-HTT の発現は、マイクログリアが産生した IL-1 β がアストロサイトに作用した結果であることが示唆された。

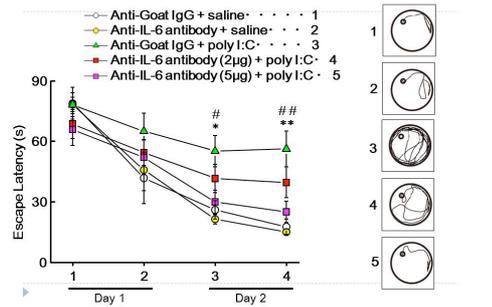
図 2 IL-1 β によるアストロサイトにおける 5-HTT の誘導



(3) poly I:C による学習行動障害における IL-6 の関与

poly I:C 投与によって海馬の CA1、DG 領域のグリア細胞の活性化とともに学習記憶障害が誘発された。これらはマイクログリアの活性化阻害剤であるミノサイクリンによって有意に抑制された。この時、海馬の IL-6 mRNA が有意に増加し、ミノサイクリン前処置によってその増加は有意に抑制された。しかし、IL-1 β および TNF- α 、IFN- α 、および c-fos の発現は増加しなかった。また、IL-6 の中和抗体を脳室内に前投与すると、水迷路試験において、poly I:C による学習障害、すなわち水面下のステージへの到達時間 (Escape Latency) の延長が短縮され、対照群の値に近づいた (図 3)。以上から、poly I:C による学習記憶障害のメカニズムとして、グリア細胞の活性化による IL-6 の発現増強が重要であることが示された。このことは IL-6 が海馬スライス標本における長期増強現象を抑制するという以前の報告(Li et al., 1997) と一致している。

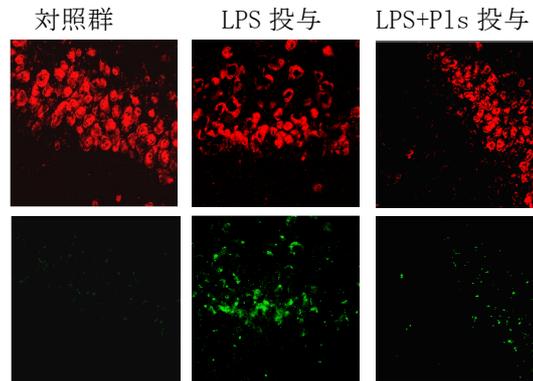
図 3 poly I:C による学習障害 (Escape Latency の延長) の IL-6 中和抗体脳室内前投与による改善



(4) LPS による脳内 β アミロイド蛋白の沈着とプラズマローゲンによる改善機序

マウスに LPS (250 μ /kg) を 7 日間連続腹腔内投与すると、海馬で β アミロイド蛋白 (A β) の沈着、IL-1 β と TNF- α の mRNA の発現増強、およびマイクログリアの活性化が惹起された。さらにこれらの反応は、膜脂質の一つであるプラズマローゲン (Pls) 末梢投与で完全に抑制された。図 4 は LPS 投与による海馬 CA1 領域の β アミロイド蛋白の沈着が Pls の同時投与により減少したことを示している。Pls はアルツハイマー病患者の脳内で減少していることが知られているが、本研究の LPS モデルにおいても脳内 Pls が減少し、Pls 投与によってそれが抑制されることを明らかにした。Pls のアルツハイマー病予防および治療薬としての可能性が示唆される。

図 4 LPS 投与による海馬 CA1 領域の β アミロイド蛋白の沈着と Pls 投与による沈着の減少



上段は NeuN 免疫染色による CA1 領域の錐体細胞を示し、下段は同じ切片の β アミロイド蛋白沈着を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Mawatari, S., Katafuchi, T., Miake, K. and Fujino, T. Dietary plasmalogen increases erythrocyte membrane

- plasmalogen in rats. *Lipids Health Dis.* 査読有 11: 161, 2012.
DOI: 10.1186/1476-511X-161
2. Ifuku, M., Katafuchi, T., Mawatari, S., Noda, M., Miake, K., Sugiyama, M. and Fujino, T. Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *J. Neuroinflammation* 査読有 9: 197, 2012.
DOI: 10.1186/1742-2094-9-197
 3. Katafuchi, T., Ifuku, M., Mawatari, S., Noda, M., Miake, K., Sugiyama, M. and Fujino, T. Effects of plasmalogens on systemic lipopolysaccharide-induced glial activation and β -amyloid accumulation in adult mice. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 査読有 1262: 85-92, 2012.
 4. Katafuchi, T. Hypothalamo-sympathetic modulation of splenic natural killer cell activity: an involvement of brain cytokines. *Adv. Neuroimmun. Biol.* 査読有 1: 63-69, 2011.
 5. Berczi, I. and Katafuchi, T. Introduction: advances in neuroimmune biology: a comprehensive way to look at biology. *Adv. Neuroimmun. Biol.* 査読有 1: 1-9, 2011.
 6. Yanagisawa, Y., Furue, H., Kawamata, T., Uta, D., Yamamoto, J., Furuse, S., Katafuchi, T., Imoto, K., Iwamoto, Y. and Yoshimura, M. Bone cancer induces a unique central sensitization through synaptic changes in a wide area of the spinal cord. *Mol. Pain* 査読有 6: 38-50, 2010.
DOI: 10.1186/1744-8069-6-38
 7. Uta, D., Furue, H., Pickering, A.E., Rashid, M.H., Mizuguchi-Takase, H., Katafuchi, T., Imoto, K. and Yoshimura, M. TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 査読有 31: 1960-1973, 2010.
 8. Maeda, A., Katafuchi, T., Oba, Y., Shiokawa, H. and Yoshimura, M. Enhancement of GABAergic tonic currents by midazolam and noradrenaline in rat substantia gelatinosa neurons *in vitro*. *Anesthesiology.* 査読有 113: 429-437, 2010.
 9. 片渕俊彦. 疲労と免疫. *CLINICAL NEUROSCIENCE.* 査読無 第 28 巻 第 2 号, 159-161, 2010.
 10. 片渕俊彦. 免疫学的疲労モデルにおける疲労の分子神経メカニズム. *最新・疲労の科学.* 別冊 医学のあゆみ, 査読無 27-31, 2010.
 11. 片渕俊彦, 井福正隆. 免疫学的疲労と脳内グリア細胞. *日本疲労学会誌* 査読有 第 5 巻 第 2 号, 30-34, 2010.
〔学会発表〕(計 5 件)
 1. 片渕俊彦, 井福正隆. 免疫学的疲労モデル動物における脳内炎症機序. シンポジウム「疲労の脳科学の最前線」第 8 回日本疲労学会総会・学術集会. *日本疲労学会誌* 第 8 巻第 1 号 p.15, 2012. 6月2-3日. (東京)
 2. Katafuchi, T., Ifuku, M, Fujino, T. and Shiro Mawatari. Plasmalogens attenuate lipopolysaccharide-induced b-amyloid accumulation in mice. Symposium session I, Cell signaling and information processing (1): The 10th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences. Program & Abstract p.12-13, 2012, February 17-19. (Gyeongju, Republic of Korea)
 3. Katafuchi, T., Ifuku, M. and Take, S. Neuroinflammation in an animal model of poly I:C-induced fatigue. Section 3: The brain in Neuroimmunomodulation. The 8th Congress of the International Society for Neuroimmunomodulation. Program p. 6, [NeuroImmunoModulation 18: 382, 2011] 2011, October 20-22. (Dresden, GERMANY)
 4. Katafuchi, T. Role of glial cells in immunologically induced fatigue. Plenary lecture. The III International Symposium: Interaction of the nervous and immune systems in health and disease. Abstract book p.26-27, 2011. June 7-June 10. (St. Petersburg, RUSSIA)
 5. Katafuchi, T., Ifuku, M., Take, S., Izumi, K., Otsubo, S. and Noda, M. Immunologically induced fatigue and glial cells. Symposium session I-3. Integration and brain function (1): The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Program & Abstracts p.20, 2010. November 25-28. (Kagoshima)
- 〔その他〕
ホームページ
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/physiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片渕 俊彦 (KATAFUCHI TOSHIHIKO)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80177401

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：