

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790271

研究課題名(和文) 遺伝子改変ラットを用いた発熱中枢ニューロンの多面的機能解析

研究課題名(英文) Multifaceted function analyses of fever-developing neurons using genetically modified rats

研究代表者

中村 佳子 (Nakamura, Yoshiko)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・研究員

研究者番号：60548543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：発熱惹起に関わる中枢機構の核心部の解明を目的とし、プロスタグランジンEP3受容体を発現する視索前野ニューロン(EP3ニューロン)の多面的解析を行った。トランスジェニックラットとウイルスを新規に作製することで、EP3ニューロン特異的に任意のレポーター遺伝子を発現させるシステムを構築することに成功した。このシステムを用いて、EP3ニューロンの脳内のすべての軸索投射先を同定した。また、EP3ニューロン特異的に光感受性チャネルを発現させ、その神経活動を光操作することで、褐色脂肪熱産生活動を変化させることに成功した。現在、EP3ニューロンの電気生理学的特性を、パッチクランプ法を用いて解析中である。

研究成果の概要(英文)：To reveal the core brain mechanism of fever development, I have performed multifaceted analyses of prostaglandin EP3 receptor-expressing neurons in the preoptic area (EP3 neurons), a center for fever development. By creating a novel transgenic rat and viruses, I established a system that allows us to specifically transduce EP3 neurons with a reporter gene. Using this system, I transduced EP3 neurons with a membrane-targeted form of GFP to visualize their axon fibers, and thereby, successfully identified all the brain regions where EP3 neurons project their axons. Also, by illuminating EP3 neurons transduced with channelrhodopsin, I was able to change thermogenic activity of brown adipose tissue in anesthetized rats. I am currently doing electrophysiological analyses of EP3 neurons in brain slices.

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：温熱生理学 生体恒常性 プロスタグランジン 発熱 視索前野 遺伝子改変動物 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

感染などによって惹起される発熱は、生体に備わった重要な生体防御反応である。病原体などの侵入によって活性化された免疫系からのシグナルによって、脳の血管内皮細胞がプロスタグランジン E_2 (PGE_2) を産生し、それが脳実質内に拡散して、視索前野と呼ばれる脳部位の神経細胞に発現するプロスタグランジン EP3 受容体に作用する(図1)。これが引き金となって遠心性の発熱指令が末梢の体温調節器官に伝達され、熱産生の亢進と体表面からの熱放散の抑制が生じ、体深部温の上昇(発熱)につながる。研究代表者らはこれまでに、*in vivo* 生理学と神経解剖学の技術を駆使し、視索前野からの発熱信号の遠心性神経伝達に関する中枢経路を明らかにした(図1)。しかし、この神経経路における最上位、視索前野の局所において、EP3 受容体発現ニューロンに PGE_2 が作用する際の詳細については、発熱の中核機構の核心部分であるにも関わらず、未解明である。

例えば、(1) 培養細胞を用いた実験から、EP3 受容体は主に抑制性の G 蛋白質に共役する代謝型受容体であることが報告されているが、生体内の、特に視索前野の EP3 受容体の活性化が神経細胞の活動に対し促進的に作用するのか抑制的に作用するのかは分かっていない。また、(2) 視索前野は発熱だけでなく、通常の体温調節の司令塔でもあり、脳内の局所温の上昇を感知して活動が亢進し、熱産生を抑制する温感受性ニューロンが分布する部位である。この通常の体温調節を司る温感受性ニューロンが EP3 受容体発現ニューロンと同一のものなのか別種なのかは、発熱メカニズムのみならず体温調節のメカニズムの研究にとっても重要な問題として世界の研究コミュニティで議論が展開されている。

そして、生体の恒常性維持や、感染などから生命を守る重要な仕組みは、視索前野を司令塔とする脳神経系で統御されているため、視索前野の局所神経メカニズムに関するこうした重要問題を解決することは、単に基礎医学的な見地にとどまらず、臨床医学的にも大きな意義を持つ。

2. 研究の目的

感染性発熱はよく知られた生体防御反応であるが、免疫シグナルを受けて脳で産生される発熱メディエーター、プロスタグランジン E_2 (PGE_2) が、発熱中枢である視索前野に作用する際、それがどのように発熱の神経回路の駆動につながるのかは全く分かっていない。本研究では遺伝子改変ラットを新規に作製し、電気生理学的、光遺伝学的、神経解剖学的手法を用いることで、視索前野のプロスタグランジン EP3 受容体発現ニューロンに PGE_2 の作用が、そのニューロンの活

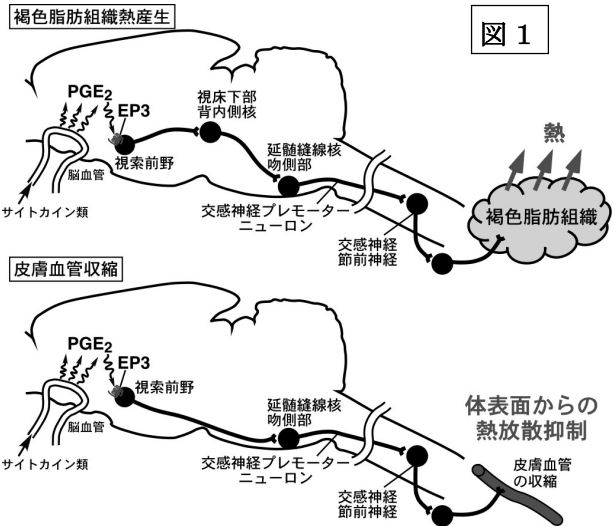


図 1

動にどのような変化をおよぼすのか、そして、そのニューロン特異的にその活動を光操作することで、発熱反応や通常の体温調節にどのような影響が出るのかを多面的に *in vivo* で解析する。こうして、視索前野局所における PGE_2 -EP3 受容体システムを介した、発熱惹起の引き金となる核心メカニズムを解明し、恒常性維持システムや免疫-脳連関の解明に寄与する。

3. 研究の方法

本研究では、(1) EP3 受容体発現細胞特異的にレポーター遺伝子を発現するトランスジェニックラットを作製する。(2) EP3 受容体発現ニューロン特異的に蛍光蛋白質を発現させた視索前野のスライスを用いたパッチクランプ法によって、その神経活動に対する PGE_2 の作用を調べる。また、(3) 視索前野の EP3 受容体発現ニューロン特異的に光感受性カチオンチャネルを発現させたラットの視索前野に光を照射して、感染性発熱反応や体温調節機能などに対する影響を *in vivo* で調べることにより、このニューロンの発熱や体温調節のメカニズムなどにおける機能的役割を同定し、視索前野においてこれらの生体調節機能を実現している局所神経メカニズムの動作原理を追求する。

4. 研究成果

本研究ではまず、視索前野の EP3 受容体発現ニューロンに特異的に任意のレポーター遺伝子を発現させることのできるシステムを構築するために、トランスジェニックラットの作製を行った。その結果6系統のトランスジェニックラットを得た。これらのラットの視索前野に、アデノ随伴ウイルスを感染させることで、EP3 受容体発現ニューロン特異的にレポーター遺伝子を発現させることを可能にする1系統を得ることができた。

このシステムでは、ウイルスで導入するレポーター遺伝子を変えることで、蛍光蛋白質だけでなく、光遺伝学実験に供するための光感受性チャネルなど、様々な蛋白質を発現させることが可能となる。そのため、こうしたレポーター遺伝子を発現させるための様々なウイルスの作製を行い、高タイトルのウイルスの作製に成功した。

この発現システムを用いて、視索前野の EP3 ニューロン特異的に、神経終末まで運ばれる蛍光タンパク質を発現させた。その結果、視索前野の EP3 ニューロンが軸索線維を投射するすべての脳領域を同定することに成功した。ここで同定した脳領域は、発熱のみならず、感染時に見られる他の様々な症状の発現にも関わる可能性がある。この結果をふまえて、今後の研究に発展させていきたい。

また、視索前野の EP3 ニューロン特異的にチャネルロドプシンなどの光感受性カチオンチャネルを発現させたラットの脳内へ麻酔下で光ファイバーを挿入し、視索前野へ光照射した。その際、血圧、体温、褐色脂肪組織の交感神経活動などを記録した。その結果、光刺激によって褐色脂肪組織の熱産生を変化させることに成功した。視索前野の EP3 ニューロン特異的にその神経活動を制御し、熱産生活動に変化をもたらすことに成功したことは、熱産生調節に視索前野の EP3 ニューロンが寄与することを示すものである。今後は、自由行動下の動物に対し、行動観察を含めて光操作実験を進め、より生理的条件下に近い状態でのこれらのニューロン群の役割を明らかにしていきたい。

さらに、視索前野の EP3 ニューロンの電気生理学的特性を解析する目的で、このニューロン特異的に蛍光蛋白質を発現させ、可視化した上で、脳スライスを作製し、パッチクランプ法によってこのニューロンの神経活動を計測している。この実験によって、PGE₂ が視索前野 EP3 ニューロンに作用した際にこのニューロンで生じる神経生理学的現象について解明を目指している。

これらの多面的な実験の結果を総合することで、発熱の鍵となる視索前野 EP3 ニューロンが感染の際に PGE₂ シグナルを受け取り、それが視索前野局所においてどのような神経回路メカニズムを作動させるのか、そしてその結果どのようにして視索前野から末梢へ発熱シグナルが出力されるのかのことが明らかになるであろう。また、この研究で得た知見をもとにさらに研究を進めることで、発熱の発生メカニズムのみならず、発熱に関連した様々な状態の解明にもつながると期待する。

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 2 件)

(1) Lkhagvasuren, B., Nakamura, Y., Oka, T., Sudo, N., & Nakamura, K.
Social defeat stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1442-1452, (2011) 査読あり

(2) Zhang, Z.-H., Yu, Y., Wei, S.-G., Nakamura, Y., Nakamura, K. & Felder, R.B.

EP3 receptors mediate PGE₂-induced hypothalamic paraventricular nucleus excitation and sympathetic activation. *Am. J. Physiol.* 301, H1559-H1569, (2011) 査読あり

[学会発表] (計 17 件)

(1) Nakamura, Y. & Nakamura, K.
Hypothalamic NPY-induced GABA inhibition of the rostral medullary raphe to inhibit sympathetic outflow to brown adipose tissue
第 91 回日本生理学会大会 2014 年 03 月 16 日 ~ 2014 年 03 月 18 日 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

(2) Nakamura, Y. & Nakamura, K.
視床下部ニューロペプチド Y による褐色脂肪熱産生の抑制機構
環境生理プレコングレス 2014 年 03 月 15 日 レインボー桜島 (鹿児島県鹿児島市)

(3) Nakamura, Y. & Nakamura, K.
視床下部室傍核のニューロペプチド Y が褐色脂肪熱産生を低下させる仕組み
温熱生理研究会 2013 年 09 月 05 日 ~ 2013 年 09 月 06 日 岡崎カンファレンスセンター (愛知県岡崎市)

(4) Nakamura, Y. & Nakamura, K.
視床下部室傍核のニューロペプチド Y は吻側延髄縫線核を GABA 抑制することで褐色脂肪熱産生を低下させる
日本肥満学会アディポサイエンス・シンポジウム 2013 年 08 月 24 日 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)

(5) Nakamura, Y. & Nakamura, K.
Neuropeptide Y in the paraventricular hypothalamic nucleus inhibits brown adipose tissue thermogenesis through GABA inhibition of the rostral medullary raphe
FASEB summer Research Conferences 2013 年 07 月 14 日 ~ 2013 年 07 月 19 日 Salishan Lodge (オレゴン 米国)

(6) Nakamura, Y., Hioki, H., Kataoka, N., Kaneko, T. & Nakamura, K.
Optogenetic stimulation of preoptic neurons inhibits brown adipose tissue sympathetic nerve activity
Experimental Biology 2013 2013 年 04 月 20 日 ~ 2013 年 04 月 24 日 Boston Convention and Exhibition Center (米国 ボストン)

(7) Nakamura, Y., Hioki, H., Kataoka, N., Kaneko, T. & Nakamura, K.
Optogenetic stimulation of neurons in the preoptic area inhibits metabolic heat production.
第 90 回日本生理学会大会 2013 年 03 月 27 日 ~ 2013 年 03 月 29 日 2012 年 10 月 13 日 ~ 2012 年 10 月 17 日

タワーホール船堀（東京都江戸川区）

(8) Nakamura, Y., Nakamura, K., Yanagawa, Y. & Morrison, S.F.

Medullary GABA neurons that inhibit sympathetic premotor neurons controlling brown adipose tissue thermogenesis.

2012 Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2012年10月13日～2012年10月17日 Ernest N. Morial Convention Center（米国ニューオーリンズ）

(9) Nakamura, Y. & Nakamura, K.

Preoptic regulation of body temperature and fever.

第35回日本神経科学大会(Neuroscience2012) (招待講演) 2012年09月18日～2012年09月21日 名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

(10) Oka, T., Lkhagvasuren, B., Nakamura, Y.

Hayashi, H. & Nakamura, K. Social defeat stress-induced hyperthermia is associated with neuronal activation of the dorsomedial hypothalamus.

第35回日本神経科学大会(Neuroscience2012) 2012年09月18日～2012年09月21日 名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

(11) Nakamura, K., Lkhagvasuren, B., Kataoka, N., Nakamura, Y. & Oka, T.

Social defeat stress-induced hyperthermia involves brown adipose tissue thermogenesis mediated by medullary raphe sympathetic premotor neurons.

The 4th International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation 2012年3月22～25日 Hotel Resort Ferradura (ブジ奥斯・ブラジル)

(12) Oka, T., Lkhagvasuren, B., Nakamura, Y. & Nakamura, K.

Social defeat stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region. (社会的敗北ストレスは延髄縫線核領域の交感神経プレモーターニューロンの活性化を介して体温上昇を生じる)

第34回日本神経科学大会(Neuroscience2011) 2011年9月14～17日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(13) Nakamura, K., Lkhagvasuren, B., Nakamura, Y., & Oka, T.

社会的敗北ストレスで活性化される体温調節性交感神経プレモーターニューロン平成23年度温熱生理研究会2011年9月1日～2日 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

(14) Nakamura, Y., Nakamura, K., Yanagawa, Y., Morrison, S.F.

体温調節性交感神経プレモーターニューロンの制御に関わる延髄GABAニューロン群の探索平成23年度温熱生理研究会2011年9月1日～2日 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

(15) Lkhagvasuren, B., Nakamura, Y., Oka, T., Sudo, N. & Nakamura, K.

Psychosocial stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region in rats.

The 21st World Congress on Psychosomatic Medicine (ICPM2011) 2011年8月25～28日 National Museum of Korea (ソウル・韓国)

(16) Nakamura, Y., Nakamura, K., Yanagawa, Y. & Morrison, S.F.

Medullary reticular GABAergic neurons that control brown adipose tissue thermogenesis through inhibition of sympathetic premotor neurons.

Brown Adipose Tissue 2011 Update シンポジウム「褐色脂肪研究の新展開」2011年6月18～19日 北海道大学獣医学部講堂(北海道札幌市)

(17) Nakamura, K., Battuvshin, L., Nakamura, Y., Oka, T.

Social defeat stress activates thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the rostral medullary raphe.

Experimental Biology 2011 2011年4月9～13日 ワシントンDC・米国

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/Nakamura/nakamura-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 佳子 (Yoshiko Nakamura)

研究者番号 : 60548543

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :