

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440174

研究課題名(和文) プロスタグランジンは冬眠する神経細胞を保護する

研究課題名(英文) Prostaglandin protects neurons in hibernation

研究代表者

山本 利春 (Yamamoto, Toshiharu)

神奈川県大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50111901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：寒冷暴露のストレスはマウス脳内の視床下部、特に室傍核のpERK免疫陽性細胞を増加させた。pERKは応答性神経細胞を標識する物質で、このことは、室傍核が寒冷に応答する脳領域の一つであることを示唆する。この領域の神経細胞はプロスタグランジン受容体のうちのE2受容体をも含み、このことは、プロスタグランジンがこれら神経細胞の作用に関係することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Low temperature increased numbers of pERK (one of markers to detect reactive neurons to stress) immunoreactive neurons in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. This result suggests that the hypothalamus is one of brain areas where cope with low temperature stress. These hypothalamic neurons also contained E2 (one of prostaglandin receptors) immunoreactive structures that suggests that prostaglandin affects the hypothalamic paraventricular neurons. Getting together, low temperature stress may be sensed in the hypothalamus where prostaglandin probably functions as a neurotransmitter and/or neuromodulator affecting the hypothalamus.

研究分野：神経解剖学

キーワード：冬眠 視床下部 プロスタグランジン

1. 研究開始当初の背景

冬眠する哺乳類には、体温が5℃までさがらるものと、そうでないものがある(Drew et al., 2007)。前者は体温が5℃という体内環境にもかかわらず神経細胞死は無い。この低温時の神経細胞保護作用のメカニズムは未だ解明されていない。これまで冬眠導入時、覚醒時にアデノシン、オピオイド、ヒスタミン神経系が関与する事が証明されている(Tamura et al., 2006)。一連の冬眠の課程における神経細胞の活性を c-fos をマーカーとしてみることにより、脳の中隔核、視床下部(特に弓状核、視交叉上核)、海馬が主要な役割を担っている(Morin and Storey, 2009; Drew et al., 2007)。また体液性因子として、血中オピオイド、冬眠導入ホルモンなるものの存在が提唱され、その関与が示唆されている(Ross and Drew, 2006)。しかし、これらのファクターは冬眠導入、ないしは覚醒を担うものであり、神経細胞保護それ自体を担うものでない。

低温冬眠は、脈拍の低下により、神経細胞が酸欠、エネルギー欠乏に陥る。この状況は脳虚血のそれと酷似している(Drew et al., 2007)。我々は、虚血に対し耐性を持つ歯状回において、プロスタグランジン合成の律速酵素である cyclooxygenase-2(Cox-2)が、低温脳虚血によって著明に増強することを発見した(Yamashita et al., 2007)。このことは、Cox-2の合成が神経細胞の耐性に関与し、それが温度依存性であることを示す。これまで、プロスタグランジンは神経毒性作用の局面から見られてきたが、近年このプロスタグランジンが神経細胞保護作用を持つことが証明された(Ahmad et al., 2005; Liang et al., 2005)。

2. 研究の目的

低温冬眠動物(シリアンハムスター)の冬眠導入期、冬眠期、途中覚醒期、覚醒期に

おける脳内プロスタグランジン神経系の動態を、形態学的、生化学的に解明し、神経細胞保護メカニズムのセンターを特定する。同時にプロスタグランジンの各種受容体の分布領域の変動を精査し、神経細胞保護センターの投射領域を明らかにする。

3. 研究の方法

実験動物としてはシリアンハムスターを使う。冬眠導入は常法によって、短日処理、それに続く低温短日処理によって導く。冬眠各時期の同定は、肛門温度、並びに活動性によって決定する。冬眠導入期、冬眠期、途中覚醒期、覚醒期における脳を免疫染色(抗Cox-2抗体を使用)し、プロスタグランジン神経系の形態学的動態を解析する。特に中隔核、視床下部、海馬に注目する。また、応答性神経細胞のマーカーとして pERK を検出することにより、冬眠の各時期の応答性神経細胞を明らかにする。同時に、プロスタグランジンの受容体のうちで、神経細胞保護作用が示唆されている E2 受容体の動向も同時に検出する。

以上の解析結果を基に、プロスタグランジンの神経細胞保護作用のセンターを同定し、その投射領域を明らかにする。

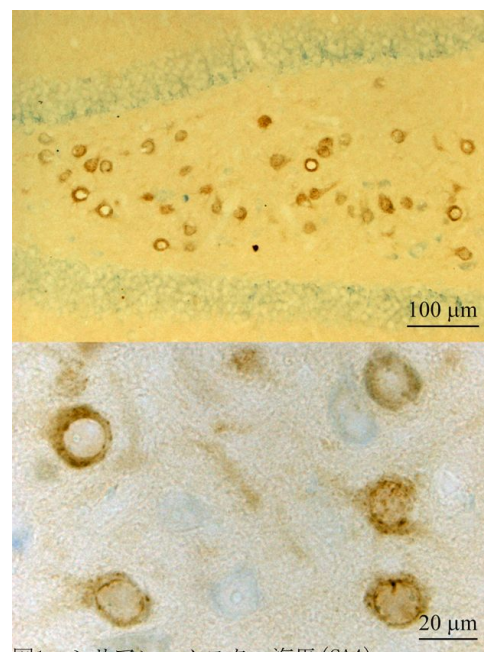


図1: シリアンハムスター海馬(CA4) Cox-2免疫陽性細胞

4. 研究成果

(1) シリアンハムスターの脳内 Cox-2 免疫陽性細胞の分布

Cox-2 免疫陽性細胞は、大脳皮質のうち 6 層構造を呈す新皮質では第 3 層に散在性に観察された。旧皮質に属す梨状葉にはより多数の Cox-2 免疫陽性細胞が観察された。最も多くみられるのは海馬複合体の中の歯状回、並びに CA4 領域であった(図 1 参照)。また、腹側 CA3 領域にも多数の Cox-2 免疫陽性細胞が観察された。これらの分布はほぼラットの脳内分布と同一であった。しかしながら、シリアンハムスターをコンスタントに人工的冬眠に誘導するのは困難を極めた。

(2) 寒冷暴露マウスの脳内応答性神経細胞の検出

外気温 4 °C の環境下に置いたマウスと、対照群を比較すると、寒冷化のマウスの脳では視床下部における pERK(応答性神経細胞のマーカーの一つ)免疫陽性細胞の増加が認められた。その増加は特に視床下部の室傍核において著明であった(図 2 参照)。これらの神経細胞体は大型で、室傍核の大細胞性領域に一致することが示唆された。

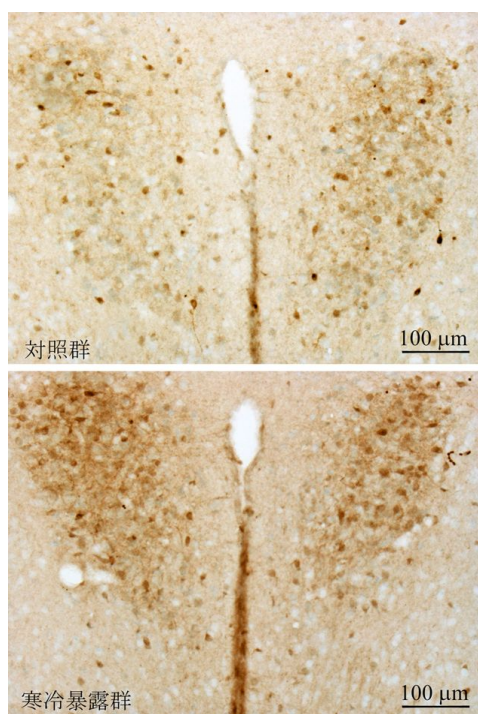


図2：マウス室傍核 pERK免疫陽性細胞

さらに、この室傍核の細胞はプロスタグランジン受容体のうち、細胞保護に関わる E2 受容体免疫陽性であり(図 3A 参照)、なおかつその神経細胞体周囲には E2 受容体免疫陽性神経終末を示唆する念珠状の神経線維が多数分布していた(図 3B 参照)。このことは視床下部室傍核が低温ストレスに応答する領域の一つであることが示唆される。また、E2 受容体が存在することは神経細胞保護への関連が示唆される。

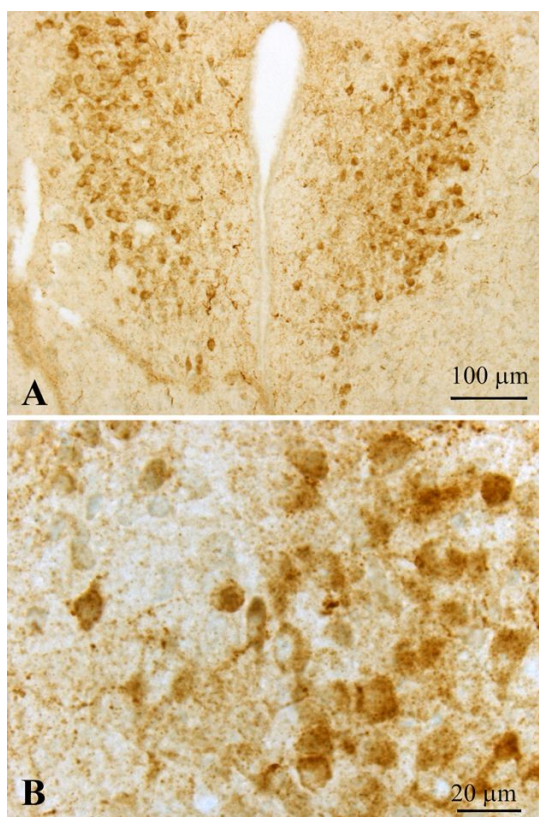


図3：マウス脳(室傍核) E2免疫陽性細胞

(3) ヒラオヤモリ脳内プロスタグランジン作動性神経系

小型哺乳類の人工的に安定した冬眠導入が極めて難しいため、実験動物を変温動物に変えた。まず、ヤモリの脳内プロスタグランジン作動性神経系の分布を明らかにした。

Cox-2 免疫陽性細胞は、視床下部の漏斗核に細胞体がみられ、興味深い点は Cox-2 免疫陽性神経線維も観察できる点である(図 4A 参照)。哺乳類では Cox-2 免疫陽性は細胞体と近位神経突起のみが標識される(図 1 参照)。

また、プロスタグランジン受容体のうちのE2受容体免疫陽性細胞も存在し、細胞体は室傍器官に、免疫陽性神経線維は視床下部全域に広がっていた(図 4B 参照)。このことはヤモリ脳を使って冬眠に関わるプロスタグランジン神経系の動態を解明することが可能であることを示唆する。

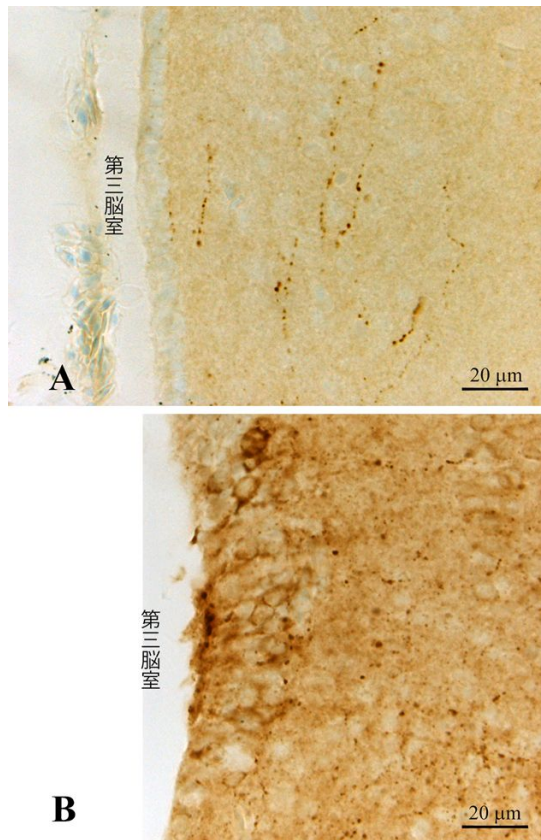


図4：ヤモリ脳内(視床下部)Cox-2(A)とE2(B)免疫陽性神経細胞及び線維

<引用文献>

Ahmad AS, Ahmad M, de Brum-Fernandes AJ, Dore S (2005) Prostaglandin EP4 receptor agonist protects against acute neurotoxicity. *Brain Res*, 1066: 71-77.

Drew KL, Buck CL, Barnes BM, Christian SL, Rasley BT, Harris MB (2007) Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *J Neurochem*, 102: 1713-1726.

Liang X, Wu L, Hand T, Andreasson K (2005) Prostaglandin D2 mediates neuronal protection via the DP1 receptor. *J Neurochem*, 92: 477-486.

Morin P, Storey KB (2009) Mammalian hibernation: differential gene expression and novel application of epigenetic controls. *Int J Dev Biol*,

53: 433-442.

Ross AP, Drew KL (2006) Potential for discovery of neuroprotective factors in serum and tissue from hibernating species. *Mini Rev Med Chem*, 6: 875-884.

Tamura Y, Monden M, Shintani M, Kawai A, Shiomi H (2006) Neuroprotective effects of hibernation-regulating substances against low-temperature-induced cell death in cultured hamster hippocampal neurons. *Brain Res*, 1108: 107-116.

Yamashita A, Kunimatsu T, Yamamoto T, Yoshida K (2007) Hypothermic, but not normothermic, ischemia causes a drastic increase in cyclooxygenase-2 immunoreactive granule cells in rat dentate gyrus after 4 hours of ischemic reperfusion. *Arch Histol Cytol*, 70: 197-205.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Kojo A, Yamada K, Yamamoto T (2016) Glucose transporter 5 (GLUT5)-like immunoreactivity is localized in subsets of neurons and glia in the rat brain. *J Chem Neuroanat*, 74: 55-70, doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.03.004, 査読有

Suzuki H, Yamamoto T (2016) Localization of amylin-like immunoreactivity in melanocyte-stimulating hormone-containing cells of the pars intermedia but not those of the pars distalis in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) pituitary. *Acta Histochem*, 118: 213-218, doi.org/10.1016/j.acthis.2016.01.001, 査読有

Mori D, Miyake H, Mizutani K, Shimpo K, Sonoda S, Yamamoto T, Fujiwara S, Kubo K (2016) Effects of occlusal disharmony on the hippocampal dentate gyrus in aged senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Arch Oral Biol*, 65: 95-101, doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.01.015, 査読有

Suzuki H, Yamamoto T (2015) CXCL14-like immunoreactivity exists in somatostatin-containing cells of mouse pancreas. *Acta Histochem Cytochem*, 48: 173-178, doi.10.1267/ahc.15016, 査読有

Yamada K, Narimatsu Y, Ono Y, Sasaguri K, Onozuka M, Kawata T, Yamamoto T (2015) Chewing suppresses the stress-induced increase in the number

of pERK-immunoreactive cells in the periaqueductal grey. *Neurosci Lett*, 599: 43-48, doi.org/10.1016/j.neulet.2015.5.023, 査読有

Suzuki H, Yamamoto T (2014) Leucine-enkephalin-like immunoreactivity is localized in luteinizing hormone-producing cells in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) pituitary. *Tissue Cell*, 46: 15-20, doi.org/10.1016/j.tice.2013.08.002, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 利春 (YAMAMOTO, Toshiharu)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50111901

(2) 連携研究者

鈴木 浩文 (SUZUKI, Hirofumi)
福岡教育大学・教育学部・教授
研究者番号：20304694