

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460322

研究課題名(和文)発熱時の脳内プロスタグランジンE2可視化によるその産生機構解明

研究課題名(英文)Visualization of prostaglandin E2 in the brain during fever

研究代表者

松村 潔 (Matsumura, Kiyoshi)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：10157349

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)：発熱メディエータ・プロスタグランジンE2(PGE2)を可視化し、脳出血による発熱のメカニズムを解明した。マウス脳出血発熱モデルで出血領域に高いPGE2陽性構造が認められた。このPGE2の一部はcyclooxygenase-1(COX-1)によって産生されていた。このCOX-1は出血領域で凝集した血小板に由来することが示唆された。COX-1の下流ではmicrosomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1)がPGE2産生に主要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに脳出血発熱にはPGE2非依存性の部分があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the molecular and cellular mechanism of fever following brain hemorrhage. Using a mouse model of brain hemorrhage fever, we confirmed that prostaglandin E2 (PGE2) was increased in the hemorrhaged region. This PGE2 production was dependent on cyclooxygenase-1 (COX-1). Aggregated platelets expressed high levels of COX-1 in the hemorrhaged region suggesting that platelets are involved in PGE2 production and fever following brain hemorrhage. In the downstream of COX-1, microsomal PGE synthase-1 (mPGES-1) played the major role in the production of PGE2. However, in some cases, fever was evident in the absence of PGE2 production. These results suggest that fever following brain hemorrhage involves PGE2-dependent and PGE2-independent mechanisms, the former being mediated by COX-1 and mPGES-1 pathway and the latter being due to the functional impairment of the thermoregulatory center.

研究分野：環境生理学

キーワード：脳出血 発熱 プロスタグランジン シクロオキシゲナーゼ 血小板

1. 研究開始当初の背景

脳出血などの脳血管障害時に発熱が頻発することはよく知られている。脳血管障害に伴う体温上昇はエネルギー需要を高め、脳組織のダメージを増大させる。そのためこの発熱のメカニズムを解明し、適切に制御することは医学的に重要な課題である。研究代表者らはこれまでにラット、マウスにおいて、脳出血による発熱（脳出血発熱）のメカニズムを研究してきた。それによると、脳出血発熱の少なくとも一部には脳内のプロスタグランジン E2 (PGE2) の産生が関わっていることを明らかにした。しかし PGE2 産生に関わる細胞、その分子機構については不明な点が多く残されている。また、脳出血発熱の全体が PGE2 で説明できるかも不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は次の3点である。

- (1) 脳出血時の PGE2 を免疫組織化学で可視化する。
- (2) 脳出血時の PGE2 産生に関わる酵素群を明らかにする。
- (3) 脳出血発熱の全体が PGE2 で説明できるか検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス脳出血発熱モデル

C57BL6 マウス（雄、8週齢）をペントバルビタールで麻酔し、腹腔内に体温測定用テレメータを留置した。一週間以上の回復期間後、マウスをフォールンで麻酔し、脳定位装置に固定した。コラゲナーゼ (Sigma Type VII, 200 U/mL, 0.3 μ L) を視索前野にマイクロシリンジにより 60 秒間で投与した。対照群には生理食塩水を同様に投与した。投与後 3 時間の体温変化分を積分し、発熱の指標 (Fever Index, FI) とした。

(2) 脳出血領域の PGE2 の可視化

コラゲナーゼ投与後 3 時間でマウスをフォールン麻酔、次いでペントバルビタール麻酔し、安楽死させた。左心室よりインドメタシンを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を注入し脱血、次いで 4% パラホルムアルデヒドを灌流し脳を固定した。凍結脳切片を作製し、ブロッッキング後、抗 PGE2 抗体 (abcam ab2318, 100 倍希釈) と 18 時間反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼポリマー標識 2 次抗体 (Vector, ImmPRESS Reagent) と 120 分反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼ基質 (Vector, ImmPRESS Vector RED) で発色させた。

(3) 脳出血領域の PGE2 の測定

コラゲナーゼ投与後 3 時間でマウスを上記と同様に安楽死させ、左心室よりイン

ドメタシン含有 PBS を灌流した。脳を取りだし、-60 に冷却したヘキサンで凍結させた。

クリオスタットにより脳の新鮮凍結切片を作成し、一部はスライドガラスに貼付け、一部はマイクロチューブに保管した。切片の溶解により PGE2 が合成されるのを防ぐため、マイクロチューブにはあらかじめ 30 μ M インドメタシン入りのエタノールを入れておいた。

マイクロチューブの脳切片を破砕し、遠心分離した。上清からエタノールを揮発させ残渣部分で EIA 法により PGE2 測定を行った。

(4) PGE2 合成系酵素の阻害剤

選択的 COX-1 阻害剤 (SC560) をコラゲナーゼ投与直後に腹腔内に投与した。SC560 は 5mg/100 μ L の濃度で DMSO に溶解し、10 mg/kg となるように投与した。25g のマウスの場合、5 μ L の投与容量となる。

(5) PGE2 合成系酵素欠損マウス

PGE2 合成の最終段階の酵素 microsomal PGE 合成酵素 (mPGES) 欠損マウス (オリエンタルバイオサービス) で、脳出血による発熱と脳内 PGE2 の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 脳出血時の PGE2 の可視化

脳出血領域では自家蛍光が高く蛍光免疫染色は適さなかった。また出血領域の赤血球が持つ酵素活性により、DAB が発色するので、通常 DAB を用いた酵素免疫染色も適さなかった。これらの問題を避けるため、アルカリフォスファターゼによる発色を行い、陽性の染色結果を得た (図 1)。

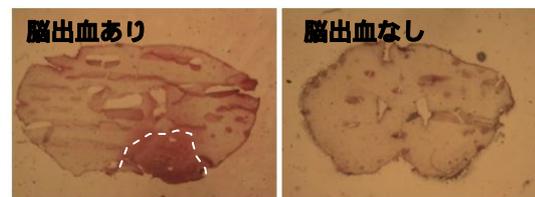


図 1 脳出血領域における PGE2 の免疫染色
左の図の破線が出血領域を示す。

図 1 左のように出血領域に対応して、強い PGE2 染色像が得られた。このような像は、1 次抗体を加えない場合には認められなかった。この結果から、脳出血領域特異的に PGE2 が増加することが明らかとなった。さらに高倍率で観察したところ、この PGE2 陽性像は明確な細胞構造とは対応せず、細胞外で広範囲に広がっていた。すなわち、細胞外に放出された PGE2 を検出している。そのため、PGE2 を産生する細胞の同定には至らなかった。

(2) 脳出血時の PGE2 産生に関わる酵素群

COX-1 の関与

これまでの研究で、脳出血発熱が非選択的 COX 阻害剤(ジクロフェナック、ケトプロフェン)により抑制されることが明らかとなった。しかし、選択的 COX-1 阻害剤(SC560)、選択的 COX-2 阻害剤(NS398)の単独投与および両阻害剤を混合投与は脳出血発熱に影響しなかった。これらの薬剤は疎水性が高く、生理食塩水をベースとした溶媒では懸濁状態となっている。そのため、生体での吸収が不十分であった可能性がある。そこで SC560 を DMSO に溶解し、5 μ L 程度の微量で投与した。その結果、溶媒の DMSO と比較して SC560 は脳出血発熱の指標(FI)と出血領域の PGE2 量を有意に低下させた(図 2)。

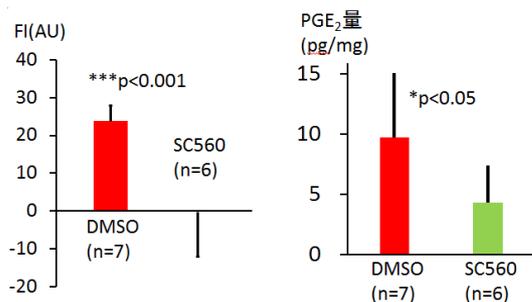


図 2 選択的 COX-1 阻害剤の脳出血発熱と出血領域 PGE2 量への効果。エラーバーは標準偏差

この結果は、脳出血発熱に関わる PGE2 産生を COX-1 が担っていることを示す。

COX-1 発現細胞の同定

脳出血領域における COX-1 発現細胞を明らかにするために、免疫組織化学を行った。脳には平常時からミクログリアが COX-1 を発現している。これに加えて、脳出血領域では形が不定で、大きさが 20~100 μ m の COX-1 陽性構造が散在していた(図 3 左)。この構造は von Willebrand factor (vWF) 陽性構造(図 3 中)とほぼ重なっていた(図 3 右)。

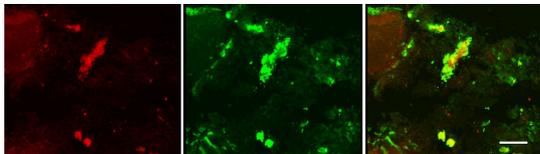


図 3 脳出血領域における COX-1(左)、von Willebrand Factor(中)とそれらの Merge 画像(右)。スケールバーは 50 μ m

vWF は血管内皮細胞と血小板のマーカーである。今回の vWF 陽性構造はその形状から血管内皮とは考えにくく、凝集した血小板と考えられる。

以上の結果は、脳出血領域での COX-1 を介した PGE2 産生に血小板が関わっていることを示す。

mPGES-1 の関与

PGES(PGE 合成酵素)は PGE2 合成の最後の段階の酵素である。PGES には複数のアイソザイムが存在する。その中で mPGES-1 が様々な組織で主要な役割を果たしていることが mPGES-1 遺伝子欠損マウス(mPGES-1 KO マウス)を用いた実験で明らかとなっている。感染性発熱モデルのマウスにおいても、mPGES-1 が発熱時の PGE2 産生に本質的である。そこで、mPGES-1 KO マウスを用いて脳出血発熱における mPGES-1 の関与を検討した(図 4)。

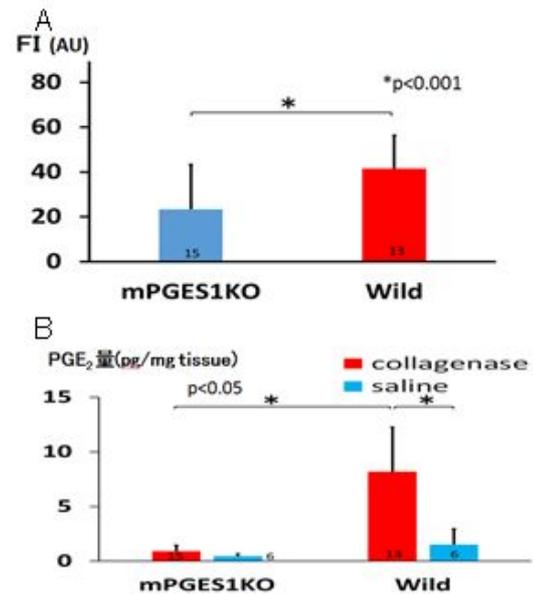


図 4 mPGES-1 KO マウスと Wild マウスの(A)脳出血発熱と(B)出血領域の PGE2

mPGES-1 KO マウスでは脳出血による PGE2 量の増加がほぼ完全に抑制された(図 4B)。一方、発熱の指標である FI は有意に抑制されたが、完全な抑制ではなかった。この結果は、脳出血領域の PGE2 産生には、mPGES-1 が主たる役割をはたしていること、脳出血発熱には PGE2 を介さない部分も含まれることを示す。

(3) 脳出血発熱の PGE2 非依存性部分

個々の mPGES-1 KO マウスと Wild マウスにおいて脳出血領域の大きさと FI の関係を調べた(図 5)。

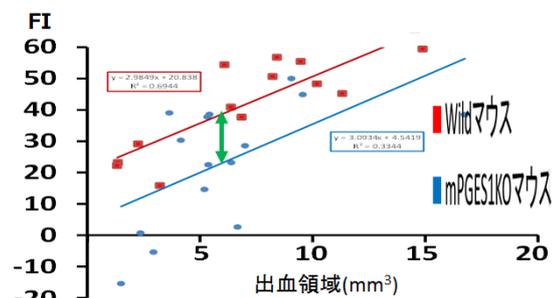


図 5 出血領域の大きさと FI の関係

mPGES-1 KO マウスと Wild マウス共に出血領域と FI は正比例の関係を示した。出血領域が小さい場合 (< 6mm³) は mPGES-1 KO マウスと Wild マウスの発熱の差は顕著であった。一方、脳出血領域がそれより大きい場合は両者に差はみられなかった。脳出血発熱は PGE2 依存性の部分と、PGE2 非依存性の部分があり、出血領域が大きい場合には後者が優勢になることを示唆する。

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)

Tsuchida K, Ibuki T, Matsumura K (2015) “Bromo-enol lactone, an inhibitor of calcium-independent phospholipase A₂, suppressed carrageenan-induced prostaglandin production and hyperalgesia in rat hind paw”, *Mediators of Inflammation*, 1-7, 査読有
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/605727>.

Hosotani R, Inoue W, Takemiya T, Yamagata K, Kobayashi S, Matsumura K (2015) “Prostaglandin transporter in the rat brain: its localization and induction by lipopolysaccharide”, *Temperature*, 2, 425-435, 査読有
<http://dx.doi.org/10.1080/23328940.2015.1062953>

[学会発表](計 7 件)

Mizutani R, Inoue T, Moriguchi K, Matsumura K, Activated brown adipose tissue shows nuclear accumulation of phosphor-nuclear factor kappa B-like immunoreactive protein, 第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日、: 浜松アクトシティ コンgressセンター (静岡県・浜松市)

Shinozaki K, Nagayama K, Matsumura K, Role of microsomal prostaglandin E synthase in fever following intracranial hemorrhage in mice, 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 24 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Nishioka T, Nakamura K, Matsumura K, Localization of monoacylglycerol lipase in mice brain during fever, 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 24 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Moriguchi K, Inoue T, Shibata T, Matsumura K, Brown adipocytes accumulate phosphor-nuclear factor kappa B-like proteins in their nucleus in response to cold exposure or beta-adrenergic stimulation, 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市)

Hirai Y, Shinozaki K, Yamamura T, Yamamoto M, Okamoto S, Minokoshi Y, Matsumura K, Role of the prostaglandin system in fever following intracranial hemorrhage in mice, 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 22 日、札幌コンベンションセンター (兵庫県・神戸市)

Matsumura K, Hirai Y, Yamamoto M, Okamoto S, Minokoshi Y, Mechanisms of fever following intracerebral hemorrhage, 6th International Conference on Phospholipase A₂ and lipid mediators, 2015 年 2 月 10 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

平井佑紀、塩見伸吾、福田拓未、岡本土毅、箕越靖彦、松村潔、脳出血による発熱のメカニズム：マウスモデルの確立と解析、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 潔 (MATSUMURA, Kiyoshi)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号：10157349

(2) 研究分担者

渡部 紀久子 (WATANABE, Kikuko)
甲子園大学・栄養学部・教授
研究者番号：90211672

山形 要人 (YAMAGATA, Kanato)
東京都医学総合研究所・脳発達神経再生研究分野・プロジェクトリーダー
研究者番号：20263262