

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462420

研究課題名(和文)術後認知機能障害の機序－神経炎症からの検討－

研究課題名(英文)Mechanism of postoperative cognitive dysfunction-Examination from neuroinflammation

研究代表者

森本 裕二 (Morimoto, Yuji)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：00250457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：IL-1 がマウス海馬のシナプス可塑性におよぼす影響を検討するために、海馬急性スライスを用い、海馬の様々部位において電気生理学的にシナプスの長期増強(long-term potentiation: LTP)を測定した。結果、IL-1 は海馬の部位によって異なる作用を示し、シナプス特異的な効果があることが明らかとなった。

また、敗血症マウス海馬のシナプス可塑性に対するミノサイクリンの効果を明らかにするために、盲腸結紮穿孔マウスの海馬を用いて実験を行った。結果、ミノサイクリンは敗血症マウス海馬のLTP低下を抑制し、その機序にIL-1受容体を介したシグナルが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of IL-1beta on synaptic plasticity, we examined long-term potentiation (LTP) electrophysiologically in different hippocampal regions in acute mouse brain slices. Our results demonstrated that IL-1beta exerted variable effects on LTP at different kinds of synapses, indicating that IL-1beta had synapse-specific effects on hippocampal synaptic plasticity.

Next, we investigated the effects of minocycline (MINO) on LTP in the hippocampus in a cecal ligation and puncture (CLP) mouse model. We have provided the evidence that MINO prevents impaired LTP related to sepsis-induced encephalopathy in the mouse hippocampus, and that mechanisms associated with IL-1 receptor activity may be involved.

研究分野：麻酔・周術期医学

キーワード：神経炎症 認知機能障害 シナプス可塑性 敗血症関連脳症 インターロイキン

### 1. 研究開始当初の背景

炎症は生体における自然免疫反応であり、外来からの侵襲に対し自己を防衛するための仕組みと考えられている。近年、中枢神経系における炎症、すなわち神経炎症が、その後の認知機能低下に大きく関わっていることが動物実験、あるいは臨床的に報告され注目を集めている。神経炎症が認知機能を引き起こすメカニズムとして、炎症性サイトカインである Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) の関連が強く示唆されている。しかし、脳内 IL-1 $\beta$  の上昇が認知機能障害を引き起こす詳細な機序は未だ不明であり、その機序解明は神経炎症に起因する疾患群の治療へとつながるものである。

術後にしばしば見られる敗血症罹患後の認知機能障害、いわゆる敗血症関連脳症は神経炎症が一因と考えられているが、未だ有効な治療法はなく、死亡率増加と関連しているため、その機序解明、治療法の開発は喫緊の命題である。

また、海馬は人間の学習や記憶を司る脳部位であり、そこで観察されるシナプスの可塑性、長期増強 (long-term potentiation: LTP) はそうした機能の細胞学的モデルと考えられている。したがって、神経炎症と認知機能障害の関連を調査するにあたり、海馬におけるシナプス可塑性を指標とし電気生理学的に検討することは重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) IL-1 $\beta$  がマウス海馬シナプス可塑性におよぼす影響

IL-1 $\beta$  が CA3 野を含むマウス海馬の各部位における LTP におよぼす影響を検討することで、IL-1 $\beta$  が海馬シナプス可塑性を変化させるメカニズムの一端を解明することを目的とし実験を行った。

(2) ミノサイクリンが盲腸結紮穿孔マウス海馬のシナプス可塑性にあたえる効果

盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture; CLP) による敗血症モデルマウスを作成し、敗血症関連脳症と海馬 LTP の関係、およびミノサイクリン (MINO) による介入の可能性について検討することとした。

### 3. 研究の方法

(1) IL-1 $\beta$  がマウス海馬シナプス可塑性におよぼす影響

4-6 週齢の C57BL/6J マウスを使用し、厚さ 300  $\mu$ m の海馬スライスを作成した。スライスを灌流槽に移して固定し、標準人工脊髄液を 2 mL/時間の速度で灌流し電気生理学的検討を行った。興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential:

EPSP) を導出、安定した後にマウス由来組み換え IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) を 30 分間灌流投与した。投与終了時に 100Hz の高頻度刺激を用いて LTP を誘導し、高頻度刺激 60 分後の EPSP 振幅を基準値と比較して定量を行った。以上の実験をシャーファー側枝-CA1 シナプス、苔状線維-CA3 シナプス、CA3 野交連/連合線維シナプスにおいて行った。苔状線維シナプスの実験では苔状線維シナプス由来の応答であることを確認するために二発増強刺激率による選別、実験終了時の群代謝型グルタミン酸受容体アゴニストの投与、高頻度刺激前の N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬の投与を行った。

(2) ミノサイクリンが盲腸結紮穿孔マウス海馬のシナプス可塑性にあたえる効果

6 週齢の C57BL/6J マウスを使用した。敗血症罹患時における MINO の海馬 LTP への作用を検討するために、CLP+生理食塩水 (vehicle) 投与群、CLP+MINO 投与群、結紮穿孔を行わない偽手術 (sham)+vehicle 群、sham+MINO 群の 4 群にわけて実験を行った。MINO は 24 時間ごとに 60 mg/kg (vehicle 群では同量の生理食塩水) の投与を 3 回行い、3 回目の投与は CLP もしくは sham 手術終了直後に投与した。手術 24 時間後に (1) と同様の手順で海馬スライスを作成し、シャーファー側枝-CA1 シナプスにおいて LTP の定量を行った。LTP の誘導には theta-burst stimulation (TBS) を用いた。

### 4. 研究成果

(1) IL-1 $\beta$  がマウス海馬シナプス可塑性におよぼす影響

NMDA 受容体依存性の LTP であるシャーファー側枝-CA1 シナプス、および CA3 野交連/連合線維シナプスでは IL-1 $\beta$  投与により有意に LTP が抑制されたが (CA1: 138.4  $\pm$  6.2% vs. 119.1  $\pm$  3.8%,  $P < 0.05$ : 図 1, CA3: 160.9  $\pm$  7.4% vs. 134.3  $\pm$  9.1%,  $P < 0.05$ : 図 2) NMDA 受容体非依存性の LTP である苔状線維シナプスでは抑制されなかった (155.0  $\pm$  15.6% vs. 161.2  $\pm$  19.8%,  $P > 0.05$ : 図 3)。

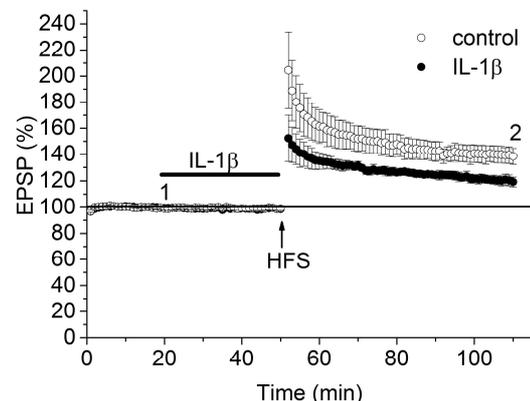


図 1 IL-1 $\beta$  が海馬 CA1 シナプスの LTP に与え

る影響

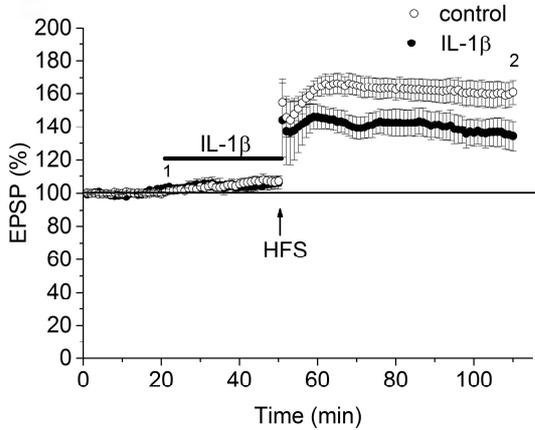


図2 IL-1 $\beta$ が海馬 CA3 野連合 / 交連線維シナプスの LTP に与える影響

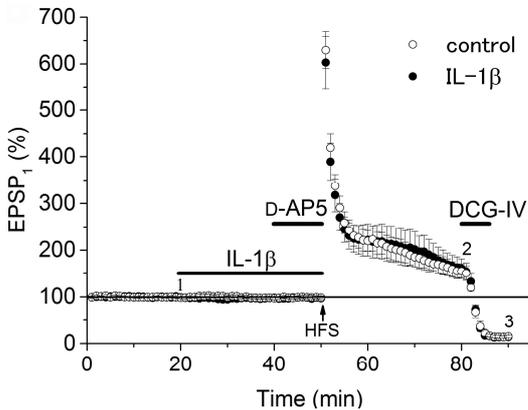


図3 IL-1 $\beta$ が海馬苔状線維シナプスの LTP に与える影響

本実験で、IL-1 $\beta$ がマウス海馬スライスにおいて LTP をシナプス特異的に抑制することを初めて示した。IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) の 30 分間投与は NMDA 受容体依存性の LTP のみを抑制し、苔状線維シナプスの LTP も抑制するとした過去の報告とは異なる結果となった。過去の苔状線維シナプスにおける報告では、苔状線維由来の EPSP であることを確認する方法を用いていないため、NMDA 受容体依存性の可塑性をもつ連合 / 交連線維シナプス由来の EPSP が混在していた可能性が考えられた。以上の結果は、IL-1 $\beta$  がシナプス可塑性を抑制するメカニズムを解明する端緒となるものである。

(2) ミノサイクリンが盲腸結紮穿孔マウス海馬のシナプス可塑性にあたる効果

CLP+MINO 群では CLP+vehicle 群と比較し有意に LTP が改善し (196.7  $\pm$  10.8% vs. 149.1  $\pm$  2.6%,  $P < 0.05$ : 図4) sham 群と同程度にまで回復した。続いて、IL-1 $\beta$  が CLP マウスのシナプス可塑性に与える影響と、MINO と IL-1 $\beta$  抑制の関係を調べるために IL-1ra (50 ng/mL) を LTP 誘導前の 30 分間灌流投与して

実験を行った。結果、IL-1ra は sham 群においては LTP を変化させなかったが、CLP+vehicle 群では IL-1ra 投与により LTP は sham 群と同程度にまで改善し (206.7  $\pm$  12.4% vs. 157.8  $\pm$  8.2%,  $P < 0.05$ : 図5) CLP+MINO 群では相加的な LTP 増強効果は見られなかった。

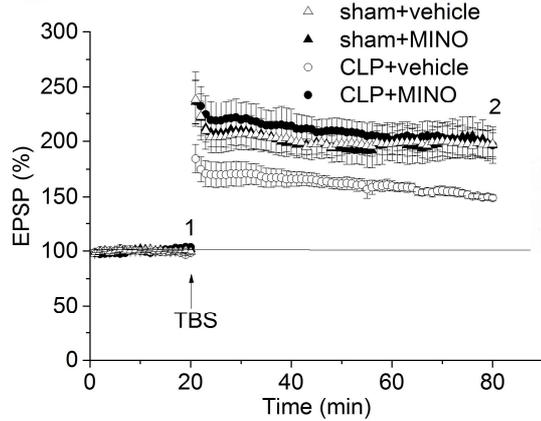


図4 ミノサイクリンが CLP マウスの海馬 LTP に与える効果

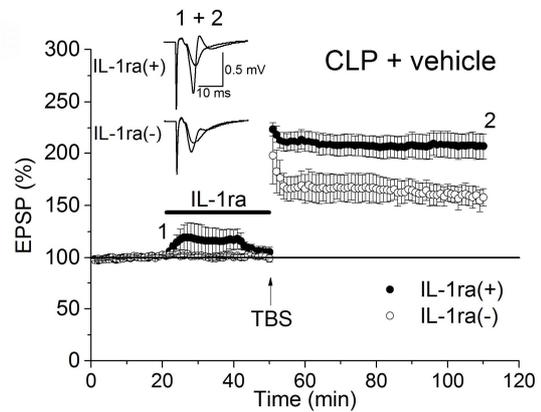


図5 IL-1ra が CLP マウス海馬の LTP に与える効果

本実験で、敗血症マウス海馬において MINO 投与が LTP 抑制を防ぐことを初めて示した。また、CLP による LTP 低下が IL-1ra の灌流投与により改善したことから、LTP 低下の機序には IL-1 受容体を介したシグナルが関与している可能性が高いと考えられた。また、MINO は小膠細胞の活性化を抑制することから、小膠細胞の活性化抑制による IL-1 $\beta$  産生の低下が MINO の LTP 改善効果の主たる機序と推察された。これは、敗血症関連脳症の治療介入への端緒となるものである。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Koji Hoshino, Kan Hasegawa, Haruyuk Kamiya, Yuji Morimoto: Synapse-specific effects of IL-1 $\beta$  on long-term potentiation in the mouse hippocampus. *Biomedical*

Research, 2017 (in press) [査読有]

Koji Hoshino, Mineji Hayakawa, Yuji Morimoto: Minocycline prevents the impairment of hippocampal long-term potentiation in the septic mouse. *Shock*, 2017 (in press)[査読有]  
DOI: 10.1097/SHK.0000000000000847

〔学会発表〕(計2件)

干野晃嗣、森本裕二

ミノサイクリンは敗血症マウス海馬のシナプス可塑性低下を抑止する  
第44回日本集中治療医学会学術集会  
2017/3/10、ホテルさっぽろ芸文館(北海道・札幌)

干野晃嗣、長谷川完、神谷温之、森本裕二  
Synapse-specific effects of interleukin-1 $\beta$  on synaptic plasticity in the mouse hippocampus  
第92回日本生理学会大会, 2015/3/21, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森本 裕二 (MORIMOTO, Yuji)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 00250457

### (2) 研究分担者

神谷 温之 (KAMIYA, Haruyuki)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 10194979

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

長谷川 完 (HASEGAWA, Kan)  
干野 晃嗣 (HOSHINO, Koji)