

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860159

研究課題名(和文) 感染時に生じる中枢症状の発症基盤

研究課題名(英文) Central circuit mechanisms underlying infection-induced symptoms

研究代表者

中村 佳子 (Nakamura, Yoshiko)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60548543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：感染時には、発熱が起こるとともに摂食不振や倦怠感など様々な中枢症状が発症するが、その神経科学的メカニズムは明らかではない。本研究では、感染時に産生される発熱メディエーターを受容する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着目し、このニューロン群特異的にレポーター遺伝子を発現させる技術を用いて、その軸索投射先を明らかにした。また、このニューロン群の活動の電気生理学的特性を解析した。その結果をもとに、感染時の食欲不振が延髄網様体を介するという新たな仮説を立てることができた。今後、この仮説を検証することで、感染時の中枢症状の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：Infection elicits a variety of central symptoms, such as fever, decreased appetite, and fatigue. However, the neural mechanisms underlying the infection-induced symptoms are unknown. In this study, I focused on preoptic area neurons that express prostaglandin EP3 receptors, which receive the pyrogenic mediator produced in response to infections. By using a technique to express reporter genes specifically in EP3 receptor-expressing neurons in the preoptic area, I revealed all the brain sites to which EP3 receptor-expressing preoptic neurons project their axons, and also electrophysiologically recorded activities of these neurons. Based on the data obtained from these analyses, I hypothesized that the medullary reticular neurons are involved in the infection-induced suppression of appetite. Further studies to test this hypothesis could lead to elucidation of the central neural circuit mechanisms of infection-induced symptoms.

研究分野：環境生理学

キーワード：発熱 摂食 代謝

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。感染時には、病原体の侵入によって活性化された免疫系からのシグナルを受けて、脳の血管内皮細胞がプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を産生する¹⁾。このPGE₂が脳実質内に拡散し、視索前野と呼ばれる体温調節中枢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^{2,3)}。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⁴⁾。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用い、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⁴⁾。

一方、PGE₂をラットの視索前野に作用させると、発熱以外にも、不動、摂食量低下、睡眠抑制などが生じることから、ヒトでも感染時には、視索前野からのシグナルによって倦怠感、疲労感、不快感、食欲不振などの多様な症状(感染症状)が引き起こされる可能性が考えられる。しかし、その発症の中枢神経機構は不明であった。また、上述の通り、視索前野の EP3 発現ニューロン(EP3 ニューロン)は、発熱メカニズムの鍵となるニューロンであるが、視索前野の局所回路には不明な点が多いため、視索前野の EP3 ニューロンがどのような仕組みを通じて発熱やその他の感染症状を発現させるための指令を下流に伝えるのかについては未解明であった。

これらの仕組みを明らかにするために、研究代表者はこれまでに、新規の遺伝子組換えラットを作製し、その視索前野へウイルスベクターを注入することによって様々な任意のレポーター遺伝子を EP3 ニューロン選択的に発現させる技術を開発した。この技術を用いることで、視索前野の EP3 ニューロンの形態を選択的に可視化することが可能となり、軸索投射先を同定する解剖学的解析や、EP3 ニューロンの活動を計測する電気生理学的解析が可能となった。また、光遺伝学や化学遺伝学などの遺伝学的手法と組み合わせることによって、視索前野の EP3 ニューロン選択的にその神経活動を人為操作することができ、*in vivo* の神経活動操作と生理学的解析を組み合わせることで、視索前野の EP3 ニューロンが担う生理機能とその神経科学的メカニズムを明らかにすることが可能となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が開発した、視索前野の EP3 ニューロン選択的に任意のレポーター遺伝子を発現させる技術を用い

て、このニューロン群に焦点を当てた組織化学的解析、電気生理学的解析、光・化学遺伝学的解析、*in vivo* 生理学的解析などを多面的に行い、感染時に生じる、発熱、倦怠感、疲労感、不快感、食欲減退などの様々な中枢性症状のメカニズムを明らかにすることである。また、感染時に見られる熱産生亢進(発熱)と食欲減退は、飢餓時に見られる熱産生(代謝)抑制(低体温)と食欲亢進と全く逆の現象である。そこで、飢餓反応の発現メカニズムを行うことで、感染症状の発現に関わる中枢メカニズム解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 視索前野の EP3 ニューロンを標的とした電気生理学的活動記録実験

研究代表者が開発した遺伝子改変ラットを用いた技術によって、視索前野の EP3 ニューロン特異的に細胞膜移行型 GFP を発現させて、このニューロン群を可視化した。この脳組織スライスを用いて、視索前野の EP3 ニューロンを標的としたスライスパッチクランプ解析を行い、このニューロン群の神経活動を、単一細胞レベルで解析した。また、PGE₂などの液性因子がこのニューロン群の活動に及ぼす作用を電気生理学的に解析した。

(2) 視索前野の EP3 ニューロンの軸索投射先を同定する神経解剖学実験

上記方法(1)と同じ手法を用いて、視索前野の EP3 ニューロン特異的に細胞膜移行型 GFP を発現させることで、EP3 ニューロンの軸索を終末まで可視化し、このニューロン群からの脳内の神経投射先をすべて組織学的に解析した。また、免疫組織化学法によってこれらの軸索終末に含まれる神経伝達物質の解析を行った。

(3) 飢餓反応の仕組みの解析を通じた感染症状の理解

まず、ラットおよびマウスの延髄縫線核へ逆行性神経トレーサー(cholera toxin b-subunit: CTb)を注入し、延髄縫線核へ軸索投射する神経細胞群を同定し、その神経細胞群の神経伝達物質を組織化学的に解析した。

次に、麻酔下のラットの褐色脂肪組織の交感神経細胞と褐色脂肪組織温度を計測した状態で、視索前野へ PGE₂ を注入して発熱を惹起した。その後、延髄網様体に神経細胞刺激薬であるピククリンを微量注入し、発熱状態にある交感神経活動と脂肪組織温度の熱産生状態への効果を観察した。自由行動下のラットにもピククリンを延髄網様体に微量注入し、摂食量ならびに咀嚼運動を計測した。

さらに、GABA 作動性ニューロン選択的に Cre を発現した遺伝子改変マウスにウイルス

を注入し、化学遺伝学ツールの人工受容体である hM3Dq を延髄網様体の GABA 作動性ニューロン群選択的に発現させた。その特異的アゴニストである CNO を延髄網様体へ微量注入して、褐色脂肪熱産生への効果を調べた。

延髄網様体の GABA 作動性ニューロン群の活動を計測するために、麻酔ラットの延髄網様体に記録電極を刺入して単一神経細胞の活動を記録した状態で、視床下部に飢餓ホルモンであるニューロペプチド Y を注入して人工的に飢餓状態を作り出した。記録終了後、ラットを灌流固定して脳組織を取り出し、GABA 作動性ニューロンのマーカーである GAD67 mRNA の発現を調べるための *in situ* hybridization を行って、記録した細胞が GABA 作動性ニューロンであるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) 視索前野の EP3 ニューロンを標的とした電気生理学的活動記録実験

視索前野の EP3 ニューロン選択的に GFP を発現させ、蛍光可視化したラットの視索前野を含む脳組織スライスを作製し、温度刺激や、PGE₂ などの薬物刺激を与えて、視索前野の EP3 ニューロンの神経活動を測定した。しかし、当初、視索前野の EP3 ニューロンは非常に脆弱であり、viability が低いために、活動の測定が困難であった。その後、脳組織スライスを作製する際の条件、スライス作製後のリカバリー条件、活動記録を取る際のバッファなど、様々な要因を詳細に検討し、神経活動を少しずつ取ることができるようになった。この実験から、視索前野の EP3 ニューロンは様々な電気生理学的個性を持つニューロンの集合体であることがわかったため、引き続き例数を増やして解析を進め、分類を行っている。

(2) 視索前野の EP3 ニューロンの軸索投射先を同定する神経解剖学実験

視索前野の EP3 ニューロン選択的に膜移行型 GFP を発現させると、このニューロン群に由来する軸索を可視化することができた。軸索の投射先を脳内くまなく探索すると、摂食、睡眠、情動の発現や制御に関わることが知られている脳領域への投射が見られた。また、これらの軸索終末に含まれる神経伝達物質を免疫組織化学法によって解析すると、一部で抑制性神経伝達物質の GABA が含まれることを確認した。

(3) 飢餓反応の仕組みの解析を通じた感染症状の理解

(2)で明らかになった視索前野の EP3 ニューロン群の投射先に関する知見に基づいて、感染時に生じる発熱だけでなく、それに伴う食欲不振に視索前野の EP3 ニューロンが寄

与するという可能性が考えられた。しかし、発熱は熱産生を伴うため、大量のエネルギーを要求する生理反応であるが、それにもかかわらず、感染時には食欲を低下させてエネルギー摂取量を減少させるのである。エネルギー恒常性の観点に照らして矛盾した生理学的反応は、飢餓の時にも生じる。飢餓時には逆に、熱産生を減少させて体温を下げる一方、食欲を亢進させることでエネルギー摂取を促進させるのである。したがって、感染症状の発現に関わる脳内の神経回路メカニズムは飢餓反応のメカニズムを明らかにすることで見えてくるのではないかと考えられた。

そこでまず、熱産生と摂食をコントロールする脳領域を探索するために、視索前野の EP3 ニューロンの投射先の一つであり、発熱時の熱産生の駆動に関わると考えられる延髄縫線核への神経情報入力に注目した。延髄縫線核へ入力する神経のトレーシング実験を行い、熱産生（代謝）と摂食の調節に関連すると考えられる脳領域を探索した結果、延髄網様体を同定した。ラットの延髄網様体に *in vivo* で薬物を用いて、神経細胞を刺激すると、摂食や咀嚼が促進された。また、視索前野に PGE₂ を微量注入することで起こる褐色脂肪組織の熱産生と発熱（体温上昇）が抑制された。また、遺伝子改変マウスと化学遺伝学的な神経活動操作技術を組み合わせ、延髄網様体の GABA 作動性ニューロンを特異的に刺激すると、褐色脂肪熱産生が抑制された。さらに、*in vivo* unit recording を行うことで、網様体の神経活動を計測すると、飢餓時には延髄網様体の GABA 作動性ニューロンが活性化されることが明らかになった。神経トレーサーを使った解析を行うと、延髄網様体の GABA 作動性ニューロンは、熱産生を駆動する延髄縫線核と摂食や咀嚼の運動を指令する三叉神経運動核に軸索を投射することがわかった。これらの実験結果から、飢餓時には、延髄網様体の GABA 作動性ニューロンが活性化され、このニューロン群が同時に、代謝（熱産生）の抑制と摂食の促進を同時に指令することが示された。この知見は、熱産生を制御する交感神経系と摂食を制御する体性運動神経系という独立した2つの指令システムを1つのニューロン群が制御するというユニークなものである。この研究成果は *Cell Metabolism* 誌に掲載された⁵⁾。また、所属大学などを通じてプレスリリースを行い、国内外の新聞や TV ニュースなどを通じて広く報道された。

感染時には、視索前野の EP3 ニューロンからの発熱指令が延髄縫線核の交感神経プレモーターニューロン群を活性化し、熱産生を惹起することで体温上昇を引き起こすと考えられる⁶⁾。この時、視索前野の EP3 ニューロン群は、同時に、延髄網様体の GABA 作動性ニューロン群へ抑制信号を送り、熱産生の駆動を促進するとともに、摂食や咀嚼の運動ニューロンに対しては抑制的な作用をもた

らす可能性が考えられる。本研究の成果から得られたこの仮説は、代表的な感染症状である発熱と食欲不振を引き起こす、視索前野を起点とした神経回路メカニズムの解明につながりうるものであり、現在も精力的にその解析を続けている。

<引用文献>

- 1) Yamagata K, *et al.* Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J. Neurosci.* 21:2669-2677, 2001.
- 2) Nakamura K, *et al.* Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 260:117-120, 1999.
- 3) Lazarus M, *et al.* EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat. Neurosci.* 10:1131-1133, 2007.
- 4) Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301:R1207-R1228, 2011.
- 5) Nakamura Y, *et al.* Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibition and mastication. *Cell Metab.* 25:322-334, 2017.
- 6) Nakamura K, *et al.* Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J. Neurosci.* 24:5370-5380, 2004.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Nakamura Y, Nakamura K. Central regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy homeostasis dependent on food availability. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 470:823-837 (2018). 査読有、doi:10.1007/s00424-017-2090-z
中村和弘、中村佳子. 飢餓反応の中樞神経回路メカニズム. *肥満研究* 23:161-168 (2017). 査読無
Nakamura Y, Yanagawa Y, Morrison SF, Nakamura K. Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibition and mastication. *Cell Metab.* 25:322-334 (2017). 査読有、doi:10.1016/j.cmet.2016.12.002
Yahiro T, Kataoka N, Nakamura Y, Nakamura K. The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation. *Sci. Rep.* 7:5031, (2017). 査読有、doi:10.1038/s41598-017-05327-8

[学会発表](計14件)

中村和弘、八尋貴樹、片岡直也、中村佳子. 温度知覚と体温調節行動は異なる温度感覚伝達路で駆動される. 第95回日本生理学会大会、2018年

中村佳子、中村和弘. ニューロペプチドYによる熱産生抑制と摂食亢進の神経メカニズム. 生命科学系学会合同年次大会、2017年

Yoshiko Nakamura, Yuchio Yanagawa, Shaun F. Morrison, Kazuhiro Nakamura. Medullary reticular nuclei control metabolism and food intake during starvation. 国際自律神経学会 2017、2017年

Yoshiko Nakamura, Yuchio Yanagawa, Shaun F. Morrison, Kazuhiro Nakamura. Medullary reticular GABAergic neurons that mediate hunger responses induced by hypothalamic neuropeptide Y. *Experimental Biology* 2017、2017年

Takaki Yahiro, Naoya Kataoka, Yoshiko Nakamura, Kazuhiro Nakamura. Lateral parabrachial nucleus mediates thermosensory signaling for behavioral thermoregulation. 第40回日本神経科学大会、2017年

八尋貴樹、片岡直也、中村佳子、中村和弘. 外側腕傍核を介した神経伝達が駆動する体温調節行動. 平成29年度温熱生理研究会、2017年

Yoshiko Nakamura, Yuchio Yanagawa, Shaun F. Morrison, Kazuhiro Nakamura. 視床下部ニューロペプチドYは延髄網様体GABA作動性ニューロンを活性化することで褐色脂肪熱産生を抑制する. 第94回日本生理学会大会、2017年

八尋貴樹、片岡直也、中村佳子、中村和弘. 行動性体温調節を駆動する外側腕傍核を介した温度感覚上行路の探索. 第45回自律神経生理研究会、2017年

中村佳子、中村和弘. ニューロペプチドYによる代謝抑制を担う神経回路: 飢餓を生き延びるための仕組み. 第93回日本生理学会大会、2016年

中村佳子、柳川右千夫、Shaun F. Morrison、中村和弘. 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のメカニズム. 第11回環境生理学プレコングレス、2016年

Yoshiko Nakamura, Yuchio Yanagawa, Shaun F. Morrison, Kazuhiro Nakamura. Medullary neural circuit for neuropeptide Y-mediated inhibition of brown adipose tissue thermogenesis. 6th International Conference on the Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation, 2016年

Yoshiko Nakamura, Yuchio Yanagawa, Shaun F. Morrison and Kazuhiro Nakamura.

Medullary reticular GABAergic neurons mediate neuropeptide Y-induced inhibition of brown adipose tissue thermogenesis. 国際自律神経学会 2015, 2015 年
中村佳子、柳川右千夫、Shaun F. Morrison、中村和弘. Neuropeptide Y が褐色脂肪熱産生を抑制する中枢神経回路メカニズム. 平成 27 年度温熱生理研究会、2015 年
Yoshiko Nakamura and Kazuhiro Nakamura. Neuropeptide Y signaling from the hypothalamus inhibits sympathetic outflow to brown adipose tissue through GABA inhibition of the rostral medullary raphe. *Experimental Biology* 2014, 2014 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2/>

アウトリーチ活動

(プレスリリース)

New insights into brain circuit for hunger responses during starvation. *Nagoya University* 2017 年 1 月 26 日.
飢餓を生き延びるための脳の仕組みを解明. 名古屋大学 2017 年 1 月 6 日.
飢餓を生き延びるための脳の仕組みを解明. 科学技術振興機構 2017 年 1 月 6 日.

(雑誌等への取材協力)

中村佳子. ようやく解明された「空腹の謎」: 代謝と摂食に關与する神経系. ヘルシスト 245 巻, 2017 年
中村佳子. 飢えからからだを守る脳の神経回路. *JT 生命誌研究館 生命誌ジャーナル* 2017 年
中村佳子、中村和弘. 延髄の網様体のニューロンはニューロペプチド Y による熱産生の抑制および摂食の促進を指令する. *ライフサイエンス 新着論文レビュー* 2017 年

報道

飢餓信号: 空腹時、脳「食べる」の指令
名大など研究チーム、解明. *毎日新聞* 2017 年 2 月 1 日 朝刊.
飢餓に反応の脳回路解明 名古屋大などのチーム. *共同通信* 2017 年 1 月 31 日 午後 6 時 16 分配信

Hunger Responses: How Brain Could Function To Increase The Chance Of Survival During Starvation. *Latinos Health* 2017 年 1 月 29 日 米国東部時間午前 11 時 26 分配信.

New insights into brain circuit for hunger responses during starvation. *ScienceDaily* 2017 年 1 月 26 日.

空腹→エネルギー蓄積の「司令塔」名大グループ発見. *朝日新聞* 2017 年 1 月 19 日 朝刊・30 面.

体熱抑え食事促す細胞群 = 延髄で発見、肥満治療期待 - 名大. *時事通信* 2017 年 1 月 6 日 午前 6 時 54 分配信.

飢餓を生き抜く脳の仕組み解明. *NHK 名古屋放送局* 2017 年 1 月 6 日

空腹時 延髄で体内調節 名大など解明 肥満治療に期待. *中日新聞* 2017 年 1 月 6 日 朝刊・33 面

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 佳子 (NAKAMURA Yoshiko)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 60548543