

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590231

研究課題名（和文） 赤血球および血小板に由来する内因性発熱物質の探索

研究課題名（英文） Search for endogenous pyrogens derived from red blood cells and platelets

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

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウスの脳出血－発熱モデルを作成し、血小板由来サイトカイン CD40L が発熱に関与している可能性を検討した。マウス視索前野へのコラゲナーゼ投与は脳出血を引き起こし、発熱とシクロオキシゲナーゼ2（COX-2）の発現を引き起こした。CD40L の脳内投与は発熱と脳血管内皮細胞での COX-2 発現を引き起こした。これらの結果は CD40L が脳出血時に内因性発熱物質として働く可能性を支持する。

研究成果の概要（英文）：This study examined in mice whether CD40L, a platelet-derived cytokine, is an endogenous pyrogen that plays an essential role in febrile response after intracerebral hemorrhage. Injection of collagenase into the medial preoptic area in mice induced hemorrhage, which was followed by fever and cyclooxygenase-2 induction. Intracerebral injection of CD40L also induced fever and cyclooxygenase-2 expression in brain endothelial cells. These results support the idea that CD40L as an endogenous pyrogen in brain hemorrhage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：血小板、発熱、シクロオキシゲナーゼ、視索前野

1. 研究開始当初の背景

1970年代以降、発熱の研究は大きく進展し、感染や炎症による発熱のメカニズムが、ほぼ明らかとなった。その概略は次のようになる；外因性発熱物質→内因性発熱物質→脳血管内皮細胞におけるシクロオキシゲナーゼ2（COX-2）の誘導→プロスタグランジン E2（PGE2）産生→視索前野の EP3 受容体活性化→効果器反応。しかし、この考えは感染や

炎症による発熱を対象としたもので、それ以外の原因による発熱（たとえば脳出血時の発熱）の説明には不十分である。研究代表者はすでに、ラット脳出血－発熱モデルを作成し、その発熱の一部に COX-2 の誘導が関わっていることを示した。脳出血時には様々な血液成分が脳実質に漏出する。血液の何等かの成分が、内因性発熱物質として脳で COX-2 を誘導し、発熱を引き起こしていることは間違い

ない。しかし、その実体は不明である。その一つの候補として、活性化血小板から放出されるサイトカイン CD40L を考えた。その根拠として、CD40LはTNF α ファミリーに属し、COX-2を誘導するという *in vitro* の実験報告がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は次の2点である。

- (1)マウスの脳出血-発熱モデルを作成する。
- (2)血小板由来サイトカイン CD40L が発熱とCOX-2の誘導を引き起こす可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1)脳内投与と体温測定

- ①ddy マウスまたはC57BL6 マウス (8週齢、雄)をペントバルビタール麻酔し、腹腔内に体温測定用テレメータを留置した。
- ②一週間以上の回復期間後、マウスをフォロレンで麻酔し、脳定位置置に固定した。
- ③コラゲナーゼ(Sigma TypeIV)またはCD40Lを視索前野に投与した。コラゲナーゼの濃度は50 unit/ml~400 unit/ml、CD40Lの濃度は1 μ g/ μ Lとし、0.2 μ L/minの流速で7分間投与した。溶媒は人工脳脊髄液を用いた。
- ④投与は午前10時~12時の間で行った。投与後、麻酔から回復させ、自由行動下で24時間体温を測定した。
- ⑤ペントバルビタール麻酔下で生理食塩水灌流により脱血し、脳を凍結保存した。
- ⑥脳の新鮮凍結切片を作成し、スライドガラスに貼りつけた。

(2)出血領域のDAB染色

- ①脳切片を風乾後、ホルマリン蒸気により固定した。
- ②固定した脳切片をDAB溶液と反応させた。赤血球の漏出した部位では、DABが褐色に発色した。
- ③メチルグリーン・ピロニンYにより対比染色し、乾燥後、透徹・封入した。

(3)COX-2染色

- ①脳切片を風乾後、10%ホルマリン(in 0.1M PBS)で10分間固定した。
- ②抗 murine COX-2 抗体(Cayman Chemical)を200倍希釈し、室温オーバーナイトで切片と反応させた。
- ③Alexa488 標識2次抗体により可視化し、蛍光顕微鏡で観察・撮影を行った。

4. 研究成果

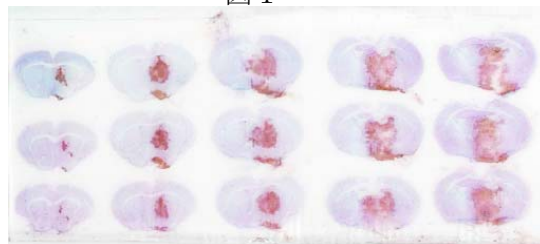
(1)マウス脳出血-発熱モデル

①出血領域の染色

コラゲナーゼ視索前野投与は脳出血を引き起こした。図1は100unit/mlの濃度でコラ

ゲナーゼを投与されたマウス脳の、24時間後の出血状態である。褐色に染まっている部分が脳出血の領域である。これまで、新鮮凍結切片では、染色作業中に赤血球の成分が流出しDAB発色が不可能であった。ホルマリン蒸気による固定で、赤血球成分の流出を防ぎ、出血領域を明確にすることができた。この手法はこれまでに報告がなく、本研究の成果のひとつである。

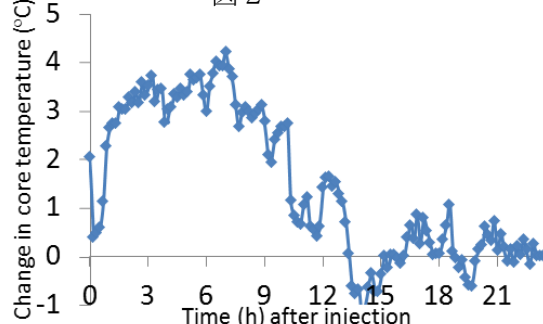
図1



②脳出血による発熱

図1のマウスでの体温変化を図2に示す。縦軸は前日の同時刻の体温との差、横軸はコラゲナーゼ投与後の時間を表している。投与後1時間から12時間の間、発熱が認められる。また、2時間から9時間の間は3 $^{\circ}$ Cを超える体温上昇となっている。

図2



③脳出血時のCOX-2発現

コラゲナーゼ投与24時間後の脳切片で、COX-2を染色した。図3Aに示すように、脳出血部位の周辺組織では、主として血管と思われる部分にCOX-2の発現が認められた。一方、脳出血の中心部(図3B)では、血球細胞と思われる細胞にCOX-2の発現が認められた。

図3A

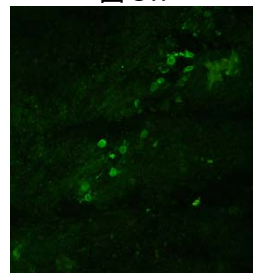
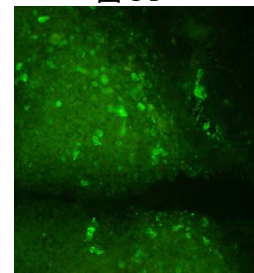


図3B



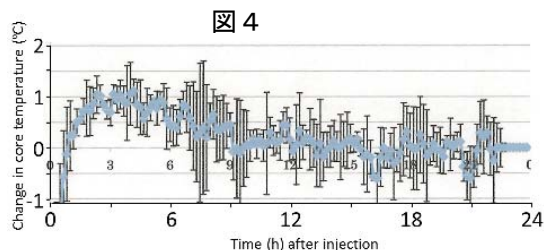
100 μ m

④課題と今後の展望

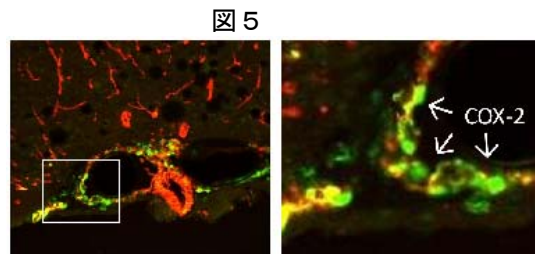
今回の研究で、マウスでもラットと同様にコラゲナーゼによる脳出血-発熱モデルを作成できることが明らかとなった。しかし、ラットと比較して、出血の程度にバラツキが大きく、安定した結果を得ることができていない。結果が不安定な原因として、つぎの2つの可能性を考えている。ひとつはコラゲナーゼに対する感受性の種差である。今回は主に ddy マウスを用いたが、すでに報告のある C57BL6 マウスで試す必要がある。他の可能性として、マウスの血圧のバラツキが脳出血の程度に影響することが考えられる。術時に血圧を管理することが必要かもしれない。安定した脳出血-発熱の条件が確立された後、様々な薬理的処置、遺伝子改変マウスの利用によって、脳出血時の発熱の分子メカニズムが解明できると期待する。

(2)CD40L による発熱と COX-2 誘導

①マウス視索前野に CD40L(1.4 μ g/1.4 μ L)を7分かけて投与すると、体温上昇が観察された(図4)。図4の縦軸は前日同時刻の体温との差、横軸は投与後の時間を表している。体温は投与後3-4時間目で最大に達した。



②CD40L 投与後、4 時間で脳を取り出し、COX-2 免疫染色を行った結果を図5(右は拡大図)に示す。緑が COX-2、赤は PECAM による血管内皮細胞の染色像である。一部の血管内皮細胞に COX-2 が誘導されていることが明らかとなった。



③課題と今後の展望

CD40L の溶媒である人工脳脊髄液の投与によっても、ある程度の体温上昇と COX-2 誘導が見られた。これは、カニューレ刺入や溶液投与による出血や組織破壊によると考えら

れる。注入液の濃度、体積を検討することで CD40L の効果をより明確にできると考えている。また、当初予定していた赤血球由来の成分による発熱反応については、実験の準備段階に留まっている。今後、実験を進めていく予定である。

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7件)

- ① Fujikawa M, Ibuki T, Matsumura K, Sawa T, Inflammatory Hyperalgesia: The Role of the Prostaglandin System in the Spinal Cord, *Advances in Neuroimmune Biology*, 3: 197-207, 2012, 査読有, doi: 10.3233/NIB-2012-012041
- ② Rummel C, Matsumura K, Luheshi GN, Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain, *Brain Res Bull*, 86:319-25, 2011, 査読有, doi:10.1016/j.brainresbull.2011.09.006
- ③ Shukuri M, Takashima-Hirano M, Tokuda K, Takashima T, Matsumura K, Inoue O, Doi H, Suzuki M, Watanabe Y, Onoe H, In vivo expression of cyclooxygenase-1 in activated microglia and macrophages during neuroinflammation visualized by PET with ¹¹C-ketoprofen methyl ester, *J Nucl Med*, 52:1094-101, 2011, 査読有, doi: 10.2967/jnumed.110.084046
- ④ Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K, Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates neurotoxicity by elevating astrocytic Ca²⁺ levels, *Neurochem Int*, 58:489-96, 2011, 査読有, doi: 10.1016/j.neuint.2011.01.003
- ⑤ Tajino K, Hosokawa H, Maegawa S, Matsumura K, Dhaka A, Kobayashi S, Cooling-sensitive TRPM8 is thermostat of skin temperature against cooling, *PLoS One*, 6:e17504, 2011, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0017504
- ⑥ Fujikawa M, Nishitani N, Ibuki T, Kobayashi S, Matsumura K, Sensory stimuli induce nuclear translocation and phosphorylation of nuclear factor kappa B in primary sensory neurons of mice, *Neurosci Res*, 71:178-82, 2011, 査読有, doi: 10.1016/j.neures.2011.06.009.
- ⑦ Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Maehara M, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K, Endothelial microsomal prostaglandin synthase-1 exacerbates

neuronal loss induced by kainite, J
Neurosci Res, 88,381-90, 2010, 査読有,
doi: 10.1002/jnr.22195.

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① Yamakuni H, Nakamura K, Matsumura K,
Brain regions activated by menthol
application to mice skin, 14th International
Congress of Histochemistry and
Cytochemistry, 2012 年 8 月 29 日、京都市
- ② 松村 潔 他 5 名、iPLA2 阻害剤はカラ
ゲニン誘発性プロスタグランジン産生
と痛覚過敏を抑制する、第 32 回日本炎
症・再生医学会、2011 年 6 月 3 日、京都
市
- ③ 松村 潔 他 5 名、マウス陰嚢の非侵害
性の加温に対する行動変化と一次感覚
神経反応、第 88 回日本生理学会大会、
2011 年 3 月 29 日、横浜市
- ④ Matsumura K, Hori A, Yamamoto T,
Hosokawa H, Kobayashi S, Arachidonic
acid and other unsaturated fatty acids induce
cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells
and evoke fever in rats, Keystone Symposia
“Bioactive Lipids: Biochemistry and
Diseases”, 2010 年 6 月 8 日、京都市

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 (H22-H23)

小林 茂夫 (KOBAYASHI SHIGEO)

京都大学・大学院情報学研究科・教授

研究者番号：40124797

(3) 連携研究者

なし