

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590300

研究課題名(和文) 暑熱馴化形成の中樞機構の解明

研究課題名(英文) Central mechanism of heat acclimation

研究代表者

松崎 健太郎 (Matsuzaki, Kentaro)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：90457185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：暑熱馴化による末梢効果器の形態的・機能的変化については多くの研究があるが、中枢機構の研究は限られていた。我々はラット長期暑熱馴化の形成過程において、視床下部の神経新生が促進され、新生したニューロンが長期暑熱馴化の形成に関与する可能性を示唆した。また、視床下部における神経新生が阻害されたラットでは暑熱馴化の形成度合いが対照群に比較して有意に減弱した。以上の結果より、暑熱馴化の形成には視床下部における神経新生が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In humans and rodents, repeated exposure to moderate heat has been well known to result in the development of heat acclimation that improves heat tolerance. The present study investigated a relationship between the improvement of heat-tolerance and the heat exposure-induced hypothalamic neurogenesis in rats. Immunohistochemical analysis showed that the numbers of BrdU-positive cells in the hypothalamus were increased in heat acclimated rats. The number of BrdU-positive cells double-stained by a mature neuron marker increased abruptly after 43 days of heat exposure. Moreover, administration of cytosine arabinoside, a mitosis inhibitor, into rats' intra-cerebral ventricle significantly reduced heat exposure-induced improvement of heat-tolerance. These results suggest that heat exposure facilitates proliferation of neuronal progenitor cells in the hypothalamus and promotes differentiation into neurons, which might have a certain role in improvement of heat tolerance.

研究分野：環境生理学

キーワード：暑熱馴化 視床下部 体温調節 環境生理学

### 1. 研究開始当初の背景

暑熱馴化による末梢効果器の形態的・機能的変化については多くの研究があるが、中枢機構の研究は限られていた。これまでに我々はラット長期暑熱馴化の形成過程において、視床下部の神経新生が促進され、新生したニューロンが長期暑熱馴化の形成に関与する可能性を世界で初めて示唆した。しかし、この形態学的変化が暑熱馴化形成時の体温調節機能にいかに関与するか明確とはなっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、(1) 長期暑熱馴化形成時に視床下部で新生したニューロンの機能を証明することを主な目的とした。さらに、(2) 加齢や認知症発症時の体温調節機能や暑熱馴化の形成についてあわせて解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 視床下部神経新生と暑熱馴化形成の関連解析

先行研究において我々は暑熱暴露されたラットの視床下部において神経前駆細胞の分裂が促進し、そのほとんどが神経細胞に分化することを見出している。また、暑熱暴露により新生した細胞はアストロサイトやオリゴデンドロサイトにはほとんど分化しないことも確認している。そこで、神経新生を阻害した際に暑熱馴化が形成されるか否かをし、新生したニューロンの機能特定を目指した。以下に具体的な実験方法を示す。

- 1) Wistar 系雄性ラット(5週齢)を明暗周期 12:12 時間、環境温 24℃、自由摂食・摂水で飼育する。
- 2) ラット腹腔内にペントバルビタール(50 mg/kg)を投与して全身麻酔し、腹腔内にテレメトリー送信機を挿入した。さらに、ラット背側皮下に細胞分裂阻害薬 Cytosine-β-arabino- $\beta$ -D-ribofuranoside (Ara-C; 2% / 生理食塩水)を充填した浸透圧ポンプ(Model 2006, Alzet)を留置し、側脳室にカニューレを挿入した。
- 3) 2週間の回復期間の後、ラットを 32℃の暑熱環境に暴露した。対照群は 24℃の同一環境下で飼育した。
- 4) 暑熱暴露開始後、ラット腹腔内に Bromodeoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg/day) を 5日間連続投与し、さらに 4~7週間暑熱環境下で飼育した。
- 5) 暴露期間中、腹腔内温・行動量をテレメトリー法で測定した。
- 6) ラットをペントバルビタール(50 mg/kg)で全身麻酔し経心的に脱血後、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定した。
- 7) 脳組織を摘出後、免疫組織学的な解析を行った。

#### (2) 老齢および認知症ラットにおける暑熱馴化形成機能の解析

老齢ラットやアルツハイマー病の原因物質であるアミロイド- $\beta$ (A $\beta$ )を脳室に投与して作成した認知症ラットにおいて暑熱暴露による視床下部神経新生と暑熱馴化形成するか否かを検討した。以下に具体的な実験方法を示す。

- 1) Wistar 系雄性ラット(5週齢:若齢群、12ヶ月齢群:中齢、24ヶ月齢:老齢群)ならびに AD モデルラット(作製方法は後述)を明暗周期 12:12 時間、環境温 24℃、自由摂食・摂水で飼育した。
- 2) ラットを全身麻酔し、腹腔内にテレメトリー送信機を留置した。
- 3) 2週間の回復期間の後、ラットを 32℃の暑熱環境に 30日間暴露し、長期暑熱馴化の形成を試みた。なお、対照群は 24℃の同一環境下で飼育する。
- 4) 暴露期間中、腹腔内温・心拍数・血圧をテレメトリー法で測定する。
- 5) 暴露期間終了後にラットの耐暑熱性および行動性体温調節機能(測定方法は後述)を測定した。

#### 【A $\beta$ 誘発性認知症ラットの作製】

- 1) Wistar 系雄性ラットを麻酔後に頭皮をメスで切開し頭蓋骨を露出させた。
- 2) Bregma から左右の位置(0.8 mm posterior, 1.4 mm lateral)に歯科用ドリルを用いて 2つ穴をあけ、左側脳室にハミルトンシリンジを用いて塩化アルミニウムを 0.5  $\mu$ g 注入した。
- 3) A $\beta$ <sub>1-40</sub> を内蔵した浸透圧ポンプ(Model 2002, Alzet)をラット背皮下に留置し、ガイドカニューレをラット右側脳室に挿入した。Vehicle として生理食塩水を用いた。
- 4) ガイドカニューレを歯科用樹脂で頭蓋骨に固定した後に頭皮を縫合した。

モデル動物を作成し、2週間後に行動性体温調節ならびに暑熱馴化の形成について検討した。

#### 【行動性体温調節の解析】

行動性体温調節機能は本研究室が所有する選択環境温度測定装置を用いて測定した。

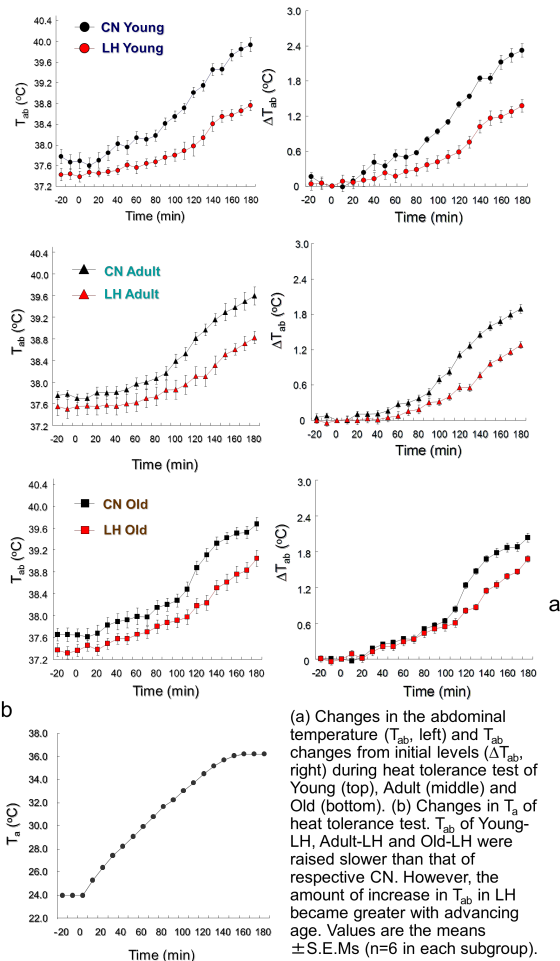
- 1) 内寸 200 × 16 × 18 cm の飼育実験装置の両端に溶接したパイプにそれぞれ冷水と温水を循環させ、装置内の長軸に沿って約 16℃ から 36℃ の温度勾配を形成させた。
- 2) 装置の中にラットを入れて 3日間慣らしたのちに、2日間連続でラットの居る位置の環境温度(選択環境温度)を測定し、行動性体温調節の指標とした。

実験後には脳組織を摘出し、免疫組織学的な解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 視床下部神経新生と暑熱馴化形成の関連解析

我々はAra-C長期投与が暑熱暴露による神経新生を完全に阻害することを確認した。また、Ara-C長期投与は神経細胞死を誘導しないことを確認した。暑熱暴露により視床下部で新生した細胞のうち、約15%はGABA作動性神経細胞マーカーにより、約12%はグルタミン酸作動性神経細胞マーカーにより染色された。また、新生した細胞の一部は温度感受性タンパク質 (TRPV1) を発現していることを明らかにした。若齢ラットの視床下部で新生したニューロンは前視床下部/視索前野 (POA/AH) に最も多く発現しており、その一部は視床下部背内側核 (DMH) に投射していることを確認した。POA/AH から DMH に投射するニューロンは暑熱環境下における皮膚血管運動や血圧の調節に深く関与することから、新生ニューロンの機能としてこれら循環調節への関与を推察した。一方、体液量や浸透圧調節に関与する視床下部室傍核や外側野、唾液腺の一次中枢が存在する上・下唾液核では神経新生がほとんど見られないことを確認した。また、神経新生を阻害したラットでは暑熱馴化形成時に見られる唾液分泌機能亢進に変化は見られなかったが、尾部皮膚血流量が減弱する傾向が観察された。以上の結果から、暑熱暴露によって新生した神経細胞が暑熱馴化形成時の乾性熱放散機能の亢進に関与する可能性が示唆された。



##### (2) 老齢および認知症ラットにおける暑熱馴化形成機能の解析

老齢ラットでは、若齢ラットに比較して暑熱暴露により誘導される神経新生が有意に減弱することが明らかになった (Fig.1)。また、老齢ラットにおける耐暑熱性は若齢ラットよりも有意に低下することが明らかとなった。以上の結果より、加齢に伴い視床下部の神経新生機能が低下し、また、暑熱馴化の形成能力が減弱する可能性が示唆された。さらに、 $A\beta$ を脳室投与して作成した認知症モデルラットにおいて、行動性体温調節機能が消失することを確認した (Fig.2)。また、この認知症モデルラットでは暑熱馴化の形成能力が対照群と比較して有意に減弱することが明らかとなった。さらに、視床下部における神経新生マーカーの Doublecortin や PCNA などのタンパク質の発現量が有意に減少していることが明らかとなった。以上の結果より、 $A\beta$ 脳室投与は行動性体温調節機能ならびに暑熱馴化の形成機能に障害を与える可能性が示唆された。高齢者や認知症患者における熱中症罹患率の増加と関連がある可能性を考えた。

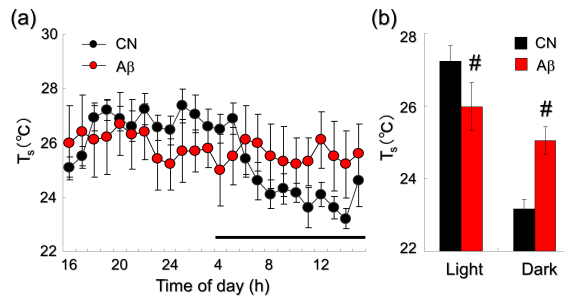


Fig.2. (a)  $T_b$  value of day of CN (black circle) and  $A\beta$ -infused rats (red circle). Dark bars above abscissa indicate the dark phase of the day. (b) Mean  $T_b$  of CN (black bar) and  $A\beta$ -infused rats (red bar) in light and dark phase. In light phase, mean  $T_b$  of  $A\beta$ -infused rats was significantly lower than that of CN. However, in dark phase, mean  $T_b$  of  $A\beta$ -infused rats was significantly higher than that of CN. Values are the means  $\pm$  S.E.Ms (n=6 in each group). # shows significant difference between CN and  $A\beta$ -infused rats.

#### 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 11 件)

- $\beta$ -amyloid infusion into lateral ventricle alters behavioral thermoregulation and attenuates acquired heat tolerance in rats. K. Matsuzaki, M. Katakura, N. Sugimoto, T. Hara, M. Hashimoto, O. Shido, 2015 Temperature in press. 査読あり
- Aging attenuates acquired heat tolerance and hypothalamic neurogenesis in rats. Matsuzaki K, Katakura M, Inoue T, Hara T, Hashimoto M, Shido O. J Comp Neurol. 2015 1;523(8):1190-201. 査読あり

3. Oral intake of encapsulated dried ginger root powder hardly affects human thermoregulatory function, but appears to facilitate fat utilization. Miyamoto M, Matsuzaki K, Katakura M, Hara T, Tanabe Y, Shido O, Int J Biomet. 2015 doi: 10.1007/s00484-015-0957-2 査読あり
  4. Effects of chronic administration of arachidonic acid on lipid profiles and morphology in the skeletal muscles of aged rats. Inoue T, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Al Mamun A, Matsuzaki K, Otani H, Shido O. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2014 91(4):119-27. 査読あり
  5. Neuroprotective Effect of Madecassoside Evaluated Using Amyloid  $\beta$ 1-42-Mediated in Vitro and in Vivo Alzheimer's Disease Models. Al M, Hashimoto M, Katakura M, Matsuzaki K, Shahdat H, Arai H, Shido O, Int J Ind Med Plant, 2014 47, 1669-82. 査読あり
  6. Long-term heat exposure prevents hypoxia-induced apoptosis in mouse fibroblast cells. Sugimoto N, Shido O, Matsuzaki K, Katakura M, Hitomi Y, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Nakamura H, Koizumi S, Yachie A, Umehara H. Cell Biochem Biophys. 2014 70(1):301-7. 査読あり
  7. Quercetin stimulates melanogenesis in hair follicle melanocyte of the mouse. Takekoshi S, Matsuzaki K, Kitatani K. Tokai J Exp Clin Med. 2013 20; 38(4):129-34. 査読あり
  8. Upregulation of aquaporin expression in the salivary glands of heat-acclimated rats. Sugimoto N, Matsuzaki K, Ishibashi H, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Sekine J, Koizumi S, Yachie A, Umehara H, Shido O. 2013 Sci Rep.:3:1763. doi: 10.1038/srep01763. 査読あり
  9. Potent activity of nobiletin-rich Citrus reticulata peel extract to facilitate cAMP/PKA/ERK/CREB signaling associated with learning and memory in cultured hippocampal neurons: identification of the substances responsible for the pharmacological action. Kawahata I, Yoshida M, Sun W, Nakajima A, Lai Y, Osaka N, Matsuzaki K, Yokosuka A, Mimaki Y, Naganuma A, Tomioka Y, Yamakuni T. J Neural Transm. 2013 120(10):1397-409. 査読あり
  10. Omega-3 polyunsaturated Fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells. Katakura M, Hashimoto M, Okui T, Shahdat HM, Matsuzaki K, Shido O. Stem Cells Int. 2013;2013:490476. 査読あり
  11. Voluntary exercise promotes proliferation and differentiation of adult rat hypothalamus progenitor cells. Li G, Matsuzaki K, Wang Y, Zhao N, Yang M, Shido O. J South Med Univ. 2013 33 (8):1099-106. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 13件)
1. Effects of  $\beta$ -amyloid-infusion on behavioral thermoregulation and acquired heat tolerance in rats、Kentarō Matsuzaki, Masanori Katakura, Toshiko Hara, Michio Hashimoto, Osamu Shido、第92回日本生理学会 2015年3月21日(神戸・神戸国際会議場)
  2. 緑茶とアルツハイマー病の話し、松崎健太郎、島根大学サイエンスカフェ、2014年12月6日(出雲・ビッグハート出雲)
  3. アミロイド- $\beta$ 脳室投与はラット暑熱馴化形成を減弱させる、松崎健太郎、片倉賢紀、杉本直俊、宮本まゆみ、原俊子、紫藤治、第52回日本生気象学会 2014年10月24日(横浜・桐蔭横浜大学)
  4. Enhancement of aquaporin expressions of the salivary glands in heat-acclimated rats. Kentarō Matsuzaki, Naotoshi Sugimoto, Masanori Katakura, Toshiko Hara, Osamu Shido, 4th International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation 2012 (PPTR2014) 2014年9月7日(南アフリカ共和国・クルーガーナショナルパーク)
  5. Effects of  $\beta$ -amyloid-infusion on behavioral thermoregulation and acquired heat tolerance in rats、Kentarō Matsuzaki, Masanori Katakura, Toshiko Hara, Michio Hashimoto, Osamu Shido、第91回日本生理学会 2014年3月16日(鹿児島・鹿児島大学)

6. ツボクサ抽出物の認知症への効果、松崎健太郎、アル マムン、片倉 賢紀、橋本道男、紫藤 治、第2回 食と環境、そして高齢化を考える研究会 2014年10月24日(大阪・アジア太平洋研究所)
7. アミロイド脳室投与によるラット行動性体温調節機能の変化、松崎健太郎、片倉賢紀、原俊子、宮本まゆみ、紫藤治、第52回日本生気象学会 2013年11月1日(米子・米子市文化ホール)
8. Improvement of heat tolerance by hypothalamic neurogenesis in long-term heat-acclimated rats、松崎健太郎、片倉賢紀、原俊子、橋本道男、紫藤治、第90回日本生理学会 2013年12月2日(東京・タワーホール船堀)
9. ラット視床下部における神経新生と暑熱馴化形成の加齢による変化、松崎健太郎、紫藤治、第1回 食と環境、そして高齢化を考える研究会 2013年11月22日(金沢・ホテル日航金沢)
10. 暑熱馴化したラットの視床下部における神経前駆細胞分裂と神経分化の促進、松崎健太郎、片倉賢紀、原俊子、李光華、橋本道男、紫藤治、第7回環境生理プレコングレス 2012年3月28日(松本・松本文化ホール)
11. Age-dependent decline of hypothalamic neurogenesis and of heat tolerance in long-term heat-acclimated rats. Kentaro Matsuzaki, Masanori Katakura, Toshiko Hara, Michio Hashimoto, Osamu Shido, 4th International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation 2012 (PPTR2012) 2012年3月22日(リオデジャネイロ・ブジ奥斯)
12. 暑熱馴化の形成に関する脳内機序、松崎健太郎、紫藤治 第16回早稲田大学人間科学総合研究センター公開シンポジウム「生存のための体温調節」 2012年3月17日(東京・早稲田大学)
13. Age-dependent decline of hypothalamic neurogenesis and of heat tolerance in long-term heat-acclimated rats、松崎健太郎、片倉賢紀、原俊子、橋本道男、紫藤治、第89回日本生理学会大会 2012年3月29日(松本・信州大学)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
松崎 健太郎 (MATSUZAKI, Kentaro)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：90457185

(2)研究分担者  
紫藤 治 (SHIDO, Osamu)  
島根大学・医学部・教授  
研究者番号：40175386

片倉 賢紀 (KATAKURA, Masanori)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：40383179

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：