

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18800

研究課題名（和文）血液脳関門が仲介する感染性体温低下機構の解明

研究課題名（英文）The central mechanism of hypothermia under infectious stress condition.

研究代表者

松脇 貴志 (Matsuwaki, Takashi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：20447361

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：プロスタグランジン（PG）E2合成酵素の遺伝子欠損マウスを用い、感染ストレス時にはPGE2の体温上昇刺激と同時に中枢性に働く体温低下作用をもつ内因性因子が存在し、この因子の作用する機構の一部が少なくともエストロゲンに感受性をもつことを明らかにした。また、組織特異的なインターロイキン1型受容体（IL-1R1）の遺伝子欠損マウスを用い、末梢からの感染刺激が中枢に伝達される際には血管内皮細胞に存在するIL-1R1が重要な働きをもつことを示した。

研究成果の概要（英文）：We used the transgenic mice lacking the gene for synthase of prostaglandin E2 to evaluate the possible hypothermic center in the central nervous system. We have demonstrated that the hypothermic center is estrogen-responsive activated by immune challenge simultaneously with the hyperthermic center. We have also shown that interleukin-1 type 1 receptor expressed on brain endothelial cells contributes to the febrile response to immune challenge by using tissue specific IL-1R1 KO mice.

研究分野：神経内分泌

キーワード：脳・神経 プロスタグランジンE2 体温低下 発熱 IL-1 感染

1. 研究開始当初の背景

(1) プロスタグランジン類による感染情報伝達

末梢組織での感染情報はインターロイキン1 (IL-1) などの炎症性サイトカインによって中枢神経系へと伝達され、発熱や過食、拒食、痛覚過敏、ストレス系ホルモンの分泌亢進などの中枢制御性のストレス反応を引き起こす。この情報伝達の仲介物質として働く主要なものの一つに、プロスタグランジン (Prostaglandin, PG) 類が挙げられる。中でも PGE₂ は脳内視索前野の EP3 受容体に結合して発熱を引き起こす熱源物質として広く知られている。代表研究者である松脇が以前所属していたスウェーデン Linköping 大学の Blomqvist グループは PGE₂ 合成系のミクロソーム PGE₂ 合成酵素-1 (mPGES-1) の遺伝子を欠損したマウスが実験的感染ストレスである LPS 誘導性の発熱を呈さないことを報告している (Engblom et al., Nature Neurosci, 2003)。また、松脇の過去の研究でストレス反応の神経内分泌学的中枢である視床下部—下垂体—副腎 (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal, HPA) 軸の感染刺激による活性化が誘導性の PG 類合成酵素 Cyclooxygenase (COX)-2 の阻害剤により抑制されることを明らかにした (Ma et al., Brain Res, 2013)。また、mPGES-1 遺伝子欠損 (KO) マウスでもこの HPA 軸の LPS 反応性低下が確認されている (Elander et al., J Neurosci, 2009)。これらの事実から、末梢から中枢への感染情報を PG 類特に PGE₂ が仲介すると考えられる。

(2) 「情報伝達経路」としての血液脳関門

末梢血と中枢間質液の間には血液脳関門が存在し、中枢組織を末梢から隔絶している。しかし近年、この血液脳関門自身が末梢からの情報伝達を仲介し、中枢性疾患の病態形成に関与することが明らかになってきた。

血液脳関門は血管内皮細胞や血管の周囲に存在するミクログリア系の細胞で構成される。我々はこれまで、IL-1β/IL-1 受容体の情報伝達系が血管内皮細胞で産生される PG 類に依存することを明らかにした (Matsuwaki, Brain Behav Immun, 2014)。

2. 研究の目的

我々は、PGE₂ の合成酵素である mPGES-1 の遺伝子欠損 (KO) マウスでは実験的感染刺激であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) の投与量によっては投与の約 5 時間後をピークとして強度の体温低下を呈することが非常に高い再現性をもって確認した。こ

の現象は PGE₂ の体温上昇刺激と同時に中枢性に働く、体温低下作用をもつ内因性因子が存在することを示唆している。そこで本研究では、体温低下刺激の責任部位や因子の特定を試みた。また、血液脳関門での情報伝達機構の細胞種レベルでの詳細な解析も行った。

同時に、感染刺激の主要な伝達因子の一つである IL-1 の機能的受容体である IL-1 型受容体 (IL-1R1) の KO マウスを用い、末梢の感染刺激が中枢へ伝達される機構について検討した。

3. 研究の方法

実験には、全身性の mPGES-1 KO マウス、IL-1R1 KO マウス、対照群としてそれぞれの同腹の野生型 (WT) マウスを用いた。さらに、IL-1R1 遺伝子については血管内皮細胞、神経細胞、求心性神経、神経節それぞれで異なるに欠損するマウスも実験に用いた。

(1) 体温の測定

マウスの腹腔内にイソフルラン麻酔下で体温測定用のテレメーターを埋込み、一週間の回復期間後 LPS を投与してその後の体温変化を記録した。雌個体については回復期間中毎日膣スミアを採取し、顕微鏡下で確認することで性周期を同定した。

(2) 視床下部—下垂体—副腎軸 (HPA 軸) 活性化の評価

LPS 投与後の個体について、神経内分泌学的なストレス反応の中枢である HPA 軸の活性化を IL-1R1KO マウスと WT マウスで比較した。LPS 投与前、投与 1、3、および 6 時間後に血液と脳を採取し、血中のグルココルチコイド濃度と ACTH 濃度を測定した。同じサンプルを用い、炎症性サイトカインである IL-1β、IL-6、TNF-α の濃度も測定した。脳は PFA で固定し、神経興奮の指標である cFos の免疫染色を行って HPA 軸の最上流である視床下部室傍核の興奮状態を評価した。

(3) 脳脊髄液中の PGE₂ 濃度測定

LPS 投与 3 及び 6 時間後に IL-1R1KO マウスと WT マウスを麻酔下で脳定位固定装置上に固定した。その後ガラスピペットを用いて顕微鏡下で大漕から脳脊髄液を採取し、PGE₂ 濃度を測定した。

(4) 視床下部におけるアラキドン酸カスケード諸因子の遺伝子発現解析

LPS 投与 3 及び 6 時間後に IL-1R1KO マウスと WT マウスから断頭後脳を取り出し、視床下部を採取した。その後リアルタイム PCR によって、COX-1 (Ptgs1)、COX-2 (Ptgs2)、mPGES-1 の遺伝子発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) mPGES-1 KO マウスには感染性体温低下にはエストロゲンが関与する

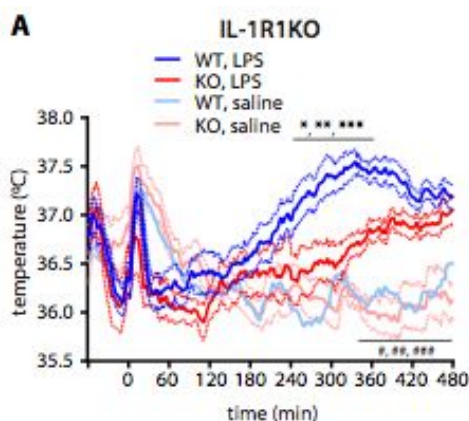
野生型マウス (WT) では雌雄ともに、顕著な発熱を呈した。一方、KO では雌のうち約半数で LPS 投与後約 5 時間を底とする強度の体温低下が観察された。残りの雌および雄では発熱も体温低下も見られなかったことから、雌特有の周期的な内分泌環境変化である性周期の関与を疑い、膣スミア像による性周期判別を毎日行った。

その結果、KO では性周期回帰に異常はないこと、LPS 投与後に体温低下を示すのは発情前期および発情期のもののみであることが明らかとなった。そこで卵巣摘出後の個体に同様の処置を行ったところ、個体の割合は減ったものの、6 匹中 1 匹では依然として LPS 投与後の体温低下を示した。さらにこれらの卵巣摘出雌に高濃度のエストロゲンを処置した後に LPS を投与すると、WT でも KO と同様の体温低下を示す個体が確認された。

以上の結果から、LPS の投与時には PGE₂ の体温上昇刺激と同時に中枢性に働く体温低下作用をもつ内因性因子が存在し、この因子の作用する機構の一部が少なくともエストロゲンに感受性をもつことが明らかとなった。

(2) IL-1/IL-1R1 情報伝達系は LPS の刺激の一部を仲介して、体温を上昇させる

全身性の IL-1R1KO マウスでは、WT マウスに比べて有意に低いものの、LPS 誘導性の体温上昇が観察された。



この結果から、

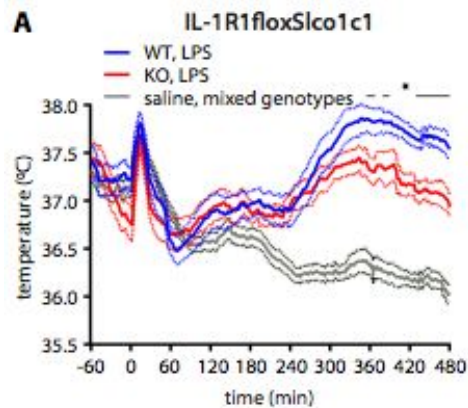
IL-1R1 は LPS の刺激を仲介し、発熱を誘導する。

LPS 誘導性の発熱は IL-1/IL-1R1 情報伝達系以外にも仲介因子 / 経路が存在することが明らかとなった。

(3) LPS 誘導性発熱を仲介する IL-1R1 は血

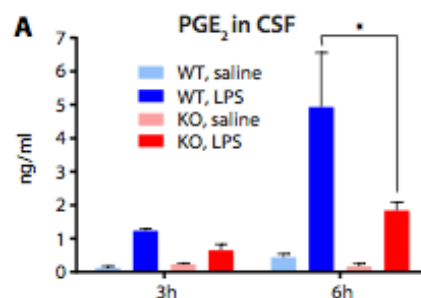
管内皮細胞に存在する

(2)の の発熱に寄与する IL-1R1 の発現部位を特定するために用いた 4 種類の組織特異的 IL-1R1 欠損マウスのうち、血管内皮細胞特異的欠損マウス (IL-1R1 FloxSlco1c1) において、全身性 IL-1R1 KO マウスと同様な発熱の軽減が見られた。このことから、LPS の刺激を IL-1 が仲介する際には血管内皮細胞に存在する IL-1R1 に結合することが示された。



(4) IL-1/IL-1R1 情報伝達系は LPS の刺激を仲介して中枢での PGE₂ 産生を促す

脳脊髄液中の PGE₂ 濃度は WT、IL-1R1 KO マウスのいずれにおいても LPS 投与により増加した。遺伝子型間で体温上昇に有意な差が見られた投与 6 時間後では、IL-1R1 KO マウスでは WT マウスに比べて低い PGE₂ 濃度を呈した。



(5) IL-1R1 KO マウスの LPS 誘導性体温上昇には IL-6, TNF- α のいずれも関与しない

(2)の に挙げた IL-1/IL-1R1 情報伝達系以外の伝達経路を同定するため、IL-6 の中和抗体 tocilizumab (RoActemra)、TNF- α の阻害剤 etanercept (Enbrel)をそれぞれ処置した後に LPS を投与し、体温の変化を観察した。いずれの前処置によっても、IL-1R1 KO マウスで見られた LPS 誘導性体温上昇は消失しなかった。

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)

Matsuwaki T, Komatsuda M, Fujisawa A, Doke M, Yamanouchi K, Nishihara M. "Molecular species of prostaglandins involved in modulating luteinizing hormone pulses under infectious stress conditions." J Neuroendocrinol, *in press*
Eskilsson A*, Matsuwaki T*, Shionoya K*, Mirrasekhian E, Zajdel J, Schwaninger M, Engblom D, Blomqvist A.

"Immune-Induced Fever Is Dependent on Local But Not Generalized Prostaglandin E2 Synthesis in the Brain." J Neurosci, *in press*

〔学会発表〕(計1件)

Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. "Suppressive effect of central prostaglandins on luteinizing hormone (LH) pulsatility under infectious stress condition" 10 th Forum of Neuroscience, Federation of European Neuroscience Societies; 7, July, 2016, Copenhagen, Denmark

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

松脇 貴志 (MATSUWAKI, Takashi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助

教

研究者番号：20447361

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()