

令和元年6月19日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15189

研究課題名(和文) 恒温動物に内在する低体温誘導メカニズムの探索

研究課題名(英文) Underlying mechanisms for induction of hypothermia in homeothermic animals

研究代表者

橋本 美穂(サトウミホ)(Sato-Hashimoto, Miho)

群馬大学・大学院保健学研究科・研究員

研究者番号：90381087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：SIRP KOマウスは、LPS投与による全身性炎症モデルに対して強い低体温応答を示す。そこで本研究では、体温調節機構の中でも冷却機構に着目し、LPSによる低体温誘導機構を調べた。SIRP KOマウスでは、LPS投与後、積極的に代謝が低下しており、これはおそらく脳内の炎症反応が強く発生することで誘導されると考えられる。結果として、代謝および体温の低下と迷走神経を介した免疫反射が起こり、末梢の炎症反応にブレーキがかけられ、過剰な炎症反応を抑えられると思われる。つまり全身性炎症反応症候群の低体温は、能動的な抑制反応であり、体温調節の破綻の結果ではないと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LPS投与に誘導される低体温は、代謝抑制が原因であることが明らかになったことは本研究の成果である。またSIRP KOマウスは、脳内のミクログリアが恒常的に活性化した状態にあり、このことが強い低体温の誘導に関与する可能性がある。ミクログリアの活性化は、老齢の動物の脳で見られる特徴と同様であることから、本研究は高齢者に全身性炎症反応が起こった際の体温調節機構を理解する上で重要な知見となるであろう。

研究成果の概要(英文)：SIRP KO mice show high sensitivities against LPS treatments, resulted in hypothermia with low doses. In this study, therefore, we focused on the mechanisms underlying LPS-induced hypothermia. After treatments of LPS, the metabolism underwent lower actively in SIRP KO mice, that is probably caused by strong inflammatory responses in the brain. In addition, hypothermia and immune reflex mediating the vagus nerve might inhibit inflammation in the peripheral organs. Hypothermia found in the systematic inflammatory response is the active response to suppress the excessive inflammation, but it might not be caused by the failure of thermoregulation.

研究分野：環境生理学

キーワード：SIRP 全身性炎症反応症候群 低体温 LPS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌感染時の体温低下は、体温調節の破綻の結果であるという理解が一般的である。本研究はその考えに疑問を抱き、計画を立案し研究を遂行した。研究代表者らは免疫細胞や神経細胞の細胞膜に発現する SIRP $\alpha$  分子に着目して研究しているが、近年、SIRP $\alpha$  遺伝子破壊 (KO) マウスにおいて、グラム陰性菌の内毒素であるリポ多糖 (LPS) の投与により低体温が非常に強く誘導されることを見出した。LPS 投与は、全身性炎症反応症候群 (SIRS) の実験モデルであり、野生型マウスでは LPS 低用量投与で発熱が、高用量投与で低体温が誘導される。一方、SIRP $\alpha$  KO マウスでは、低用量投与によっても低体温が誘導され、中～高用量投与では低体温が 24 時間以上も続く。LPS の低体温誘導には、中枢性に作用するバソプレッシンとプロスタグランジンが関与していることが報告されているが、これらの物質の相互関係は不明であり、SIRP $\alpha$  分子との関連も知られていない。

(2) 生体に LPS 投与を行う実験系は全身性炎症のモデルとされ、LPS が引き起こす体温変化には LPS 受容体を発現する免疫細胞や血管内皮細胞により産生される炎症性メディエーターが重要な役割を果たす。細菌感染時の発熱はプロスタグランジン (PG) E2 によって誘導され、一方低体温は PGD2 に誘導されるというモデルが提唱されている。

### 2. 研究の目的

細菌感染時の発熱は、炎症性メディエーターと交感神経を介して代謝性熱産生などを誘発することで起こり、発熱により免疫細胞はより効果的に働く。このように生体は免疫システムに連動した体温調節機構を有しており、その過程では発熱だけでなく冷却機構も制御されていることが想定されるが、体温を下げるメカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、膜型分子 SIRP $\alpha$  KO マウスが示す LPS 投与による低体温易誘導性の原因を究明することより、生体に内在する未知の低体温誘導メカニズムとその生理機能を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 実験に使用したマウスとして、全身に発現するヒトサイトメガロウイルスプロモーター支配下に Cre リコンビナーゼの遺伝子を導入したマウスと、loxP 配列で挟んだ SIRP $\alpha$  遺伝子配列を持つ SIRP $\alpha$ -floxed マウスとを交配して得られた SIRP $\alpha$  ノックアウト (KO) マウスを用いた。コントロールマウスとしては野生型マウス (C57BL/6) を用いた。また、低体温易誘導性の原因を特定するために細胞特異的に SIRP $\alpha$  を欠損させたコンディショナル KO マウス (cKO) を作成した。樹状細胞特異的 cKO マウス作成には CD11c-Cre マウスを SIRP $\alpha$ -floxed マウスと交配した。また、ミクログリア特異的 cKO マウスには、CX3CR1-CreER マウスを用いた。その際、タモキシフェン誘導性にミクログリアの SIRP $\alpha$  を欠損させるために、2 ヶ月齢のマウスにコーンオイルに溶かした 4 mg/ml のタモキシフェンを一日置きに 3 回の頻度で皮下投与を行い、その 2 ヶ月後に実験に用いた。以上のような手法で作成したマウスについて、SIRP $\alpha$  の低体温易誘導性への関与を評価した。すべてのマウスは室温 23-24 °C、12 時間周期の明暗条件下にて飼育し、投与実験も同条件下で行った。

(2) マウスの体温の継続的な変化を捉えるために、慢性実験テレメトリー自動計測システム (DSI 社製) を用いた。あらかじめ、体温と活動量を測定するための送信機 (TA11TA-F10) をイソフルレン麻酔下でマウスの腹腔内に埋め込む手術を行った。体温や活動量の測定は、マウスが手術から完全に回復した術後 10 日目以降に行った。リポポリサッカライド (LPS) は *Escherichia coli* serotype 0111:B4 (SIGMA) を用い、マウスの腹腔内に投与を行った。低体温誘導には、LPS を 1 mg/kg でマウスに投与し、投与は午前 9 時から 10 時の間に行い、血液および組織のサンプリングはすべて投与 6 時間後に行った。対照群のマウスには、LPS 投与と個体と同様の投与時間に生理食塩水を投与した。

(3) マウスの呼吸代謝は、オキシマックス等流量システム (Columbus Instruments) により測定し、チャンバー内のガス濃度の変動を連続的にモニターし、酸素消費量、二酸化炭素産出量、呼吸商、熱量を測定した。

(4) LPS 投与 6 時間後の視床下部、肝臓の炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)、抗炎症性サイトカイン (IL-10) および一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の遺伝子発現についてリアルタイム PCR を使って測定した。髄膜についてはサイトカインに加え、プロスタグランジン (PG) の合成に関わるシクロオキシゲナーゼである COX-1、COX-2、および PGD2 合成酵素であるリポカイン型 PDGS (L-PDGS) と造血管型 PDGS (H-PDGS) の遺伝子発現について測定した。LPS 投与後に全脳を摘出し、視床下部を採取し、液体窒素で凍結後、RNA 抽出まで -80 °C で保管した。一方、髄膜は、脳を RNAlater に浸漬後に剥がし、RNA 抽出まで 4 日に保管した。肝臓については、組織片を液体窒素にて凍結後、-80 °C で保管した。RNA 抽出は、セパゾール RNAI SuperG (Nacalai tesque) 中で各サンプルをポリトロンホモジナイザーにて破碎、均質化し、その後 RNeasy (QIAGEN) を使って Total RNA を抽出し、Quanti Tect Reverse Transcription (QIAGEN) を使って cDNA を作成した。発現量を測定した遺伝子に特

異的なプライマーをそれぞれ作成し、SYBR green による検出系にて LightCycler<sup>®</sup>96( Roche ) を使ってリアルタイム PCR を行った。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) SIRP $\alpha$ KO マウスにおける LPS 投与後 24 時間の体温と活動量の変化

SIRP $\alpha$  KO マウスと野生型マウスの LPS 投与後の体温を測定し比較した。野生型マウスの体温は、LPS 投与後 6-7 時間後に平均 1.09 $\pm$  低下し、その後投与 18 時間後には 37 $\pm$  台を維持していた。一方、SIRP $\alpha$  KO マウスは投与 8 時間後には平均 28 $\pm$  まで低下し、その後徐々に上昇し、24 時間後 33 $\pm$  まで復温し、最終的には 37 $\pm$  にまで回復した。また、LPS 投与後 0-24 時間 ( 1 日目 ) および 24-48 時間 ( 2 日目 ) の活動量を SIRP $\alpha$  KO マウスと野生型マウスを比較したところ、SIRP $\alpha$  KO マウスで有意に低下していた。この活動量の低下は体温低下が原因の一つであると考えられ、またそれに加えて、LPS 投与が引き起こす Sickness Behavior が関係しているものと考えられる。Sickness Behavior はうつ様行動( 活動量低下 )、食欲減退、体重減少などの一連の症状のことを指し、SIRP $\alpha$  KO マウスはこの Sickness Behavior の症状が重篤化したとも考えられる。それはおそらく、SIRP $\alpha$  KO マウスの脳内ミクログリアが恒常的な活性化状態にあることに起因すると考えられる。ミクログリアの SIRP $\alpha$  分子はミクログリアの活性化を自ら制御しているため、SIRP $\alpha$  が欠損した場合は抑制が解除され、細胞は活性化に傾く。そのような状態のミクログリアが LPS に刺激されることで、多くのサイトカインを産生し、Sickness Behavior が強く引き起こされると考えられる。

##### ( 2 ) SIRP $\alpha$ KO マウスにおける LPS 投与後 24 時間の呼吸代謝の変化

SIRP $\alpha$  KO マウスでは酸素消費量が LPS 投与により投与前の 1/3 まで減少し、野生型マウスと比較しても 1/2 倍まで低下した。同様に、二酸化炭素産生量や熱量は LPS 投与により顕著に減少し、野生型マウスと比較してどちらも約 1/2 量まで減少していた。このことから、SIRP $\alpha$  KO マウスは LPS 投与により代謝が低下することが明らかとなった。一方、呼吸商については LPS 投与前が 0.9-1 周辺の値を示したが、投与後には 0.7-0.8 周辺の値まで減少した。このことから、LPS 投与後は呼吸のエネルギー源として主には体内の脂質が消費されたことが推測された。以上の結果より、SIRP $\alpha$  KO マウスの LPS に誘導される低体温は、代謝の低下を伴うことが明らかとなり、この低体温と低代謝は全身性に起こる炎症を抑制する効果をもたらすことが推測される。

##### ( 3 ) LPS 投与後の SIRP $\alpha$ KO マウスの視床下部、髄膜、肝臓におけるサイトカイン遺伝子等の発現量の変化

LPS 投与 6 時間後の視床下部、髄膜、肝臓の炎症性サイトカイン ( TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 )、抗炎症性サイトカイン ( IL-10 ) および iNOS 遺伝子発現量を SIRP $\alpha$  KO マウスと野生型マウスで比較した。SIRP $\alpha$  KO マウスでは、投与後の TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 の遺伝子発現量が野生型マウスに比べて有意に高く、一方 IL-6 や iNOS 遺伝子は SIRP $\alpha$  KO マウスで高い傾向はあるものの有意な差は示されなかった。髄膜に関しては、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 の遺伝子発現が SIRP $\alpha$  KO マウスで野生型マウスと比べて有意に高かった。

LPS 投与後 6 時間後の髄膜のサンプルについては、COX-1、COX-2、L-PGDS、H-PGDS の遺伝子発現についても測定した。COX1、COX2 および H-PGDS の遺伝子発現量については LPS 投与後に SIRP $\alpha$  KO マウスでより高い傾向が示されたが有意差はなかった。一方、L-PGDS の遺伝子発現量は LPS 投与後に SIRP $\alpha$  KO マウスで低い傾向にあった。

肝臓での LPS 投与後のサイトカインの変化は、SIRP $\alpha$  KO マウスの TNF $\alpha$  発現量は野生型マウスと比べて有意に低く、IL-1 $\beta$  についても有意差は示されなかったが低い傾向にあった。一方、IL-10 および iNOS の発現量は LPS 投与後に SIRP $\alpha$  KO マウスで高い値が示されたが、野生型マウスと比べて有意差は示されなかった。

腹腔内に投与された LPS が脳に炎症をもたらす経路を考えた場合、髄膜や脳室周囲器官が近接する視床下部は、投与された LPS が拡散する部位にあたる。上記の結果より、SIRP $\alpha$  KO マウスはこれらの部位において LPS 投与により炎症性サイトカインの値がより上昇し、炎症が強く誘導されることが明らかとなった。一方、興味深いことに SIRP $\alpha$  KO マウスの肝臓では LPS 投与後に TNF $\alpha$  の値が有意に減少しており、炎症に対して何らかの抑制メカニズムが作動したと考えられる。おそらくこれは、K. J. Tracy ら ( *Nature* 2002 ) が提唱する迷走神経を介した炎症反射による制御メカニズムを介して起こった現象であることが推測され、このメカニズムにより炎症と発熱は抑制され、組織の損傷が最小限に抑えられていると考えられる。

##### ( 4 ) LPS 投与後のミクログリアの形態学的変化

LPS 投与 24 時間後のミクログリアの形態学的な変化を検討した。ミクログリアはミクログリアマーカーである Iba-1 抗体を使って免疫組織化学的染色を行って観察した。saline を投与した SIRP $\alpha$  KO マウスと野生型マウスの大脳皮質のミクログリアを観察すると、細胞形態に顕著な違いは認められなかったが、LPS 投与を行ったものでは、SIRP $\alpha$  KO マウスについては明らかにミクログリアの細胞体は大きく、突起の長さも短くなっていた。視床下部のミクログリアについては SIRP $\alpha$  KO マウスでは saline 投与の場合でも、野生型マウスと比べて突起が短

く細胞体が大きいが、LPS 投与により、突起はより短くなり細胞がより丸くなっていた。これらの結果から、SIRP $\alpha$  KO マウスのミクログリアは LPS に対してより強く反応して細胞形態を変化させていることが明らかとなった。つまり、SIRP $\alpha$  KO マウスのミクログリアが LPS に好感受性であり、そのため LPS に対する反応として形態をより変化させ、サイトカインをより多く産生している可能性が考えられる。

#### (5) ミクログリア特異的 SIRP $\alpha$ cKO マウスを使った検討

ミクログリア特異的 SIRP $\alpha$  cKO マウスに LPS を投与し、体温と活動量を測定したところ、コントロールマウスと比べて体温は顕著に低下し、投与後 6 時間から 16 時間は 33℃ 以下を示したが、最低体温は 31℃ で全身の SIRP $\alpha$  KO マウスに比べるとその程度は軽度であった。活動量においては、LPS 投与後 1 日目、2 日目ともに野生型マウスと比べて SIRP $\alpha$  cKO マウスの活動量は減少していた。このことから、ミクログリアの SIRP $\alpha$  が欠損することで、低体温が強く誘導されることから、ミクログリアの活性化の状態が体温に影響を与えることが判明した。

#### (6) 樹状細胞特異的 SIRP $\alpha$ cKO マウスを使った検討

樹状細胞特異的 SIRP $\alpha$  cKO マウスに LPS を投与し、体温と活動量を測定したところ、コントロールマウスに比べて体温は顕著に低下し、投与後 4 時間から 24 時間まで 33℃ 以下を維持し、最低温度は 28℃ であったことから、全身の SIRP $\alpha$  KO マウスと同程度の低体温が誘導されたと判断した。活動量も投与 1 日目と 2 日目ともに野生型マウスに比べて低下していた。

さらに詳しい検討を行う目的で、視床下部と肝臓のサイトカイン遺伝子発現量を測定した。視床下部において、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、iNOS 遺伝子の発現量を測定したところ、全て野生型マウスと比較して有意な差は示されなかった。一方、肝臓については、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10、iNOS の遺伝子発現量が野生型マウスと比べて高値を示した。以上の結果をまとめると、全身の SIRP $\alpha$  KO マウスと体温変化や活動量に関しては類似したように見えたが、サイトカインの発現変化は全く逆で脳では差がなく、肝臓で上昇していた。従って、全身の SIRP $\alpha$  KO マウスと異なるメカニズム、例えば肝臓のマクロファージあるいは樹状細胞などが関与することによって肝臓のサイトカイン産生が上昇し、それが迷走神経節を介して炎症の情報を脳に送り、低体温が誘導されているのかもしれない。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sato-Hashimoto M, Nozu T, Toriba R, Horikoshi A, Akaike M, Kawamoto T, Hirose A, Hayashi Y, Nagai H, Shimizu W, Saiki A, Ishikawa T, Elhanbaly R, Kotani T, Murata Y, Saito Y, Naruse M, Shibasaki K, Oldenburg P-A, Jung S, Matozaki T, Fukazawa Y, Ohnishi H. Microglial SIRP $\alpha$  regulates the emergence of CD11c<sup>+</sup> microglia and demyelination damage in white matter. *eLIFE*, 査読あり, Mar 26; 8, 2019, DOI: 10.7554/eLife.42025.

〔学会発表〕(計 14 件)

橋本美穂、野津智美、浦野江里子、齊藤泰之、小谷武徳、村田陽二、的崎尚、大西浩史、SIRP $\alpha$  欠損マウスは LPS 投与によって誘導される低体温症が重症化する、第 59 回日本神経化学学会大会、福岡国際会議場、2016.9.8-10

野津智美、橋本美穂、Ruwaida Elhanbaly, 石川達也、齊藤泰之、小谷武徳、村田陽二、的崎尚、深澤有吾、大西浩史、白質におけるミクログリア恒常性制御、第 59 回日本神経化学学会大会、福岡国際会議場、2016.9.8-10

野津智美、橋本美穂、Ruwaida Elhanbaly, 石川達也、齊藤泰之、小谷武徳、村田陽二、深澤有吾、的崎尚、大西浩史、SIRP 欠損マウスにおけるクプリゾン感受性の亢進、第 63 回北関東医学会総会、群馬大学刀城会館、2016.9.29-30

Tomomi Nozu, Miho Hashimoto, Ruwaida Elhanbaly, Tatsuya Ishikawa, Ayaka Hirose, Waka Shimizu, Takashi Matozaki, Yugo Fukazawa, Hiroshi Ohnishi, Analysis of a direct cell-cell communication signal that regulates glial activation in the brain、第 12 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス、近畿大学 11 月ホール、2016.10.27-30

Hiroshi Ohnishi, Miho Hashimoto, Tomomi Nozu, Ruwaida Elhanbaly, Tatsuya Ishikawa, Yugo Fukazawa, Takashi Matozaki、ミクログリア活性化を制御する細胞間相互作用シグナルの解析、第 40 回日本神経科学大会、2017. 7.22

Hiroshi Ohnishi, Shinya Kusakari, Miho Hashimoto, Kaori Imai, Eriko Urano, Takashi Matozaki, The importance of ion dynamics for low temperature-induced tyrosine phosphorylation of SIRP $\alpha$  in neurons、第 60 回日本神経化学学会、2017.9.7

橋本美穂、堀越絢乃、永井裕美、神宮大輝、赤池美穂、浦野江里子、的崎尚、大西浩史、SIRP $\alpha$  シグナルの欠損がミクログリアに与える影響、第 16 回生体機能研究会、岐阜大学サテライト

キャンパス、2017.9.22

Daiki Jingu, Mika Iino, Shinya Kusakari, Miho Hashimoto, Hiroshi Ohnishi, The impact of ion dynamics on tyrosine phosphorylation of SIRP $\alpha$ , The 3rd Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase in Sendai / The 8th Japanese Conference on Protein Phosphatase, 2017.11.19

Ayano Horikoshi, Miho Hashimoto, Hiromi Nagai, Hiroshi Ohnishi, The effect of genetic ablation of CD47-SIRP $\alpha$  signal on microglial activation and pathology of demyelination, The 3rd Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase in Sendai / The 8th Japanese Conference on Protein Phosphatase, 2017.11.19

Daiki Jingu, Ayaka Motai, Mika Iino, Joji Kawasaki, Kaori Imai, Miho Sato-Hashimoto, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi, Study of stress-induced tyrosine phosphorylation of SIRP $\alpha$  in immortalized murine microglia cell line, 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学学会大会、2018.9.6

Hiromi Nagai, Miho Hashimoto, Ayano Horikoshi, Ruwaida Elhanbaly, Tatsuya Ishikawa, Takashi Matozaki, Yugo Fukasawa, Hiroshi Ohnishi, A molecular signal that controls tissue damage and repair in the brain white matter, 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学学会大会、2018.9.7

Hiromi Nagai, Ayuto Shimoda, Tomomi Nozu, Ayano Horikoshi, Miho Akaike, Yuriko Hayashi, Miho Sato-Hashimoto, Hiroshi Ohnishi, Control of microglia activation by SIRP $\alpha$ . Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery, 2018.10.24

Mika Iino, Joji Kawasaki, Daiki Jingu, Ayaka Motai, Kaori Imai, Miho Sato-Hashimoto, Hiroshi Ohnishi. Analysis of stress-induced tyrosine phosphorylation of SIRP $\alpha$  in primary cultured neurons. Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery, 2018.10.24

Daiki Jingu, Ayaka Motai, Mika Iino, Joji Kawasaki, Kaori Imai, Miho Sato-Hashimoto, Hiroshi Ohnishi Study of stress-induced tyrosine phosphorylation of SIRP $\alpha$  in immortalized murine microglia cell line. Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery, 2018.10.24

〔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：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。