

令和元年5月31日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18980

研究課題名(和文)脳室周囲器官は炎症情報を脳実質に伝える窓口である - 血管周囲免疫細胞の役割 -

研究課題名(英文)Perivascular macrophages in the circumventricular organs have a role in immune-to-blood communication

研究代表者

森田 晶子 (Morita, Shoko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70647049

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)：エンドトキシンを繰り返し投与すると発熱や摂食量及び飲水量の低下といった反応が抑制される現象は、ヒトで自然に起きエンドトキシンに対する過剰反応から宿主を守るのに重要なシステムであるにもかかわらずメカニズムが分かっていない。本研究ではエンドトキシンを感知する脳部位である脳室周囲器官をエンドトキシン耐性のないマウスとあるマウスと比較した。本研究により血中のエンドトキシンは脳室周囲器官の血管周囲まで侵入すること、耐性のないマウスでは骨髄細胞由来の血管周囲マクロファージが炎症性サイトカインIL-1を産生するが、耐性のあるマウスでは産生しないことがエンドトキシン耐性の原因である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に感染や炎症が生じた時には疲労感、抑うつ気分、摂食量や飲水量の低下などの防御反応が生じるが、エンドトキシンを繰り返し投与すると過剰反応から自己を守るために耐性が生じる。本研究ではエンドトキシン耐性のないマウスとあるマウスにエンドトキシンを投与して、脳でいち早くエンドトキシンを感知しsickness behaviorに関わる脳室周囲器官における反応を調べた。どちらのマウスでも血中のエンドトキシンは脳室周囲器官の血管周囲に侵入したが、耐性のないマウスで炎症性サイトカインを産生するマクロファージが、耐性のあるマウスでは産生しないことを示し、エンドトキシン耐性のメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Circulating endotoxins induce fever and decrease food and water intake, but pre-injection of endotoxins attenuates these changes. This phenomenon, known as endotoxin tolerance, can occur naturally in humans and is an important system for host protection against excessive response to endotoxin, clarifying the mechanisms for development of tolerance to endotoxins is needed. Here, we investigated feature of the circumventricular organs in endotoxin-non-tolerant and endotoxin-tolerant mice. Our data indicate that perivascular macrophages enable the circumventricular organs to produce inflammatory cytokine IL-1 in response to circulating endotoxins and that its hyporesponsiveness may be the cause of endotoxin tolerance.

研究分野：神経解剖学

キーワード：骨髄由来細胞 エンドトキシン耐性 インターロイキン1 マクロファージ除去 sickness behavior

1. 研究開始当初の背景

リポ多糖(LPS)を含むエンドトキシンは発熱や摂食量及び飲水量の低下を引き起こす。これらの行動レベルの変化は sickness behavior と呼ばれるが、LPS を予め投与しておくとの後の LPS に対する sickness behavior は減衰する。この現象をエンドトキシン耐性というが、ヒトで自然に起きエンドトキシンに対する過剰反応から宿主を守るのに重要なシステムであるにもかかわらずメカニズムが分かっていない。

Sickness behavior は脳に炎症性サイトカインが作用することによって起きる。感染すると血中の免疫細胞は炎症性サイトカインを産生するが、エンドトキシンによって誘導される sickness behavior は時には血中サイトカイン濃度が上昇する前に起きる。これらの結果は血中のエンドトキシンが脳に直接作用していることを示唆する。しかし、血中のエンドトキシンは血液脳関門というバリアによって脳に自由に侵入できないようになっている。

脳の中でも脳室周囲器官と総称される脳部位は血液脳関門を持たない。その一つ脳弓下器官は血中の LPS を直接感知して炎症性サイトカインを産生する。LPS を投与すると IL-1、IL-6、TNF といった炎症性サイトカインが脳弓下器官において迅速に産生される。特に IL-1 は sickness behavior を引き起こすのに重要である。IL-1 受容体のアンタゴニストを脳弓下器官に局所投与すると LPS 投与後の発熱が抑えられる。これらのことは脳弓下器官が直接血中の LPS を感知し、IL-1 を産生して sickness behavior を引き起こしていることを示唆する。更に LPS 投与後の脳弓下器官における IL-1 の産生は LPS を予め投与したウサギで認められなくなる。この IL-1 発現の減衰は脳弓下器官がエンドトキシン耐性に関与していることを示唆する。しかし、どの細胞が血中の LPS に反応して IL-1 を産生し、なぜ LPS を予め投与した動物の脳弓下器官は IL-1 を産生しなくなるのかは不明である。

脳弓下器官は血液脳関門を持たない特殊な脳部位であるために、LPS のような血中の分子が自由に侵入すると考えられてきた。しかし、最近血中の比較的大きな分子(分子量 10,000 以上)は脳弓下器官の中でも血管の周辺にしか侵入できないことを報告した(脳弓下器官のような血液脳関門を持たない部位の血管透過性について 5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕(2)にまとめ発表した)。脳弓下器官では血管周囲の基底膜が分離し大きな血管周囲腔を形成している、末梢から投与したトレーサーは脳弓下器官の血管周囲腔に局限していた。LPS は大きなミセルを形成するので血中の LPS が脳弓下器官の脳実質に拡散するとは考えにくい。さらに脳弓下器官のマクロファージが IL-1 産生細胞ではないかと言われている。脳に常在する免疫細胞であるミクログリアとは異なり、脳弓下器官のマクロファージは骨髄細胞に由来し末梢から補充される。これらのことから脳弓下器官では血管周囲腔マクロファージが血中の LPS を感知し、エンドトキシン耐性に関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

以上の学術的背景をもとに、本研究では脳弓下器官のマクロファージの特徴を調べ、LPS に対して耐性のないマウスとあるマウスで脳弓下器官の血管周囲マクロファージが IL-1 産生にどのような役割を持つのかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

成体雄マウス(C57BL/6J)に LPS を腹腔内投与し、投与後 24 時間の体重変化及び摂食量・飲水量を計測した。免疫組織化学法により LPS 投与後 IL-1 を発現する細胞と LPS の局在を調べた。クロドロン酸リポソームにより血管周囲マクロファージを除去し、LPS 投与後の IL-1 産生への寄与を確かめた。エンドトキシン耐性のないマウスとあるマウスで血管周囲マクロファージが骨髄由来細胞であるか確かめるために、全身の細胞が緑色蛍光を発するマウス(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP))から得た骨髄由来細胞を野生型マウス(C57BL/6N)に移植した。最後にエンドトキシン耐性のあるマウスに 2 回目の LPS を投与し、脳弓下器官の血管周囲マクロファージにおける IL-1 発現を調べた。

4. 研究成果

まず、マウスに LPS を初めて腹腔内投与し、投与後 24 時間の体重変化及び摂食量・飲水量を計測した。これらのパラメータの低下を確認して「エンドトキシン耐性のないマウス」と定義づけた。初めての投与から 4 日後に再度 LPS を投与し再び投与後 24 時間の体重変化及び摂食量・飲水量を計測し 4 日間で耐性が生じることを確かめ、「エンドトキシン耐性のあるマウス」として以後の実験に用いた(図 1)。

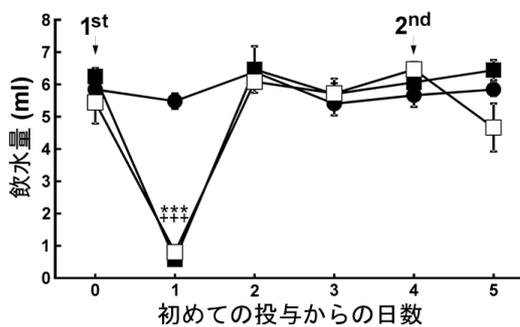
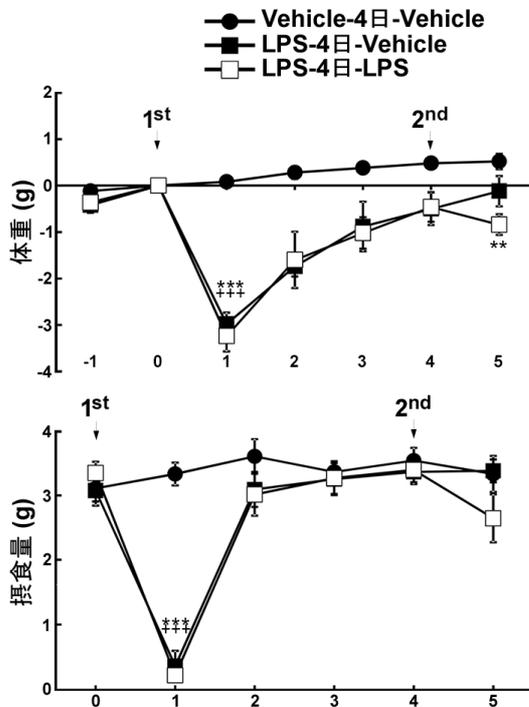


図1 LPS を初めて投与してから4日後にもう一度LPSを投与すると体重、摂食量、飲水量の低下が認められなくなった。

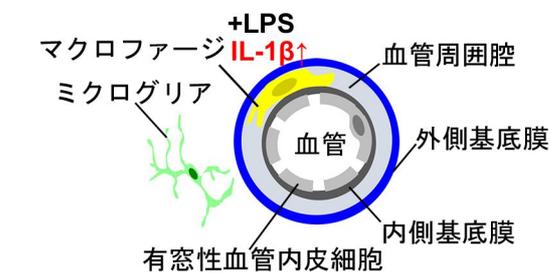


図2 脳弓下器官の血管周囲マクロファージがIL-1βを産生した。

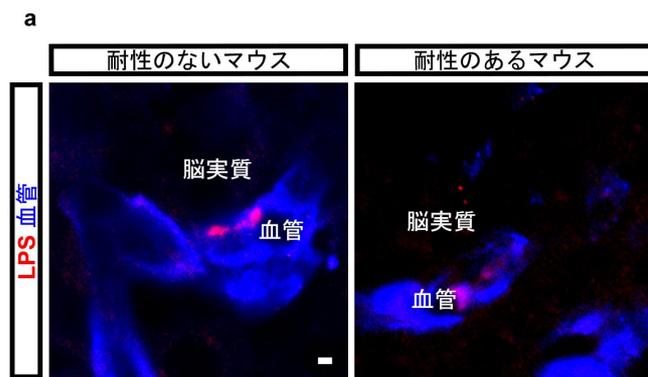
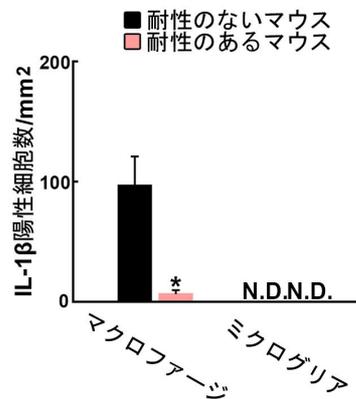
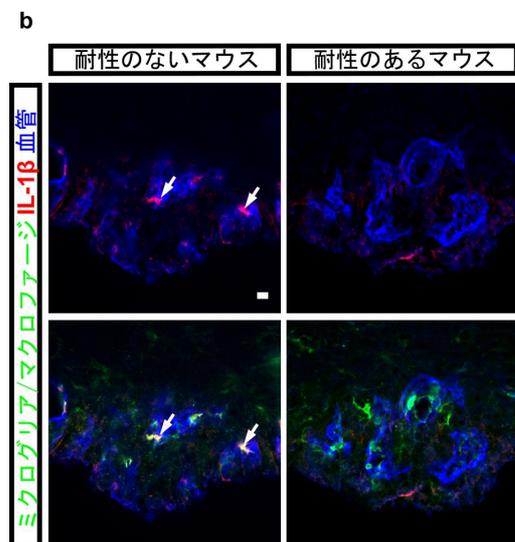


図3 a 耐性のないマウスと同様にあるマウスでも脳弓下器官の血管周囲腔にLPSは到達した。b 耐性の有るマウスではLPS投与後の血管周囲マクロファージにおけるIL-1β発現が低下した。



次にエンドトキシン耐性のないマウスに LPS を投与すると、脳実質のミクログリアではなく血管周囲腔に限局するマクロファージがすばやく IL-1 を産生することがわかった。投与した LPS も血管周囲腔に限局した。貪食性の細胞のみに作用するクロドロン酸リポソームを用いてマクロファージを除去すると LPS 投与後の IL-1 発現が低下したことからマクロファージが IL-1 産生細胞であることを確認した。エンドトキシン耐性のあるマウスでは、ないマウスと比較して骨髄由来のマクロファージ数が有意に増加すること、エンドトキシン耐性のあるマウスでも 2 度目に投与した LPS が脳弓下器官の血管周囲腔に到達していることがわかった。それにもかかわらず、脳弓下器官の血管周囲マクロファージは IL-1 を産生しなくなった。

これらの結果は血管周囲マクロファージが脳弓下器官に LPS に反応して IL-1 を産生することを可能にしていることを示唆する。また、血管周囲マクロファージが LPS に反応しなくなることがエンドトキシン耐性の原因であるかもしれない。以上の研究結果を 5 . 主な発表論文等〔雑誌論文〕(1)にまとめ発表した。

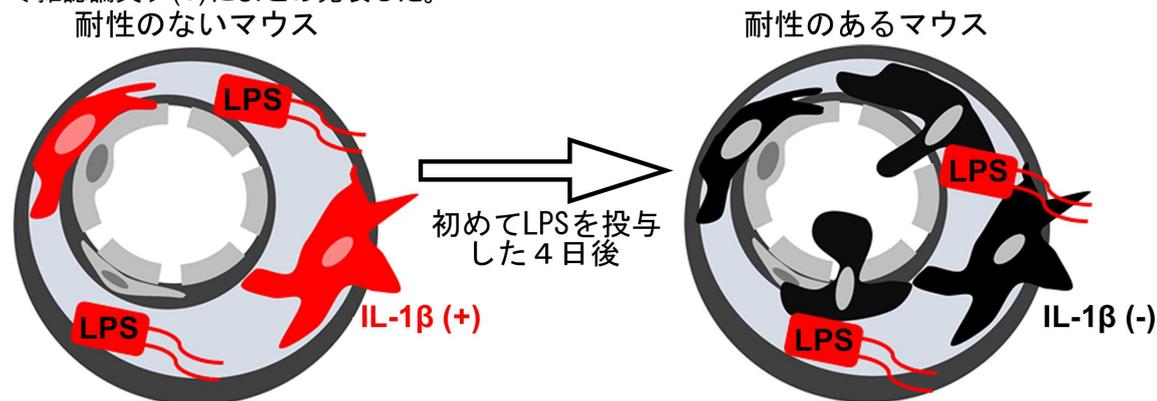


図4 本研究結果のまとめ 耐性のないマウスでは脳弓下器官の血管周囲マクロファージが LPS を感知して IL-1 β を産生するが、初めて LPS を投与して 4 日後耐性が生じると脳弓下器官の血管周囲マクロファージの数は増え、血管周囲腔に LPS は到達しているにもかかわらずマクロファージによる IL-1 β 産生は低下した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) **Morita-Takemura S***, Nakahara K, Hasegawa-Ishii S, Isonishi A, Tatsumi K, Okuda H, Tanaka T, Kitabatake M, Ito T, Wanaka A.
Responses of perivascular macrophages to circulating lipopolysaccharides in the subfornical organ with special reference to endotoxin tolerance.
Journal of Neuroinflammation, 16:39. (2019)
- (2) **Morita-Takemura S***, Wanaka A.
Blood-to-brain communication in the hypothalamus for energy intake regulation.
Neurochemistry International, 128:135-142. (2019)

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) **森田-竹村晶子**
弓状核及び正中隆起における血中物質の到達と血管構築変化
第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、3S17-2、長崎県長崎市、長崎大学、3月 28 ~ 30 日、2017 年 (シンポジウム)
- (2) **Shoko Morita-Takemura**, Kazuki Nakahara, Kouko Tatsumi, Hiroaki Okuda, Tatsuhide Tanaka, Ayami Isonishi, Akio Wanaka
Immune cells in the perivascular space of the sensory circumventricular organs
第 40 回日本神経科学大会、3P-188、千葉県千葉市、幕張メッセ、7月 20 ~ 23 日、2017 年 (一般演題 (ポスター))
- (3) **森田-竹村晶子**、中原一貴、長谷川-石井さなえ、石西綾美、辰巳晃子、奥田洋明、田中達英、和中明生
脳弓下器官の IL-1 産生における血管周囲マクロファージ様細胞の役割
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、1P-91、東京都武蔵野市、日本医科大学、3月 28 ~ 30 日、2018 年 (一般演題 (ポスター))

〔その他〕

ホームページ等

奈良県立医科大学解剖学第二講座

<http://www.narmed-u.ac.jp/~2ana/publish.html>

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。