

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790356

研究課題名（和文） 脳神経系特異的な新規脂質メディエーター産生系の生理的意義

研究課題名（英文） Physiological significance of a novel brain-specific lipid mediator production pathway.

研究代表者

北 芳博 (KITA YOSHIHIRO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20401028

研究成果の概要（和文）：

モノアシルグリセロールリパーゼ (MGL) 欠損マウスおよび細胞質型ホスホリパーゼ α (cPLA2 α) 欠損マウスにおいてリポポリサッカライド投与による発熱を比較したところ、MGL 欠損マウスにおいては発熱応答が消失することを発見した。詳細な検討により、MGL が視床下部におけるプロスタグランジン E2 産生を介して発熱応答を媒介することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

MGL-deficient mice and cPLA2 α -deficient mice were subjected to LPS-induced fever model. Febrile response was lost in MGL-deficient mice, suggesting MGL is involved in hypothalamic prostaglandin E2 production during fever.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：代謝異常学・脂質メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン (PG) やロイコトリエン (LT) などのエイコサノイドは、脂肪酸の一種であるアラキドン酸を共通前駆体とする代謝産物群であり、それぞれ特異的な受容体のリガンドとして働くことにより細胞間のシグナル分子として固有の生理機能・病態と関わる。

炎症・免疫細胞を含む末梢組織では、リン脂質（主としてホスファチジルコリン）の sn-2 位に含まれるアラキドン酸が cPLA2 α により遊離され、シクロオキシゲナーゼ (COX) やリポキシゲナーゼ (LOX) 等の働きによって、PG や LT 等が生じ、炎症の増悪や免疫応答過程等に関わることが知られている。cPLA2 α KO マウスを用いて、多くの炎症・免疫関連の疾患・病態モデルの検討がなされ、いずれにおいても顕著な症状の改善が見られることなどから、cPLA2 α は

アラキドン酸カスケードにおけるアラキドン酸供給酵素としての位置づけがすでに確固としたものとなっている。こうした背景のもと、中枢神経系におけるエイコサノイド産生についても同様の代謝様式が暗黙のうちに仮定されてきた経緯があった。

今回、研究代表者は cPLA2 α KO マウスを用いた予備的検討から、脳組織中のプロスタグランジンは cPLA2 α 非依存的に生じることを発見していた。

2. 研究の目的

申請者の予備的知見をもとに、本研究では、以下の2つの新規な概念について明らかにすることを目的とした。

1つめは、アラキドン酸カスケードの前駆体がリン脂質ではなくジアシルグリセロールである場合があるという仮説である。この仮説は、これまでの通説を大きく覆す

ものである。2つめは、中枢神経系においてはジアシルグリセロールリパーゼ α (DGL α) によって生じることが知られている2-AG 自体が重要な脂質性メディエーターである点であり、2-AG の代謝産物としてエイコサノイドが生じ、機能するという概念である。これは、ある脂質性メディエーターから別のクラスの脂質性メディエーターが生じることを意味している。換言すれば、内因性カンナビノイドの生理機能とエイコサノイドの生理機能はその調節メカニズムにおいても関連している可能性が考えられる。これらの概念はこれまで立証されていないものである。

本研究では、中枢系における cPLA $_2$ α 非依存的なプロスタグランジン類が 2-AG の分解によって生じるという仮説に立ち、各種 KO マウスを用いた生理機能の検証を行うことにした。

3. 研究の方法

本研究課題においては、上記の目的を達成するために、以下に示す事柄について各々検討することを計画した。

新規エイコサノイド産生経路の発熱・体温ホメオスタシスへの関与の検討

PGE2 は視床下部の EP3 受容体を介して体温セットポイントを上昇させ、発熱反応に関わることが知られている。一方、2-AG-CB1 シグナルは低体温を引き起こすことが知られている。また、最近の報告では、RANK/RANKL 系が PGE2-EP3 系を介して概日体温変動に関与する可能性も指摘されている。これらを踏まえ、cPLA $_2$ α KO/MGLKO/DGL α KO/CB1 \cdot MGL のダブル KO の各遺伝子欠損マウスにおいて、エンドトキシン(LPS) 投与後の発熱反応および概日体温変動にどのような影響があるか調べることにした。体温測定は、直腸温度プローブおよび埋め込み体温計により実施することを計画した。また、視床下部の脂質性メディエーターの一斉定量解析を実施し、脂質性メディエータープロファイルとマウス表現型の対応を検討することを計画した。

新規エイコサノイド産生経路の中枢性疼痛メカニズムへの関与の検討

PGE2 は炎症性疼痛モデルにおいて、EP2 受容体を介して中枢性（脊髄レベル）に疼痛閾値の低下を起こすことが示されている。疼痛のモデルは多くあるが、プロスタグランジンが関与する疼痛は、インドメタシン等の非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) により痛みを抑制できることが指標となる。本研究では、そのようなモデルとして、後肢にザイモサン（または完全フロイントア

ジュバントなどの刺激物質）を投与することにより遅発性に痛覚過敏が引き起こされるモデル、および、腹腔内に希酢酸を投与することにより引き起こされる疼痛反応（酢酸ライジング）モデルを用いた検討を計画した。これらのモデルは、脊髄中の PGE2-EP2 系の関与が指摘されており、cPLA $_2$ α KO/MGLKO/CB1KO の各遺伝子欠損マウスの相互比較を行うことにより、各遺伝子の寄与を明らかにできる。前項の体温・発熱モデルの場合と同じく、CB1 \cdot MGL のダブル KO マウスによる検討、および CB1 アンタゴニスト (AM251) を投与した状態で WT マウスと KO マウスの評価も行うことを計画した。酢酸ライジングモデルにおいては、腹腔内 LPS 前投与 (24 時間前) による脊髄中の COX2 遺伝子の発現誘導に特徴付けられる痛覚閾値低下を主たる検討項目となる。脊髄中の各種脂質性メディエーターの一斉定量解析を行い、脂質性メディエータープロファイルとマウス表現型の対応づけを行うことを計画した。

2-AG 代謝系の様々な脂質代謝物への波及効果

MGL が 2-AG 産生だけでなくエイコサノイド産生にも大きく関与しているであろうことを踏まえ、さらに広範囲な探索により、MGL に依存する脂質代謝物を明らかにすることを計画した。脳内にはアラキドン酸だけでなく、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) といった多価不飽和脂肪酸が非常に多く含まれており、これらもアラキドン酸同様に酸化酵素により様々な代謝物を生じることが報告されている。また、神経因性疼痛において LPA (リゾホスファチジン酸) の関与が報告されているが、ジアシルグリセロールはホスファチジン酸と代謝的に近いため、LPA 等の生理活性リズリン脂質類の産生に MGL が影響する可能性もある。探索手法は、包括的脂質メタボローム解析技術である、LC-MS 法による総脂質のディフレンシャル解析法を用いることを計画した。遺伝子欠損マウスと野性型マウスの比較を、以下に示すような各種条件との組み合わせで解析することを想定した：異なる脂質成分を含む餌の投与による脳内脂質プロファイル変動/細菌感染 (LPS 投与) 等による全身性炎症コンディショニングによる脳神経組織中の脂質プロファイル変動、等。

4. 研究成果

本研究の実施により、以下に示すような成果が得られた。

新規エイコサノイド産生経路の発熱・体温

ホメオスタシスへの関与の検討

各種遺伝子欠損マウスを用いて、LPS 誘発発熱モデルを検討した。20ugLPS をマウスの腹腔内に投与し、30 分おきに直腸体温を測定したところ、野生型マウスでは、約 2 時間後から有意な深部体温上昇すなわち発熱応答が見られた。cPLA2 α 欠損マウスは野生型マウスと同様に、正常な発熱応答を示した。一方、MGL 欠損マウスは発熱応答が消失していた。

MGL 欠損マウスでは、脳の様々な部位で 2-AG 量が慢性的に上昇し、また、これに伴い、2-AG 受容体である CB1 のダウンレギュレーションが見られることが報告されていることから、MGL 欠損マウスにおける発熱応答消失が CB1 受容体を介した機能の異常により説明される可能性を検討するために、CB1/MGL ダブル KO マウスでも同様の実験を行ったところ、CB1/MGL ダブル KO マウスにおいても発熱応答の消失が依然として見られたことから、CB1 受容体の機能とは無関係であることが判明した。

LPS 誘発発熱応答においては、LPS 投与後に、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 などの発熱性サイトカインの血中濃度の一過性上昇が見られることが知られている。他の研究者グループにより、MGL 欠損マウスに LPS を投与した 6 時間後において、脳組織中の炎症性サイトカイン類が激減しているとの報告がなされたため、LPS 誘発発熱モデルにおける血中サイトカイン類を検討した。その結果、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 のいずれに関しても、野生型および MGL 欠損マウスの両方において、LPS 投与の 2 時間後に、血中濃度の顕著な増大を認めた。IL-1 β および IL-6 に関しては、野生型マウスと MGL 欠損マウスの間で有意な違いは認められず、TNF α に関しては、MGL 欠損マウスにおいて若干の低下が認められたが、それにより発熱応答の消失を説明できるとは考えられない程度であった。

LPS 誘発発熱モデルにおいて、MGL 欠損マウスと野生型マウスの間で、視床下部の脂質メディエーター産生にどのような違いがあるかを調べるために、液体クロマトグラフィー質量分析計などを用いた、リポドミクス解析を実施した。LPS 投与 2 時間の視床下部においては、PGE2 を含む複数のエイコサノイド類の上昇が認められたが、MGL 欠損マウスでは、その量が減少しており、LPS 投与後においても、野生型マウスの生理食塩水投与時と同等程度であった。このことから、MGL が視床下部 PGE2 産生を介して発熱応答に関与していることが示唆された。

LPS 誘発発熱応答に関わる PGE2 の由来として、肝臓の Kupffer 細胞に由来するとい

う仮説が存在していた。また、MGL 欠損マウスでは、LPS 投与 6 時間後の肝臓のプロスタグランジンの量が減少しているとの報告もあった。そこで、LPS 投与 2 時間後の肝臓における PGE2 の量を測定したところ、LPS 投与による PGE2 増加は認められず、また、野生型と MGL 欠損マウスの間でも違いは認められなかった。これらの結果から、PGE2 は肝臓に由来する可能性よりも、視床下部において産生される可能性が高いと考えられた。

MGL 欠損マウスにおいて、組織中の総脂肪酸プロファイリングをガスクロマトグラフィー分析 (GC-FID 法) により実施した。アラキドン酸を含む、検出された脂肪酸類全てについて、MGL 欠損マウスと野生型マウスの間で、視床下部中の含有量に違いは見られなかった。従って、MGL 欠損マウスにおける PGE2 の減少はアラキドン酸の枯渇によるものではないと考えられた。また、視床下部組織中のリン脂質類のプロファイリング解析を実施したが、MGL 欠損マウスと野生型マウスの間には明らかな差異は認められなかった。この結果は、ホスホリパーゼの基質であるリン脂質類に違いは認められないことを示している。

これらの結果を総合し、発熱応答における PGE2 産生は、MGL による 2-AG 分解によって媒介されると考えるのが妥当であると結論付けられた。

新規エイコサノイド産生経路の中樞性疼痛メカニズムへの関与の検討

本計画部分については、予備検討のみ実施したが、評価可能なデータを得るには至らなかった。

2-AG 代謝系の様々な脂質代謝物への波及効果

本計画部分については、予備検討のみ実施したが、評価可能なデータを得るには至らなかった。

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)

[学会発表] (計 1 件)
LIPID MAPS Meeting 2012
(Scripps Seaside Forum, アメリカ
・カリフォルニア州 La Jolla)
演題: Alternative arachidonic acid
cascade in the brain
発表者: 北芳博、清水孝雄

6. 研究組織
(1) 研究代表者

北 芳博 (KITA YOSHIHIRO)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20401028

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：