

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430062

研究課題名(和文)低温応答シグナルによる脳機能調節機構の解明

研究課題名(英文)Study on a cold sensitive signal that regulates brain function

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・日本学術振興会特別研究員(RPD)

研究者番号：90381087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：低温応答性シグナルであるSIRP の脳機能調節機構を研究する目的でSIRP マウスがリポポリサッカライド(LPS)投与により低体温が強く誘導される原因を探った。SIRP KOマウスはLPS腹腔内投与により脳内の炎症性サイトカイン、特にIL-1 遺伝子の発現が野生型マウスに比べて有意に誘導され、それはミクログリア由来のサイトカインであると考えられた。脳におけるSIRP の機能は、ミクログリアのLPSに対する反応を抑制的に制御することで、炎症時の恒温性維持に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：SIRP phosphorylation is induced by cold exposure. In this study, we tried to find out physiological roles of SIRP in the regulation of brain function when animals became hypothermia. Among some methods to induce hypothermia, LPS treatments particularly resulted in the severe hypothermia and decreased physical activity in SIRP knockout (KO) mice, that lasted more than 24 hours. In SIRP KO mice, moreover, levels of gene expression in pro-inflammatory cytokines were elevated significantly after LPS treatments compared with those in wild type (WT) mice. Results of experiments using conditional KO mice in which a gene of SIRP was deleted in macrophages or microglia shows the gene deletion in microglia was responsible for hypothermia in part but not in macrophages. These results indicate that microglial SIRP inhibit cellular responses to LPS stimulation, which may regulate thermogenesis to maintain a constant body temperature.

研究分野：神経化学

キーワード：タンパク質リン酸化 低温シグナル 低体温 脳 LPS ミクログリア 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 温度変化は生物にとって一般的なストレスの一つであり、微生物や植物、変温動物では低温への適応能力が生存のために重要な意味を持つ。一方、恒温動物では、細胞や組織の低温への適応については、主に冬眠動物をモデルとして解明が進められているものの、十分に解明されていない (Al-Fageeh MB and Smales CM, Biochem J, 2006)。低温は脳血管障害に対して神経保護効果を示すため臨床現場では低体温療法として応用されている。しかし、低体温は記憶障害を引き起こすことが実験動物だけでなく人でも報告されており、脳機能を大きく変化させるが、そのメカニズムは十分理解されていない。このように、脳の低温への応答反応についての研究は、基礎的な研究分野として重要なだけでなく、これを利用して、神経保護や脳機能や記憶の操作など、新たな応用分野を創出する可能性を秘めた研究分野である。

(2) 研究代表者らは近年、低温刺激によりチロシンリン酸化を受け活性化する膜型分子を低温応答シグナル分子として同定した。その分子は Signal Regulatory protein α (SIRP α) と呼ばれる分子で、神経細胞や免疫細胞の細胞膜に存在し、細胞外領域に3つのイムのグロブリン (Ig) 様構造を、細胞内領域には、チロシンリン酸化モチーフを持つ膜型タンパク質である (Matozaki T et al., Trends Cell Biol, 2009)。また、SIRP α 分子の細胞外領域は、リガンドである膜型分子 CD47 と接触することで、双方向性にシグナルを伝達する。これまで明らかになっている SIRP α 分子の機能は、免疫系ではマクロファージの貪食作用の抑制に関わっていることが分かっている。一方神経系では、SIRP α ノックアウト (KO) マウスを使った実験で、強制水泳中の無動時間の増加 (= マウスのうつ様行動) が見られることから、マウスのうつ様行動の制御に関わることが明らかになっている。また、強制水泳で泳がせたマウスの体温が低下することにより、SIRP α がリン酸化することが判明し、培養神経細胞においても低温暴露が SIRP α のリン酸化を誘導することから低温応答性であることが明らかとなった。しかし、脳における SIRP α の低温応答性シグナルとしての生理的機能の詳細は不明であるため、SIRP α のリン酸化を手掛かりに生体の低温応答反応の研究を展開すべく本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳機能調節における SIRP α 分子の低温応答性シグナルとしての生理機能を明らかにし、それを手掛かりに、脳の新たな制御機構とその機能解明に取り組む。本研究により、低体温という従来の生理的条件下では見出すことのできない新たな生体調節機構が解明されるとともに、将来これを標的とした神経保護、脳機能維持・改

善などに向けた基盤的成果を得ることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 実験には、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 α 遺伝子配列を持つ SIRP α -floxed マウスとを交配して得られた SIRP α 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 α を欠損させたコンディショナル KO (cKO) マウスを作成した。マクロファージ特異的 cKO マウス作成には LysM-Cre マウスを、ミクログリア特異的 cKO マウスには CX3CR1-CreER マウスを用い、それぞれ SIRP α -floxed マウスと交配して、マクロファージおよびミクログリア cKO マウスを作成し、SIRP α の低体温誘導性への関与を評価した。

(2) SIRP α KO マウスと野生型 (WT) マウスに既知の低体温誘導薬を使って、慢性実験テレメトリー自動計測システム (DSI 社製) を用いて低体温の誘導性を評価した。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腹腔内に埋め込んだ。実際の体温および活動量の測定は術後7日目以降に行った。使用した低体温薬は、アデノシン 5'-リン酸ジナトリウム (5'-AMP) とリポポリサッカライド (LPS) であり、腹腔内投与により低体温を誘導した。

(3) LPS 投与による低体温により SIRP α のリン酸化の誘導をウエスタンブロッティングによって確認した。サンプルには LPS 投与8時間後の WT マウスの脳を用いた。また、SIRP α リン酸化が低体温の影響か、あるいは LPS の影響かを明らかにするために、LPS 投与後のマウスのケージをヒートマット (39 °C) の上に置き、保温することで体温低下を妨げたマウスについても SIRP α リン酸化を検出した。ウエスタンブロッティングは、10% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動したのち、PVDF メンブレンに転写を行い、5% アルブミン含有の PBS にてブロッキングを行った。SIRP α のリン酸化 Y501 を認識する抗体を用いて SIRP α チロシンリン酸化を検出した。ブロッキングバッファーで希釈した抗体液で一晩インキュベーションをした後、HRP 標識した抗ウサギ IgG 抗体でさらにインキュベーションした後、ECL による発光検出を行った。

(4) LPS 投与後の脳と肝臓の炎症サイトカイン、一酸化窒素合成酵素の遺伝子発現量を測定した。LPS 投与3時間後と24時間後に全脳を摘出し、液体窒素で凍結後 -80 °C で保管

した。一方、肝臓は8時間後に摘出したものを用いた。RNAの抽出は、まず、セパゾール RNA I Super G (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 mini kit (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は Tumor Necrosis Factor α (TNF α)、IL-1 β 、IL-6、iNOS であり、それぞれの遺伝子配列に特異的なプライマーを作成し SYBR green による検出系にて LightCycler[®]96 (Roche) を使ってリアルタイム PCR を行った。

4. 研究成果

(1) LPS 投与による低体温が誘導する SIRP α のリン酸化

LPS 投与による低体温が SIRP α リン酸化を誘導するのかどうかを確認するために、LPS 投与をした WT マウスの脳(視床下部)を採取し、ウエスタンブロッティングでリン酸化を定量的に解析した。神経細胞の SIRP α 分子は体温依存性にリン酸化しており、体温が 30-35 の動物と 25-29 のものとは後者の方がより強くリン酸化が誘導された。また、体温の低下度は室温依存性であった。さらに、神経細胞の SIRP α リン酸化が低温によるものなのか、あるいは LPS の作用によるものなのかを明らかにするために、LPS 投与後に保温し、体温を 37 前後で維持したマウスの脳について調べたところ、リン酸化は誘導されなかった。これらの結果より、神経細胞の SIRP α のリン酸化は LPS の直接的作用によるものではなく、低体温によって誘導され、体温の低下度が大きいほど強く誘導されることが明らかになった。

(2) SIRP α KO マウスにおける LPS 投与後の体温と活動量への影響

SIRP α KO マウスと WT マウスの LPS 投与後の体温変化と活動量をモニターし比較した。WT マウスでは LPS 投与 6-7 時間後に1日の平均体温より約 1.09 低下し、その後投与 18 時間後には 37 台を維持していた。一方、SIRP α KO マウスは投与 8 時間後には最低 28 まで低下し、その後徐々に上昇するし、24 時間後に 33 、その後 37 まで回復した。また活動量への影響はより顕著で、LPS 投与後 0-24 時間および 24-48 時間後の活動量ともに SIRP α KO マウスで WT マウスと比較して有意に低下していた。LPS 投与は、Sickness behavior と呼ばれる活動量低下(うつ様行動)、食欲減退、体重減少などの一連の症状を引き起こすことが知られているが、SIRP α KO マウスでは野生型マウスと比較して低体温だけではなくその Sickness behavior の影響も顕著であり、その原因として SIRP α KO マウスにおいて LPS に対して免疫応答性が強い可能性があ

る。つまり体温と活動量測定の結果より、脳内のミクログリア、脳血管周囲のマクロファージなど中枢系の免疫細胞、あるいは末梢のマクロファージのいずれかの LPS への応答性が強いことが予想された。そこで次に、SIRP α KO マウスの活動量の低下や低体温が強く現れる表現系の原因を調べる目的で、LPS 投与後の脳および肝臓のサイトカイン等の遺伝子発現量を調べ、これらの臓器に存在する免疫細胞の LPS 応答性を検討した。

(3) LPS 投与後の SIRP α KO マウスの脳と肝臓におけるサイトカイン等の遺伝子発現量の変化

LPS 投与 3 時間および 24 時間後の脳の炎症性サイトカインおよび iNOS の遺伝子発現量を SIRP α KO マウスと野生型マウスで比較した。投与 3 時間後は IL-1 β の発現量が SIRP α KO マウスで有意に高く、また TNF α 、IL-6、iNOS の発現量は KO マウスで高い傾向にあったが、有意差は示されなかった。さらに 24 時間後には、KO マウスと WT マウス共にこれらの遺伝子発現量は低下し、両者の値を比較したところ有意差は認められなかった。一方、LPS 投与 8 時間後の肝臓での炎症性サイトカインおよび iNOS 発現量は、SIRP α KO マウスと野生型マウスとの間に IL-1 β 、TNF α 、IL-6 および iNOS の発現量に有意差は示されなかった。

従ってこれらの結果より、SIRP α KO マウスの LPS 投与による体温低下や活動量の低下は、末梢のサイトカインよりも脳内のサイトカインの発現が上昇していることが関与している可能性が示された。Sickness behavior は、炎症性サイトカイン IL-1 β がその症状の発現を誘導するとされている (Saper CB, Nat Neurosci, 2012)。SIRP α KO マウスの LPS 投与後の顕著な活動量の低下は、脳内 IL-1 β の有意な上昇が原因かもしれない。今後の研究でこれらの詳細を検討する予定である。

(4) 細胞特異的 cKO マウスにおける LPS による低体温誘導性の検討

脳内には免疫細胞として主にミクログリア、血管周囲にはマクロファージが存在し、これらの細胞は SIRP α を発現する。そこで、これらの免疫細胞の SIRP α の欠損が LPS 低体温易誘導性に関連している可能性を検討するためにミクログリアおよびマクロファージ特異的 cKO マウスについてテレメトリーシステムを使って LPS 投与後の体温、活動量を測定した。マクロファージ特異的 cKO マウスについては野生型マウスと比較して顕著な体温低下は認められなかった。一方、ミクログリア特異的 cKO マウスはやや体温低下や活動量の低下が強く出る傾向があるものの全身 SIRP α KO マウスに比べるとその変化は穏やかであった。

これら結果より、①脳血管周囲や末梢のマ

クロファージの SIRPa が Sickness behavior や低体温に關与している可能性は少ないと考えられること、②ミクログリアの SIRPa 欠損は炎症性サイトカイン、特に IL-18 の上昇を引き起こし、Sickness behavior の症状を悪化させる可能性が示された。しかし、③ミクログリアの SIRPa 欠損だけでは、全身 KO マウスの症状の説明には至らず、ミクログリアだけでなく神経細胞の SIRPa の關与が疑われる。つまり、ミクログリアや神経細胞の SIRPa 分子は通常では低体温を抑制し恒温性を維持するよう機能すると想定される。一方で、神経細胞の SIRPa のリン酸化は低温ではより強く誘導されるので、冬眠のような体温低下が強く誘導されるような状況では、リン酸化を受けた SIRPa は体温調節とは別の機能、例えば低温耐性を誘導するような機能が存在するのかもしれない。

<引用文献>

- ① Al-Fageeh MB and Smales CM, Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem J*, 2006.
- ② Matozaki T et al, Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPa signaling pathway. *Trends Cell Biol*, 2009.
- ③ Saper CB et al, Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat Neurosci*, 2012.

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 1 件)

- ① Kusakari S, Saitow F, Ago Y, Shibasaki K, Sato-Hashimoto M, Matsuzaki Y, Kotani T, Murata Y, Hirai H, Matsuda T, Suzuki H, Matozaki T, Ohnishi H. Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice. *Mol Cell Biol*, 査読有、Vol.35, 2015, pp1557-1572
DOI: 10.1128/MCB.01339-14

[学会発表](計 16 件)

- ① Miho Sato-Hashimoto, Yuriko Hayashi, Shinya Kusakari, Eriko Urano, Masahiro Shigeno, Tsuneo Sekijima, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hirokazu Murakami, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi, Hypothermia-dependent and -independent effects of forced swim on the phosphorylation states of signaling molecules in mouse hippocampus, *Neuro 2013*, 国立京都国際会館、2014.6.20-23
- ② Shinya Kusakari, Fumihito Saitow, Miho Sato-Hashimoto, Koji Shibasaki, Yukio Agou, Toshio Matsuda, Benjamin G.

Neel, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi, Functional Analysis of A non-receptor type protein tyrosine phosphatase Shp2 in the adult brain, *Neuro 2013*, 国立京都国際会館、2014.6.20-23

- ③ 橋本美穂、齊藤泰之、金子哲也、大西浩史、草苺伸也、小谷武徳、村田陽二、岡澤秀樹、的崎尚、SIRPa による脾臓 T 細胞の恒常性の調節、群馬大学医学部刀城会館、2016.9.26-27

- ④ 草苺伸也、橋本美穂、柴崎貢志、吾郷由希夫、松田敏夫、Benjamin G. Neel、小谷武徳、村田陽二、的崎尚、大西浩史、細胞質型チロシンホスファターゼ Shp2 の成熟脳における機能解析、群馬大学医学部刀城会館、2016.9.26-27

- ⑤ Miho Sato-Hashimoto, Yuriko Hayashi, Shinya Kusakari, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi, Regulation of microglial homeostasis through cell-cell interaction signal, *Neuroscience 2014*, パシフィコ横浜、2014.9.11-13

- ⑥ Shinya Kusakari, Fumihito Saitow, Miho Hashimoto, Yasunori Matsuzaki, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hirokazu Hirai, Hidenori Suzuki, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi, Functional analysis of protein tyrosine phosphatase Shp2 in post-mitotic neurons, 第 11 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス、東北大学医学部 長陵会館 2014.11.12-14

Miho Sato-Hashimoto, Tomomi Nozu, Eriko Urano, Yasuyuki Saito, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi, Analysis of cell-cell interaction signal that regulates microglial homeostasis, 第 38 回日本神経科学大会、神戸コンベンションセンター、2015.7.28

- ⑧ Hiroshi Ohnishi, Shinya Kusakari, Miho Sato-Hashimoto, Shuya Ishikawa, Eriko Urano, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki, Behavioral analysis of forebrain neuron-specific Shp2 conditional knockout mice, 第 38 回日本神経科学大会、神戸コンベンションセンター、2015.7.28

- ⑨ Ohnishi Hiroshi, Kusakari Shinya, Sato-Hashimoto Miho, Ishikawa Shuya, Urano Eriko, Kotani Takenori, Murata Yoji, Matozaki Takashi, Behavioral phenotypes of neuron-specific Shp2 conditional knockout mice, 第 58 回日本神経化学学会大会、大宮ソニックシティ、2015.9.11-13

- ⑩ Sato-Hashimoto Miho, Nozu Tomomi, Urano Eriko, Saito Yasuyuki, Kotani Takenori, Murata Yoji, Matozaki Takashi, Ohnishi Hiroshi, Cell-cell interactions via CD47-SIRPa signal regulate microglial activation, 第 58 回日本神経化学学会大会、大

宮ソニックシティ、2015.9.11-13

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、ミクログリアにおける SIRPα シグナルの役割、第 62 回北関東医学会総会、2015.10.1-2

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、SIRPα 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

〔図書〕(計 2 件)

① 大西浩史, 橋本美穂 (2014). 膜型分子 CD47 と SIRPα による細胞間接触シグナルと脳内環境制御. 114~118, 脳内環境—維持機構と破綻がもたらす疾患研究 (遺伝子医学 MOOK 26 号), メディカルドゥ, 大阪.

② 橋本美穂, 大西浩史 (2015). ミクログリアを制御する細胞間相互作用シグナル. 1350~1353, Clinical Neuroscience 33 巻 12 月号, 中外医学社, 東京.

〔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 :
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
橋本 美穂 (SATO-HASHIMOTO Miho)
群馬大学・大学院保健学研究科・
日本学術振興会特別研究員 (RPD)
研究者番号 : 90381087

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
大西 浩史 (OHNISHI Hiroshi)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号 : 70334125

(4) 研究協力者
()