

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861345

研究課題名(和文)機能性視床下部性腺機能低下におけるミクログリアの役割

研究課題名(英文)Role of microglia in functional hypothalamic hypogonadism

研究代表者

藤岡 仁美 (Fujioka, Hitomi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：50410064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：感染ストレスにより黄体形成ホルモン(LH)分泌が抑制されることが知られている。申請者らは予備実験で、ミクログリア/マクロファージ(M ϕ)系細胞の活性化阻害薬であるミノサイクリンの前投与により、リポポリサッカライド(LPS)投与によるLHサージ状分泌抑制が回復することを発見した。本研究では、LPS投与によるLH分泌抑制に關与するミクログリア/M ϕ 系細胞由来の分子について検討した。その結果、終板脈絡器官のIba1(ミクログリア/M ϕ 系細胞のマーカータンパク質の一種)陽性細胞の一部が、IL-1 β の分泌を介して、LPSによるLHサージ状分泌抑制に關与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory/immune challenge is known to suppress luteinizing hormone (LH) secretion. We previously observed that pretreatment with minocycline, a potent inhibitor of microglial activation, significantly alleviate the suppression by lipopolysaccharide (LPS) of ovarian steroid-induced LH surge in ovariectomized (OVX) rats. In this study, we observed that IL-1 β and IL-6, but not IL-2, gene expressions were increased by LPS treatment in the preoptic area of ovarian steroid-primed OVX rats. Minocycline pretreatment tended to attenuate the induction of cytokines by LPS. IL-1 β immunoreactivity was found only in Iba1 (a marker of microglia/macrophage) immunoreactive cell in the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) in LPS treated rats. These results suggest that IL-1 β produced by microglia/macrophage in the OVLT is involved in the inflammatory/immune challenge induced suppression of LH secretion.

研究分野：神経内分泌

キーワード：LH ミクログリア マクロファージ ストレス IL-1 終板脈絡器官

1. 研究開始当初の背景

機能性視床下部性無月経は、不良な栄養状態や代謝的なストレス、物理的または心理的なストレスと関連があることが知られている。ストレスにより黄体形成ホルモン (LH) 分泌が抑制されることはヒトや様々な実験動物で示されている。一般に、ストレスにより様々な神経伝達物質の放出の変化やシナプス構造のリモデリングなどニューロン機能に変化が起こることが知られており、神経伝達物質の放出の変化がストレスによる LH 分泌抑制に関与することが示されている。

近年、ストレスによりミクログリアの機能が変化 (活性化) することが報告された。ミクログリアの活性化は、ニューロンの構造や機能に影響することが示されている。更に、ストレスによる認知機能低下や情動の変化にも、このミクログリアの機能変化が関与することが報告された。これらのことから、ストレスによるニューロン機能変化と行動変化に活性化ミクログリアが関与することが強く想定される。

しかし、グリア細胞による GnRH ニューロン機能の調節に関する研究の多くはアストロサイトに着目したものであり、ストレスによる視床下部性生殖機能抑制にミクログリアが関与するのかについては全く解っていない。

上記の学術的背景をふまえ、申請者は、ストレスによるミクログリアの活性化が GnRH ニューロン機能に影響を与え、LH 分泌を抑制するとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、感染ストレス (リポポリサッカライド (LPS) 投与) による性ステロイド誘起 LH サージ状分泌抑制へのミノサイクリン (ミクログリア活性化抑制作用を持つ) の影響を調べた。その結果、ミノサイクリンの前投与により感染ストレスによる LH サージ状分泌抑制が減弱した。この予備実験の結果は、上記仮説を強く支持するものである。

2. 研究の目的

上記の背景より、本研究ではストレスによる LH 分泌抑制へのミクログリア活性化の関与の検討と、この LH 分泌抑制に関与する活性化ミクログリア由来シグナル伝達分子を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣摘出しエストロゲン/プロゲステロン処置した Wistar-Imamichi 系雌ラットに、ミクログリア/マクロファージの活性化阻害薬であるミノサイクリンまたは生理食塩水を腹腔内に前処置し、LPS または生理食塩水を留置カニューレより静脈内に投与した。2 時間後に視床下部視索前野を含む領域を切り出し、LPS 投与による視床下部視索前野領域における炎症性メディエーター遺伝子の発現上昇に対するミノサイクリンの影響を、qPCR 法を用いて検討した。

(2) 卵巣摘出しエストロゲン/プロゲステロン処置した雌ラットに、ミクログリア/マクロファージの活性化阻害薬であるミノサイクリンまたは生理食塩水を腹腔内に前処置し、LPS または生理食塩水を留置カニューレより静脈内に投与した。LPS または生理食塩水投与 2 時間後にホルムアルデヒドで灌流固定を行い、脳サンプルを作成、視床下部視索前野 (POA) とその前後を含む切片を作成し、IL-1 に対する免疫組織化学を行い、IL-1b の局在を検討した。

(3) 卵巣摘出しエストロゲン/プロゲステロン処置した雌ラットに LPS を留置カニューレより静脈内に投与した。2 時間後にホルムアルデヒドで灌流固定を行い、脳サンプルを作成、視床下部視索前野とその前後を含む切片を作成し、CD11b または Iba1 (ともにミクログリア/マクロファージ系細胞のマーカータンパク質として広く用いられる) と IL-1 との二重蛍光免疫組織染色を行い、IL-1b 発現細胞とミクログリア/マクロファージ系細胞との組織学的関係を検討した。

(4) CD11b 陽性細胞にてジフテリアトキシン受容体 (DTR) を発現する CD11b-DTR-EGFP マウスの、視床下部視索前野領域での組み換え遺伝子発現を、EGFP 抗体を用いた免疫染色で検討した。

(5) 卵巣摘出した雌ラットにミクログリア活性化阻害薬であるミノサイクリンまたは生理食塩水を腹腔内に前処置し、留置カニューレより 6 分おきに連続採血を 3 時間行った。LPS または生理食塩水を採血開始 1.5 時間後に留置カニューレより静脈内に投与した。血清より LH 濃度を RIA 法により測定し、LPS による LH パルス状分泌抑制へのミノサイクリン前投与の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 感染ストレスによる LH サージ状分泌の抑制に関与する活性化ミクログリア由来因子の検討

申請者は先行研究で、LPS 投与による LH サージ状分泌の抑制が、ミクログリア/マクロファージ活性化阻害薬であるミノサイクリンの前投与で、回復することを明らかにした。本研究では、この抑制に関与するミクログリア由来因子を検討するため、GnRH ニューロン細胞体を多く含む視床下部視索前野領域における炎症性メディエーター (IL-1, IL-2, IL-6, COX-2, iNOS) の遺伝子発現に対するミノサイクリンの影響を、qPCR を用いて検討した。その結果、LPS の投与により IL-1・IL-6・COX-2・iNOS の遺伝子発現の上昇が観察された。ミノサイクリンの前投与により、このうち IL-1 と IL-6 の遺伝子発現の上昇が減弱する傾向が観察された。これらの結果により、IL-1 および IL-6 が LPS による LH

サージ状分泌抑制に關するミクログリア由来因子である可能性が示唆された。(一部を第 41 回日本神経内分泌学会学術集会にて発表)

(2) 視床下部視索前野領域における LPS 誘導性 IL-1 タンパク質発現細胞の組織的分布の解析

上記(1)の結果をふまえ IL-1 に着目し、視床下部視索前野領域において、LPS 投与により IL-1 の発現が増加する細胞の分布を、IL-1 抗体を用いた免疫組織化学にて検討した。生理食塩水投与群では、終板脈絡器官および視索前野で IL-1 陽性細胞は観察されなかった。生理食塩水前投与-LPS 投与群では、終板脈絡器官で IL-1 陽性細胞が観察された。一方視索前野では IL-1 陽性細胞は観察されなかった。ミノサイクリン前投与 LPS 投与群では、終板脈絡器官で IL-1 陽性細胞が観察されたが、その数は生理食塩水前投与-LPS 投与群に比べ少ない傾向が見られた。視索前野では IL-1 陽性細胞は観察されなかった。これらの結果より、終板脈絡器官の IL-1 陽性細胞が LPS による LH サージ状分泌抑制に關する可能性が示唆された。(第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会にて発表)

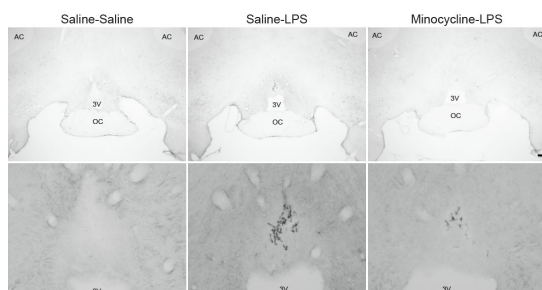


図 1 終板脈絡器官における IL-1 の発現

(3) LPS 誘導性 IL-1 発現細胞とミクログリア/マクロファージ系細胞の關係の検討

上記(2)の結果をふまえ、LPS により IL-1 を発現する終板脈絡器官の細胞が、ミクログリア/マクロファージ系細胞であるのかを検討するため、CD11b または Iba1 と IL-1 との二重蛍光免疫組織染色を行い、その同在を解析した。その結果、IL-1 陽性細胞は Iba1 陽性であった。脳実質の Iba1 陽性細胞では IL-1 のシグナルは観察されず、終板脈絡器官の Iba1 陽性細胞の一部で IL-1 の発現が観察された。一方、IL-1 陽性細胞は CD11b 陰性であった。CD11b 陽性細胞は脳実質では観察されたが終板脈絡器官では観察されなかった。これらの結果より、LPS によって IL-1 発現が上昇する細胞は Iba1 陽性細胞の一部であり、CD11b 陰性であることが示された。(一部を第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会にて発表)

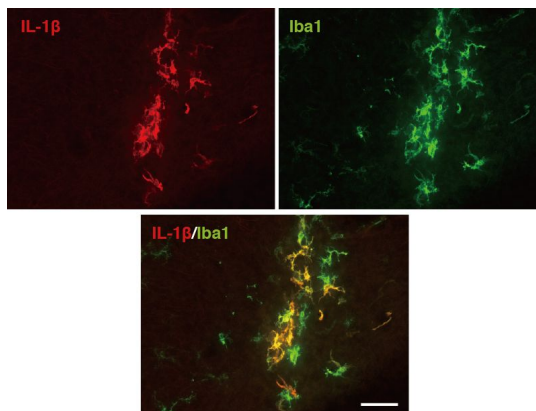


図 2 LPS 投与ラット終板脈絡器官における IL-1 陽性細胞と Iba1 陽性細胞の分布

(4) CD11b-DTR-EGFP マウスの視床下部視索前野領域における組み換え遺伝子発現の検討

本実験では当初、CD11b-DTR-EGFP マウスを用いて、脳内のミクログリア/マクロファージ系細胞を後天的に除去し、LPS による LH サージ状分泌抑制へのミクログリア/マクロファージ系細胞の關与を検討する予定であった。まず、このマウスにおける組み換え遺伝子の視床下部視索前野領域での発現を、抗 EGFP 抗体を用いて組織化学的に検討した。正常マウス (LPS 非投与) では、白質ではシグナルが観察されたが、灰白質では、シグナルはほとんど観察されず、組み換え遺伝子の発現が低いことが示唆された。さらに上記(3)にて LPS 誘導 IL-1 発現細胞が CD11b 陰性であったことから、本実験は中止した。

(5) 感染ストレスによる LH パルス状分泌抑制へのミクログリア/マクロファージ系細胞の關与の検討

LPS 投与による LH パルス状分泌の抑制に、ミクログリア/マクロファージ系細胞の活性化が關与するのかわ、ミノサイクリンを用いて検討した。その結果、ミノサイクリンの前投与は、LPS による LH パルス状分泌の抑制を回復しないことが示された。この結果より、LPS による LH サージ状分泌抑制機構と LH パルス状分泌抑制機構が異なり、前者は活性化ミクログリア/マクロファージ系細胞が關与し、後者は關与しない可能性が示唆された。(第 93 回日本生理学会大会にて発表)

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

藤岡 仁美、福島 篤、船橋 利也、明間 立雄、ミノサイクリンはリポポリサッカライドによる LH パルス状分泌抑制を回復しない (Minocycline did not

affect the suppression by lipopolysaccharide of pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats.) 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 23 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

藤岡 仁美、船橋 利也、明間 立雄、プロスタグランジン E2 の GnRH ニューロン miniature EPSC への影響、第 42 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会、2015 年 9 月 18 日、仙台市戦災復興記念館 (宮城県・仙台市)

藤岡 仁美、福島 篤、船橋 利也、明間 立雄、終板脈管器官のミクログリア / マクロファージ系細胞は IL-1 β を介してリポポリサッカライドによる LH サージの抑制に關与する (IL-1 β produced by Microglia/macrophage in the organum vasculosum of the lamina terminalis is involved in the suppression by lipopolysaccharide of steroid-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized rats.) 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015 年 3 月 22 日、神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

藤岡 仁美、福島 篤、船橋 利也、明間 立雄、急性ストレスによる LH 分泌抑制へのミクログリアの關与、第 41 回日本神経内分泌学会学術集会、2014 年 11 月 1 日、都道府県会館 (東京都・千代田区)

藤岡 仁美、船橋 利也、明間 立雄、プロスタグランジン E2 の GnRH ニューロン微小 EPSC への影響 (Effects of prostaglandin E2 on miniature EPSCs of gonadotropin-releasing hormone neurons.) 第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/physiology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤岡 仁美 (FUJIOKA, Hitomi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：50410064

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

明間 立雄 (AKEMA, Tatsuo)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：60128585

船橋 利也 (FUNABASHI, Toshiya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：70229102