

論 文 要 旨

Orexin neurons are indispensable for stress-induced thermogenesis in mice

〔 オレキシンニューロンはマウスにおいて
ストレスによる体温上昇に不可欠である 〕

砂永 仁子

【序論および目的】

オレキシン含有ニューロンは、視床下部に存在し、覚醒状態の維持、摂食、内分泌など様々な生理機能に関与していることが分かっている。ストレス防御反応に際しては、血圧、心拍数、呼吸数、換気量の増加、鎮痛、覚醒度並びに行動量の増加など、複数の出力にオレキシンが不可欠であることが明らかになっている。

今回の研究は、まだ検討されていなかった体温調節におけるオレキシンニューロンの役割を検討することを目的とした。合わせて、オレキシン及びオレキシンニューロンに存在する他の共存伝達物質（グルタミン酸、ガラニン、ダイノルフィン）の体温調節における役割を検討した。

【材料および方法】

材料として、オレキシン遺伝子ノックアウトマウス（ORX-KO;オレキシンは欠如しているが他の共存伝達は存在する）、オレキシン含有ニューロン特異的破壊マウス（ORX-AB ;オレキシンと共存伝達物質がすべて欠如している）、ならびに対照野生型マウス（WT）を用いた。

方法として、直腸内へ温度プローベを反復挿入することによってストレス刺激とした（handling stress）。ストレスによる体温上昇を前投薬のなしの場合、生理食塩水または β -3 阻害薬を腹腔内に前投与の場合、溶媒または α -1 阻害薬投与を腹腔内に前投与した場合について検討した。Handling stress によって非ふるえ熱産生物質である褐色脂肪組織（BAT）が活性化されていたかを評価するため、ミトコンドリアの uncoupling protein-1（UCP-1）の mRNA をリアルタイム PCR にて定量した。褐色脂肪組織の機能が正常であるか否かを確認するために、 β -3 受容体作動薬を腹腔内に投与し、褐色脂肪組織の温度変化も測定した。オレキシン含有ニューロンの活性化を最初期遺伝子（c-Fos）の発現で評価した。

【結 果】

Handling stress 前のベースラインの体温に関しては三群間で差は認められなかった。WT マウスでは handling stress によって刺激開始後約 20 分後をピークとする体温上昇が認められた。KO マウスにおいても WT マウスと同様の handling stress による体温上昇が認められたが、AB マウスにおいては体温上昇が認められなかった。 β -3 阻害薬を腹腔内に前投与すると WT, KO マウスいずれも生理食塩水の前投与群と比較して handling stress による体温上昇が抑制されていた。また、 α -1 阻害薬を腹腔

内に前投与した場合は handling stress による体温上昇抑制は認められなかった。

Handling stress によって、WT,KO マウスの褐色脂肪組織の UCP-1 は有意に増加していたが、AB マウスにおいては増加が認められなかった。

褐色脂肪組織温は、WT,KO,AB いずれのマウスも腹腔内に β -3 受容体作動薬投与後に上昇しているのが認められた。

WT マウスにおいては Handling stress 後に c-Fos の発現量が増加し、ORX との二重染色されている細胞数が増加していた。また、KO マウスにおいても handling stress を与えたマウスのほうが c-Fos の発現量も増加し、ORX の代わりにマーカーとして用いた LacZ との二重染色されている細胞数の増加が認められた。

【考察及び結論】

基礎体温は三群のマウスで差がなかったことより、オレキシンニューロンは基礎体温維持には関与が薄いと結論された。WT,KO マウスの handling stress による体温上昇は選択的 β -3 阻害薬投与により抑制され、 α -1 阻害薬により抑制されなかったことにより、ストレスによる体温上昇は血管収縮性交感神経よりも褐色脂肪細胞支配の交感神経の活性化が重要であることが示された。

Handling stress によって、WT,KO マウスの体温が上昇したのに対し、AB マウスでは上昇しなかった。UCP-1 の測定結果は体温の変化と良く一致していたので、ストレスによる体温上昇にはオレキシンニューロンを経由した褐色脂肪細胞の活性化が関与していると考えられた。 β -3 受容体投与によって、いずれのマウスも褐色脂肪組織温は上昇していた。このことにより、AB マウスの褐色脂肪組織自体は正常であることが示され、AB マウスにおける体温上昇消失の原因は中枢神経系の異常、すなわちオレキシンニューロンの欠損にあると推測された。

WT,KO のいずれのマウスも免疫組織学的染色を行うことにより、オレキシンニューロンにおける c-Fos の発現量が handling stress によって増加している事が確認され、ストレスによってオレキシンニューロンが活性化されているのが確認できた。

以上をまとめると、オレキシン含有ニューロンはストレス時の体温調節に不可欠であるが、オレキシン自体よりも共存伝達物質の方が重要であると考えられた。

ストレス時の血圧・呼吸等の上昇にはオレキシン自体が重要であるとの過去の報告と合わせ考えると、ストレス防衛反応の全ての要素が完全に出現するためには、オレキシン及び共存伝達物質の双方を含むオレキシンニューロンが不可欠である、と結論された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第133号		学位申請者	砂永 仁子
審査委員	主査	乾 明夫	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	亀山 正樹	副査	橋口 照人
	副査	垣花 泰之	副査	松永 明

Orexin neurons are indispensable for stress-induced thermogenesis in mice (オレキシンニューロンはマウスにおいてストレスによる体温上昇に不可欠である)

オレキシン含有ニューロンは、ストレス防御反応に際して、複数の出力に不可欠であることが明らかになっている。今回の研究は、まだ検討されていなかった体温調節におけるオレキシンニューロンの役割を検討することを目的とした。

材料として、オレキシン遺伝子ノックアウトマウス (KO)、オレキシン含有ニューロン特異的破壊マウス (AB)、ならびに対照野生型マウス (WT) を用いた。直腸内への温度プローベの反復挿入をストレス刺激とした (handling stress)。ストレス刺激による体温上昇を、前投薬なしの場合、生理食塩水または β -3 アドレナリン阻害薬を腹腔内に前投与した場合、溶媒または α -1 アドレナリン阻害薬投与を腹腔内に前投与した場合について検討した。Handling stress による褐色脂肪組織 (BAT) の活性化を評価するため、ミトコンドリアの UCP-1 (uncoupling protein-1) の mRNA をリアルタイム PCR にて定量した。 β -3 アドレナリン受容体作動薬を腹腔内に投与し、褐色脂肪組織の温度変化も測定した。オレキシン含有ニューロンの活性化を最初期遺伝子 (c-Fos) の発現で評価した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. Handling stress による直腸温上昇は WT, KO マウスで観察されたが AB マウスでは観察されなかった。
2. WT, KO マウスの Handling stress による体温上昇は選択的 β -3 アドレナリン阻害薬の前投与によって抑制されたが、 α -1 アドレナリン阻害薬の前投与によっては抑制されなかった。
3. Handling stress によって WT, KO マウスの UCP-1 は増加したが AB マウスの UCP-1 は増加しなかった。
4. β -3 アドレナリン受容体作動薬投与により WT, KO, AB いずれのマウスも褐色脂肪細胞温は上昇した。
5. WT, KO マウスでは、ストレス刺激によって視床下部オレキシンニューロンの c-Fos の発現量が増加した。

以上の結果からオレキシン含有ニューロンはストレス時の体温調節に不可欠であるが、オレキシン自体よりも共存伝達物質の方が重要であると考えられた。

ストレス時の血圧の上昇、呼吸数の増加などの反応にオレキシン自体が重要であるとの過去の報告がある。この事と合わせ考えると、ストレス防衛反応の全ての要素が完全に出現するためには、オレキシン及びグルタミン酸、ガラニン、ダイノルフィンなどの共存伝達物質の双方を含むオレキシンニューロンが不可欠であることを示した点で本研究は非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第133号		学位申請者	砂永 仁子
審査委員	主査	乾 明夫	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	亀山 正樹	副査	橋口 照人
	副査	垣花 泰之	副査	松永 明

主査および副査の5名は、平成23年8月29日申請者 砂永 仁子君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) KO、ABマウスの見た目の違い、また、基礎的体温のメカニズムの違いは

(回答) KO、ABマウスの見た目の違いは基本的にはない。今回の実験において α -1 アドレナリン阻害薬投与後に体温が低下したことから考えると、マウスにおいては尾の末梢血管が基礎的体温調節に関与していると考えられる。

質問2) Real time PCRではどのくらいの組織量でどのくらいのカウントを行うのか

(回答) 褐色脂肪組織は、一匹当たり約150mg摘出された。それを全量使用しRNA抽出を行った。cDNAは一匹当たり6マイクログラム使用し、1サンプル当たり三回の測定を行った。

質問3) 体温について、DMHの場所のみが関与するのであれば、そのみに焦点を絞ってもよいのではないか

(回答) 免疫組織学的な染色の際に、脳弓を境として外側・内側で染色された細胞数を別々にカウントした。ストレス刺激によって内側野のオレキシンニューロンがより強く活性化されたが、外側野のオレキシンニューロンも活性化された。この事より、多少なりとも外側のオレキシンニューロンも体温上昇に関与していると考えられた。

質問4) オレキシンニューロンの投射部位によって摂食、睡眠などの機能との対応が分かっているのか

(回答) 摂食には弓状核が関与していると考えられており、睡眠や覚醒には腹外側視索前野、青斑核、結節乳頭体核、背側縫線核などが関与していると考えられている

質問5) ストレスの違いにより反応は異なってくるのか

(回答) 寒冷ストレスによる反応については、視床下部のオレキシンニューロンが活性化されることが確認されており、今回の実験と同じような過程による反応が考えられる。

質問6) 今回の実験では、褐色脂肪組織の活性化がストレス反応による体温上昇には重要という話であったが、末梢血管が収縮する反応だけが起こる場合があるのか、または、同時に起こる場合があるのか

(回答) 感染症による発熱においては、同時に起こる。熱放散抑制に対する別の経路が存在するため、熱放散の抑制と熱産生が同時に起こることもある。

質問7) オレキシンニューロンの共存伝達物質でストレスによる体温上昇に関与していると思われるものは、一つ一つ調べていけばわかるのか

(回答) 共存伝達物質のうちガラニン、ダイノルフィンが脳室内投与により体温が低下するという報告がある。グルタミン酸のアゴニストを縫線核に投与することによって、褐色脂肪組織の活性化が認められる。このことにより今後検討は必要であるが、グルタミン酸が関与する可能性が高いと考えられる。

質問8) 実験を開始するにあたって、KOとABマウスを初めから同時に使用したのか、それとも別々に使用したのか

(回答) 防衛反応に対する実験を行う上で、KOとABマウスの両者を使用し、循環・呼吸では同様の反応が認めら

れた。同様に handling stress に対する反応を両マウスで行ったところ、直腸温の上昇に差が認められた。このため、共存伝達物質の有無がこの結果の違いになると考え、今回の実験を行うこととなった。

質問9) AB マウスはメンデルの法則に従って生まれてくるのか

(回答) メンデルの法則に従って生まれてくる。

質問10) 今回の実験でオスのみを使用した理由はあるのか

(回答) メスの場合、月経周期が基礎体温に変化をもたらす可能性があり、今回の実験ではオスのみを使用した。

質問11) ニューロトキシン3の神経障害の機序は何か

(回答) トリプレットリピート病の原因であるアタキシン3というアポトーシスを起こす神経毒によって神経障害が起こる。

質問12) GLP-1とオレキシンの分子の関係はどのように理解しているか

(回答) 両者は同程度の分子量の生理活性ペプチドであるが、アミノ酸配列は全く異なり生理機能にも類似性はない。使用した抗体に交差性がないことを確認して実験を行った。

質問13) Fig. 3の縦軸の基準はどのような設定になっているのか

(回答) 絶対値に対する比較となっている。

質問14) Handling stressを最初に認知する脳の部位は扁桃体なのか

(回答) 不安や恐怖に対する入力扁桃体に入力されるといわれているが、今回の handling stress は不快なストレスであり扁桃体に情報が入力されると思われる。

質問15) 論文中に The reason for incomplete penetration of LacZ expression is unknown とあるがどういう意味なのか

(回答) β ガラクトシダーゼはオレキシンの代わりに遺伝子発現をするように設計してあるが、今回の実験で免疫組織学的に染色された細胞数はオレキシンの細胞数と比較し少なかった。この理由については不明であるが、なんらかの原因で破壊されてしまった事などが考えられる。

質問16) Fig. 2にて、AB マウスもストレスによりわずかな体温上昇が認められるが、オレキシン以外に体温上昇をもたらすものがあるのか

(回答) 甲状腺ホルモンなどの関与が考えられるが、今回の研究ではホルモン値測定は行っておらずホルモンなどの関与については不明である。

質問17) 共存伝達物質の中でグルタミン酸以外の物で体温上昇に関係しているものがわかっているのか、また、摂食、覚醒にもグルタミン酸が関与しているのか

(回答) 現在の時点では共存伝達物質の中で体温上昇に関与するものは判明していない。覚醒にはグルタミン酸が関与している報告もあるが、摂食についての関与はわかっていない。

質問18) 血管収縮にはオレキシンは関与していないのか

(回答) 臓器によってはオレキシンが関与している可能性がある

質問19) α -1 阻害薬を投与した場合、放熱抑制から熱産生へシフトしたということなのか

(回答) 今回の実験の結果からは、熱放散抑制から熱産生へシフトしたのではないかといえる。

質問20) 使用した動物には体重差は認められなかったのか

(回答) 実験に使用した時点では WT, KO, AB マウスで体重差は認められなかった。

質問21) オレキシンの作用は単相性か

(回答) 少なくとも体温に関して、二相性の変化は認められなかった。

質問22) オレキシンがないことの compensation による影響はないのか

(回答) オレキシン受容体阻害薬投与の実験でも遺伝子操作動物と同様の結果が得られ、長期の影響および代償作用の影響は少ないと考えられた。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。