

1. 慢性疲労症候群等の病的疲労の研究
- 1.2. 慢性疲労症候群に関わる代謝動態の研究
- 1.2.1. 疲労状態にいたるまでの脳内代謝動態の解明

京都大学大学院情報学研究科・生体情報処理分野・松村 潔

#### (1) 要約

本研究ではラットのウイルス擬似感染モデルを用い、疲労に関わる脳内分子と脳領域を検討した。2本鎖RNA(poly I:C)をラット腹腔内に投与すると、ウイルス感染時と同様に発熱と自発行動量低下(疲労の指標)が起こった。発熱はプロスタグランジン(PGE2)依存性であり、PGE2は脳血管内皮細胞で産生されること明らかとなった。一方、自発行動量低下はPG非依存性で、その分子機構は現在検討中である。Poly I:C投与により神経活動が上昇する脳領域をc-fos免疫染色で検討し、c-fos反応がPG依存性の脳領域と、PG非依存性の脳領域に分類された。後者の脳領域が疲労に関与していることが示唆された。

#### (2) 研究目的

疲労を引き起こす原因の一つに感染がある。特にインフルエンザ罹患時に経験するように、ウイルス感染時の疲労感は著しい。また慢性疲労症候群の誘因として、ウイルス感染が疑われている。したがって、ウイルス感染時の疲労機構を明らかにする事が、慢性疲労症候群のような病的疲労の原因究明と治療につながると期待される。本研究の目的は、ウイルス感染の情報が如何なる経路で脳に伝達され、如何なる脳領域を介して疲労感を惹起しているかを明らかにすることである。ウイルス感染に伴う共通した感冒様症状は、ウイルスが増殖する際に産生される2本鎖RNAによって引き起こされる。そこで本研究では合成2本鎖RNA投与により擬似的ウイルス感染状態を引き起こしたラットを実験モデルとして用いた。感染から疲労に至る経路を3段階に区分し、それぞれの段階で解析を試みた。すなわち感染に反応する免疫系細胞と、そこから放出されるサイトカイン、サイトカインが脳に作用する機序、サイトカインにより活性化あるいは沈静化する脳内疲労関連神経、の3段階である。

#### (3) 研究方法

##### (i) モデル動物

ウイスター系雄ラット(8週齢)を用い、ウイルス擬似感染モデルとして、以下の3条件の妥当性を検討した。

- 2本鎖RNA(poly I:C) 600 µgの腹腔内投与
- ヒトインターフェロン(hIFNα)の腹腔内投与
- poly I:CとhIFNαの腹腔内同時投与

これらの条件下で体温と自発輪回し量を測定し、妥当なウイルス擬似感染モデルを決定した。

体温測定:ラットをネブタール(50mg/kg 腹腔内注射)で麻酔し、腹腔内に体温測定用送信機を装着した。ラットは受信ボードの上に置いた個別ケージに入れ、体温を10分間隔で測定した。実験までに1週間の回復期間を置いた。

輪回し行動: ラットを回転輪の付いた個別ケージに入れ、輪回し回数を記録した。

#### (ii) プロスタグランジン E2 (PGE2) 測定

ラット腹腔内に poly I:C あるいは生理食塩水を投与し、一定時間後にネブタールで麻酔した。ラット頭部を脳定位装置に固定し、大槽より脳脊髄液を採取し、凍結保存した。脳脊髄液中の PGE2 を酢酸エチルで抽出し、酵素免疫測定法 (EIA 法) により定量した。

#### (iii) 免疫組織化学

##### 脳 PGE2 合成系酵素

Poly I:C 投与して一定時間後にラットをネブタールで麻酔し、左心室よりリン酸緩衝生理食塩水を灌流し脱血した。脳を取り出し、ドライアイス粉末中で凍結した。凍結切片を作成し、スライドグラスに接着させ、2%パラホルムアルデヒド(pfa)あるいは0.1%メタ過ヨウ素酸ナトリウムで固定した。1次抗体として、抗ラットシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)、抗ヒト膜型 PGE 合成酵素 (mPGES)、抗ラット von Willebrand factor(内皮細胞マーカー)を用いた。間接蛍光法によりこれらの抗体を可視化した。

##### 腹腔内細胞、血球細胞サイトカイン

Poly I:C 投与して一定時間後にラットをネブタールで麻酔し、腹腔内に 50ml の PBS を注入する。一定時間後 PBS を回収し、その中に含まれる腹腔内細胞を遠心操作により濃縮し凍結する。その後右心房より血液を採取、血漿と血球成分を遠心分離し、それぞれ凍結保存する。凍結切片を作成し、抗 rat インターロイキン 1 (IL-1 $\beta$ )抗体により染色した。一部の実験では、細胞の同定を行うために、各種のマクロファージ、顆粒球マーカーで2重染色を行った。

##### 脳内 c-fos

Poly I:C 投与して一定時間後にラットをネブタールで麻酔し、左心室よりPBS、次いで4%パラホルムアルデヒドを灌流し脳を取り出した。脳の浮遊切片を作成し、c-fos 免疫染色を行なった。

#### (iv) 血中カルニチン、アセチルカルニチン

16時間絶食させたラットに poly I:C あるいは生理食塩水を腹腔内投与し、3時間後に静脈血を採取した。遠心分離により血漿を採取し凍結した。カルニチン、アセチルカルニチンを定法により測定した(阪大山口浩二先生の協力による)

### (4) 研究成果

#### (i) 擬似感染モデルの妥当性

Poly I:C 腹腔内投与により、ラットは発熱した(図1)。リコンビナント・ヒト・インターフェロン (rhIFN $\alpha$ )の腹腔内投与では発熱は起こらなかった(図2)。Poly I:C と rhIFN $\alpha$ の同時投与では、発熱のピーク値は poly I:C 単独投与時と差がなかったが、発熱の持続時間が増加した。Poly I:C 腹腔内投与により、疲労の指標としての輪回し回数の低下が起こった。しかし、rhIFN $\alpha$ の腹腔内投与による輪回し回数の低下は、対照群(生食投与群)と差がなかった。Poly I:C と rhIFN $\alpha$ の同時投与しても、Poly I:C 単独投与以上の効果は見られなかった。以上の結果より本課題ではウイルス擬似感染モデルとして、poly I:C 単独投与を用いることにした。

#### (ii) 擬似感染症状におけるプロスタグランジン系の関与

発熱には脳内 PGE2 が関与している。Poly I:C による発熱もシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)阻害剤(NS398)によりほぼ完全に抑制された(図5)。一方、poly I:C による輪回し回数の低下は、発熱

を阻害する量の NS398 により影響を受けなかった (図 6)。すなわち poly I:C による輪回し回数の低下は、発熱による 2 次的反応ではない。また、それはプロスタグランジン系を介さない反応であることが示唆された。

Poly I:C 腹腔内投与により、脳脊髄液中の PGE2 濃度は上昇し (図 7)、この上昇は COX-2 阻害剤により抑制された (図 8)。この時、脳血管内皮細胞には COX-2 (図 9) と mPGES (図 10) が誘導された。また COX-2 と mPGES は脳血管内皮細胞の核周囲にほぼ重なって誘導された。以上の結果から、poly I:C による発熱には、脳血管内皮細胞で産生される PGE2 が寄与していることが示された。

#### (iii) 擬似感染モデルにおけるサイトカイン産生

腹腔内に投与した poly I:C がどのような経路で脳に作用するかを考える際に、末梢の免疫系細胞で産生されたサイトカインによる情報伝達が第一に考えられる。Poly I:C 投与後 3 時間で、腹腔内に IL-1 $\beta$  陽性の顆粒球、マクロファージが認められた (図 11、12)。また血液中でも IL-1 $\beta$  陽性顆粒球が認められた。以上の結果から poly I:C による脳の反応に末梢で産生された IL-1 $\beta$  が関与していることが示された。

#### (iv) 擬似感染モデルにおける脳内応答部位

Poly I:C 投与後 3 時間での脳内活性化部位を c-fos 免疫組織化学で検討し、さらにその反応の PG 依存性を調べた。Poly I:C により腹内側視索前野 (VMPO、図 13)、視索上核 (SON、図 14)、室旁核 (PVN、図 15)、視床下部背内側核 (DMN、図 16)、扁桃体中心核 (CeA、図 17)、視床室旁核 (PVT、図 18) で c-fos の発現が増加した。このうち、VMPO、SON、PVN 外側部の c-fos 発現反応は COX 阻害剤で大きく抑制された。一方 PVN 内側部、DMN、CeA、PVT では COX 阻害剤による抑制効果は弱いものであった。以上のことからウイルス擬似感染による脳の活性化に、PG 依存性と非依存性の経路が存在することが明らかとなった。

#### (v) 擬似感染モデルにおける血漿カルニチン、アセチルカルニチンの濃度

慢性疲労症候群の患者では血中アセチルカルニチンの低下が報告されている。本ウイルス擬似感染モデルではカルニチン、アセチルカルニチンとも変化が見られなかった (図 19)。少なくとも、本モデルの疲労にはアセチルカルニチンの低下が関与していないことが示された。

### (5) 考察

我々は様々な原因で疲労を感じるが、その原因の一部に感染症があることは間違いない。慢性疲労症候群では、インフルエンザに罹患したような疲労感が長期にわたって続くといわれる。またこの症候群では、免疫系の異常がしばしば報告されている。したがって、感染時の疲労感は病原菌侵入 免疫系活性化 脳の反応という経路で引き起こされると考えられる。本研究ではこの経路を 3 段階に分類し、それぞれの段階での解明を試みている。

まず、実験モデルとして、poly I:C (2 本鎖 RNA) 腹腔内投与を採用した。これによりラットに発熱と輪回し回数の低下を引き起こす事ができた。一方、ヒトで強い発熱反応と疲労感を引き起こすインターフェロンは、ラットにおいては無効果であった。したがって、poly I:C はインターフェロン (IFN) を誘導して発熱と輪回し回数の低下を引き起こしているのではない。ラットで IFN が無効果である理由は不明である。最近 poly I:C の IFN とは独立した細胞内信号伝達系が明らかにされつつある。その中に、poly I:C による転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化が報告されている [1]。NF- $\kappa$ B の活性化により、数多

くの炎症関連遺伝子が転写される。炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ も NF- $\kappa$ B のコントロール下にある。実際に本研究では poly I:C により、腹腔内マクロファージと顆粒球が IL-1 $\beta$ を産生することを示した。これ以外にも poly I:C により誘導されるサイトカインがあると考えられる。これに関しては今後、網羅的に検討する必要がある。

Poly I:C により引き起こされる発熱は、脳血管内皮細胞での PGE2 合成によって起こることが示された。これは、これまで我々が解明してきた細菌感染や局所炎症による発熱機序と一致するものである[2-3]。脳血管内皮細胞には IL-1 受容体が存在するので[4]、poly I:C 刺激により免疫系細胞で産生された IL-1 $\beta$ が脳血管内皮細胞に作用して PGE2 合成系酵素を誘導すると考えられる。しかしそれ以外のサイトカインの関与も検討する必要がある。

一方、ラットの疲労の指標として用いた輪回し行動の低下は、発熱を抑制する量の PG 合成阻害剤では影響を受けなかった。したがって、輪回し行動の低下(疲労)は発熱の結果2次的に起こる反応ではないことが明らかとなった。輪回し行動の低下は、発熱を引き起こさない程度の微量の PGE2 によって最大限に起こるか、あるいは全く PGE2 を介さないで起こるかのいずれかである。この結果は、ウィルス擬似感染に対する脳内応答にも、発熱と輪回し行動低下に対応して、COX 阻害剤で大きく影響を受ける部位と、あまり影響を受けない部位が存在することを示唆する。そして、輪回し行動の低下に関わる脳内部位は、COX 阻害剤の影響を受けにくい部位であると推定できる。

実際、c-fos 発現を指標にすると、脳内で poly I:C により活性化される部位が見出され、c-fos 発現への COX 阻害剤の効果は脳内部位によって異なっていた。疲労との関連で注目すべきは、扁桃核、視床室旁核、視床下部室旁核内側部、背内側視床下部である。これらの諸核と疲労との関連を明らかにする事が課題である。

## (6) 引用文献

- [1] Iwamura et al.: Induction of IRF-3/-7 kinase and NF- $\kappa$ B in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways, *Genes to Cells* 6, 375-388 (2001)
- [2] Cao et al.: Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain: its possible role in the febrile response, *Brain Res.* 697, 187-196 (1995)
- [3] Cao et al.: Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA in the rat brain by LPS, *Am. J. Physiol.* 272, R1712-1725 (1997)
- [4] Cao et al.: Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible sites of prostaglandin synthesis responsible for fever, *Brain Res.* 733, 262-272 (1996)

## (7) 成果の発表

### 1) 原著論文による発表

#### イ) 国外誌

- Kiyoshi Matsumura, Souhei Kaihatsu, Hissei Imai, Akira Terao, Takuma Shiraki, Shigeo Kobayashi: Cyclooxygenase-2 in the vagal afferents: is it involved in the brain prostaglandin response evoked by lipopolysaccharide?, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 85, 88-92, 2000
- Kanato Yamagata, Kiyoshi Matsumura, Wataru Inoue, Takuma Shiraki, Kyoko Suzuki, Shin Yasuda, Hiroko Sugiura, Chunyu Cao, Yasuyoshi Watanabe, Shigeo Kobayashi: Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever, *Journal of Neuroscience*, 21, 8, 2669-2677, 2001
- Chunyu Cao, Kiyoshi Matsumura, Noriyuki Shirakawa, Mitsuyo Maeda, Ikuyo Jikihara, Shigeo Kobayashi, Yasuyoshi Watanabe: Pyrogenic cytokines injected into the rat cerebral ventricle induce cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells and also upregulate their receptors, *European Journal of Neuroscience*, 13, 1781-1790, 2001
- Kazuhiro Nakamura, Kiyoshi Matsumura, Takeshi Kaneko, Shigeo Kobayashi, Hironori Katoh, Manabu Negishi: The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area, *Journal of Neuroscience*, 22, in press, 2002

### 2) 原著論文以外による発表

#### ア) 国内誌

- 松村 潔、小林茂夫: 疲労と脳-免疫-内分泌相関、*疲労の科学*、井上正康、倉恒弘彦、渡辺恭良編、講談社、36-42、2001
- 松村 潔、井上 渉、小林茂夫: 脳血管内皮細胞:免疫系と脳をつなぐ情報伝達装置、*神経研究の進歩* 45、891-900、2001

#### イ) 国外誌

- Kiyoshi Matsumura and Shigeo Kobayashi: Neuroanatomy of fever: localization of cytokine and prostaglandin systems in the brain, (In *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation, and Pain* (eds. M. Kosaka, T. Sugahara, K.L. Schmidt, E. Simon, Springer-Verlag Tokyo, 290-299, 2001)

### 3) 口頭発表

#### ア) 招待講演

- Kiyoshi Matsumura, Cytokine actions on brain prostaglandin system, *Cytokines and Brain Satellite Symposium for Society for Neuroscience 2000 Nov.*, New Orleans
- 松村 潔他:脳血管内皮細胞:免疫系と脳をつなぐ情報伝達装置、第36回脳のシンポジウム 2001 3月、福岡
- 松村 潔:免疫情報伝達装置としての脳血管内皮細胞、第1回環境生理シンポジウム 2001 3月、京都
- 松村 潔他:脳血管内皮細胞による免疫系から脳への情報伝達、第11回脳血管シンポジウム 2001 9月、大阪
- 松村 潔他:脳と免疫系の対話、*神経科学の基礎と臨床*、2001 12月、大阪