九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

競合的PCR法による脳微量サンプルmRNAの定量 : 炎症性および非炎症性ストレスにおけるラット視床下部および海馬内インターロイキン-1β mRNA発現量の解析

金光, 芳郎
九州大学大学院医学研究院心身医学分野

https://doi.org/10.15017/7236435

出版情報：福岡醫學雜誌. 91 (7), pp.170-183, 2000-07-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

福岡医誌 91(7):170−183, 2000

競合的PCR法による脳微量サンプルmRNAの定量：炎症性および非炎症性ストレスにおけるラット視床下部および海馬内インターロイキン-1β mRNA発現量の解析

九州大学大学院医学研究院心身医学分野（指導：久保千春教授）
九州大学大学院医学研究院統合生理学分野（指導：堀　哲郎教授）
金　光　芳　郎

Quantitation of mRNA in Micro-samples of the Brain by Competitive PCR: Analysis of Expression of Interleukin-1β mRNA in Rat Hypothalamus and Hippocampus after Inflammatory or Non-inflammatory Stress

Yoshio KANEMITSU
Department of Psychosomatic Medicine (Director : Prof. C. Kubo)
Department of Integrative Physiology (Director : Prof. T. Hori)
Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, 812-8582 Japan

Abstract Changes in the expressions of interleukin-1β (IL-1β) mRNA in the rat brain were investigated during inflammatory or non-inflammatory stress. We utilized competitive reverse transcription PCR (RT-PCR) to quantitate precisely the minute amount of IL-1β mRNA in small tissues which were micro-punched out from discrete sites in the brain. Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (100μg/kg) caused a widespread and high elevation of IL-1β mRNA in the hypothalamus, hippocampus and cerebral cortex. Immobilization stress significantly increased IL-1β mRNA only in the hypothalamus, when examined in the brain block samples, which reached a peak 30 minutes after the start of stress. However, examination of the small tissues punched out from discrete sites in the brain revealed a profound elevation of IL-1β mRNA in the CA1 region of the hippocampus and in all the hypothalamic nuclei examined 30 minutes after the start of immobilization stress, but not in the CA3 region and the dentate gyrus or cerebral cortex. The method shown in this report proved to be useful and may be applied to quantify the low amount of mRNA in the small areas in the brain.

はじめに

インターロイキン-1β (IL-1β) は，代表的な炎症性サイトカインの一つであり，免疫系で重要な役割を果たすとともに，脳への信号物質として働き，発熱[13]，食欲の減弱[24]，徐波睡眠増加[22]，痛覚閾値の変化[21]，視床下部・下垂体・副腎皮質系 (hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, HPA axis) の賦活[27]などの様々な中枢性急性期反応を惹起する．さらに，IL-1β は，脳内でも，各種の中枢神経系の疾患のみならず，末梢組織の炎症時や身体・情動ストレス時においても産生されることが知られている[19]．脳内で発現するIL-1β は，神経毒作用[41]もしくは逆に神経保護作用[26]を発揮する他に，比較的早い時間経過で効果が発現する神経伝達/修飾物質様の作用を示すことが報告されている[34]．例えば，ラットに拘束ストレスを負荷すると，HPA axis が賦活されるが，それがIL-1 receptor antagonist (IL-1ra) の視床下部内投与でブロックされることから[29]，ストレス誘発性HPA axis の賦活における視床下部IL-1の関与が推測される．同様に，抗IL-1β 抗体をラットの脳室内に投与すると，徐波睡眠量が減少したり，断眠後の睡眠量増加が抑制されたり

する[22]．また，lipopolysaccharide (LPS) 全身投与などの炎症性ストレスを与えると，IL-1βが脳内に発現し[2)38]，これが発熱やHPA axisの賦活などをはじめとする多彩な中枢神経反応の少なくとも一部に貢献していると考えられている．このように，脳内IL-1は中枢性急性期反応に様々な形で関与していることがわかっているが，その脳内発現部位と生理作用およびその機序についての関係は，未だ不明な点が多く残されている．その理由の一つとして，中枢神経系におけるIL-1蛋白やmRNAの発現量が極微量であり，その変動幅も小さい[19)20)]ことが挙げられる．

微量のmRNAの発現を検出する方法としては，きわめて高い増幅率と特異性を有するreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法があり，特定の微量遺伝子産物を検出するのに用いられている．しかし，PCR法はそのままでは原理的に定量的検出が困難で，これを克服するために種々の方法が開発されてきた．その中で，競合的PCR法は，近年用いられるようになった遺伝子産物の高感度定量法である．この方法は，標準DNAもしくはRNA(mimic DNAもしくはmimic RNA)と，測定対象となる遺伝子産物を混合したのちに反応を行い，それぞれの増幅産物の比から定量を行うものである[7]．この方法により，mRNAの正確な定量が広い範囲に亘って可能となり，従来の代表的mRNAの検出法であるNorthern blotting法より高感度であるのみならず，定量性にも優れた測定システムであることが示されている[5]．

本研究では，まず視床下部（多数の中枢性急性期反応で中心的役割を果たす)，海馬(IL-1レセプターに富み[9]，HPA axisとの関連やストレスに対する様々な反応に関与する[12)18)])および大脳皮質の3ケ所を選んで，炎症性ストレス（LPSの腹腔内投与）および非炎症性ストレス（拘束）負荷時の，IL-1βmRNA発現の各ブロックごとの経時変化を観察した．さらにラット脳の各微小区域を脳切片上で打ち抜き（punch-out)，得られた微小組織サンプル内のmRNAの発現量を競合的PCR法を使って比較定量したのでここに報告する．

実　験　方　法

動物および実験手順の概略

体重290-320 gのWistar系雄ラット（九動）を用いた．動物飼育施設において環境温23± 1 °C，明期(8-20時)，暗期（20-8時）の明暗周期とし，自由摂食，自由飲水の状態で飼育した．

ラットに下記のように，一定時間の炎症性もしくは非炎症性ストレス負荷を加えた後，エーテル麻酔下ですばやく開胸し，ヘパリン20 U/mlを含むphosphate buffered saline（PBS）を左心室腔内より注入して，十分に灌流を行った後，全脳を取り出した．炎症性ストレス負荷では，生理食塩水1.0 mlに溶解したLPS (Sigma L 2630，lot No. 97 H 4018) 100 μg/kgをラットの腹腔内に投与し，1時間後，2時間後，および4時間後に脳を摘出し，下記の手順で，脳サンプルを作成した．ラットの直腸温は，LPS投与後2-5時間の間約1.5°C上昇した．非炎症性ストレス負荷では，金属網でラットを被う非圧迫的拘束を行い，拘束開始から30分，1時間および2時間後に同様の手順で脳サンプルを作成した．

脳ブロック標本の作成

灌流後摘出した脳から，脳の皮質（頭頂葉の一部)，海馬（CA1，CA3および歯状回を含む）および視床下部全体（前後は，視交叉から乳頭体まで，背側は前交連まで，および正中から横2 mmのラインによって境界される部分）を切り出し，これらを脳ブロック標本とし，すばやくドライアイスにて凍結し，−80°Cで保存した．

打ち抜き(punch-out)による微小脳組織切片の採取

微小脳組織切片のpunch-out用の脳ブロックは，アルミホイル内にてO.C.T. Compoundで包埋し，ドライアイス・エタノールにて凍結した後，−80°Cで保存した．微小脳組織切片を採取する当日，保存した脳ブロックをクリオスタット内にて −10°Cに30分以上保持した後，20 μmの厚さで切片を作成した．切断部位の同定およびRNA保持の確認は，必要箇所ごとに切片標本のメチルグリーンピロニン染色を行って顕微鏡下で実施した．切片は，クリオスタット内の黒色板上で，肉眼で部位の確認を行いつつ，1000 μlディスポーザブルピペットチップ（Genetics社，No. 17071-1，内径0.9 mm)の先端で円形の標本を打ち抜いた．標本採取部位をFig. 1に示す．視床下部内では内側視索前野(medial preoptic area，MPO)，外側視索前野(lateral preoptic area，LPO)，第3脳室前腹側領域（antero-

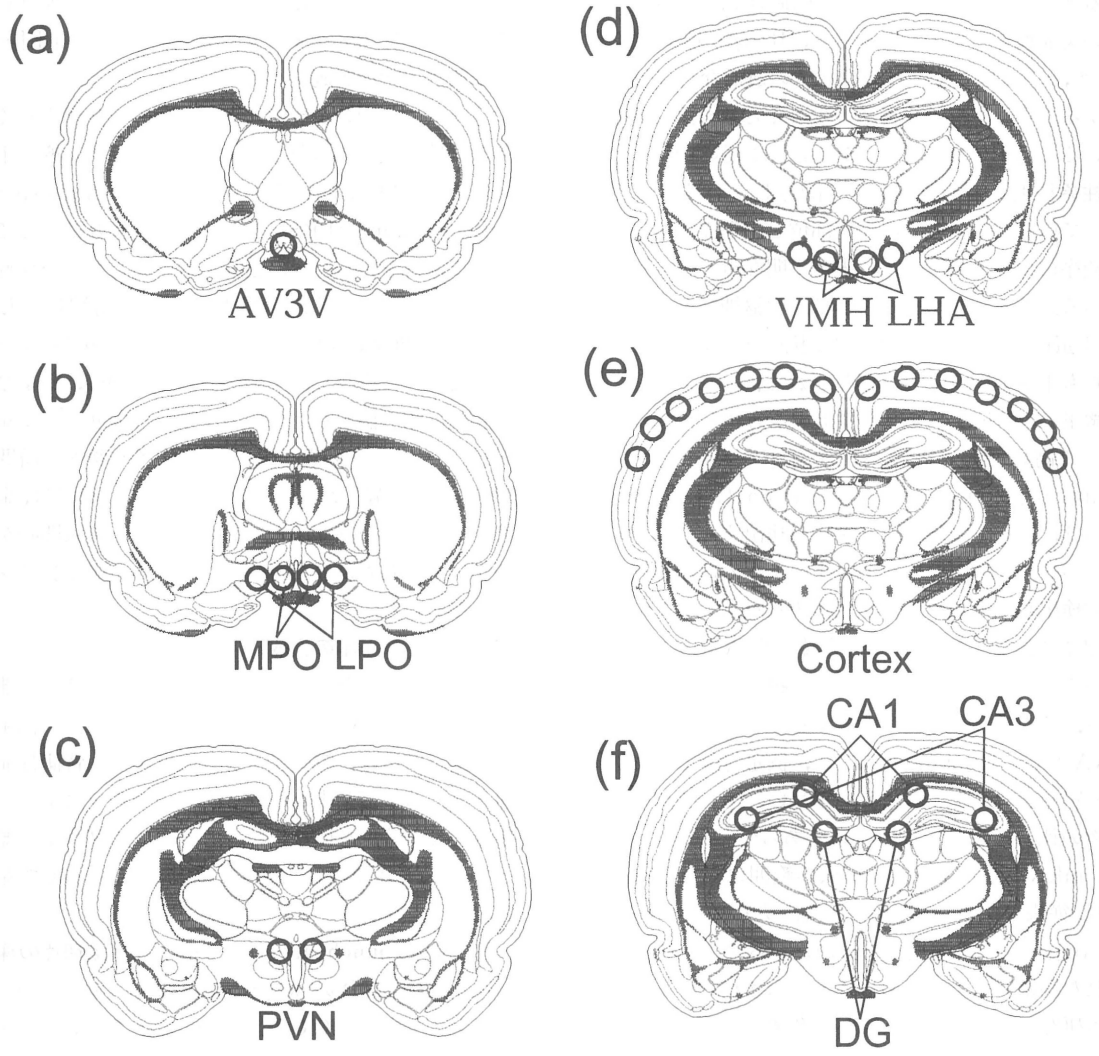


Fig. 1 The punched out regions of the rat brain.
The punched out sites are indicated as circles in the brain. The punched out brain tissues were taken grossly, checking the position frequently by microscopic observation with methylgreen-pyronin staining. 30～50 sections were collected from each region. These maps were copied from the reference[33] CD-ROM and the following section numbers and the distance from the bregma were defined in it. (a) level 17, −0.00 mm : (b) level 19, −0.26 mm : (c) level 26, −1.78 mm : (d) and (e) level 28, −2.45 mm : (f) level 31, −3.70 mm.

ventral region of the third ventricle, AV3V), 室傍核 (paraventricular nucleus, PVN), 腹内側核 (ventromedial nucleus of hypothalamus, VMH), 外側野 (lateral hypothalamic area, LHA) のそれぞれから採取した. 海馬では, CA1 領域, CA3 領域および歯状回 (dentate gyrus, DG) から採取した. また, 大脳皮質の頭頂葉からも採取を行った. 標本は切片をかえながら同一チップで 30～50 回にわたって連続的に punch-out し, 直後の RNA の抽出までチップ内で凍結保存した.

mimic DNA の作成

測定の基準として用いられる競合的 mimic DNA

は，ラットより採取した total RNA をもとに Grassi らの方法を用い PCR によって合成した[8]．その概要を Fig. 2 に示す．まず，逆転写により生成した cDNA をテンプレートとして，Table 1 に示された 2 組のプライマー（sense プライマーと挿入用 antisense プライマー，および antisense プライマーと挿入用 sense プライマー）によってそれぞれ別個に PCR を行い，末端に挿入箇所（Bam HI 部位を含む）を付加した DNA を

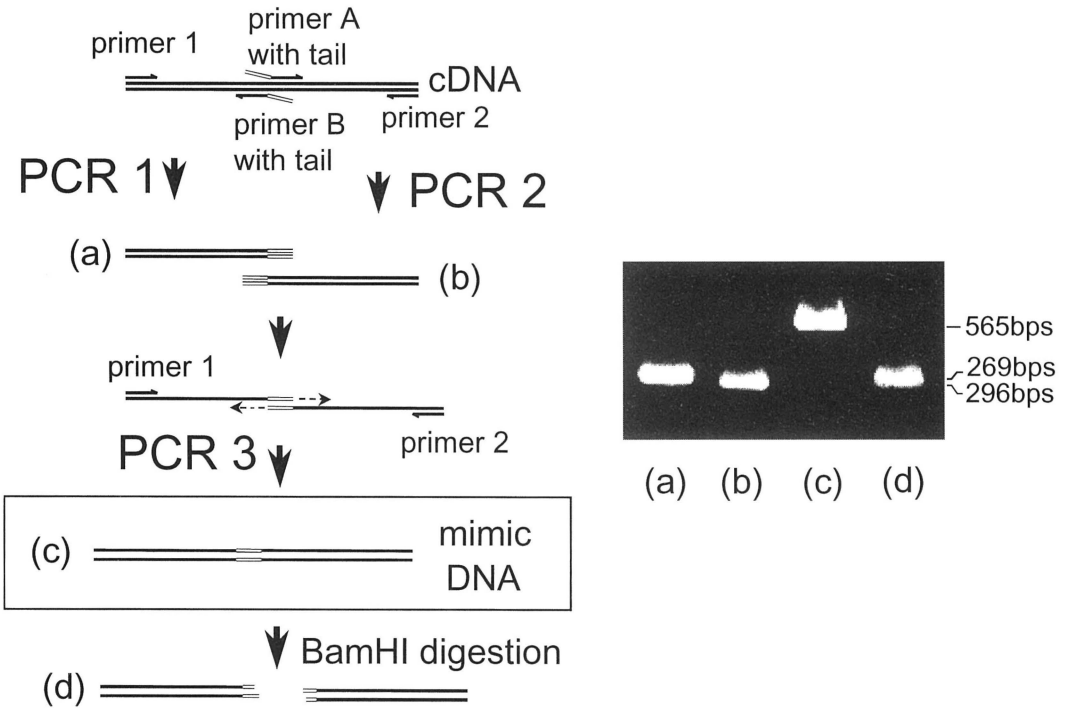


Fig. 2 The production of mimic DNA.
Left : Mimic DNA with an additional restriction site was generated from native cDNA. PCR 1 was performed using primer 1 and primer B with 'tail' which included the restriction site. PCR 2 was performed with primer 2 and primer B which had the complementary tail. Products of PCR 1 and 2 were mixed and amplified by primers 1 and 2 attaching with tails. Right : (a), product of PCR 1 : (b), product of PCR 2 : (c), attached product of PCR 3 : (d), digested product of PCR 3.

Table 1 The sequences of the PCR primers for IL-1β and GAPDH.

primer	sequence (5'-3')
IL-1β	
sense	CAGCTTTCGACAGTGAGGAGAATG
antisense	TGTGCCGTCTTTCATCACACAGGA
insertion sense	ACCTGCAGGGATCCGTCGACGGGATGATGACGACCTGCTA
insertion antisense	GTCGACGGATCCCTGCAGGTACGAGTCACAGAGGACGGGC
GAPDH	
sense	TCCTGCACCACCAACTGCTTAG
antisense	TCTTACTCCTTGGAGGCCATGT
insertion sense	ACCTGCAGGGATCCGTCGACGTATCCGTTGTGGATCTGAC
insertion antisense	GTCGACGGATCCCTGCAGGTGCAGTGATGGCATGGACTGT

2種合成した．次にその2つをテンプレートとして混合し，senseおよびantisenseプライマーによって増幅することにより，中間の挿入箇所以外は元のcDNAと同一配列のmimic DNAを合成した．PCRの反応溶液としては，1×Taq添付PCRバッファーに，Taq polymerase (GIBCO-BRL) 2.5 U/100 μl，0.05% W-1 (GIBCO-BRL)，2.0 mM $MgCl_2$ およびそれぞれ0.2 mMのdNTPを加えたものを用い，テンプレートとして逆転写産物もしくは100倍希釈したPCR産物を，反応溶液の10分の1体積加えた．PCR反応は94°C 3分間の後，93°C 40秒，60°C 40秒および72°C 20秒を1サイクルとして35サイクル行い，72°C 3分間および4°C 1分間を加えた．最終PCR産物はフェノール/クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行ったのち蒸留水に溶解し，限外濾過フィルター (UFC4LTK25，Millipore) にてプライマーおよびdNTPを除去後，分光光度計にて生成量を測定した．mimic DNAは，IL-1βおよびinternal controlとしてのglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) について作成した．

脳ブロック標本からのRNA抽出

凍結した脳ブロックを，0.1 M 2-メルカプトエタノールを含む4 Mグアニジンチオシアネート溶液中にて，ポリトロンホモジナイザーで粉砕した．その溶液を500 μlずつ取り，2 M酢酸ナトリウム (pH 4.0) 50 μlおよび水飽和酸性フェノール500 μlを加え撹拌したのち，200 μlのクロロホルム・イソアミルアルコール混和物（49：1）を加え撹拌した．分離した上層から300 μlを取り，等量のイソプロピルアルコールと混和して−20°Cにて冷却後，12,000 Gで15分間遠心し，沈殿物を70%エタノールで洗浄した．沈殿したtotal RNAは，蒸留水にて溶解後，分光光度計にて濃度を測定した．

微小脳組織切片からのRNAの精製

サンプルを採取したピペットチップの先端を，そのまま0.1 M 2-メルカプトエタノールを含む4 Mグアニジンチオシアネート溶液50 μl中に入れ，ピペッティングによってサンプルと溶液を溶解混和した．その溶液に2 M酢酸ナトリウム (pH 4.0) 5 μlおよび水飽和酸性フェノール50 μlを加え撹拌したのち，20 μlのクロロホルム・イソアミルアルコール混和物（49：1）を加え撹拌した．分離した上層に核酸沈殿剤 (Ethachinmate，Nippon Gene) 0.5 μlを加えてよく混和した後，等量のイソプロピルアルコールと混和して−20°Cに冷却し12,000 Gで15分間遠心した．沈殿物は70%エタノールにて洗浄を行った．

逆転写反応

精製されたtotal RNAを，ブロックサンプルの場合は1 μg，punch-outサンプルの場合はすべてを，11 μlの蒸留水に溶解し，100 μg/mlのランダムヘキサマー1 μlを加えて75°Cで5分間インキュベーションしたのち氷水上にて冷却した．さらに4 °Cに冷却した逆転写酵素（M-MLV transcriptase，GIBCO/BRL）100 Uを含む逆転写溶液8 μl（最終濃度：10 mM DTT，dNTPそれぞれ500 μMおよび1×添付逆転写バッファー）を加え，40°Cで60分間の逆転写反応をおこなった．反応終了後，95°Cで5分間変性を行ったのち，4 °Cで冷却保存した．

競合的PCR

逆転写されたサンプルと，精製・定量されたmimic DNAとの混和物をテンプレートとして，それらの比を段階的に変えてPCRを行った．逆転写産物，および10^{-12}~$^{-15}$ Mのmimic DNA溶液をPCR反応液の10分の1体積ずつ加えた以外は，PCRの反応液組成やサイクル条件はmimic DNA作成の場合と同様であった．PCR反応後，Bam HI 0.5 U/μlを含む同体積の1×Bam HIバッファーを加え，32°Cで30分間インキュベーションを行いmimic DNAの切断を行った．

測定およびデータ処理

PCR産物は0.5×TBEバッファー中で1.5%アガロースゲル電気泳動を行い，エチジウムブロマイドで染色後，CCDカメラで画像データを記録した．画像データは画像解析ソフトウェア（NIH image）で処理し，各バンドの輝度総計を数値化した．輝度総計とは，そのバンドの画素あたりの輝度の総計からバックグラウンドを差し引いたものである．得られたバンドごとの輝度総計から，それぞれのmimic濃度におけるサンプル/mimicの比を求めた．さらにその比を片対数グラフに取り，その値が1と交差する点を求めることにより，サンプル濃度を決定した．発現量を標準化して評価するために，それぞれのサンプルにつきIL-1β mRNAの濃度と内部標準としてのGAPDH mRNA

の濃度を測定し，それらの比を求めた．

統計解析

得られたすべてのデータは χ^2 適合性検定により正規性を検討した結果，対数変換を行い正規化したのちに統計検定を行った．ブロックサンプルを用いた時間経過については，one-way ANOVA にて各群の差を検討したのち，対照群とそれぞれの負荷群との有意差について *Dunnett* 法で検定を行った．punch-out サンプルによる各領域の値については，対照群と負荷群の2群について student *t*-test で検定を行った．

実　験　結　果

競合的 PCR による定量の直線性の検討

今回の検出系で再現性よく直線的定量ができる濃度範囲を確認するため，濃度既知の IL-1β mRNA を含む total RNA 逆転写産物を段階的に希釈し，この希釈溶液中の IL-1β mRNA 量を競合的 PCR 法により測定した．希釈系列は 1.2×10^{-17} mol から 2.8×10^{-21} mol にわたる5段階で実施した(n=4)．この濃度範囲は実際の検体で検出された IL-1β mRNA の濃度範囲とほぼ一致する．その結果は，図示 (Fig. 3) したように，良好な再現性と直線性を示した．

LPS 投与群における IL-1β mRNA の変化

LPS 投与群の，視床下部，海馬，大脳皮質の各ブロック標本における IL-1β mRNA の発現の経時変化を Fig. 4 に示した．視床下部では，対照群と比較して，2時間後および4時間後において，有意な発現量の増加を認めた ($p<0.01$)．海馬および大脳皮質でも，1時間後，2時間後および4時間後において，それぞれの対照群よりも有意に増加していた ($p<0.01$)．最大増加率は，視床下部では4時間後の 15.0 倍，海馬では4時間後の 53 倍，皮質では2時間後の 10.6 倍であった．一方，punch-out 微小サンプルでも，LPS 投与後は，同様に，調べたすべての脳内部位で IL-1β mRNA が2時間後上昇した (Fig. 5)．特に，AV3V，PVN，VMH，CA3 および DG における有意差は，$p<0.001$ であった．

拘束ストレス負荷群における IL-1β mRNA の変化

Fig. 6 に，拘束負荷群の，視床下部，海馬，大脳皮質の各ブロックにおける IL-1β mRNA 発現の経時変化を示した．視床下部においては対照群との間に，30分後および1時間後において，有意な発現量の増加が認められ ($p<0.05$)，その最大増加率は 30 分後の 2.1 倍であった．2時間後には，ほぼ，対照値に戻った．一方，海馬および大脳皮質では，拘束後 30 分から2時間において，IL-1β mRNA は変化しなかった．

拘束ストレス負荷終了 30 分後における punch-out 微小サンプルの各部位における IL-1β mRNA の値を Fig. 7 に示した．視床下部内では全般に対照群に対する増加が見られ，AV3V，MPO，LPO，PVN，VMH および LHA のすべてが有意な増加を見せた．海馬においては CA1 のみが有意な増加を示し，CA3 および DG では有意な増加は見られなかった．大脳皮質においても有意な変化は見られなかった．

考　　察

競合的 PCR 法の利点

競合的 PCR 法は，サイトカイン mRNA などのよう

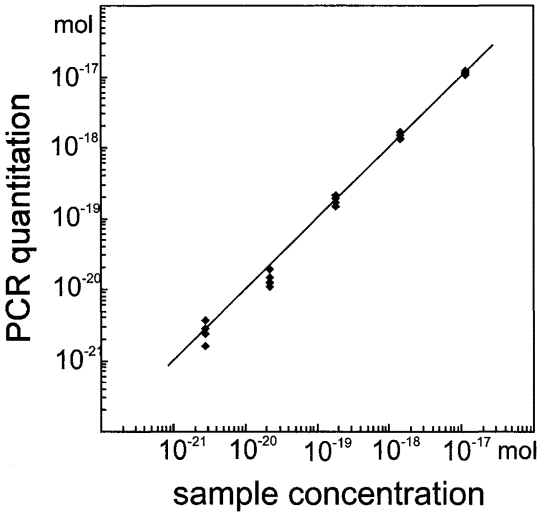


Fig. 3　Linearity of the PCR quantitation of IL-1β gene product.
The linearity and the range of the detection were evaluated. Diluted reverse-transcribed product of IL-1β mRNA of known concentration was mixed with mimic DNA and co-amplified by PCR. The X-axis represents the concentration calculated by the dilution and the Y-axis shows the actual measurement by competitive RT-PCR. The linear line shows the ideal value.

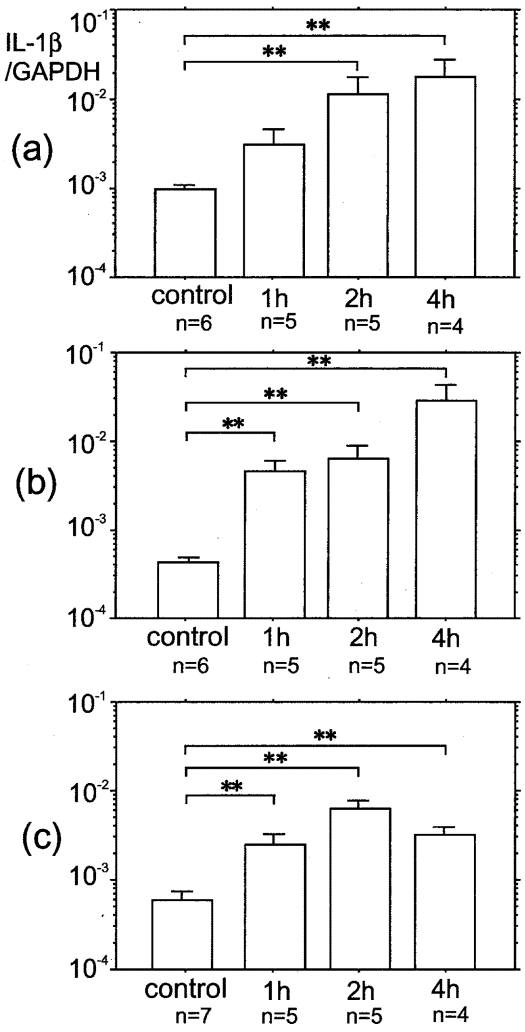


Fig. 4 The time course of IL-1β mRNA expression after intraperitoneal injection of LPS. 100 μg of LPS was injected i.p. and IL-1β and GAPDH mRNA were measured by competitive PCR in hypothalamus (a), hippocampus (b) and cerebral cortex (c). Values represent the meam±SE of the IL-1β/GAPDH ratio (**P<0.01).

に通常では微量にしか発現していない遺伝子産物の測定に適した，高感度で定量性の高い方法である[7]．従来一般的に用いられているmRNAの定量法としてNorthern blotting法があるが，今回のように微量のサンプル（total RNAとして1 μg以下）で，比較的発現量の少ないmRNAを検出・定量するにはNorthern blotting法では感度の点であまり現実的ではない．Northern blotting法との比較において，競合的PCR法は100倍以上高感度であることが報告されている[5]．Northern blotting法より高感度であるとされるRNase protection assay法で，比較的高感度のものでもmRNAが0.1 pg程度必要となる[6]．今回競合的PCR法によって直線性を有する定量が可能であった10^{-21} mol程度のmRNAは，重量としては数百分の1 pgのオーダーであり，それよりはるかに少ない．このような少量のmRNAの発現はRT-PCRを用いなければ検出不可能な領域にあると思われる．今回のpunch-outサンプルを用いた検出において，逆転写反応液20 μlあたり，30～50 punchが用いられたが，その量は実測重量（600 punchで11.9 mg）から計算すると約0.6～1 mgに相当する．脳組織1 gあたり通常数mgのRNAが抽出されることから類推すると，この量の脳組織から抽出されるtotal RNAの量は，抽出効率の低下を考えなければ，通常のRT-PCRにおいて用いられる，逆転写反応液20 μlあたりのtotal RNA 1～5 μg分に匹敵する．すなわち，サンプル量は微量であるが，通常のRT-PCRによって検出可能な物質は，この方法により精細な検出が可能であると考えられる．

空間的分解能に優れたmRNAの検出法としては*in situ* hybridization法があるが，検出感度はNorthern blotting法に準じ，高くはない．非刺激時や非炎症性ストレスでの脳内IL-1βの*in situ* hybridization法によるmRNA検出の報告が現在までほとんどないのは検出感度以下であったためと思われる．われわれは，PCR法の高感度を生かして微量のmRNAを検出・定量をおこない，さらに微小領域のサンプリングを行うことで各領域間の比較を可能とし，空間的解像度を上げることに成功した．本方法によって，それぞれが重要な働きを担っている視床下部の核群などにおいて，mRNAの発現量を独立して測定することが可能である．一方，この方法の弱点としては，*in situ* hybridizationのようにmRNAの産生細胞を特定することが不可能であることが挙げられるが，それを補う方法として，組織切片上にて増幅を行う*in situ* PCRや，in vitroであればsingle cell PCRを同じプライマーを用いて行うなどの手段が考えられる．

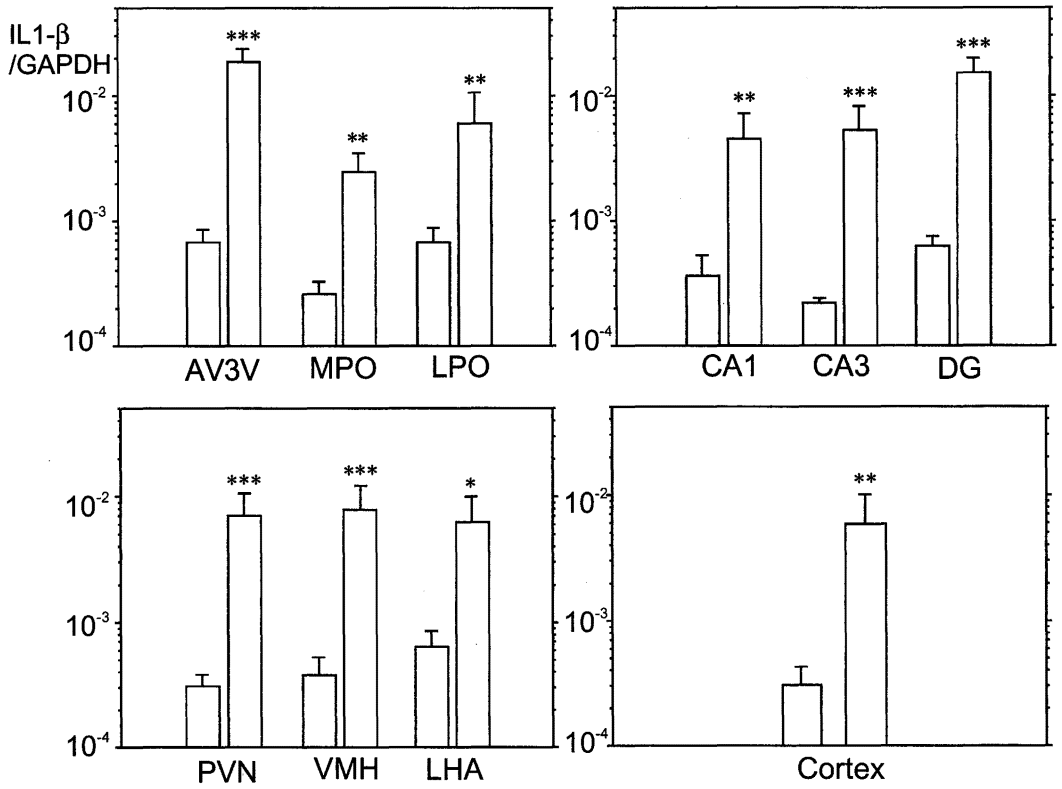


Fig. 5 Expressions of IL-1β mRNA in various regions after intraperitoneal injection of LPS. Micro samples were punched out from various regions in hypothalamus, hippocampus and cerebral cortex two hours after i.p. injection of LPS. Values represent the mean±SE of the IL-1β/GAPDH ratio (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001). n=7, 4 (control, LPS) except CA3 (6, 4) or DG (6, 4).

測定の定量性に関しても，競合的 PCR 法は広い範囲にわたって Northern blotting 法と良い相関を示しており[5]，*in situ* hybridization 法が定量性に乏しいこととは対照的である．実際，今回の検出系では無刺激時の IL-1β mRNA も定量が可能であった．mRNA は 10^{-17}～10^{-21} mol/μg RNA の範囲の増幅・検出ができ，しかもそのすべての範囲内において直線的な定量性を有した（Fig. 3）．

この方法を用いることによるもう一つの大きな利点は，特殊な装置や放射性同位元素を用いる必要がないことである．高感度の Northern blotting 法や protection assay 法では放射性同位元素を用いることが多いが，PCR では特殊な施設や操作を用いずとも，それ以上の高感度な定量が可能である．また，定量化のために，1サンプルにつき PCR を複数行うため，通常の PCR に比べて反応数は増えるが，通常の PCR と同じ検出系やプライマーをそのまま用いることが可能であり，特別な技術やコストが不要であることは利点である．最近，定量的な PCR を目的として，リアルタイム検出型の PCR 装置が開発されているが，専用の装置を必要とし，また方式によっては特殊なプライマーも必要となる．今回用いられた方法は，一般的なクリオスタットと通常の PCR 環境があれば他には特殊な器具の必要もなく，任意の領域を指定して微量遺伝子発現の測定が可能であり，非常に有用な方法であると考えられる．

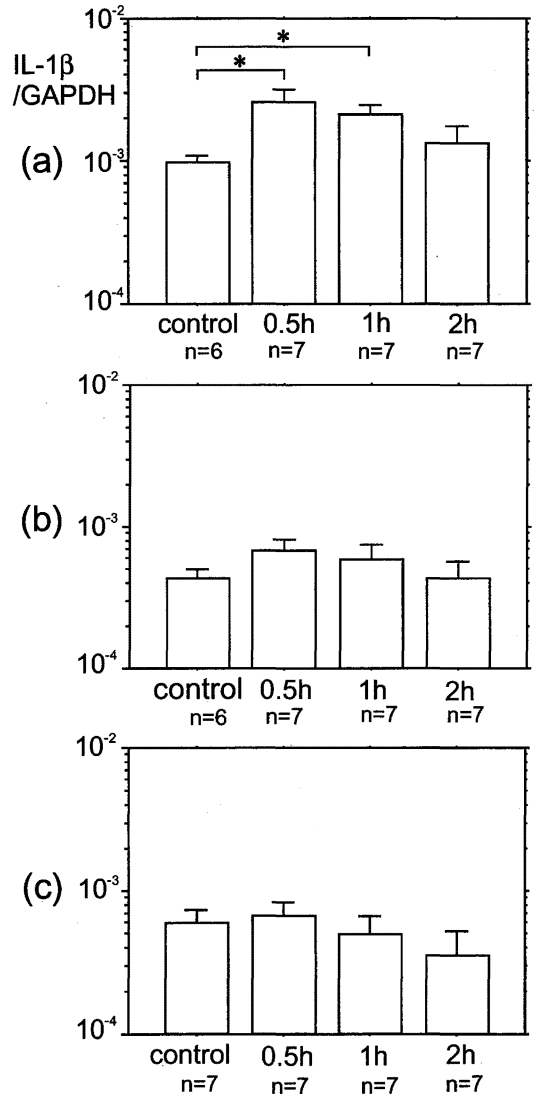


Fig. 6 The time course of the expression of IL-1β mRNA after restraint stress.
IL-1β mRNA were measured in hypothalamus (a), hippocampus (b) and cerebral cortex (c) after 30 min, one hour or two hours of restraint stress. Values represent the mean±SE of the IL-1β/GAPDH ratio (*$P<0.05$).

炎症性ストレスモデルにおける脳内 IL-1β mRNA の発現

本研究において，LPS の腹腔内投与を炎症性ストレスのモデルとして用いたが，従来の報告と同様に[2]，脳内における IL-1β mRNA の広範囲な発現が見られた．腹腔内あるいは静脈内に投与された LPS がどのようにして IL-1β mRNA を脳内に発現させるかは，完全には明らかではない．従来，LPS あるいは炎症性サイトカインがいかなる機序で脳へ信号を送るかについては，様々な仮説が議論され，基本的には次の 4 つの仮説が提唱されている．(a)炎症反応によって血中に遊離したサイトカインあるいは LPS が脳室周囲器官(終板器官を中心とする AV3V や最後野など)の有窓毛細血管の間隙から脳内に侵入し，局所のマクロファージやグリア細胞に作用して prostaglandin E_2 (PGE_2) を産生させ，その部位のニューロン活動を変化させて，信号が視床下部へ送られるとする脳室周囲器官説[23]，(b)脳内全般の血管壁に存在する各種サイトカインに特異的なキャリア蛋白が脳内にサイトカイン(IL-1α, IL-1β, IL-6, TNFα, IFNα, IL-1ra) を輸送し (IL-2 は輸送されない)，血管周囲の脳内受容体に作用するという説[1]，(c)サイトカイン (IL-1, TNF, IL-6) 受容体を持つ血管内皮細胞が cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現を介して PGE_2 を産生し，それが脳内に信号を伝達するという説[3]，(d)炎症組織に由来するサイトカインを含む種々の炎症媒介物質により刺激された迷走神経あるいは体性神経を介する，求心性神経伝達説[39]などである．今回，腹腔内 LPS 投与後，IL-1β mRNA 誘導は，脳室周囲器官の一つである AV3V 領域でも見られたが，他の脳内部位と比較して，特に高い値ではなかった．脳室周囲器官による伝達は関与しているとは思われるが，これのみでは説明しにくい．(b)では脳内へ輸送されたサイトカインが同じあるいは他のサイトカインを誘導することが考えられるが，その輸送速度は多くても脳 1 g 当たり 0.3%であり[1]，今回の結果の全てを説明できるかは不明である．同様に，(c)の機序では，脳における部位差はなく，COX-2 から誘導された PGE_2 が脳内へ移行し，それが発熱を誘起することが想定されているが，PGE_2 及び他の COX 産物はマクロファージからの LPS 誘発性 IL-1 及び TNF の産生を抑制する一方[31]，ヒト単球による IL-1 による IL-1 産生及び IL-6 産生は PGE_2 の存在下で促進するなど[30]の知見から，複雑な要素の関与が考えられ，本研究における LPS 投与による IL-1β mRNA の増加に(c)の機序が働いているか否かは不明である．LPS の

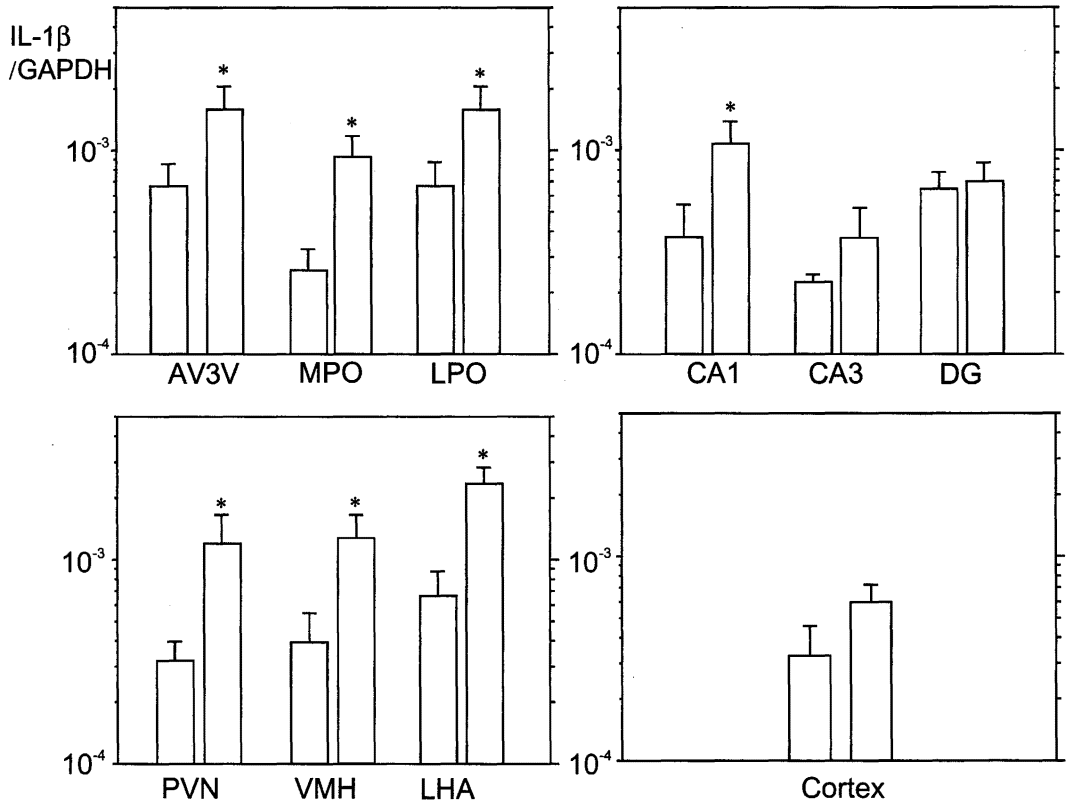


Fig. 7 Expressions of IL-1β mRNA in various regions after immobilization stress.
Various regions in hypothalamus, hippocampus and cerebral cortex were sampled after thirty minutes of restraint stress. Values represent the mean±SE of the IL-1β/GAPDH ratio (*P<0.05). n=7 except CA3 n=6 or DG n=6.

腹腔内投与によるマウス脳内 IL-1β mRNA の増加が迷走神経の切断により大きく減弱する（完全には消失しない）ので[14]，(d)の機序は今回見られた IL-1β mRNA の少なくとも一部に貢献していると思われる．これら(a)～(d)の機序は相互に矛盾はせず，同時に重複して存在すると思われる．

非炎症性ストレスモデルにおける脳内 IL-1β mRNA の発現

本研究において，非炎症性の拘束ストレスで，視床下部における IL-1β mRNA の発現が有意に増加した．これは視床下部内の IL-1β が，非炎症性ストレス反応において重要な役割を果たしているという従来の説と合致する結果である．これまでの報告では検出感度等の問題から，生理的条件下や非炎症性ストレス負荷時における IL-1β 発現の検出は困難であったが，本研究においてはその変化を定量的に測定することに成功し，また従来知ることのできなかった，視床下部内の各部位における変化として見ることができた．

非炎症性ストレスによって脳内 IL-1β が産生される機序については，未だ詳細なメカニズムは解っていない．拘束ストレス負荷によって視床下部のノルアドレナリン濃度およびその代謝産物濃度が上昇する[29]．神経末端におけるノルアドレナリンの濃度を上昇させるメタアンフェタミンの投与によって，ラット視床下部内において IL-1β mRNA の産生が増加し，それが β ブロッカーによって抑制される[40]．また，IL-1β そのものが脳内においてノルアドレナリン産生を促す一方で[11]，in vitro でラット視床下部切片にノルアドレナ

リンを投与すると，IL-1の産生が見られる[37]．以上の知見により，非炎症性ストレス時におけるIL-1βの産生にノルアドレナリンが関与していることが考えられる．

また，拘束ストレス負荷時に腸管壁の透過性が大きく変化し，腸管内のバクテリア由来のLPSが生体内に侵入し，消化管周辺組織や肝臓の細網内皮系からサイトカイン（少なくともIL-6）が誘導される[36]．従って，拘束ストレスによって血中に遊離したサイトカイン（もしくはLPSそのもの）が，炎症性ストレスの場合と同様に脳血管壁もしくは迷走神経を経由して，脳内に作用している可能性も考えられる．われわれの未発表データにおいても，拘束ストレス時に脾臓ではなく肝臓においてIL-1β mRNA産生の亢進が観察されており，脳-腸-肝-脳の経路による賦活系が考えられる．

本研究では，拘束ストレス負荷における視床下部ブロックのIL-1β mRNA発現の増加は，無刺激時の2.1倍と軽度であった．この変動幅は，IL-1βおよびIL-1β mRNAの脳内発現の日内変動幅とほぼ等しい．例えば，ネコの睡眠時の脳室内IL-1濃度の平均が覚醒時の約3倍であり[16]，RT-PCRにてラット視床下部・海馬・大脳皮質のIL-1β mRNAの日内変動が最大で1.5～2.5倍程度と報告されている[35]．さらに，副腎摘出により，非炎症性ストレス時のラット視床下部IL-1βの発現が著しく増加することからわかるように[20]，軽度ストレス時における脳内IL-1βの発現が，グルココルチコイドによって最小限に抑えられている．このように，脳内IL-1β発現は比較的狭い範囲内に制御されており，その変動の観察には高感度の検出系や再現性の高い定量性が要求され，今回実施した競合的PCR法によるmRNAの組織定量法がこれらの条件を満たしている．さらに，IL-1raの投与によってラットの睡眠パターンが変化すること[22]，IL-1raによってin vivoにおけるラット海馬細胞のLTPの維持が障害されること[28]，fM以下の極微量のIL-1βがin vitroにおいてラットCA1ニューロンのグルタミン酸反応性に影響を与えること[17]，などの実験結果は，IL-1βは生理的濃度においても脳内調節物質としての作用を有していることを示しており，今回見られた変化量も生理的意義を持ちうるものと推測される．

海馬では，IL-1β mRNA発現の上昇が見られたのはCA1のみであった．ブロック全体で有意差がなかったのは，それが部分的な上昇であったためと考えられる．CA1はglucocorticoid receptor（GR）のmineralocorticoid receptor（MR）に対する比率が高く[10]，GRのコルチコステロンへの親和性がMRより低いため[25]，コルチコステロンによるIL-1産生の抑制を受けにくいことが原因のひとつと考えられる．さらに，CA1はCA3ニューロンより慢性の心理的ストレスによる細胞死を生じにくい事も知られている．CA3ニューロンの変性が，NMDAレセプターのアンタゴニスト投与によって防止できるという報告があり[18]，in vitroにおいて，NMDAのニューロンに対する毒性を低濃度のIL-1βが減弱したという報告とあわせると[26]，今回見られたCA1におけるIL-1の産生の軽度の上昇が神経保護的に作用している可能性も考えられる．その他にも，CA1，CA3およびDGにおいては，LTPなどの電気生理学特性が異なるなど[42]，神経発火パターンやその細胞内メカニズムの海馬内における様々な部位差が報告されており，それらと視床下部および海馬に発現するIL-1βとの関係については未だ不明な点が多い．今後，本方法を用いて，様々な条件下における各種mRNAの発現量の脳内微小区域の部位差を検討することにより，より詳細な脳内機序の解析が可能となろう．

総　　括

(1) IL-1βは，免疫系のみならず脳においても，神経分化，神経系の細胞の生存維持，成長，細胞死や急性期反応発現などにおいて中心的役割を果たす．しかしながら脳内における蛋白やmRNA発現はごく僅かで発現量の変動幅も小さい．本研究では，競合的RT-PCRの手法を用いて，ラットの脳微小区域を脳切片上で打ち抜き（punch-out）した組織切片中のIL-1β mRNAの定量化を試み，良好な成績が得られた．

(2) この方法を用いて，lipopolysaccharide（LPS）を腹腔内に投与したラット（炎症モデル）から経時的に採取した脳ブロックおよび脳微小区域標本中のIL-1β mRNA発現量を部位別に定量したところ，視床下部，海馬および大脳皮質のそれぞれにおいて全般的な上昇が認められた．

(3) 一方，ラットをゆるく拘束した時（非炎症性ストレス）は，これら3ケ所のブロック標本のうち，視床下部においてのみストレス開始後30分をピークとし，約1時間続くIL-1β mRNAの上昇が見られた．脳微小区域標本で見ると，大脳皮質では発現に変化が見られなかったが，視床下部のほぼ全域（内側視索前野，外側視索前野，室傍核，腹内側核，外側視床下部）でIL-1β mRNA発現量が増加していた．

(4) 拘束ストレス負荷における視床下部ブロックのIL-1β mRNA発現量の増加は，無刺激時の2.1倍と軽度であった．この変動幅はIL-1β mRNAの脳内発現の日内変動幅や睡眠・覚醒リズムに伴う髄液IL-1β量の変動量とほぼ等しい．さらに，軽度ストレス時の脳内IL-1βの発現もストレスによって遊離されるグルココルチコイドによって強力に抑えられており，fM以下の極微量のIL-1βあるいはIL-1raがラット海馬神経細胞のシナプス伝達に影響を与えるなどの知見も考え合わせると，このような発現量の僅かな変動でも中枢神経活動を制御する重要な因子として機能していると考えられた．

(5) 拘束ストレス負荷により，海馬のブロック標本ではIL-1β mRNA発現量は変化しなかったが，海馬内の微小区域標本で見るとCA1領域においてのみIL-1β mRNAが増加し，CA3および歯状回では有意差がなかった．CA1はglucocorticoid receptor (GR)のmineralocorticoid receptor (MR)に対する比率が高く，GRのコルチコステロンへの親和性がMRより低いため，コルチコステロンによるIL-1産生の抑制を受けにくいことが原因のひとつと考えられた．

謝　辞

本研究を行うにあたり，終始丁寧なご指導を賜りました九州大学大学院医学研究院・心身医学分野の久保千春教授並びに同・統合生理学分野の堀哲郎教授に深く感謝いたします．また，直接のご指導を頂きました統合生理学分野の高木厚司助手に心より感謝いたします．研究の遂行にあたり，多大なご助力を頂きました統合生理学分野水口洋子技官に厚く御礼申し上げます．

文　献

1) Banks WA, Kastin A and Broadwell RD: Passage of cytokines across the blood-brain barrier. Neuroimmunomoduration 2: 241-248, 1995.

2) Buttini M and Boddeke H: Peripheral lipopolysaccharide stimulation induces interleukin-1β messenger RNA in rat brain microglial cells. Neuroscience 65: 523-530, 1995.

3) Cao C, Matsumura K, Yamagata K and Watanabe Y: Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. Am. J. Physiol. 272: R1712-1725, 1997.

4) Feldman S and Weidenfeld J: Glucocorticoid receptor antagonists in the hippocampus modify the negative feedback following neural stimuli. Brain Res. 821: 33-37, 1999.

5) Gattei V, Degan M, De Iuliis A, Rossi FM, Aldinucci D and Pinto A: Competitive reverse-transcriptase PCR: A useful alternative to Northern blotting for quantitative estimation of relative abundances of specific mRNAs in precious samples. Biochem. J. 325: 565-567, 1997.

6) Gautreau A and Kerdelhue B: Simultaneous quantitation of substance P-encoding preprotachykinin alternatively spliced mRNAs and substance P receptor NK-1 mRNA by an RNase protection assay. Brain Res. Protocols 2: 133-140, 1998.

7) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K and Bunn HF: Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2725-2729, 1990.

8) Grassi G, Zentilin L, Tafuro S, Diviacco S, Ventura A, Falaschi A and Giacca M: A rapid procedure for the quantitation of low abandance RNAs by competitive reverse transcrition-polymerase chain reaction. Nucleic Acid Res. 22: 4547-4549, 1994.

9) Haour F, Marquette C, Ban E, Crumeyrolle-Arias M, Rostene W, Tsiang H and Fillion G: Receptor for Interleukin-1 in the central nervous and neuroendocrine systems. Annales d'Endocrinologie 56: 173-179, 1995.

10) Herman JP, Patel PD, Akil H and Watson SJ: Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. Mol. Endocrinol. 3: 1886-1894, 1989.

11) Kamikawa H, Hori T, Nakane H, Aou S and Tashiro N: IL-1β increases norepinephrine level in rat frontal cortex: involvement of prostanoids, NO, and glutamate. Am. J. Physiol. 275: R803-810, 1998.

12) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res. 239: 57-69, 1982.

13) Kluger MJ: Fever: role of pyrogens and cryogens. Physiol. Rev. 71: 93-127, 1991.

14) Laye S, Bluthe R, Kent S, Combe C, Medina C, Parnet P, Kelley K and Dantzer R: Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1β mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. Am. J. Physiol. 268: R1327-1331, 1995.

15) Linthorst ACE, Flachskamm C, Holsboer F and Reul JMHM: Local administration of recombinant human interleukin-1β in the rat hippocampus increases serotonergic neurotransmission, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity, and body temperature. Endocrinology 135: 520-532, 1994.

16) Lue FA, Bail M, Jephthah-Ochola J, Carayanniotis K, Gorczynski R and Moldofsky H: Sleep and cerebrospinal fluid interleukin-1-like activity in the cat. Intern. J. Neurosci. 42: 179-183, 1988.

17) Luk WP, Zhang Y, White TD, Lue FA, Wu C, Jiang CG, Zhang L and Moldofsky H: Adenosine: a mediator of interleukin-1β -induced hippocampal synaptic inhibition. J. Neurosci. 19: 4238-4244, 1999.

18) Magarinos AM and McEwen BS: Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. Neurosci. 69: 89-98, 1995.

19) Minami M, Kuraishi Y, Yamaguchi T, Nakai S, Hirai Y and Saitoh M: Immobilizaiton stress induces interleukin-1β mRNA in the rat hypothalamus. Neurosci. Lett. 123: 254-256, 1991.

20) Nguyen KT, Deak T, Owens SM, Kohno T, Fleshner M, Watkins LR and Maier SF: Exposure to acute stress induces brain interleukin-1β protein in the rat. J. Neurosci. 18: 2239-2246, 1998.

21) Oka T, Aou S and Hori T: Intracerebroventricular injection of interleukin-1β induces hyperalgesia in rats. Brain Res. 624: 61-68, 1993.

22) Opp MR and Krueger JM: Anti-interleukin-1β reduces sleep and sleep rebound after sleep deprivation in rats. Am. J. Physiol. 266: R688-695, 1994.

23) Ota K, Katafuchi T, Takaki A and Hori T: AV3V neurons that send axons to hypothalamic nuclei respond to the systemic injection of IL-1β: Am. J. Physiol. 272: R532-540, 1997.

24) Plata-Salaman CR, Oomura Y and Kai Y: Tumor necrosis factor and interleukin-1β: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. Brain Res. 448: 106-114, 1988.

25) Reul JM and de Kloet ER: Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. Endocrinol. 117: 2505-2511, 1985.

26) Rothwell NJ and Strijbos PJLM: Cytokines in neurodegeneration and repair. Int. J. Devl. Neurosci. 13: 179-185, 1995.

27) Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P and Vale W: Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. Science 238: 522-524, 1987.

28) Schneider H, Pitossi F, Balschun D, Wagner A, del Rey A and Besedovsky HO: A neuromodulatory role of interleukin-1β in the hippocampus. Proc. Natl. Acad. Sci.: 7778-7783, 1998.

29) Shintani F, Nakaki T, Kanba S, Sato K, Yagi G, Shiozawa M, Aiso S, Kato R and Asai M: Involvement of interleukin-1 in immobilization stress-induced increase in plasma adrenocorticotropic hormone and in release of hypothalamic monoamines in the rat. J. Neurosci. 15: 1961-1970, 1995.

30) Sirko SP and Dinarello CA: A role for arachidonate acid metabolites of cyclooxygenase in IL-1 induced synthesis of IL-1 in vitro. Lymphokine Res. 9: 608, 1990.

31) Spinas GA, Bloesch D, Keller U, Zimmerli W and Cammisuli S: Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor-α, interleukin-6 and elastase during acute endotoxemia. J. Infect. Dis. 163: 89-95, 1991.

32) Swanson LW, Sawchenko PE and Lind RW: Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response, In Hokfelt T, Fuxe K and Pernow B (eds): Progress in brain research. vol. 68, pp. 169-190, Elsevier, Amsterdam, 1986.

33) Swanson LW: Structure of the rat brain second edition. Elsevier, Amsterdam, 1999.

34) Szucs A, Stefano GB, Hughes TK and Rozsa KS: Modulation of voltage-activated ion currents on identified neurons of Helix pomatia L. by interleukin-1. Cell. Mol. Neurobiol. 12: 429-438, 1992.

35) Taishi P, Bredow S, Guha-Thakurta N, Obal F and Krueger JM: Diurnal variation of interleukin-1β mRNA and β-actin mRNA in rat brain.

J. Neuroimmunol. 75 : 69-74, 1997.

36) Takaki A, Hori T, Yagi S, Oka K, Kanemitsu Y, Sudo N, Sioda S and Arimura A : Plasma IL-6 and its pyrogenicity during noninflammatory stress, In Yamashita H, Funder JW, Ueda Y and Endo Y (eds) : Control mechanisms of stress and emotion : neuroendocrine-based studies. pp. 173-177, Elsevier Science, Amsterdam, 1999.

37) Tringali G, Mancuso C, Mirtella A, Pozzoli G, Parente L, Preziosi P and Navarra P : Evidence for the neuronal origin of immunoreactive interleukin-1β release by rat hypothalamic explants. Neurosci. Lett. 219 : 143-146, 1996.

38) Van Dam AM, Bauer J, Tilders FJH and Berkenbosch F : Endotoxin-induced appearance of immunoreactive interleukin-1β in ramified microglia in rat brain : a light and electron microscopic study. Neurosci. 65 : 815-826, 1995.

39) Watkins LR, Maier SF and Goehler LE : Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. Life Sci. 57 : 1011-1026, 1995.

40) Yamaguchi T, Kuraishi Y, Minami M, Yabuuchi K and Satoh M : Involvement of central beta-adrenoceptors in the induction of hypothalamic interleukin-1β mRNA by methamphetamine. Neurosci. Res. 12 : 432-439, 1991.

41) Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y and Kogure K : Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. Stroke 26 : 676-681, 1995.

42) Zalutsky RA and Nicoll RA : Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. Science 248 : 1619-1624, 1990.

(受付 2000－5－12)