

筑波大学

博士（医学）学位論文

敗血症性ショックに対する神経ペプチド
オレキシンによる治療効果

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

小川靖裕

目次

1. 背景.....	3
1. 1. 敗血症.....	3
1. 2. 中枢神経系による炎症反応制御機構.....	6
1. 3. オレキシン.....	8
2. 目的.....	10
3. 方法.....	11
4. 結果.....	22
5. 考察.....	33
5. 1. 投与方法とオレキシン受容体作動薬.....	33
5. 2. 敗血症モデルおよび敗血症性ショックモデル.....	34
5. 3. 作用機序.....	36
6. 総括.....	39
7. 図表.....	40
8. 謝辞.....	58
9. 引用文献.....	60

1. 背景

1. 1. 敗血症

敗血症 (Sepsis) は、昔から血液中に病原微生物が検出される「菌血症」を発端として全身性炎症が惹起され、多臓器不全へと進展し、死に至る病気として認識されていた。1992年に初めて診断基準として「感染症による全身性炎症反応症候群」と定義された (Sepsis-1)¹。さらに、臓器障害を伴うものを重症敗血症、循環不全を伴うものを敗血症性ショックと重症度が分類され、死亡率も増加していく²。その後、2003年に改訂され (Sepsis-2)³、2016年には、より臨床に則した「感染症によって重篤な臓器障害が引き起こされる状態」と臓器障害に重きを置いた定義に変更された (Sepsis-3)⁴⁻⁶。主な臓器障害としては、急性循環不全、血液凝固系の異常である播種性血管内凝固症、肺・呼吸器の障害である急性呼吸不全・急性呼吸窮迫症候群、急性腎障害、急性肝障害、意識障害や見当識障害を伴う敗血症関連脳症が挙げられる⁷。特に、急性循環不全は、組織への酸素供給を低下させ、他の臓器障害を助長させることから、敗血症性ショックは最も重篤な状態と認識されている²。

敗血症の疫学は、世界で年間2700万人が敗血症に罹患し、そのうち800万人が死亡するという統計がある⁸。発展途上国では、小児の主な死亡原因となっている⁹。しかし、敗血症は必ずしも発展途上国だけの問題ではなく、日本に

においても年間約30万人が敗血症に罹患していると推測され、致死率は20～40%である。先進国では、敗血症の患者の多くが集中治療を受けているにもかかわらず非常に高い致死率であり、集中治療室に入院した患者の主な死亡原因となっている¹⁰。敗血症は、世界的な”medical emergency”である。

敗血症の病態生理は非常に複雑である。しかし、近年の免疫学の進歩は、感染症によって全身性炎症が惹起されるメカニズムや全身性炎症が個々の臓器を障害していくメカニズムを明らかにしている¹¹。特に、Toll-like receptor (TLR) を介して病原微生物を認識し、自然免疫が活性するプロセスの解明は大きな進歩となった。エンドトキシンショックは昔からよく用いられる敗血症性ショックモデルであるが、グラム陰性菌のエンドトキシンであるリポポリサッカライド (LPS) はTLR4によって認識され、過剰な炎症反応を惹起することが明らかになっている¹²。そして、これらのメカニズムの解明は敗血症に対する新しい治療ターゲットの可能性を示し、多くの治療法が提案されている。

敗血症の治療法は、抗菌薬の投与や感染源のコントロールなど感染症に対する治療や輸液と昇圧剤を用いた循環不全に対する治療、呼吸不全に対する人工呼吸管理などを中心とした集中治療が行われるが、確立した治療プロトコールはない¹³⁻¹⁶。さらに、病態生理に基づいて、全身性炎症に対する免疫学的アプローチや播種性血管内凝固症に対する血液学的アプローチ、急性腎障害に対する

急性血液浄化療法（腎代替療法）などが提案されているが、未だ有効性は示されていない。今後敗血症のアウトカムを改善させるには、新しい治療ターゲットを探索するだけでなく、治療ターゲットに見合った治療戦略を構築していく必要がある²。

1. 2. 中枢神経系による炎症反応制御機構

近年中枢神経系による炎症反応制御機構が明らかになっている。炎症反応制御機構の経路としては、神経内分泌（視床下部-下垂体-副腎系）と自律神経系が知られている¹⁷。視床下部-下垂体-副腎系による制御では、最終的に副腎から抗炎症効果を持つ糖質コルチコイドの分泌が促進される。自律神経系による制御は複雑ではあるが、副交感神経系の最終神経伝達物質であるアセチルコリンが α 7ニコチン性アセチルコリン受容体を介してマクロファージに直接作用し活性を抑制することが知られている¹⁸。さらに、交感神経系も、脾神経を經由して最終神経伝達物質であるノルアドレナリンが脾臓において β 2アドレナリン受容体を介してT細胞に作用し、T細胞からのアセチルコリン放出を促進することによってマクロファージの活性を抑制する¹⁹。

ラットの敗血症モデルを用いて脳の活性化部位を探索した研究の結果では、視床下部-下垂体-副腎系など神経内分泌に関わる神経核である室傍核（Periventricular nucleus : PVN）、副交感神経系（迷走神経）の神経核である孤束核（Nucleus of solitary tract : NTS）と背側迷走神経運動核（Dorsal motor nucleus of vagus nerve : DMNX）、交感神経節前繊維に投射している延髄吻側腹外側野（Rostral ventrolateral medulla : RVLM）の神経活性が上昇している²⁰。これらの神経の活性化は、全身性炎症に対する中枢神経系の防御反応と考えられる。実際

迷走神経を刺激すると、敗血症モデルラットの生存率が改善する²¹。また、RVLMのC1神経を特異的に活性化させると、腎虚血によって誘導された腎臓の炎症に対して抗炎症効果を示す²²。このように、中枢神経系は敗血症だけではなく炎症性疾患に対する治療ターゲットとしての可能性がある。

1. 3. オレキシン

オレキシンは、2種類のオーファン G 蛋白共役型受容体(OX1R および OX2R) に対するリガンドとして発見された2種類の生理活性ペプチド(オレキシン A およびオレキシン B) であり、共通の前駆体(プレプロオレキシン) から生成される²³。オーファン受容体から内因性の生理活性物質を探す方法は”Reverse pharmacology (逆薬理学)”と呼ばれるが、オレキシンはこの手法で同定された初めての生理活性ペプチドである。オレキシンは視床下部外側野(Lateral hypothalamus : LH) に限局して存在する神経(オレキシン神経) で産生され、脳室内投与によって摂食量を増加させることから、当初、摂食行動を制御する神経ペプチドとして注目された²³。その後、ノックアウトマウスの研究や犬の研究から、オレキシン系の欠損が睡眠覚醒障害ナルコレプシーの原因であることが明らかになり、オレキシンによる睡眠覚醒制御に注目が集まった^{24,25}。オレキシン神経は脳全体に投射しているが、視床下部内では摂食行動の制御に関わる弓状核などに密に投射し、視床下部外では睡眠覚醒の制御に関わるノルアドレナリン作動性神経の起始核である青斑核(Locus coeruleus : LC)、セロトニン作動性神経の起始核である縫線核、ヒスタミン作動性神経の起始核である結節乳頭核(Tuberomammillary nucleus : TMN)、橋のコリン作動性神経の起始核である外背側被蓋核と橋脚被蓋核に密に投射している²⁶。

オレキシンの機能として、睡眠覚醒および摂食行動の制御が有名であるが、意欲などの精神機能²⁷や肥満などの代謝機能²⁸などにも関わっており、睡眠覚醒障害、摂食障害のみならず、うつ病や生活習慣病への臨床応用が期待されている。その中でも、我々は、オレキシンによる神経内分泌と自律神経系の制御に注目した。オレキシンを脳室内投与すると、視床下部-下垂体-副腎系と交感神経系が活性化することが知られている²⁷。これは、オレキシンによる中枢性炎症反応制御の可能性を示唆させる。

オレキシンをターゲットとした創薬を考えた場合、オレキシン自体は中枢神経系に作用し、さらに通常血液脳関門を通過できないため²⁹、薬理効果を得るには中枢神経系に作用させるためのなんらかの方法が必要である。例えば、血液脳関門を通過する低分子量化合物の開発である。近年低分子量オレキシン受容体拮抗薬が開発され、睡眠導入薬として臨床応用されている³⁰。しかし、オレキシン受容体作動薬については現在開発を進めているが、未だ臨床応用には至っていない。ここで我々が治療対象としている敗血症では、全身性炎症によって血液脳関門の機能が障害を受けており、ペプチドであるオレキシンでも血液脳関門を通過できるかもしれないと予想した。

2. 目的

本研究の目的は、敗血症性ショックに対するオレキシンによる治療効果を検証することである。さらに、全身性炎症に伴う血液脳関門の機能障害によるオレキシンの脳への移行性を検討し、より臨床的意義の大きい末梢投与での治療効果を検証する。敗血症性ショックのモデルとしては、致死量の LPS 注射によるエンドトキシンショックマウスを用いる。

3. 方法

実験動物

C57BL/6J を遺伝的バックグラウンドとして2つの遺伝子型 ($OX1R^{-/-};OX2R^{-/-}$ および野生型のホモ接合マウス) の8~10週齢の雄マウスを無作為に実験群に割り当てた。実験マウスは個別ケージで飼育、特定の病原体のない条件下 (Specific-pathogen free : SPF)、周囲温度 23 ± 1 °C、12時間 : 12時間の明暗スケジュールで管理した。

溶液調整

リポポリサッカライド (LPS : 大腸菌由来リポポリサッカライド 055 : B5, Sigma) は、生理食塩水 (大塚) に溶解し、1 mg/ml に調整した。ヒトオレキシン A (OXA、ペプチド研究所) は、生理食塩水に溶解し、実験ごとに濃度は調整した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) はリン酸緩衝生理食塩粉末 (0.01 mol/l、pH 7.2-7.4、和光) から、リン酸緩衝液 (PB) はリン酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/l、pH 7.4、和光) から作成した。パラホルムアルデヒド (PFA、ナカライ) は、PBS に溶解し、4% (w/w) に調整した。Clozapine *N*-oxide (CNO、Sigma) を生理食塩水に溶解し、5 mg/ml に調整した。この CNO 溶液を各実験用の溶液に添加することによって再調整した。

マウスにおける LPS 誘導エンドトキシンショックモデル

マウスにエンドトキシンショックを誘発するために、ZT10.5（暗期開始 1.5 時間前）に LPS（10 mg/kg）を腹腔内（IP）注射した。

手術

オレキシンの中枢投与の効果を調べるために、ガイドカニューラを左側脳室に取り付けた。体温および心拍数を 10 分毎にモニターするために、テレメトリプローブ（TA11TA-F10、Data Science International）を皮下に埋め込んだ。マウスは手術後 1 週間回復させた。

エンドトキシンショックにおける生存率実験

エンドトキシンショックマウスの生存率に対する末梢投与したオレキシンの予防効果を調べるために、浸透圧ポンプ（Alzet、Durect）を麻酔下で皮下に埋め込んだ。ポンプには、200 μ l の生理食塩水に溶解した 1 mg の OXA（または、対照として 200 μ l の生理食塩水）があらかじめ注入されており、ポンプの埋め込みと同時に 8 μ l/時間の速度で投与を開始した。

末梢投与したオレキシンの治療効果を調べるために、プログラム可能なマイ

クロインフュージョンポンプ (iPRECIO、Primetech) を麻酔下で皮下に埋め込んだ。ポンプには、100 μ l の生理食塩水に溶解した 1 mg の OXA (または、対照として 100 μ l の生理食塩水) が注入されており、LPS 注射の 30 分後に 8 μ l/時間の速度で投与を開始した。このポンプは外部スケジューラによってワイヤレスで制御され、投与スケジュールは iPRECIO 管理ソフトウェア ver1.1 でプログラムした。翌日、OXA (1 mg の OXA を 100 μ l の生理食塩水に溶解) または 100 μ l の生理食塩水を iPRECIO に補充した。

中枢投与したオレキシンの効果を調べるために、まず LPS 注射の 30 分前に麻酔下で 3 μ l の生理食塩水に溶解した 0.06 mg の OXA (または、対照として 3 μ l の生理食塩水) を 5 分間でガイドカニューラを通して脳室内 (ICV) 投与し、輸液として 200 μ l の生理食塩水を含む浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、8 μ l/時間の速度で投与を開始した。さらに、LPS 注射と同時に、0.02 mg/ μ l の OXA を 0.5 μ l/時間の速度で 24 時間 ICV 投与を開始した。

保温 (オレキシンを投与したマウスと同程度) の効果を調べるために、LPS 注射と同時に 24 時間 30 $^{\circ}$ C のヒートパッドでマウスを加温した。

全ての生存率実験において、LPS 注射後の 7 日間、体温をモニターした。主評価項目として生存率、副評価項目として LPS 注射の 24 時間後での体温を評価した。観察は 7 日後または死亡により中止した。生存率と体温の関係は、様々な体

温値での偽陽性率（X 軸：1-特異度）に対する真の陽性率（Y 軸：感度）をプロットする受信者動作特性曲線（Receiver operating characteristic curve：ROC 曲線）によって表した。ROC 曲線は曲線下面積（Area under the curve：AUC）によって評価し、最適なカットオフ値を決定した。サンプルサイズは、以下の前提で計算した。許容誤差は 0.05、検出力は 0.8、2 日目の対照群の生存率は 0.2、7 日目の治療群の予想生存率は 0.6~0.9 とした。すべての実験マウスは、除外なしにデータサンプルとして使用した。

血液脳関門透過性の検討

体温をモニターしながら、LPS または生理食塩水を注射したマウスに $[^{125}\text{I}]\text{OXA}$ を 10^6 cpm で IP 投与した。 $[^{125}\text{I}]\text{OXA}$ 投与の 2 時間後に脳を取り出し、放射線レベルを γ -カウンターで測定した。次に、脳を 4%PFA 中で一晩固定後、1 mm の冠状切片をイメージングプレート（Bas-SR 2040、Fuji Film）に 5 日間焼き付け、その後 BAS-2500（Fuji Film）で現像した。

サイトカイン/ケモカイン、カテコールアミン、コルチコステロンの測定

エンドトキシンショックにおける血液および組織のサンプリング。

エンドトキシンショックマウスにおけるサイトカイン産生に対するオレキシン

の効果を調べるために、体温をモニターしながら、LPS 注射の 4 時間後または 22 時間後に麻酔下で血液および脳を採取した。ヘパリンまたは EDTA-2Na を含む 27G 針 (Terumo) を用いて左心室から血液を採取し、3,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を血漿または血清として用いた。取り出した脳は液体窒素中で凍結させ、-80°C で保存した。

脳組織からのタンパク質抽出。

全脳を秤量し、体積の 5 倍量の抽出緩衝液 (Tris-HCl:20 mM、NaCl:0.15 M、0.05% Tween-20、プロテアーゼ阻害剤カクテル) 中で破碎し、均質化した。試料は 4 °C で 10 分間遠心分離 (1,000 g) し、上清を除去した。2 回目の遠心分離 (20,000 g、4 °C で 40 分間) の後、上清をタンパク質抽出サンプルとして用いた。全てのサンプルについて、タンパク質量を BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Scientific) で定量した。

サイトカイン/ケモカインの測定。

サイトカイン/ケモカインは、マルチプレックスキット (Millipore) を用いて測定した。血漿サンプルは、アッセイ緩衝液で 1 : 2 に希釈した。脳サンプル抽出液は、250 µg のタンパク質を使用した。25 µl の試料および標準液を、各ウェルに 2~8 °C で一晩、抗体を含むマイクロスフェアとともにインキュベートした。次に、マイクロスフェアの表面上の検体を、ビオチン化抗体のカクテルによって検

出し、ストレプトアビジン-フィコエリトリンの結合後、レポーター蛍光シグナルを Luminex 200 reader (Millipore) で測定した。

カテコールアミンとコルチコステロンの測定。

血清カテコールアミンおよび血漿コルチコステロンの測定は SRL に外注した。

培養腹腔マクロファージにおけるサイトカイン mRNA レベルの測定

マウス腹腔マクロファージは、1.5 ml のチオグリコレート (2.4 g/100 ml、BD Biosciences) を IP 注射して、5 日後に PBS で腹腔洗浄して採取した。細胞懸濁液におけるマクロファージの純度は 95%以上であった。マクロファージ (実験条件当たり 5×10^6 /ウェル) を組織培養プレートに一晩付着させた後、OXA (10^{-9} , 10^{-7} M) の存在下または非存在下、37 °C で 6 時間、LPS (50 ng/ml) を含有する 10%FBS/DMEM 中でインキュベートした。次に培養上清をサンプリングし、RNeasy (Qiagen) を用いて全 RNA を精製した。Interleukine-6 (IL-6)、IL-17、Interferon- γ (IFN- γ)、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) の発現レベルを、以下のプライマーを用いて QPCR によって測定した：

IL-6 は 5'-CACAGAGGATACCACTCCCAACA-3' と

5'-TCCACGATTTCCCAGAGAACA-3'、

IL-17 は 5'-GAAGGCCCTCAGACTACCTCAA 3' と

5'-TCATGTGGTGGTCCAGCTTTC-3'、

IFN- γ は 5'-CGCCTATCTTCGGGATGAATC3' と

5'-CCAACCGATACTCCATGAAAATG-3'、

TNF- α は 5'-GGCCTCCCTCTCATCAGTTC-3' と

5'-GACAAGGTACAACCCATCGGC-3' である。

エンドトキシンショックにおけるオレキシンの一過性応答

末梢投与したオレキシンの一過性の効果を調べるために、LPS または生理食塩水注射の 13.5 時間後に、100 μ l の生理食塩水中に溶解した 0.1 mg (30 nmol) の OXA (または、対照として 100 μ l の生理食塩水) を IP ボーラス投与した。中枢投与したオレキシンの一過性の効果を調べるために、LPS 注射の 13.5 時間後に 6 μ l の生理食塩水に溶解した 0.01 mg (3 nmol) の OXA (または、対照として 6 μ l の生理食塩水) を 5 分間で ICV 投与した。体温および心拍数は、オレキシン投与後 6 時間測定した。

免疫組織化学

LPS または生理食塩水注射の 13.5 時間後に、100 μ l の生理食塩水に溶解した 0.1 mg (30 nmol) の OXA (または、対照として 100 μ l の生理食塩水) を IP ボーラ

ス投与した。OXA または生理食塩水投与の 1.5 時間後、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg IP) で麻酔し、まず PBS で灌流し、その後 4%PFA で灌流固定した。脳を頭蓋骨から取り出し、4%PFA でさらに一晩固定後、沈降するまで 30%ショ糖液 (PB に溶解) に浸した。Optimal Cutting Temperature Compound (O.C.T. Compound、Sakura Finetek) 中に脳を凍結させた後、クライオスタット (Leica) を用いて脳を 40 μ m の厚さで連続的に切り出した。すべての切片は、ウサギ抗 Fos 抗体 (1 : 10,000、RRID : AB_2314421) で一晩インキュベート (4 $^{\circ}$ C) した。一次抗体のインキュベート後、二次抗体としてビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (1 : 200、RRID : AB_2313606) で 1.5 時間インキュベートし、アビジン-ビオチン複合体 (ABC 溶液、Vector Labs) に 30 分間浸した。免疫反応性生成物の検出は、ニッケルと H₂O₂ を加えたジアミノベンジジン (DAB、Vector Labs) を用いて Fos 陽性細胞の核を暗黒色で標識した。さらに、神経細胞の神経化学的特徴を同定するために、Fos の染色後、縫線核はヤギ抗 5HT 抗体 (1 : 5,000、RRID : AB_572262) で、結節乳頭核 (TMN) はウサギ抗 HDC 抗体 (1 : 1,000、RRID : AB_1002154) で、視床下部外側野 (LH) はヤギ抗オレキシン A 抗体 (1 : 50、RRID : AB_653610) で、インキュベート (4 $^{\circ}$ C) した。一次抗体のインキュベート後、二次抗体として各ビオチン化抗体 (抗ヤギ IgG 抗体 (1 : 200; RRID : AB_2336123)、抗ウサギ IgG 抗体 (1 : 200、RRID : AB_2313606)) で 1.5 時間インキュベートし、ABC

溶液に 30 分間浸した。免疫反応性生成物の検出は、ニッケルを加えない DAB を用いて神経化学的特徴を示す細胞の細胞質を薄い褐色で標識した。最後に、切片をスライド上に載せ、空気乾燥、脱水、封入した。核標識細胞 (Fos 陽性細胞) と細胞質標識細胞は、LSM700 顕微鏡 (Zeiss) で撮影した写真を用いて、3 人の観察者によって盲検した。細胞質標識細胞および二重標識細胞を各領域の切片で数え、細胞質標識細胞中の二重標識細胞の割合を評価した。

抑制性 DREADD 実験

DREADD による延髄縫線核セロトニン作動性神経の抑制の電気生理学的検証

6 週齢の ePet-Cre マウスをイソフルランで麻酔し、定位固定手術台 (Kopf) に固定した。体温は、フィードバック制御加熱パッドを用いて維持した。延髄縫線核全体へ発現させるために、1 μ l の AAV8-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry を 2 カ所に 0.05 μ l/分の速度でガラス毛細管用いてマイクロインジェクションした。定位座標は、(前後 : -5.5 mm、中外側 : -0.0 mm、背腹 : -6.1 mm) および (前後 : -6.8 mm、中外側 : 0.0 mm、背腹 : -6.0 mm) であった。

8 週齢になったマイクロインジェクションしたマウスからすばやく脳を取り出し、脳の冠状スライス (200 μ m) を氷冷したカッティング溶液 (KCl 2.5 mM、NaH₂PO₄ 1.25 mM、MgCl₂ 5 mM、CaCl₂ 0.5 mM、NaHCO₃ 26 mM、グルコース 11

mM、スクロース 210 mM、pH 7.4) 中で作成した。スライスは、室温で維持した酸素化人工脳脊髄液 (aCSF; NaCl 125 mM、KCl 2.5 mM、NaH₂PO₄ 1.25 mM、MgCl₂ 1 mM、CaCl₂ 2 mM、NaHCO₃ 26 mM、グルコース 11 mM、pH 7.4) 中で 30 分間インキュベートした後、チャンバー内を室温で維持した酸素化 aCSF 中で灌流 (2 ml/分) させながら記録した。パッチ電極は、ピペット溶液 (K-グルコン酸塩 125 mM、KCl 10 mM、MgATP 4 mM、Hepes 10 mM、Na-GTP 0.3 mM、Phosphocreatine-Na₂ 8 mM、EGTA 0.5 mM、pH 7.2) で満たした。パッチクランプ記録には、Multiclamp 700B (Molecular Devices) を用いた。Digidata1322A インターフェース (Molecular Devices) を用いてシグナルをデジタル化し、Clampex 10.2 (Molecular Devices) を用いてシグナルを取得した。シグナルを 20 kHz でローパスフィルタリングし、40 kHz でデジタル化した。ホールセル記録はカレントクランプモードで行い、Clampfit 9.0 (Molecular Devices) を用いてデータを分析した。抑制性 DREADD 実験のために、hM4Di を発現した神経細胞を mCherry の蛍光によって同定し、自然発火を示す神経細胞のみを選択した。aCSF で 5 分間のベースラインを記録し、続いて aCSF で調整した 100 μM の CNO を 2 分間灌流投与し、その後 aCSF でウォッシュアウトした。

DREADD による延髄縫線核セロトニン作動性神経の抑制によるエンドトキシシンショックにおけるオレキシンの一過性応答

6~8 週齢のマウス (ePet-Cre および同腹野生型) の延髄縫線核に、AAV8-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry をマイクロインジェクションした。実験後、mCherry および 5HT の免疫組織化学によって、延髄縫線核における hM4Di 発現の局在を可視化した。ウイルスのマイクロインジェクションの 2 週間後、体温を記録するためにテレメトリプローブをマウスの皮下に埋め込み、1 週間回復させた。LPS 注射の 13.5 時間後に、CNO (4.5 mg/kg) または生理食塩水を IP 注射した。CNO 注射の 1.5 時間後に、100 μ l の生理食塩水に溶解した 0.1 mg (30 nmol) の OXA を IP ボーラス投与した。体温は、オレキシン投与後 6 時間測定した。

統計分析

全ての統計分析は PRISM Ver.6.0 (RRID : SCR_002798) を使用した。生存率は Kaplan-Meier 曲線で表し、生存曲線の比較は Mantel Cox log-rank 検定を行った。全ての値は平均 \pm 標準誤差 (mean \pm s.e.m) で表した。2 群の比較は、unpaired student t 検定を行った。2 つ以上の群の比較は、1-way ANOVA で分析後、個々の平均を Bonferroni 検定で比較した。時系列データの比較は、2-way ANOVA で分析後、個々の平均を Bonferroni 検定で比較した。差は、 $p < 0.05$ の場合有意であるとみなした。

4. 結果

末梢投与したオレキシンがエンドトキシンショックマウスの生存率を改善する

オレキシンは、通常血液脳関門を通過しない²⁹。しかし、驚くべきことに、致死量の LPS 注射（70～90%のマウスが死亡、10 mg/kg IP）の 30 分前に、オレキシン A（OXA、1 mg/マウス/24 時間）の皮下（SC）投与を開始した結果、エンドトキシンショックマウスの生存率が劇的に改善した（Figure 1A）。オレキシン受容体欠損（*OX1R*^{-/-};*OX2R*^{-/-}）マウスでは、この効果は見られなかった（Figure 1B）。さらに、LPS 注射の 30 分後に OXA（2 mg/マウス/24 時間）の SC 投与を開始した結果でも、生存率および生存時間が有意に改善した（Figure 1C）。興味深いことに、オレキシンは最初の 24 時間しか投与されなかったが、生命維持効果は数日間持続していた。

オレキシンはエンドトキシンショックマウスのサイトカイン産生を抑制する

LPS は、全身に過剰なサイトカイン産生を誘発し、炎症反応をさらに増幅する¹²。そこで、エンドトキシンショックマウスの末梢血中の 32 種類のサイトカインレベルを測定した。LPS はほとんどのサイトカインのレベルを増加させたが、OXA (1 mg/マウス/24 時間) の SC 投与の結果、LPS 注射の 4 時間後および 22 時間後に、多数のサイトカインの増加を有意に抑制していた (Figure 3)。同時に、LPS 注射の 4 時間後および 22 時間後に、LPS によって誘導された低体温も改善していた (Figure 4)。エンドトキシンショックの初期において、特に活性化マクロファージによって産生されるサイトカイン (例えば、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α または CCL3)、MIP-1 β (CCL4)) のレベルが有意に減少していた。後期では、マクロファージおよび/またはリンパ球によって産生されるより多くのサイトカインのレベルが有意に減少していたが、そのうち Interferon- γ (IFN- γ) および Interleukin-17 (IL-17) が特に著しく減少していた。LPS の代わりに生理食塩水を注射した健常マウスでは、末梢投与した OXA は末梢血中のサイトカインレベルに影響を与えなかった (Figure 3)。中枢神経系の炎症状態を調べるために、LPS 注射したマウスの脳において同じ 32 種類のサイトカインレベルを測定した。LPS は脳においてほとんどのサイトカインレベルを増加させたが、末梢投与した OXA は LPS 注射の 4

時間後および 22 時間後の脳内の特定のサイトカイン、特にミクログリア由来のケモカイン（例えば、MIP-1 α /1 β ）の増加を有意に抑制していた（Figure 5）。

エンドトキシンショックにおける過剰なサイトカイン産生は、主に LPS によって活性化されたマクロファージに起因する^{12,31}。我々の結果から、オレキシンが、中枢神経系を介して、またはマクロファージへの直接作用によって、マクロファージの活性化を調節している可能性が示唆される。後者の可能性を調べるために、野生型またはオレキシン受容体欠損マウスから腹腔マクロファージを調製し、OXA（1 nM および 100 nM）の存在下または非存在下で、LPS によってマクロファージを活性化した。OXA の非存在下で野生型およびオレキシン受容体欠損マウス由来のマクロファージの IL-17、IFN- γ 、IL-6、TNF- α mRNA レベルは LPS 添加後に増加したが、OXA（1 nM および 100 nM）の存在下でも LPS によるこれらの mRNA の増加に影響を与えなかった。結果として、マクロファージに対するオレキシンの直接作用の証拠は見出せなかった（Figure 6）。

次に、オレキシンによる中枢神経系を介した抗炎症効果の末梢組織でのエフェクターとして、カテコールアミンおよびコルチコステロンが媒介している可能性が考えられる¹⁷。LPS 注射したマウスの末梢血中のノルエピネフリンは、健常マウスと比較して、有意に減少していた（Figure 2A）。OXA は、LPS 注射したマウスにおいてエピネフリンを増加させ、LPS によるノルエピネフリンの低下

を部分的に抑制していた (Figure 1D)。 LPS 注射したマウスの末梢血中のコルチコステロンは、健常マウスと比較して有意に増加していた (Figure 2B)。 OXA は、 LPS 注射したマウスにおけるコルチコステロンの増加をさらに増強していた (Figure 1E)。 これらの結果から、エンドトキシンショックマウスにおいて末梢投与したオレキシンによって中枢性炎症反応制御機構が働いた可能性が考えられた。

末梢投与したオレキシンは直接中枢神経系に作用する

末梢投与したオレキシンは健康状態では血液脳関門を通過しない²⁹。しかし、健常マウスと比較して、エンドトキシンショックマウスでは IP 投与した [¹²⁵I]OXA の脳への取り込みが有意に増加していた (Figure 7A、B)。この結果は、末梢投与したオレキシンが全身性炎症下で脳内に移行することを示している。

次に、オレキシンの中枢投与による生存率の改善効果を調べた。低用量 (0.3 mg/マウス/24 時間) の OXA を中枢 (ICV) 投与した結果、エンドトキシンショックマウスの生存率が改善した (Figure 7C)。一方、この低用量の OXA の末梢 (SC) 投与では、生存率の改善は見られなかった (Figure 7C)。興味深いことに、ここでもまた、オレキシンは最初の 24 時間しか投与されなかったが、生命維持効果は数日間持続していた。さらに、LPS 注射後初期におけるオレキシンの中枢投与による抗炎症効果を調べた。OXA (0.1 mg/マウス/4 時間) の ICV 投与によって、LPS 注射の 4 時間後の末梢血中の MIP-1 α のレベルの増加を有意に抑制し、MIP-1 β 、TNF- α のレベルの増加を抑制する傾向を示した (Figure 7D)。同時に、ICV 投与した OXA は、LPS によって誘導された低体温も改善していた (Figure 8)。これらの結果は、オレキシンが中枢神経系に直接作用することによって、エンドトキシンショックマウスの生存率が改善したことを示している。

オレキシンはエンドトキシンショックマウスの生存予後予測因子である体温および心拍数を改善する

齧歯類³²およびヒト³³において、低体温は敗血症における炎症の重篤度の重要な指標となっている。そこで、エンドトキシンショックマウスの生存率と体温の相関を調べた。オレキシンを投与したマウスの体温は、生理食塩水を投与したマウスの体温よりも高く保たれていた (Figure 9A)。さらに、生存したマウスは、死亡したマウスと比較して、LPS 注射の 24 時間後の体温が有意に高かった (Figure 9B)。受信者動作特性 (ROC) 曲線より、体温 28.5 °C のカットオフ値で最適の感度と特異度が与えられた (Figure 9C)。これは、LPS 注射の 24 時間後の体温がエンドトキシンショックマウスの生存予後予測因子になることを示している。しかし、体温の維持がエンドトキシンショックの生存改善の唯一の原因であることを必ずしも意味しない。実際に、オレキシンを投与したマウスと同程度にヒートパッド上で温めただけでは、エンドトキシンショックマウスの生存率は改善しなかった (Figure 10)。

心血管機能 (例えば、心拍数や血圧) の評価は、エンドトキシンショックの重症度の評価として重要である。そこで、エンドトキシンショックマウスに対して、ボラス投与した OXA の体温および心拍数に対する効果を調べた。OXA を ICV 投与したマウスの体温および心拍数は、生理食塩水を ICV 投与したマウス

と比較して、3時間有意に高く保たれていた (Figure 9D、E)。野生型マウスでは OXA (0.1 mg/マウス) の IP 投与によって生理食塩水の IP 投与に比べて体温 (Figure 9F、G) および心拍数 (Figure 9H、I) が一過性に上昇したが、オレキシン受容体欠損マウスではこの一過性の上昇は見られなかった。これは、オレキシンによるこの一過性の体温および心拍数上昇効果がオレキシン受容体を介していることを示している。対照として、健康な野生型マウスでは、OXA の IP 投与によって体温および心拍数に影響を与えなかった (Figure 11A-D)。

エンドトキシンショックマウスの中枢神経系におけるオレキシンの標的部位

エンドトキシンショックマウスの中枢神経系におけるオレキシンの生命維持効果の標的部位を明らかにするために、生存率改善効果のサロゲージ・マーカーとしてオレキシンの一過性の体温上昇効果に焦点を当てた。縫線核は、延髄および中脳の領域に別々に存在する。延髄縫線核は、健常ラットにおいてオレキシンをマイクロインジェクションすることによって体温が上昇する部位として報告されている³⁴。延髄縫線核の淡蒼縫線核および大縫線核（Raphe Pallidus/Raphe Magnus : RPa/RMg）において OXA によって活性化したセロトニン作動性神経の割合を抗 Fos 抗体と抗 5HT 抗体を用いた二重染色によって評価した（Figure 12A）。エンドトキシンショックの野生型マウスでは、生理食塩水投与と比較して、OXA 投与後の RPa/RMg における Fos 陽性セロトニン作動性神経の割合が有意に増加していた（Figure 12B）。この Fos 発現誘導は、エンドトキシンショックのオレキシン受容体欠損マウス（Figure 12B）または健常野生型マウス（Figure 12C）では見られなかった。中脳縫線核の背側縫線核背側部および腹側部（Dorsal part of Dorsal raphe/Ventrolateral part of Dorsal Raphe : DRD/DRVl）は、体温上昇によって活性化する温度センサであるという報告がある³⁵。エンドトキシンショックの野生型マウスでは、OXA 投与によって DRD/DRVl におけるセロトニン作動性神経の Fos 活性が有意に増加していた（Figure 13A-C）。中

中枢神経系における主なオレキシン神経投射部位を系統的に調べたが、OXA 投与によって Fos 活性が有意に変化した他の領域は見出せなかった (Figure 13D-H)。

副交感神経系 (迷走神経) の神経核である孤束核 (Nucleus of solitary tract : NTS) と背側迷走神経運動核 (Dorsal motor nucleus of vagus nerve : DMNX)、交感神経節前繊維に投射している延髄吻側腹外側野 (Rostral ventrolateral medulla : RVLM) の神経細胞は LPS 注射後に活性化する²⁰。また、コルチコトロピン放出ホルモンによる青斑核 (Locus coeruleus : LC) の活性化が、末梢リンパ球に対する免疫抑制効果を示すことが報告されている³⁶。これらの神経細胞が、オレキシン系とは独立して、LPS 注射後に活性化することを確認した (Figure 14)。エンドトキシンショックマウスにおいて、オレキシンの末梢投与によって、オレキシン受容体依存的にセロトニン作動性の体温調節系が活性化したと結論づけた。

延髄縫線核は、エンドトキシンショックマウスに対するオレキシンによる体温上昇効果において重要である

組織学的探索の結果から、エンドトキシンショックマウスにおいてオレキシンの体温上昇効果の標的部位候補として延髄縫線核を見出した。エンドトキシンショックマウスのオレキシンによる体温上昇効果において延髄縫線核セロトニン作動性神経の活性が重要かどうかを調べるために、薬理遺伝学的手法を用いて延髄縫線核セロトニン作動性神経の活動を特異的に阻害した (Figure 5D)。神経特異的ヒトシナプシンプロモーターの制御下で、mCherry と結合した hM4Di を Cre 依存的に発現する組換えアデノ随伴ウイルス (AAV8-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry) を、セロトニン作動性神経特異的に Cre を発現する ePet-Cre トランスジェニックマウスの延髄縫線核にマイクロインジェクションした。抗 5HT 抗体を用いた免疫組織化学によって、セロトニン作動性神経における hM4Di-mCherry の発現を評価した (Figure 5E)。hM4Di-mCherry 陽性神経の 89% がセロトニン作動性神経であった。さらに、電気生理学的分析によってセロトニン作動性神経に発現した hM4Di の機能を確認した。CNO (100 μ M) は、延髄縫線核における mCherry 陽性神経の自然発火を減少させた (Figure 5F, G)。ここで、エンドトキシンショックマウスにおいて、CNO によって延髄縫線核セロトニン作動性神経の活動を抑制した時に、オレキシンによる体温上昇効果が抑制され

るかどうかを調べた。AAV8-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry をマイクロインジェクションした ePet-Cre トランスジェニックマウスにおいて、CNO (4.5 mg/kg) は LPS 注射後の OXA による体温上昇を有意に抑制した (Figure 5H, I)。一方で、AAV8-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry をマイクロインジェクションした同腹野生型マウスにおいて、CNO は LPS 注射後の OXA による体温上昇に影響を与えなかった (Figure 5H, I)。

5. 考察

5. 1. 投与方法とオレキシン受容体作動薬

我々は、敗血症の病態を逆手にとって末梢投与したオレキシンを脳内へデリバリーすることに成功した。臨床現場において脳内に直接薬物を投与することは現実的に難しさがあるため、その臨床的意義は大きい。しかし、直接脳内に投与した場合、末梢投与では効果がない低濃度でも効果を示したことから、オレキシンをいかに効率的に脳内で作用させるかが重要であると考えられる。我々の研究機構では、末梢投与で脳内に移行する低分子量オレキシン受容体作動薬の開発を推し進めており、オレキシン2型受容体作動薬 YNT-185 を発見し³⁷、マウスへの末梢投与によって覚醒効果およびナルコレプシー様症状改善効果を示すことを報告した³⁸。今後低分子量オレキシン受容体作動薬の開発が進めば、より効果的にオレキシン系の活性を薬理的にコントロールすることができるようになるかもしれない。

5. 2. 敗血症モデルおよび敗血症性ショックモデル

我々は、敗血症性ショックモデルとしてエンドトキシンショックマウスを用いた。エンドトキシンショックでは、直接感染症を引き起こすわけではないが、グラム陰性桿菌の細胞壁の構成成分である LPS がエンドトキシンとして働き、TLR4 によって認識されることがトリガーとなって全身性炎症が惹起され、致死性のショック状態に陥る¹²。近年では、腸内の細菌を腹腔に感染させることによって全身性炎症が惹起される盲腸結紮穿刺（cecal ligation and puncture : CLP）が敗血症モデルのゴールドスタンダードとして用いられているが、LPS によるエンドトキシンショックは昔からよく研究されてきた敗血症性ショックモデルであり、全身性炎症モデルとしてもしばしば用いられ、全身性炎症による致死的なショックモデルとしては簡便で有用なモデルであると考えている。しかし、臨床応用を考えた場合、より臨床に近い感染症からの敗血症モデルでの検証が必要であるかもしれない。また、臨床現場では、細菌性だけでなく、ウイルス性や真菌性の敗血症もしばしば問題となり、現在ではウイルス性や真菌性の敗血症モデルも存在する。細菌性、ウイルス性、真菌性の敗血症は、全身性炎症を惹起するメカニズムや臓器を障害するメカニズムはそれぞれ異なる。しかし、オレキシンによる治療法は、中枢神経系を介することによって、発端となる病原微生物には依存せずに、全身性炎症を含む全身状態の悪化に対して包括的にアプロ

一チすることができる可能性があると考えている。

一方で、齧歯類の敗血症モデルで有効性が示された治療法が実際の患者での臨床試験ではことごとく失敗に終わっている現状から、齧歯類の敗血症モデルとヒトの敗血症では病態が異なるという指摘もある³⁹。臨床応用を考えた場合、他の動物種での検証も必要であるかもしれない。ヒトにより近種の霊長類での検証は、非常に有効であると考えられる。

5. 3. 作用機序

本研究において、オレキシンによる中枢神経系を介した敗血症性ショックに対する治療効果について、その作用機序は十分に解明されたとはいえない。しかし、本研究の結果から、オレキシンの投与によって、1) コルチコステロンが増加する、2) カテコールアミンが増加する、3) サイトカインの増加を抑制する、4) 標的部位候補の1つとして延髄縫線核セロトニン作動性神経が活性化することを見出した。

コルチコステロンやカテコールアミンは、中枢性炎症反応制御における末梢組織でのエフェクターであり¹⁷、コルチコステロンやカテコールアミンの増加によって抗炎症効果や生存率改善効果も説明ができるかもしれない。実際糖質コルチコイドやカテコールアミンの全身投与は、敗血症の治療としてしばしば用いられ、部分的には有効性がある¹³。しかし、その副作用は大きく、むしろ害となることもしばしばある。実際ラットでのカテコールアミンの全身投与による生存率の改善効果は、オレキシンによる改善効果より弱い⁴⁰。中枢神経系による統制と神経からの局所の分泌が、主作用をより効果的にして、副作用を最小限にした可能性が考えられる。

敗血症における延髄縫線核の役割を示した研究報告は今までにない。近年神経科学の発展により、薬理遺伝学的手法や光遺伝学的手法を用いて特定の神経

細胞の活動を制御することが可能になっている。そして、この数年、特定の中樞性神経細胞と末梢免疫系との連関を示した研究がいくつか報告されている。一つは、報酬系の重要な神経核である腹側被蓋野のドーパミン作動性神経を活性化することによって、末梢免疫系が活性化するという報告である⁴¹。もう一つは、RVLMのC1神経を活性化することによって、腎虚血によって誘発した腎臓の炎症に対して抗炎症効果を示すという報告である²²。直近では、前脳基底部のコリン作動性神経を活性化することによって、敗血症モデルの全身性炎症に対して抗炎症効果を示すという報告である⁴²。同様にして、我々も、薬理遺伝学的手法を用いて延髄縫線核セロトニン作動性神経の活動を抑制した時に、オレキシンによる体温上昇効果が消失することを示した。しかし、敗血症における延髄縫線核の役割を直接示すには、延髄縫線核セロトニン作動性神経の活性化による全身性炎症や生存率への効果を調べる必要がある。また、薬理遺伝学的手法や光遺伝学的手法以外にも、オレキシンを延髄縫線核へマイクロインジェクションすることによって、オレキシンによる延髄縫線核への直接的な薬理効果を示すことができるかもしれない。とはいえ、延髄縫線核は、体温上昇効果を指標にオレキシン神経の主な投射部位の活性化を探索した結果見出された標的部位候補の1つであり、先入観なしに生存率改善効果や抗炎症効果を指標に全脳で活性化した神経細胞を探索する必要があるかもしれない。さらに、神経科学の発展

により、活性化した神経細胞について入力先と出力先の神経細胞を標識することが可能となっている。この技術を用いることによって、敗血症において活性化される神経ネットワークを同定し、その神経ネットワークにおけるオレキシンの作用を明らかにすることができるかもしれない。

6. 総括

本研究は、末梢投与したオレキシンが敗血症性ショックモデルの1つであるエンドトキシンショックマウスの生存率を改善することを示した。通常オレキシンの薬理効果を得るには脳内へ直接投与する必要があるため、末梢投与によって治療効果が得られたことの臨床的意義は大きい。敗血症は、未だ致死率の高い疾患であり、臨床応用が期待される。

しかし、作用機序については、未だ十分に明らかになっておらず、最新の神経科学的手法を用いて解明を進めている。また、臨床応用を考えた場合、他の敗血症モデルでの検討や他の動物種での検証が必要であり、現在霊長類での検証を始めている。

7. 図表

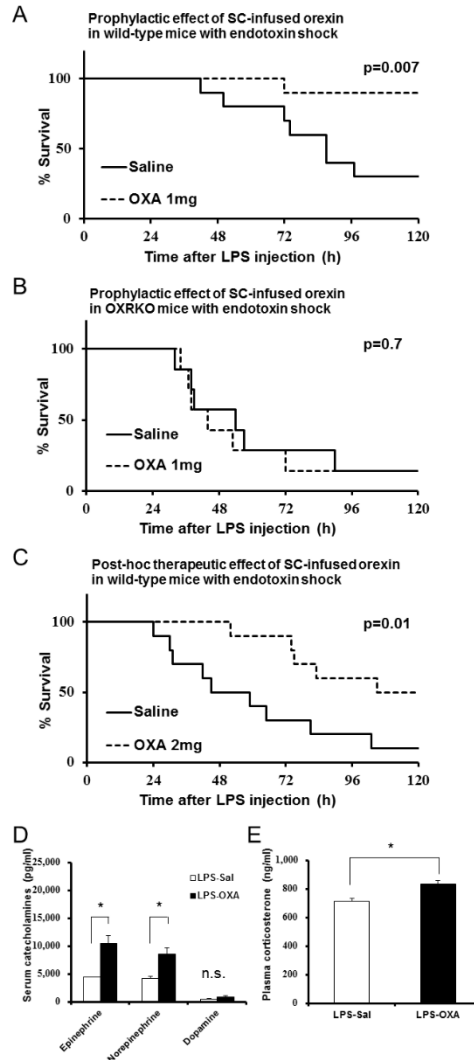


Figure 1. Effects of peripherally administered orexin-A (OXA) on survival in mice with endotoxin shock.

(A) Kaplan-Meier survival curves of wild-type mice subcutaneously (SC) administered with saline or orexin-A (OXA; 1 mg/mouse/24 h) 30 min before lipopolysaccharide (LPS; 10 mg/kg) injection (each group n=10). (B) Kaplan-Meier survival curves of *OX1R*^{-/-};*OX2R*^{-/-} (OXRKO) mice SC-administered with saline or OXA (1 mg/mouse/24 h) 30 min before LPS injection (each group n=7). (C) Kaplan-Meier survival curves of wild-type mice SC-administered with saline or OXA (2 mg/mouse/24 h) 30 min after LPS injection (each group n=10). (D, E) Effect of OXA treatment on the levels of catecholamines (D) in the serum and corticosterone (E) in the plasma from LPS-injected mice, compared to saline treatment (each group n=3–5, *p<0.05). Data are presented as

mean \pm s.e.m. Statistical significance assessed by Mantel Cox log-rank test (A–C) and unpaired t-test (D, E). Data are replicated in at least three independent experiments. n.s., not significant

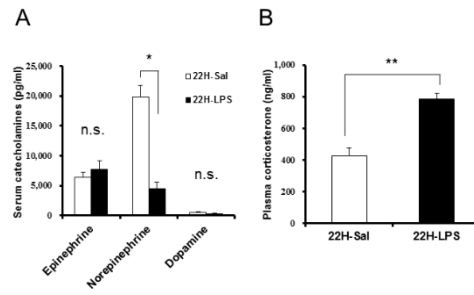
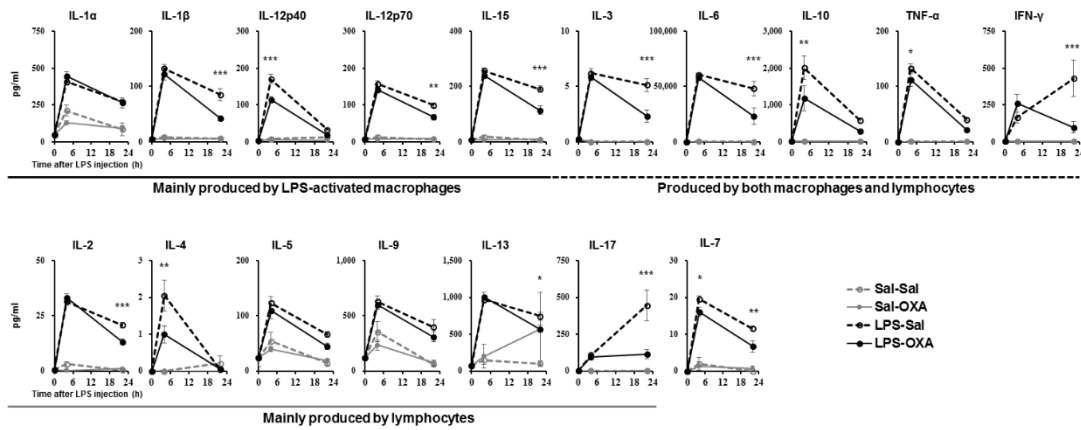


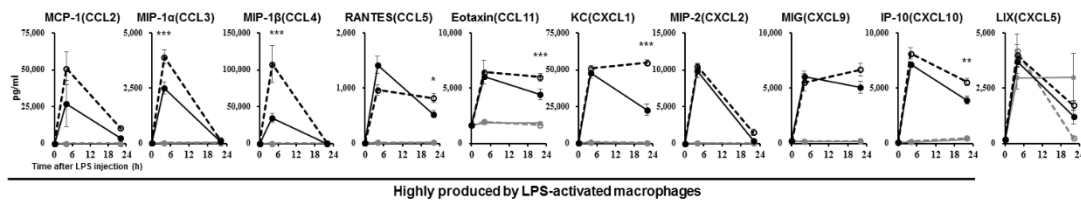
Figure 2. Serum catecholamines (A) and plasma corticosterone (B) levels at 22 h after LPS injection.

Norepinephrine level in the serum decreased and corticosterone level in the plasma increased at 22 h after LPS injection (22H-LPS), compared to saline injection (22H-Sal) (each group n=3–5, *P<0.05, **P<0.01).

A. Cytokines



B. Chemokines



C. Others

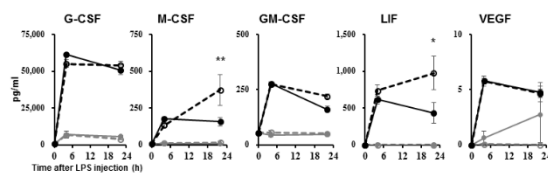


Figure 3. Effects of peripherally administered OXA on cytokine production in mice with endotoxin shock.

Effects of OXA treatment on the levels of 32 cytokines in serum at 4 h and 22 h after injection of LPS (LPS-OXA) or saline (Sal-OXA), compared to saline treatment (LPS-Sal, Sal-Sal) (each group $n=8$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$). OXA (1 mg/mouse/24 h) started to be SC-administered at 30 min before LPS injection. Statistical significance assessed by 2-way ANOVA coupled to Bonferroni's test. Data are replicated in at least three independent experiments.

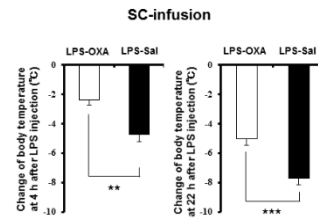
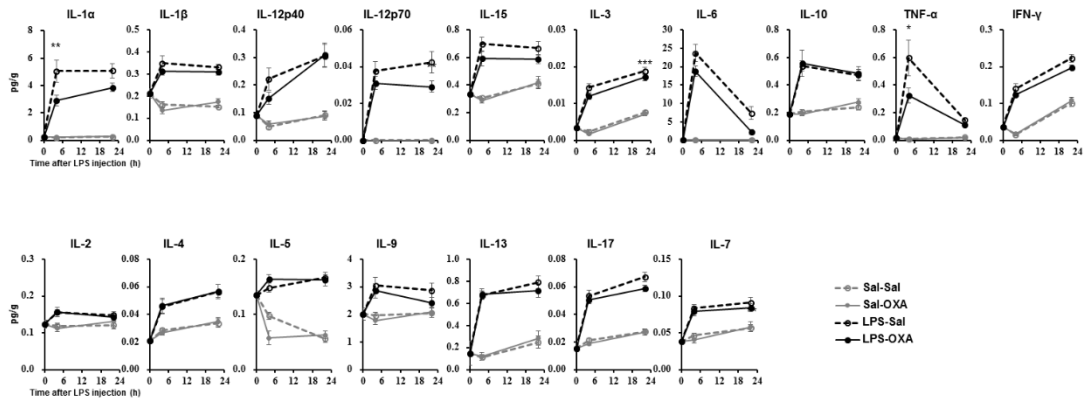


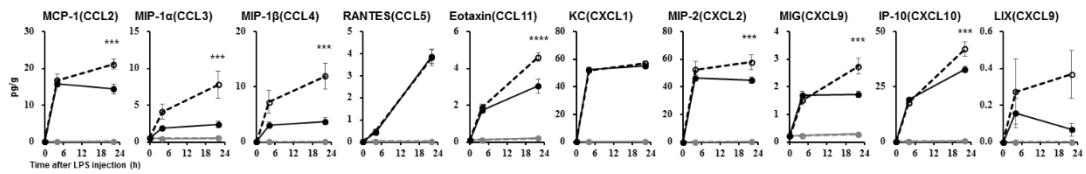
Figure 4. Effects of SC-infused OXA on body temperature at 4 h or at 22 h after LPS injection.

The changes of body temperature at 4 h or 22 h after LPS injection by SC administration of OXA (1 mg/mouse/24 h, LPS-OXA), compared to saline administration (LPS-Sal) (each group n=8, ***P<0.001, **P<0.01).

A. Cytokines



B. Chemokines



C. Others

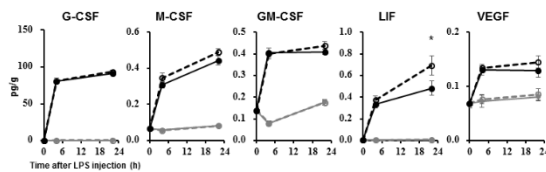


Figure 5. Effects of SC-infused OXA on cytokine production in brain at 4 h or at 22 h after LPS injection.

LPS increased most cytokines in all samples assayed. SC administration of OXA (1 mg/mouse/24 h, LPS-OXA) for 4 h or 22 h decreased several cytokine levels in the brain from LPS-injected mice, compared to saline SC administration (LPS-Sal) (each group n=8, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

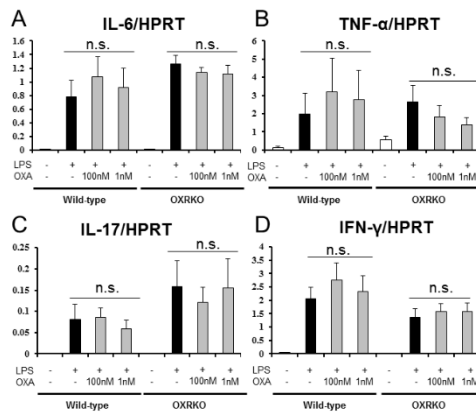


Figure 6. Effects of OXA on expressions of IL-6 (A), TNF- α (B), IL-17 (C), and IFN- γ (D) mRNA in cultured peritoneal macrophages from wild-type and OXRKO mice.

Hypoxanthine phosphoribosyl transferase-1 (HPRT) was used as internal control (each group n=6).

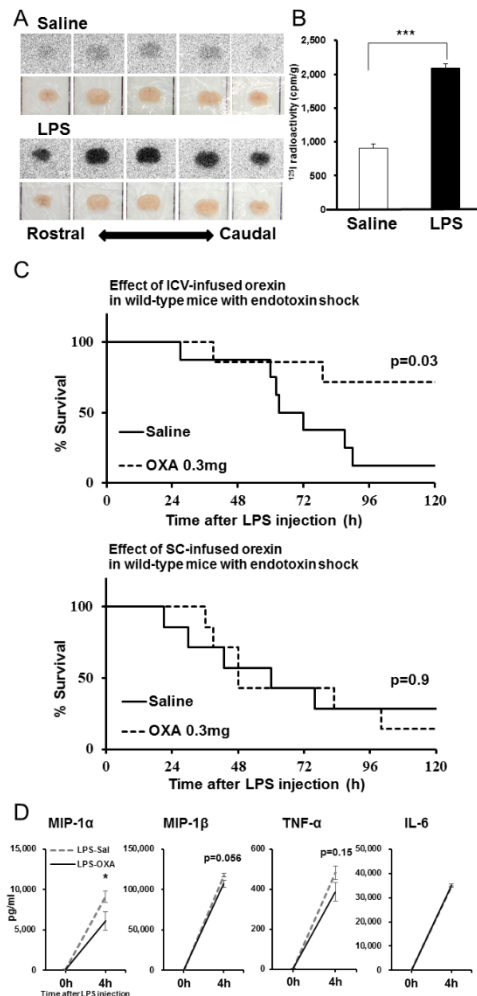


Figure 7. Direct action of OXA on the CNS in mice with endotoxin shock.

(A) [^{125}I]OXA-autoradiography of 1-mm coronal brain sections from control (saline) and endotoxin shock (LPS) mice. The brains were removed without perfusion at 2 h after intraperitoneal (IP) administration of [^{125}I]OXA, and were fixed in 4% PFA overnight. The sections were exposed to imaging plates for 5 days, and then scanned by BAS-2500 (Fuji Film). (B) The levels of radioactivity in the whole brain from LPS- or saline-injected mice at 2 h after IP administration of [^{125}I]OXA (each group n=4, ***p<0.001). (C) Kaplan-Meier survival curves of wild-type mice intracerebroventricularly (ICV, upper; saline: n=8, OXA: n=7) or subcutaneously (SC, lower; each group n=7) administered with saline or OXA (0.3 mg/mouse/24 h) before LPS injection. (D) Effects of ICV-administered OXA on the levels of MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α and IL-6 in serum at 4 h after LPS injection (LPS-OXA), compared to saline treatment (LPS-Sal) (each group n=8, *p<0.05). OXA administration (0.1 mg/mouse/4 h) started 30 min before LPS injection. Data are presented as mean \pm s.e.m. Statistical

significance assessed by unpaired t-test (B), Mantel Cox log-rank test (C), and 2-way ANOVA coupled to Bonferroni's test (D). Data are replicated in at least three independent experiments.

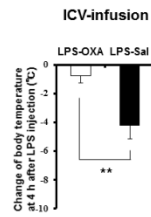


Figure 8. Effects of ICV-infused OXA on body temperature at 4 h after LPS injection.

The changes of body temperature at 4 h after LPS injection by ICV administration of OXA (0.3 mg/mouse/24 h, LPS-OXA), compared to saline administration (LPS-Sal) (each group n=8, **P<0.01).

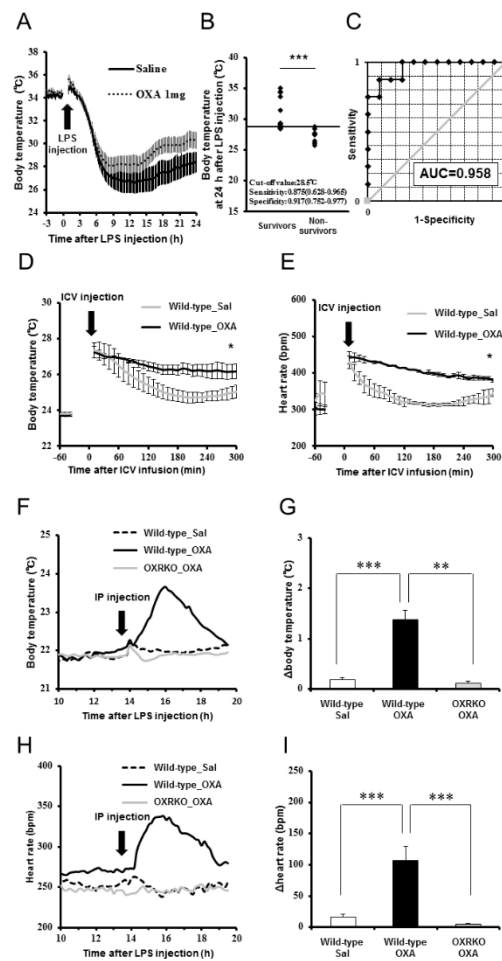


Figure 9. Effects of OXA on body temperature and heart rate in mice with endotoxin shock.

(A) The changes in body temperature of LPS-injected mice treated with OXA (1 mg/mouse/24 h) or saline (each group n=10). (B) The correlation between the survival and body temperature in mice with endotoxin shock (Survivor n=12, Non-survivor n=8, ***p<0.001). (C) Receiver operating characteristic (ROC) curve between survival and body temperature in mice with endotoxin shock. AUC: area under the curve. (D, E) Transient effects of bolus ICV-injected OXA (Wild-type_OXA) or saline (Wild-type_Sal) on body temperature (D) and heart rate (E) in LPS-injected wild-type mice (each group n=4, *P<0.05). (F, H) Transient effects of bolus IP-injected OXA on body temperature (F) and heart rate (H) in mice with endotoxin shock. (G, I) IP injection of OXA (Wild-type_OXA) but not saline (Wild-type_Sal) increased body temperature (G) and heart rate (I) transiently in LPS-injected wild-type mice, but not in LPS-injected OXRKO mice (OXRKO_OXA) (each group n=4, **P<0.01, ***P<0.001). Statistical significance assessed by unpaired t-test (B), 2-way ANOVA (D, E), and 1-way ANOVA

coupled to Bonferroni's test (G, I). Data are replicated in at least three independent experiments.

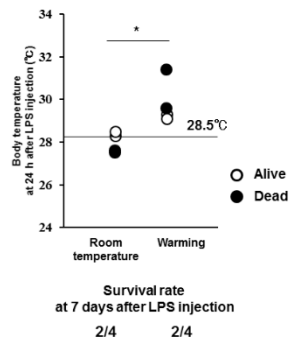


Figure 10. Effects of whole-body warming with a heat pad on body temperature (upper) and survival rate (lower) in mice with endotoxin shock.

Warming elevated body temperature at 24 h after LPS injection, but did not improve survival of mice with endotoxin shock, compared to room temperature exposure (each group n=4, *P<0.05).

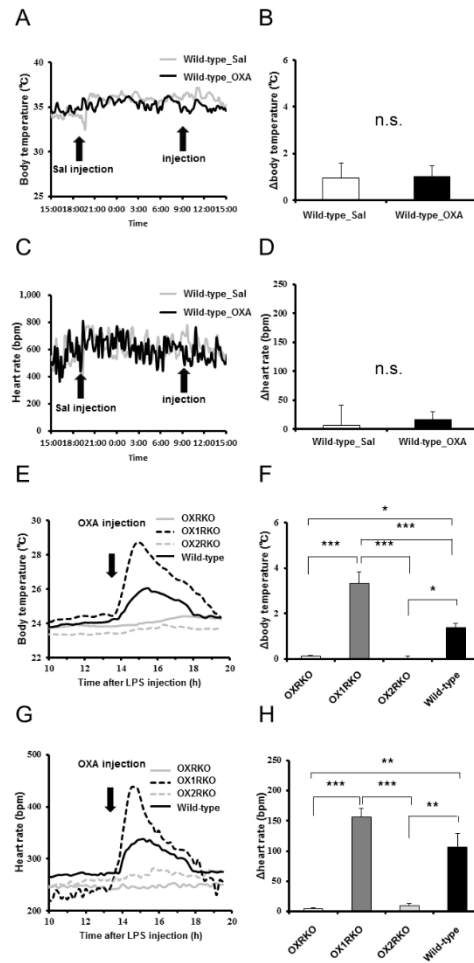


Figure 11. Transient effects of IP-injected OXA on body temperature and heart rate in healthy wild-type mice injected with saline (A, B, C, D) or in $OX1R^{-/-}$ (OX1RKO) and $OX2R^{-/-}$ (OX2RKO) mice with endotoxin shock (E, F, G, H). IP injection of OXA had no effects on body temperature and heart rate in healthy wild-type mice. In OX2RKO mice, transient effects of OXA on body temperature and heart rate in endotoxin shock were canceled. In OX1RKO mice, the transient effect of OXA on body temperature in endotoxin shock was significantly potentiated. (each group n=4, *P<0.05, **P<0.01, *P<0.001).**

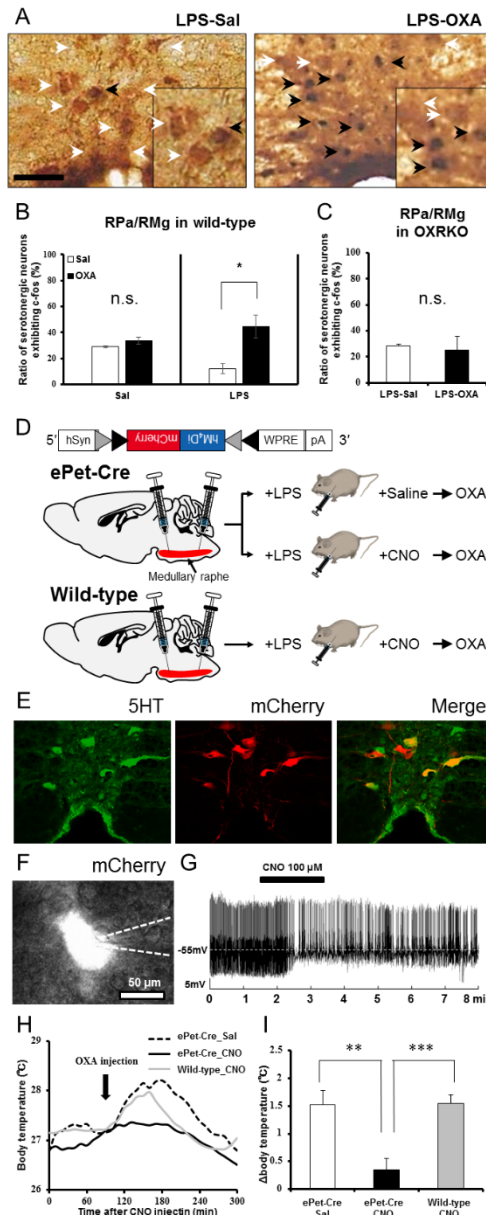


Figure 12. Thermogenic effect of OXA in mice with endotoxin shock through medullary raphe serotonergic neurons.

(A) IP-administered OXA (LPS-OXA, right) but not saline (LPS-Sal, left) activated serotonergic neurons in raphe pallidus nucleus and raphe magnus nucleus (RPa/RMg) in LPS-injected wild-type mice by immunohistochemistry using anti-c-fos and anti-5HT antibodies. Black arrows indicate double positive cells and white arrows indicate 5HT-single positive cells. (B, C) IP-administration of OXA significantly activated serotonergic neurons in RPa/RMg of LPS-injected wild-type mice, compared to saline administration (each group n=4, *P<0.05) (B). There was no significant difference in activities of serotonergic neurons in RPa/RMg between saline and OXA administration in healthy

wild-type mice (B) or in OXRKO mice with endotoxin shock (C). Statistical significance assessed by unpaired t-test. Scale bar: 100 μ m. (D) Scheme illustrating chemogenetic experiments (See also main text). (E) Immunostaining in medullary raphe with antibody to 5HT (green; left), fluorescence of mCherry (red; middle). (F) A typical patch-clamped mCherry-positive neuron in medullary raphe of ePet-Cre mice. White broken lines show the pipette. (G) Typical change in the spontaneous firing rate of mCherry-positive neuron after CNO (100 μ M) application. (H, I) CNO (4.5 mg/kg body weight) (ePet-Cre CNO) but not saline (ePet-Cre Sal) attenuated the increase of body temperature under endotoxin shock by OXA in ePet-Cre mice injected with virus, but not in wild-type littermate mice (Wild-type CNO) injected with virus (each group n=5–7, **P<0.01, ***P<0.001). Statistical significance assessed by 1-way ANOVA coupled to Bonferroni's test. Data are replicated in at least three independent experiments.

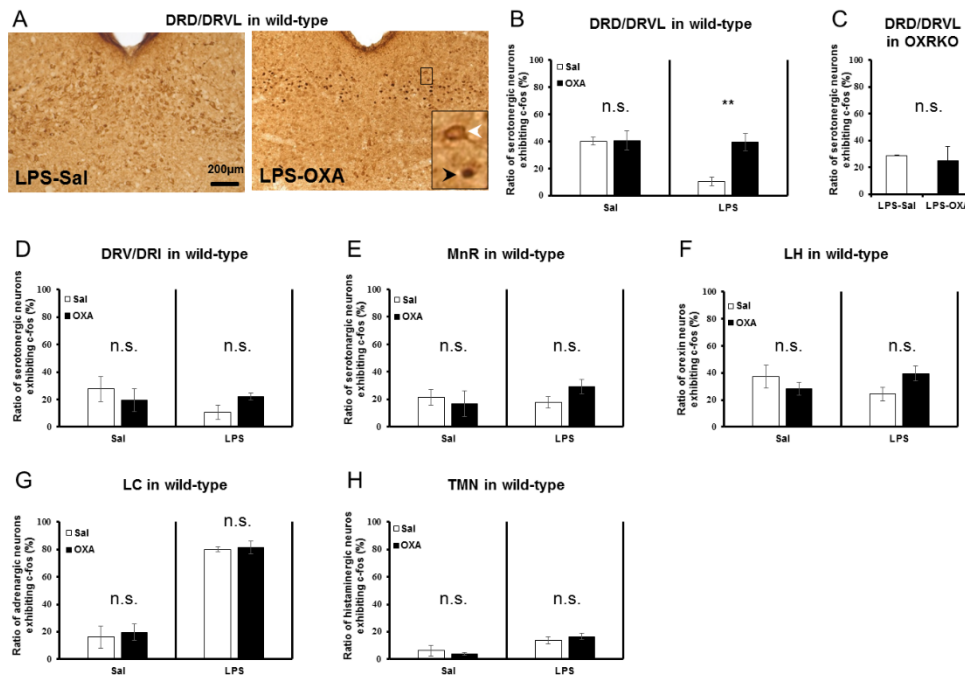


Figure 13. Systematic survey of orexin's targets in the CNS of mice with endotoxin shock.

(A) Typical photographs of double staining for c-fos and 5HT in DRD/DRVL from LPS-injected mice treated with saline (LPS-Sal, left) or OXA (LPS-OXA, right). (B, C) The percentage of c-fos positive serotonergic neurons in DRD/DRVL from LPS-injected mice treated with saline or OXA, from saline-injected normal mice treated with saline or OXA (B) and from LPS-injected OXRKO mice treated with saline or OXA (C). (D, E) The percentage of c-fos positive serotonergic neurons in DRV/DRI (D) and in MnR (E) from LPS-injected mice treated with saline or OXA and from normal mice treated with saline or OXA. (F) The percentage of c-fos positive orexin neurons in LH from LPS-injected mice treated with saline or OXA and from normal mice treated with saline or OXA. (G, H) The percentage of c-fos positive noradrenergic neurons in LC (G) and histaminergic neurons in TMN (H) from LPS-injected mice treated with saline or OXA and from normal mice treated with saline or OXA. (B–H each group n=4, **P<0.01). DRD: dorsal raphe nucleus, dorsal part; DRVL: dorsal raphe nucleus, ventrolateral part, DRV: dorsal raphe nucleus, ventral part, DRI: dorsal raphe nucleus, interfascicular part, LH: lateral hypothalamus, LC: locus coeruleus, TMN: tuberomammillary nucleus.

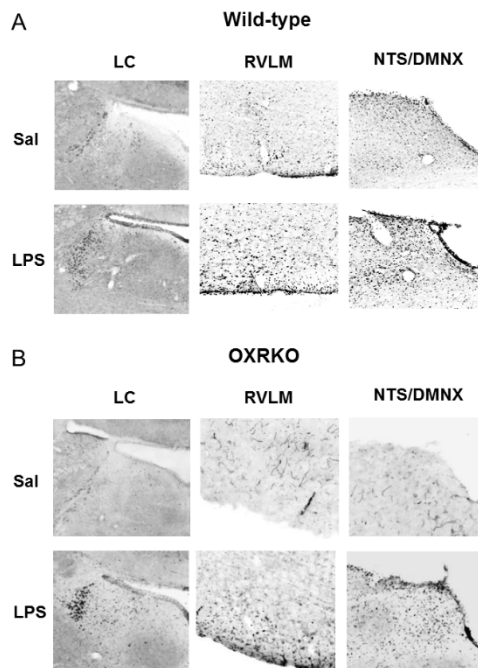


Figure 14. Activation of neurons in the LC, RVLM, NTS and DMNX at 3 h after LPS injection in wild-type (A) or OXRKO (B) mice.

Typical photographs of Fos staining in LC (left), RVLM (middle), NTS and DMNX (right) from wild-type mice or OXRKO mice injected with saline or LPS. LC: locus coeruleus. RVLM: rostral ventrolateral medulla. NTS: nucleus tractus solitaries. DMNX: dorsal motor nucleus of the vagus.

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、以下の多くの方々から、ご指導、ご支援、ご協力をいただきました。この場を借りて、深く感謝申し上げます。

国際統合睡眠医科学研究機構 柳沢正史教授は、指導教員として、多大なご指導とご支援をいただきました。

国際統合睡眠医科学研究機構 入鹿山容子研究員は、本研究の主要論文の Co-first author であり、メンターとして多大なご指導とご支援をいただいたとともに、日々共に研究を遂行してきました。

循環器内科 村越伸行講師、および国際統合睡眠医科学研究機構 石川有紀子技術員、木山麻衣子さん、石川ゆいさん、内田俊太郎さん、富永拓さん、細川直人さんは、共に本研究を遂行してきました。

国際統合睡眠医科学研究機構 長瀬博教授、および長瀬研究室の方々は、オレキシン受容体作動薬の研究開発を共に遂行してきました。

解剖・発生学教室 高橋智教授、濱田理人助教、木村早希さんは、腹腔マクロファージの実験でご協力をいただきました。

国際統合睡眠医科学研究機構 林悠准教授、鹿糠実香技術員、森田美穂技術員は、DREADD 実験でご協力をいただきました。

国際統合睡眠医科学研究機構 Kaspar Vogt 准教授、Akindele Tito 研究員は、論

文の校閲をしていただきました。

国際統合睡眠医科学研究機構 神宮亜美さん、福岡純也さん、石井佐知子さん、安倍忍さん、滑川由紀子さん、山口拓土さん、深井諒さん、牟田博樹さん、川邊優希さんは、研究室で共に研究を遂行してきました。

最後に、国際統合睡眠医科学研究機構の多くの方々からご支援、ご協力をいただきました。

9. 引用文献

1. Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, and W.J. Sibbald, *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.* Chest, 1992. **101**(6): p. 1644-1655.
2. Angus, D.C. and T. van der Poll, *Severe sepsis and septic shock.* N Engl J Med, 2013. **369**(9): p. 840-851.
3. Levy, M.M., M.P. Fink, J.C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S.M. Opal, J.L. Vincent, G. Ramsay, and Sccm/Esicm/Accp/Ats/Sis, *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.* Crit Care Med, 2003. **31**(4): p. 1250-1256.
4. Seymour, C.W., V.X. Liu, T.J. Iwashyna, F.M. Brunkhorst, T.D. Rea, A. Scherag, G. Rubenfeld, J.M. Kahn, M. Shankar-Hari, M. Singer, C.S. Deutschman, G.J. Escobar, and D.C. Angus, *Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).* JAMA, 2016. **315**(8): p. 762-774.
5. Shankar-Hari, M., G.S. Phillips, M.L. Levy, C.W. Seymour, V.X. Liu, C.S. Deutschman, D.C. Angus, G.D. Rubenfeld, M. Singer, and F. Sepsis Definitions Task, *Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).* JAMA, 2016. **315**(8): p. 775-787.
6. Singer, M., C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G.R. Bernard, J.D. Chiche, C.M. Coopersmith, R.S. Hotchkiss, M.M. Levy, J.C. Marshall, G.S. Martin, S.M. Opal, G.D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.L. Vincent, and D.C. Angus, *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).* JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-810.
7. Vincent, J.L., R. Moreno, J. Takala, S. Willatts, A. De Mendonca, H. Bruining, C.K. Reinhart, P.M. Suter, and L.G. Thijs, *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine.* Intensive Care Med, 1996. **22**(7): p. 707-710.

8. Kisson, N., J.A. Carcillo, V. Espinosa, A. Argent, D. Devictor, M. Madden, S. Singhi, E. van der Voort, J. Latour, and C. Global Sepsis Initiative Vanguard Center, *World Federation of Pediatric Intensive Care and Critical Care Societies: Global Sepsis Initiative*. *Pediatr Crit Care Med*, 2011. **12**(5): p. 494-503.
9. Liu, L., S. Oza, D. Hogan, J. Perin, I. Rudan, J.E. Lawn, S. Cousens, C. Mathers, and R.E. Black, *Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis*. *Lancet*, 2015. **385**(9966): p. 430-440.
10. Martin, G.S., D.M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss, *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(16): p. 1546-1554.
11. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 885-891.
12. Beutler, B. and E.T. Rietschel, *Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(2): p. 169-176.
13. Rhodes, A., L.E. Evans, W. Alhazzani, M.M. Levy, M. Antonelli, R. Ferrer, A. Kumar, J.E. Sevransky, C.L. Sprung, M.E. Nunnally, B. Rochweg, G.D. Rubinfeld, D.C. Angus, D. Annane, R.J. Beale, G.J. Bellinghan, G.R. Bernard, J.D. Chiche, C. Coopersmith, D.P. De Backer, C.J. French, S. Fujishima, H. Gerlach, J.L. Hidalgo, S.M. Hollenberg, A.E. Jones, D.R. Karnad, R.M. Kleinpell, Y. Koh, T.C. Lisboa, F.R. Machado, J.J. Marini, J.C. Marshall, J.E. Mazuski, L.A. McIntyre, A.S. McLean, S. Mehta, R.P. Moreno, J. Myburgh, P. Navalesi, O. Nishida, T.M. Osborn, A. Perner, C.M. Plunkett, M. Ranieri, C.A. Schorr, M.A. Seckel, C.W. Seymour, L. Shieh, K.A. Shukri, S.Q. Simpson, M. Singer, B.T. Thompson, S.R. Townsend, T. Van der Poll, J.L. Vincent, W.J. Wiersinga, J.L. Zimmerman, and R.P. Dellinger, *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016*. *Crit Care Med*, 2017. **45**(3): p. 486-552.
14. Investigators, A., A.C.T. Group, S.L. Peake, A. Delaney, M. Bailey, R. Bellomo, P.A. Cameron, D.J. Cooper, A.M. Higgins, A. Holdgate, B.D. Howe, S.A. Webb, and P. Williams, *Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(16): p. 1496-1506.
15. Mouncey, P.R., T.M. Osborn, G.S. Power, D.A. Harrison, M.Z. Sadique, R.D.

- Grieve, R. Jahan, S.E. Harvey, D. Bell, J.F. Bion, T.J. Coats, M. Singer, J.D. Young, K.M. Rowan, and M.T.I. Pro, *Trial of early, goal-directed resuscitation for septic shock*. N Engl J Med, 2015. **372**(14): p. 1301-1311.
16. Pro, C.I., D.M. Yealy, J.A. Kellum, D.T. Huang, A.E. Barnato, L.A. Weissfeld, F. Pike, T. Terndrup, H.E. Wang, P.C. Hou, F. LoVecchio, M.R. Filbin, N.I. Shapiro, and D.C. Angus, *A randomized trial of protocol-based care for early septic shock*. N Engl J Med, 2014. **370**(18): p. 1683-1693.
 17. Tracey, K.J., *The inflammatory reflex*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 853-859.
 18. Wang, H., M. Yu, M. Ochani, C.A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J.H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C.J. Czura, and K.J. Tracey, *Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 384-388.
 19. Pavlov, V.A. and K.J. Tracey, *Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation*. Nat Neurosci, 2017. **20**(2): p. 156-166.
 20. Elmquist, J.K., T.E. Scammell, C.D. Jacobson, and C.B. Saper, *Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration*. J Comp Neurol, 1996. **371**(1): p. 85-103.
 21. Borovikova, L.V., S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G.I. Botchkina, L.R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J.W. Eaton, and K.J. Tracey, *Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 458-462.
 22. Abe, C., T. Inoue, M.A. Inglis, K.E. Viar, L. Huang, H. Ye, D.L. Rosin, R.L. Stornetta, M.D. Okusa, and P.G. Guyenet, *C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice*. Nat Neurosci, 2017. **20**(5): p. 700-707.
 23. Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R.M. Chemelli, H. Tanaka, S.C. Williams, J.A. Richardson, G.P. Kozlowski, S. Wilson, J.R. Arch, R.E. Buckingham, A.C. Haynes, S.A. Carr, R.S. Annan, D.E. McNulty, W.S. Liu, J.A. Terrett, N.A. Elshourbagy, D.J. Bergsma, and M. Yanagisawa, *Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior*. Cell, 1998. **92**(4): p. 573-585.
 24. Chemelli, R.M., J.T. Willie, C.M. Sinton, J.K. Elmquist, T. Scammell, C. Lee, J.A. Richardson, S.C. Williams, Y. Xiong, Y. Kisanuki, T.E. Fitch, M. Nakazato, R.E.

- Hammer, C.B. Saper, and M. Yanagisawa, *Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation*. Cell, 1999. **98**(4): p. 437-451.
25. Lin, L., J. Faraco, R. Li, H. Kadotani, W. Rogers, X. Lin, X. Qiu, P.J. de Jong, S. Nishino, and E. Mignot, *The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene*. Cell, 1999. **98**(3): p. 365-376.
 26. Sakurai, T., *The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(3): p. 171-181.
 27. Sakurai, T., *The role of orexin in motivated behaviours*. Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(11): p. 719-731.
 28. Funato, H., A.L. Tsai, J.T. Willie, Y. Kisanuki, S.C. Williams, T. Sakurai, and M. Yanagisawa, *Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity*. Cell Metab, 2009. **9**(1): p. 64-76.
 29. Fujiki, N., Y. Yoshida, B. Ripley, E. Mignot, and S. Nishino, *Effects of IV and ICV hypocretin-1 (orexin A) in hypocretin receptor-2 gene mutated narcoleptic dogs and IV hypocretin-1 replacement therapy in a hypocretin-ligand-deficient narcoleptic dog*. Sleep, 2003. **26**(8): p. 953-959.
 30. Michelson, D., E. Snyder, E. Paradis, M. Chengan-Liu, D.B. Snively, J. Hutzelmann, J.K. Walsh, A.D. Krystal, R.M. Benca, M. Cohn, C. Lines, T. Roth, and W.J. Herring, *Safety and efficacy of suvorexant during 1-year treatment of insomnia with subsequent abrupt treatment discontinuation: a phase 3 randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet Neurol, 2014. **13**(5): p. 461-471.
 31. Moore, R.N., K.J. Goodrum, and L.J. Berry, *Mediation of an endotoxic effect by macrophages*. J Reticuloendothel Soc, 1976. **19**(3): p. 187-197.
 32. Blanque, R., C. Meakin, S. Millet, and C.R. Gardner, *Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha*. Gen Pharmacol, 1996. **27**(6): p. 973-977.
 33. Kushimoto, S., S. Gando, D. Saitoh, T. Mayumi, H. Ogura, S. Fujishima, T. Araki, H. Ikeda, J. Kotani, Y. Miki, S. Shiraishi, K. Suzuki, Y. Suzuki, N. Takeyama, K. Takuma, R. Tsuruta, Y. Yamaguchi, N. Yamashita, N. Aikawa, and J.S.R.S. Group, *The impact of body temperature abnormalities on the disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective*

- survey of severe sepsis*. Crit Care, 2013. **17**(6): p. R271.
34. Tupone, D., C.J. Madden, G. Cano, and S.F. Morrison, *An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis*. J Neurosci, 2011. **31**(44): p. 15944-15955.
 35. Hale, M.W., K.F. Dady, A.K. Evans, and C.A. Lowry, *Evidence for in vivo thermosensitivity of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus and raphe pallidus nucleus implicated in thermoregulatory cooling*. Exp Neurol, 2011. **227**(2): p. 264-278.
 36. Rassnick, S., A.F. Sved, and B.S. Rabin, *Locus coeruleus stimulation by corticotropin-releasing hormone suppresses in vitro cellular immune responses*. J Neurosci, 1994. **14**(10): p. 6033-6040.
 37. Nagahara, T., T. Saitoh, N. Kutsumura, Y. Irukayama-Tomobe, Y. Ogawa, D. Kuroda, H. Gouda, H. Kumagai, H. Fujii, M. Yanagisawa, and H. Nagase, *Design and Synthesis of Non-Peptide, Selective Orexin Receptor 2 Agonists*. J Med Chem, 2015. **58**(20): p. 7931-7937.
 38. Irukayama-Tomobe, Y., Y. Ogawa, H. Tominaga, Y. Ishikawa, N. Hosokawa, S. Ambai, Y. Kawabe, S. Uchida, R. Nakajima, T. Saitoh, T. Kanda, K. Vogt, T. Sakurai, H. Nagase, and M. Yanagisawa, *Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(22): p. 5731-5736.
 39. Seok, J., H.S. Warren, A.G. Cuenca, M.N. Mindrinos, H.V. Baker, W. Xu, D.R. Richards, G.P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C.C. Finnerty, C.M. Lopez, S. Honari, E.E. Moore, J.P. Minei, J. Cuschieri, P.E. Bankey, J.L. Johnson, J. Sperry, A.B. Nathens, T.R. Billiar, M.A. West, M.G. Jeschke, M.B. Klein, R.L. Gamelli, N.S. Gibran, B.H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S.E. Calvano, P.H. Mason, J.P. Cobb, L.G. Rahme, S.F. Lowry, R.V. Maier, L.L. Moldawer, D.N. Herndon, R.W. Davis, W. Xiao, R.G. Tompkins, *Inflammation, and L.S.C.R.P. Host Response to Injury, Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(9): p. 3507-3512.
 40. Li, Y., X. Cui, J. Su, M. Haley, H. Macarthur, K. Sherer, M. Moayeri, S.H. Leppla, Y. Fitz, and P.Q. Eichacker, *Norepinephrine increases blood pressure but not survival with anthrax lethal toxin in rats*. Crit Care Med, 2009. **37**(4): p. 1348-

1354.

41. Ben-Shaanan, T.L., H. Azulay-Debby, T. Dubovik, E. Starosvetsky, B. Korin, M. Schiller, N.L. Green, Y. Admon, F. Hakim, S.S. Shen-Orr, and A. Rolls, *Activation of the reward system boosts innate and adaptive immunity*. Nat Med, 2016. **22**(8): p. 940-944.
42. Zhai, Q., D. Lai, P. Cui, R. Zhou, Q. Chen, J. Hou, Y. Su, L. Pan, H. Ye, J.W. Zhao, and X. Fang, *Selective Activation of Basal Forebrain Cholinergic Neurons Attenuates Polymicrobial Sepsis-Induced Inflammation via the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway*. Crit Care Med, 2017.