

令和元年6月4日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09269

研究課題名(和文) ストレス応答調節におけるネガティブ・フィードバック破綻の機序の解明

研究課題名(英文) CRF-related mechanism of stress responses in the rat brain

研究代表者

山口 奈緒子 (YAMAGUCHI, Naoko)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50380324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体において、ストレスは様々な反応を引き起こす。中枢性ストレス応答の出力系として、交感神経-副腎髄質系の活動亢進は末梢でのカテコールアミンの遊離・分泌を促進する。本来これらのストレス反応は生体の防御機構であるが、過剰なストレス反応は、ストレス不適合状態をもたらす。本研究では、視床下部室傍核でのストレス応答におけるシグナル経路の役割、およびそれらがストレス応答の持続に及ぼす影響について検討した。その結果、ストレス性交感神経反応の中枢性調節に、視床下部室傍核のアドレナリン受容体およびGABA受容体が関与すること、また急性および慢性ストレス負荷により交感神経反応が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレス反応は本来、生体の防御機構である。しかし、過剰なストレス反応はストレス不適合をもたらす、さらにはうつ病などのストレス関連疾患の発症の契機ともなりうる。このような過剰なストレス反応をもたらす中枢性調節機構については、交感神経反応制御の観点では未だ不明な点も多い。本研究は、脳内、特に交感神経反応およびストレス応答の制御中枢である視床下部室傍核におけるストレス応答調節機序について、その一端を明らかにした。さらに、交感神経系ストレス応答の調節メカニズムに関する基礎的知見蓄積の一助となり、将来的にストレス関連疾患の予防・治療法の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Stress exposure causes various stress responses. Stressful events activate sympathetic nervous system, resulting in the elevation of plasma catecholamine levels. In this study, we examined the mechanisms in the brain, especially in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN), of stress-induced sympathetic activation in rats. Our results demonstrated that corticotropin-releasing factor (CRF), one of the major stress-related neuropeptides, in the brain elevated plasma noradrenaline level via activation of α_1 -adrenoceptors in the PVN and plasma adrenaline level via activation of α_2 -adrenoceptors in the PVN. We also revealed that GABA receptors in the PVN mediate α_1 -adrenoceptors-dependent elevation of plasma noradrenaline level. Furthermore, our results showed that there are differences in stress-induced sympathetic responses in the PVN between acute and chronic stress exposure.

研究分野：神経科学

キーワード：ストレス コルチコトロピン放出因子 CRF 交感神経系 カテコールアミン 室傍核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体において、ストレスは様々な反応を引き起こす。このストレス反応の制御には、神経系、内分泌系および免疫系が複雑に関わり合っている。中枢性ストレス応答の出力系として、交感神経-副腎髄質系の活動亢進は末梢でのカテコールアミンの遊離・分泌を促進し、また、視床下部-下垂体-副腎髄質系 (HPA 系) の活性化は副腎皮質からのグルココルチコイド分泌を促進する。通常ストレス反応の抑制系として、グルココルチコイドの分泌量増加によるネガティブ・フィードバックシステムが機能し、視床下部からのコルチコトロピン放出ホルモン分泌および下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌を抑制することによって速やかに定常状態に戻すよう作用する^③。本来これらのストレス反応は生体の防御機構である。しかし、過剰なストレス反応は、ストレス不応答やストレス脆弱性をもたらし、さらにはうつ病などのストレス関連疾患の発症の契機ともなりうる。

我々はこれまで、血中カテコールアミン濃度を交感神経系活動の、また、血中コルチコステロン濃度を HPA 系活動の指標として、ラット脳室内に投与した種々のストレス関連ペプチドによる交感神経系および HPA 系の脳内調節機序について解析してきた。その過程で、コルチコトロピン放出因子 (CRF) による交感神経系活性化に、脳内シクロオキシゲナーゼ (COX) および一酸化窒素合成酵素 (NOS) が促進的に関与すること、また、CRF 投与後の少なくとも数時間にわたって視床下部室傍核における COX および NOS の発現誘導が持続することを見出し^{⑥-⑩}、CRF による交感神経系の反応が一過性のものではないことを明らかにした。これらの成果から、視床下部室傍核において CRF 反応性を促進するメカニズムが存在する可能性が示唆される。さらに、CRF 脳室内投与実験でみられた COX および NOS の作用が、ストレス負荷条件でも存在するかを検討したところ、急性の拘束ストレス負荷後の交感神経系活性化にこれらの酵素群が関与することが明らかとなった。ところで、COX および NOS の誘導型アイソザイムの発現は、核内転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) により調節されることが知られている。さらに、NF- κ B のシグナル経路は転写共役因子 peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR) により制御される。最近我々は、CRF による交感神経系活性化に NF- κ B および PPAR が関与することを明らかにしており、前述の COX および NOS の作用発現に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、視床下部室傍核でのストレス応答における上記のシグナル経路の役割、およびストレス応答の持続に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、ラットを用いて CRF を中心とした脳内ストレス応答機構の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 薬物投与実験

Wistar/ST 成体雄ラットを用いた。麻酔下で脳定位装置にラットを固定し、各種薬物を微量投与した。投与薬物は側脳室もしくは交感神経系・ストレス応答の制御中枢である視床下部室傍核に行った。あらかじめ大腿動脈に留置したカニューレから経時的に採血を行った。採取した血液サンプルをアルミナ抽出し、高速液体クロマトグラフィーにより血中ノルアドレナリンおよびアドレナリン濃度を測定した。

(2) 拘束ストレス実験

Wistar/ST 成体雄ラットを用いた。麻酔下でマイクロダイアリシスのためのガイドカニューレを頭蓋骨に固定し、5 日間の安定化後、急性および慢性拘束ストレスを負荷した。

ストレス負荷群のラットに対しては、市販の金属製網にラットを固定して拘束ストレス (1 時間) を負荷した。また、コントロール群のラットは、通常の飼育環境下で飼育された。拘束ストレス負荷時には、あらかじめ大腿動脈に留置したカニューレから経時的に採血を行った。採取した血液サンプルをアルミナ抽出し、高速液体クロマトグラフィーにより血中ノルアドレナリンおよびアドレナリン濃度を測定した。また、視床下部室傍核より回収した透析液から、質量分析法により各種の神経伝達物質を微量同時定量した。

4. 研究成果

(1) CRF による血中カテコールアミン増加におけるアドレナリン受容体および GABA 受容体の役割

CRF は主要なストレス関連ペプチドの 1 つである。実際に、ストレス曝露によって、視床下部室傍核を含む複数の脳部位において CRF の mRNA およびタンパク質レベルが増加することが報告されている。そこで本研究では急性ストレス応答の機序を明らかにするため、

まず外因性 CRF による交感神経反応に関わる経路を解析した。CRF の脳室内投与により視床下部室傍核でのノルアドレナリン遊離が亢進した。そこで、同部位にアドレナリン受容体刺激薬を微量投与したところ、アドレナリン α_1 受容体刺激薬により血中アドレナリンが増加し、アドレナリン α_1 受容体刺激薬により血中ノルアドレナリンおよびアドレナリン(ノルアドレナリン>>アドレナリン)が増加した。さらに詳細を明らかにするため、視床下部室傍核のアドレナリン受容体を局所的に遮断したところ、CRF による血中アドレナリン増加はアドレナリン α_1 受容体遮断薬により抑制され、血中ノルアドレナリン増加はアドレナリン α_1 受容体遮断薬によって抑制された。これらの結果から、CRF は視床下部室傍核でのノルアドレナリン遊離を亢進させ、遊離したノルアドレナリンは同部位のアドレナリン α_1 受容体の賦活を介して血中アドレナリンを、またアドレナリン α_1 受容体の賦活を介して血中ノルアドレナリンを増加させることが明らかとなった(図1)。

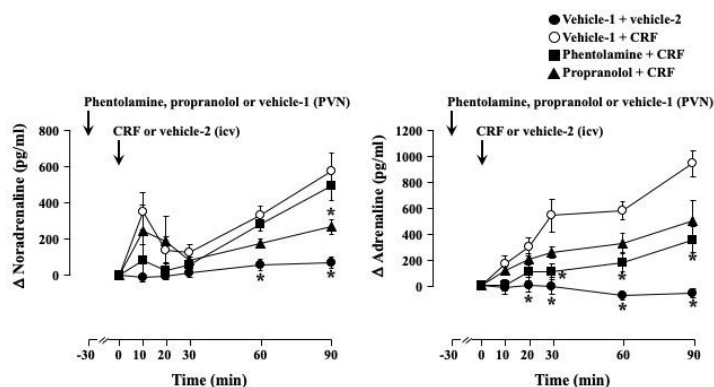


図1 . CRF による血中カテコールアミン増加に及ぼす
アドレナリン受容体遮断薬の影響
(Okada & Yamaguchi, Auton. Neurosci. 2017)

さらに、視床下部室傍核のアドレナリン α_1 受容体賦活による血中ノルアドレナリン増加の機序について解析した。その結果、アドレナリン α_1 受容体賦活による血中ノルアドレナリン増加には、視床下部室傍核の GABA_B 受容体が関与することが明らかとなった(図2)。

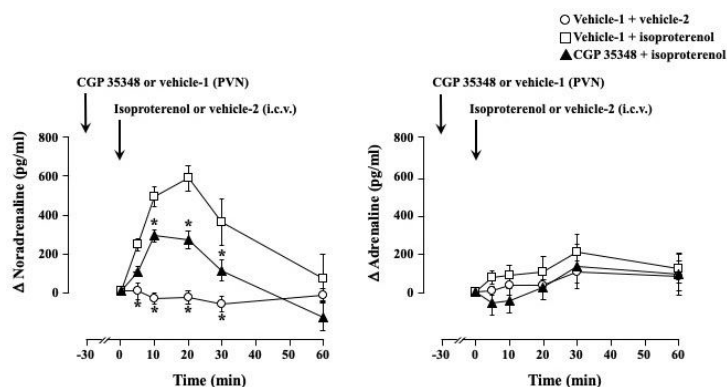


図2 . アドレナリン α_1 受容体刺激による血中カテコールアミン増加に及ぼす
GABA 受容体遮断薬の影響
(Yamaguchi, Mimura, Okada, Eur. J. Pharmacol. 2019)

(2) 拘束ストレス負荷による脳内ストレス応答に対する各種阻害薬・受容体遮断薬の効果

急性および慢性拘束ストレス負荷により、血中ノルアドレナリンおよびアドレナリンレベルは有意に増加した。これらの反応は、急性期の方が顕著であった。ストレス負荷前に各種酵素阻害薬もしくは受容体遮断薬を投与したところ、CRF 受容体遮断薬、COX 阻害薬等の前投与は急性拘束ストレス負荷による血中カテコールアミンレベルの増加を有意に抑制した。また、視床下部室傍核から回収した透析液サンプルを用いて、質量分析法により透析液中の神経伝達物質の同時一斉定量を行ったところ、急性拘束ストレス負荷による室傍核透析液中の GABA レベルの上昇を認めた。

(3) 結論

以上の結果から、ストレス関連ペプチド CRF による交感神経反応の脳内機序の一端が明らかとなった。また、急性拘束ストレスと慢性拘束ストレスによる交感神経反応および脳内

分子の変動が異なることが示された。今後は、ストレス負荷期間の違いによるストレス応答の変化の要因をさらに詳細に解析する必要があると考える。

<引用文献>

Chrousos, 2009. *Nat Rev Endocrinol* 5, 374-381. Ulrich-Lai et al., 2009. *Nat Rev Neurosci* 10, 397-409. Pasquali, 2012. *Ann NY Acad Sci* 1264, 20-35. Spear, 2009. *Dev Psychopathol* 21: 87-97. Arborelius L et al., 1999. *J Endocrinol* 160: 1-12. Yokotani et al., 2001. *Eur J Pharmacol* 419, 183-189. Okada et al., 2003. *Eur J Pharmacol* 477, 95-100. Yamaguchi-Shima et al., 2007. *Eur J Pharmacol* 564, 94-102. Yamaguchi et al., 2009. *Auton Neurosci* 148, 83-89. Yamaguchi et al., 2009. *Auton Neurosci* 151, 82-89. Yamaguchi et al., 2010. *Neuroscience* 170, 773-781. Xie et al., 1994. *J Biol Chem* 269, 4705-4708. Herrmann et al., 2005. *Nat. Med.* 11, 1322-1329. Daynes and Jones, 2002. *Nat Rev Immunol* 2, 748-759. Zhang et al., 2011. *Neuroscience* 176, 381-395. Okada et al., 2008. *Eur J Pharmacol* 584, 207-212. Kalin et al., 1994. *Brain Res* 656, 182-186. Li et al., 1996. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2359-2364.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Yamaguchi N, Mimura K, Okada S. GABA_B receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate α -adrenoceptor-induced elevations of plasma noradrenaline in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 査読有. 848, 88-95 (2019)

DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.01.029

山口奈緒子, 岡田尚志郎. CRF による交感神経系活性化における視床下部室傍核アドレナリン受容体の役割. *自律神経* 査読有. 55, 295-300 (2018)

<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/select?jo=cj3jirit&UserID=192.218.116.221>

Okada S, Yamaguchi N. Possible role of adrenoceptors in the hypothalamic paraventricular nucleus in corticotropin-releasing factor-induced sympatho-adrenomedullary outflow in rats. *Auton. Neurosci.* 査読有. 203, 74-80 (2017)

DOI: 10.1016/j.autneu.2017.01.008

[学会発表](計 4 件)

Yamaguchi N, Mimura M, Okada S. Prostaglandin E₂ EP₃ receptor subtype in the paraventricular hypothalamic nucleus mediates the corticotropin-releasing factor-induced elevation of plasma noradrenaline level in rats. 第 92 回日本薬理学会年会, 大阪, 2019 年.

Yamaguchi N, Mimura K, Okada S. GABA_B receptor in the hypothalamic paraventricular nucleus mediates α -adrenoceptor activation-induced elevation of plasma noradrenaline in rats. 18th World congress of basic and clinical pharmacology. Kyoto, Japan. 2018 年.

Yamaguchi N, Sano K, Okada S. Differential roles of adrenoceptors in the hypothalamic paraventricular nucleus in corticotropin-releasing factor-induced sympathetic activation in rats. 第 70 回日本自律神経学会総会 (International Society for Autonomic Neuroscience 2017 合同大会), 名古屋, 2017 年.

Yamaguchi N, Mimura K, Okada S. Possible role of adrenoceptors in the hypothalamic paraventricular nucleus in corticotropin-releasing factor-induced sympathetic activation in rats. 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎, 2017 年.

[その他]

ホームページ等

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/pharmacology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 岡田 尚志郎

ローマ字氏名: OKADA, shoshiro

所属研究機関名: 愛知医科大学

部局名: 医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 40203989

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。