

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790457  
 研究課題名（和文） CRFによる中枢性交感神経-副腎髄質系賦活における誘導型 NOS の役割  
 研究課題名（英文） Role of nitric oxide synthase isozyme in brain CRF-induced sympathetic activation  
 研究代表者  
 臼井 大介（USUI DAISUKE）  
 高知大学・教育研究部医療学系・助教  
 研究者番号：70351913

研究成果の概要：副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)による交感神経系賦活の調節因子として一酸化窒素合成酵素(NOS)に着目し、CRFを脳室内投与したラットの視床下部室傍核におけるNOS発現の解析を行った。CRF投与によりiNOS発現は有意に増加し、一方nNOS発現の変化はみられなかった。また、iNOSおよびnNOS陽性細胞は各々、CRFにより活性化した。以上より、CRFによる交感神経系賦活には主としてiNOSが関与している可能性が示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：CRF、一酸化窒素合成酵素、視床下部室傍核、Fos、交感神経-副腎髄質系

## 1. 研究開始当初の背景

副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）は種々のストレスに対する生体防御反応の重要なメディエーターの1つである。ストレス負荷時には、脳内CRFの遊離が亢進し、視床下部室傍核（PVN）から脳幹・脊髄へ投射される神経線維を介して、交感神経-副腎髄質系の賦活に深く関与していると考えられている。しかし、このCRF作用が消去されずに何らかの原因で異常に亢進し、持続的な脳内CRF作用の過剰状態に陥るとうつ病や不安障害に関連する病態を引き起こすのではないかと推測されている。しかし、脳内CRF

の交感神経-副腎髄質系賦活機構に関与するCRF受容体の下流における脳内神経情報伝達経路について詳細は未だ明らかではなく、特に過剰なCRF作用の持続性という観点からの報告は例をみない。

私達はこれまでに、ラット脳室内に投与したCRFによる交感神経-副腎髄質系の中枢性賦活機構を薬理的に解析し、(1)CRF単回投与により血中ノルアドレナリン及びアドレナリンが少なくとも6時間にわたって増加する、(2)CRF投与による血中ノルアドレナリン及びアドレナリンの増加が、CP-154526（選択的CRF-1受容体遮断薬）の脳室内前処置に

よって抑制される、(3)CRF 投与による血中ノルアドレナリン及びアドレナリンの増加が、シクロヘキシミド (タンパク質合成阻害薬)、L-NAME (非選択的一酸化窒素合成酵素阻害薬)、S-methylisothiourea (誘導型一酸化窒素合成酵素阻害薬) の脳室内前処置によって抑制されることを報告した。以上の実験成績から、脳室内投与した CRF による血中カテコールアミン持続性増加に PVN における iNOS の誘導が重要な役割を担うことが推測される。

## 2. 研究の目的

本研究では、特に CRF 作用の持続性という観点から、脳内 CRF による交感神経-副腎髄質系賦活の調節因子の1つとして、一酸化窒素合成酵素(NOS)の役割に焦点を絞り、交感神経-副腎髄質系の調節に重要である PVN における NOS アイソザイム [誘導型 NOS (iNOS)および神経型 NOS (nNOS)] の発現を解析する。下行性交感神経線維細胞体を標識・同定した上で NOS アイソザイムの発現を解析するため、単シナプス性逆行性蛍光トレーサー (フルオロ・ゴールド; FG) による神経回路標識法を免疫染色と組み合わせて用いた。

## 3. 研究の方法

### (1) 逆行性トレーサー注入

Wistar 系雄性ラット (体重約 300 g) を、ペントバルビタール (40 mg/kg, i.p.) を用いて麻酔した。ステンレス・カニューレを用いて、第 8 および 9 胸髄・中間外側細胞柱 (IML) に、4%フルオロ・ゴールドを各 50 nl 注入した。

### (2) 脳室内投与

トレーサー注入の 14 日後に、ウレタン (1.2 g/kg, i.p.) を用いて麻酔した。鼠径動脈に採血用カニューレを留置し、脳定位固定下に右側脳室にステンレス・カニューレを挿入した。5 時間の安静の後、CRF (1.5 nmol/animal) を脳室内投与した。

### (3) カテコールアミン測定

血漿ノルアドレナリンおよびアドレナリンは、アルミナ抽出した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて電気化学的に測定した。

### (4) 免疫組織染色

CRF 投与の 1 もしくは 3 時間後に、麻酔下で 4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行い、脳を摘出した。前頭断凍結切片を作製し、iNOS もしくは nNOS と Fos に対する抗体を用いて蛍光二重免疫組織染色を行

った。各 NOS アイソザイムに対しては Cy3 標識二次抗体を、Fos に対しては FITC 標識二次抗体を用いて標識した。また、フルオロ・ゴールドは UV 下で可視化した。陽性細胞数および逆行性標識細胞数は、グリッド (100 × 100 μm) あたりの細胞数を計測し、1 匹あたり 5 切片の平均をそのラットの値とした。

## 4. 研究成果

### (1) CRF の血中カテコールアミンに対する影響

逆行性トレーサーの微量注入が、脳室内投与 CRF による交感神経系活性化を阻害するか確認するため、交感神経活動の指標として血中カテコールアミンレベルを測定した。トレーサーを注入したラットにおいては、以前に報告された無処置ラットと同様に、脳室内投与 CRF は、投与 1 ないし 3 時間後の血中ノルアドレナリンおよびアドレナリンを有意に増加させた。以上の結果から、トレーサーを注入したラットにおいても、CRF により交感神経系が活性化されていることが示された。

### (2) 逆行性トレーサー(FG)により標識された PVN ニューロンの分布

PVN においては、先行研究と同様に、3 つの亜核の細胞群が逆行性に標識された。FG 標識ニューロンは PVN の dorsal cap (PaDC)、ventral part (PaV) および posterior part (PaPo) において、トレーサー注入側の同側に、豊富に認められた (図 1)。以後の解析は、上記の 3 つの亜核について行った。

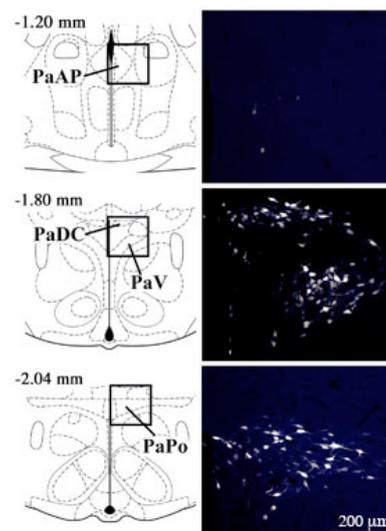


図 1. PVN における FG 標識ニューロンの分布

### (3) PVN・FG 標識ニューロンにおける NOS アイソザイム発現に対する CRF の影響 脳室内投与 CRF は、PVN における iNOS

陽性細胞数を有意に増加させた。さらに、PVNのFG標識ニューロンにおいても、CRFは、投与1および3時間に、3つの亜核全てにおいてiNOS発現を有意に増加させた(図2)。

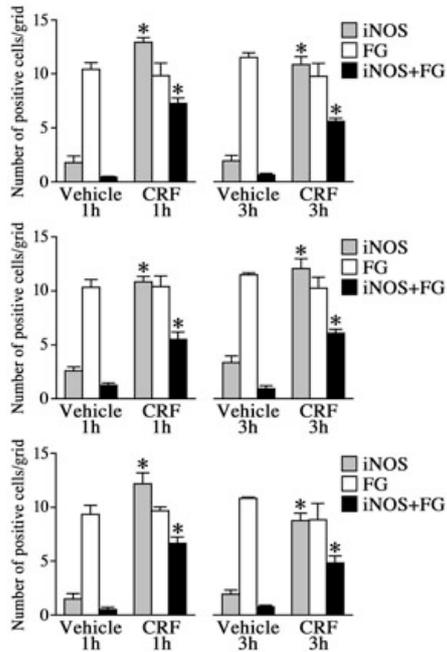


図2. PVN・FG標識ニューロンにおけるiNOS発現に対するCRFの影響

一方、PVNのnNOS陽性細胞数およびFG標識ニューロンにおけるnNOS発現について、CRF投与による変化はみられなかった(図3)。

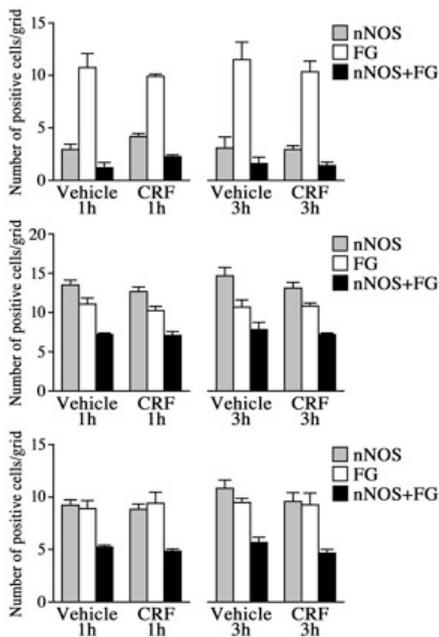


図3. PVN・FG標識ニューロンにおけるnNOS発現に対するCRFの影響

以上の結果から、PVNの下行性交感神経線維細胞体において、脳室内投与CRFがiNOS発現を増加させ、一方、nNOS発現には影響しないことが明らかとなった。

#### (4) PVN・FG標識ニューロンにおけるNOSアイソザイムおよびFos共発現に対するCRFの影響

さらに本研究では、脳室内投与CRFによるNOS発現FG標識ニューロンの神経活性化について明らかにするため、CRF投与1時間後の、FG標識ニューロンにおけるNOSアイソザイムおよびFos(神経活動のマーカー)の共発現の解析を行った。

CRFは投与1時間後に、PVNの3つの亜核それぞれにおいて、iNOS/Fosを共発現したFG標識ニューロン数を有意に増加させた(図4)。

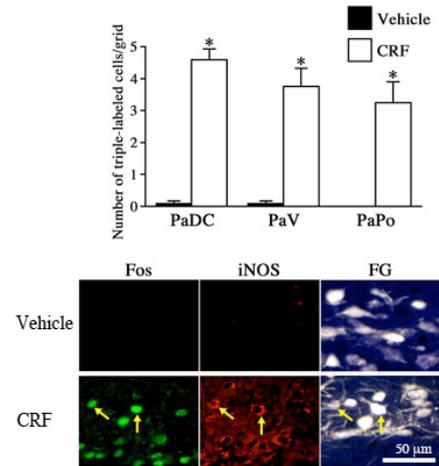


図4. PVN・FG標識ニューロンにおけるiNOS/Fos共発現に対するCRFの影響

一方、CRFは、PVNのventral partにおいてのみnNOS/Fosを共発現したFG標識ニューロン数を有意に増加させた(図5)。dorsal capおよびposterior partでは変化はみられなかった。

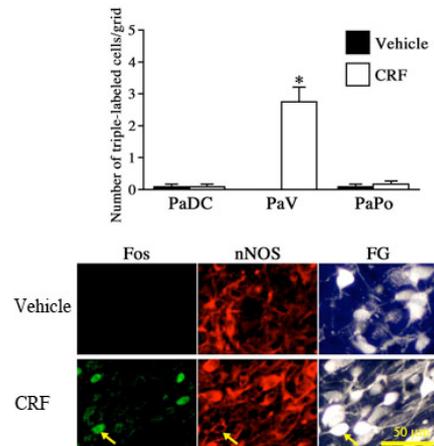


図5. PVN・FG標識ニューロンにおけるnNOS/Fos共発現に対するCRFの影響

以上の結果から、脳室内投与 CRF が、PVN の交感神経系制御に関与する亜核全域において iNOS を発現する下行性交感神経線維細胞体を活性化させること、また、一亜核においてのみ nNOS を発現する下行性交感神経線維細胞体を活性化させることが示された。

#### (5) 考察

本研究は、交感神経節前線維に直接投射する下行性交感神経線維細胞体において、CRF が NOS アイソザイム、とくに iNOS を発現したニューロンを活性化することを示した。これらの結果は、PVN における CRF の交感神経系活性化の機序に、NOS アイソザイム、とくに iNOS、が関与する可能性を示唆している。

NOS アイソザイムの発現の違いは、iNOS および nNOS それぞれに由来する NO の機能的差異を表すことが報告されている。一般に、この2つの NOS アイソザイムは、NO 産生増加に要する時間の長さ、NO 遊離の持続時間が異なる。構成型である nNOS 由来の NO は、刺激後短時間にわずかに増加する。一方、iNOS 由来の NO は、刺激後 iNOS が誘導される潜時の後、大量に数時間ないし数日にわたって遊離される。前述のように、CRF はストレス反応の重要なメディエーターの1つであり、かつ、交感神経-副腎髄質系を賦活させる。この CRF 作用が過剰に亢進・持続することがうつ病や不安障害に関連する病態を引き起こすのではないかと推測されている。先行諸研究において既に、単回投与した CRF が数時間にわたって持続した交感神経系賦活作用を示すことが報告されている。本研究で示された NOS 発現の増加は、NOS がこの CRF 作用の持続に関与する因子である可能性を示唆している。

また、本研究でみられた NOS 発現下行性交感神経線維細胞体での Fos 発現増加は、これらのニューロンの活性化を示してはいるが、NOS の酵素活性の直接的証拠とはならない。今後さらに、PVN での NOS 酵素活性の時間的経過についての解析が必要であると考える。

最近、うつ病に対して CRF-1 受容体遮断薬が治療薬として開発され臨床的に有望視されており、脳内 CRF が関与する疾患の病態生理における役割が注目されている。本研究の成果は、うつ病や不安障害の患者にみられるような脳内 CRF による病態の発症機序の解明のみならず、新たな薬物治療の開発に繋がると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yamaguchi N, Okada S, Usui D, Yokotani K. Nitric oxide synthase isozymes in spinally projecting PVN neurons are involved in CRF-induced sympathetic activation. *Auton. Neurosci.* 印刷中. 査読有
- ② Usui D, Yamaguchi-Shima N, Okada S, Shimizu T, Wakiguchi H, Yokotani K. Central bombesin activates adrenal adrenaline- and noradrenaline-containing cells via brain thromboxane A<sub>2</sub> in rats. *Auton. Neurosci.* 印刷中. 査読有
- ③ Usui D, Yamaguchi-Shima N, Okada S, Shimizu T, Wakiguchi H, Yokotani K. Selective activation of the sympathetic ganglia by centrally administered corticotropin-releasing factor in rats. *Auton. Neurosci.* 146, 111-114. 2009. 査読有
- ④ Yamaguchi-Shima N, Okada S, Shimizu T, Usui D, Nakamura K, Lu L, Yokotani K. Adrenal adrenaline- and noradrenaline-containing cells and celiac sympathetic ganglia are differentially controlled by centrally administered corticotropin-releasing factor and arginine-vasopressin in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 564, 94-102. 2007. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

臼井大介 他, 脳室内投与 CRF による交感神経-副腎髄質系における視床下部室傍核での一酸化窒素合成酵素の役割, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 3 月, 横浜市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 大介 (USUI DAISUKE)

高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号: 70351913

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者