

機関番号：16401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590702
 研究課題名（和文）内因性カンナビノイドによる中枢性交感神経-副腎髄質系賦活への抑制作用について
 研究課題名（英文）Roles of endocannabinoid in the modulation of central sympatho-adrenomedullary outflow in rat
 研究代表者
 横谷 邦彦（YOKOTANI KUNIHICO）
 高知大学・教育研究部医療学系・教授
 研究者番号：30174858

研究成果の概要（和文）：

麻酔下ラットの脳室内に投与した各種のストレス関連ペプチドによる血液中カテコールアミン(CA)上昇を指標に、交感神経-副腎髄質(S-A)系の中枢性賦活機構における脳内カンナビノイド(エンドカンナビノイド)の役割を解明した。血中CA増加に脳内ホスホリパーゼC(PLC)/ジアシルグリセロールリパーゼ系により生成されたモノアシルグリセロール(MAG)(別名;2-アラキドノイルグリセロール)がアラキドン酸の前駆物質としてS-A系賦活に促進性に、さらに強力なエンドカンナビノイドとしてこの系に抑制性に関与するという、2方向性の役割を担うことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We tried to clarify the role of monoacylglycerol (MAG) involved in the central activation of sympatho-adrenomedullary (S-A) outflow by intracerebroventricular administration of stress-related peptides (CRF, vasopressin, bombesin) using anesthetized rats. Elevation of plasma catecholamines evoked by these peptides is mediated by arachidonic acid cascade produced by phospholipase C/diacylglycerol lipase/MAG lipase-mediated mechanisms. In addition, MAG (=2-arachidonoylglycerol: the most powerful endocannabinoid) reduced these peptide-induced activation of S-A outflow through CB1 receptor-mediated mechanisms in rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：交感神経-副腎髄質系の中枢性賦活；アラキドン酸カスケード；ホスホリパーゼC；ジアシルグリセロールリパーゼ；2-アラキドノイルグリセロール；エンドカンナビノイド

1. 研究開始当初の背景

麻酔したラット脳室内に種々のプロスタノイド[プロスタグランジン(PG)E₂, PGD₂, PGI₂, PGF₂α]を投与すると、①PGE₂のみが胃交感神経性胃酸分泌抑制、さらに血液中カテコールアミン(ノルアドレナリンのみ)の上昇を引き起こすこと、②PGE₂の受容体サブタイプ(EP1-4)の選択的刺激薬を用いた解析から、中枢性交感神経の賦活に脳内プロスタノイドEP₃受容体サブタイプが関与することが明らかになった(Yokotani et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1988; Br. J. Pharmacol. 1995; 1996)。

さらに、脳室内へのアラキドン酸投与により血中カテコールアミン(ノルアドレナリンとアドレナリンが共に)増加し、この増加反応がインドメタシン(シクロオキシゲナーゼ阻害薬)の脳室内前処置により消失したことから、中枢性副腎髄質の賦活に脳内トロンボキサンA₂が関与することが推測された(Yokotani et al., Eur. J. Pharmacol. 2000; 2005)。そこで、ラットの視床下部(交感神経-副腎髄質系の中核)にプロスタノイドTP受容体刺激薬(I-BOP)を微量投与すると血中アドレナリンが著しく増加した(Murakami et al., 2002)。

次に、ストレス関連ペプチド(コルチコトロピン放出因子(CRF)、バソプレッシン、ボンベシン等)のラット脳室内投与による血中カテコールアミン(ノルアドレナリンとアドレナリン)増加がインドメタシンの脳室内前処置により消失した(Yokotani et al., Eur. J. Pharmacol., 2001)。

これらの成績から、脳内アラキドン酸カスケード系が中枢性交感神経-副腎髄質系の賦活に大きな役割を担うことが明らかになった。

2. 研究の目的

中枢性交感神経-副腎髄質系賦活に関与する脳内アラキドン酸生成経路を解析した。炎症などにおけるプロスタノイド生成には、従来、ホスホリパーゼA₂による生体膜リン脂質からのアラキドン酸遊離が報告されている。また、ラット脳室内へのメリチン(ホスホリパーゼA₂刺激作用を有するハチ毒)の投与は血中カテコールアミン(ノルアドレナリンとアドレナリン)増加を引き起こし、この増加はメパクリン(ホスホリパーゼA₂遮断薬)およびインドメタシンの脳室内前処置により抑制された(Yokotani et al., Eur. J. Pharmacol., 2000)。従って、脳内ホスホリパーゼA₂が中枢性交感神経-副腎髄質系の賦活に関与することが推測された。しかし、CRFの脳室内投与による血中カテコールアミン

(ノルアドレナリンとアドレナリン)増加は、メパクリンによって抑制できなかった。そこで、新たなアラキドン酸生成経路を明らかにすることを計画した。他の経路としては、ホスホリパーゼCを介する経路、ホスホリパーゼDを介する経路などが考えられる。

3. 研究の方法

実験にはウレタン麻酔した雄性ラットを用いた。経時的な動脈血採取のためと持続的な生理食塩水投与のため、鼠径動脈と静脈にカニューレを留置した。脳定位固定装置に頭部を固定した後、側脳室への薬物投与用の小孔をドリルで穿孔した。微細なステンレスカニューレを用いて、脳室内に種々のストレス関連ペプチドを投与した。経時的に動脈血を採取し、血漿中のカテコールアミ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。さらに、各種遮断薬(ホスホリパーゼC遮断薬、ジアシルグリセロールリパーゼ遮断薬、モノアシルグリセロール(MAG)リパーゼ遮断薬、カンナビノイド関連試薬)の脳室内前処置のストレス関連ペプチド性血中カテコールアミン増加作用に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

CRF、バソプレッシン、ボンベシン等のストレス関連ペプチドによる血中カテコールアミン(ノルアドレナリンとアドレナリン)の増加は、メパクリン(ホスホリパーゼA₂遮断薬)では影響されず、ホスホリパーゼC遮断薬(U-73122)、ジアシルグリセロールリパーゼ遮断薬(RHC-80267)、さらにMAGリパーゼ遮断薬(MAFP, JZL184)により抑制された(Shimizu et al., Eur. J. Pharmacol., 2004; 2005; 2008)。従って、脳内アラキドン酸生成にはホスホリパーゼA₂経路ではなく、ホスホリパーゼC/ジアシルグリセロールリパーゼ/MAGリパーゼ系が関与することが明らかになった。また、この生成経路で産生されるMAGの脳室内投与により血中カテコールアミン(ノルアドレナリンとアドレナリン)の増加を引き起こし、この増加はインドメタシンの脳室内前処置により消失した(Shimizu et al., Eur. J. Pharmacol., 2008)。

さらに興味あることに、この生成経路で産生されるMAGは別名2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)であり、強力なエンドカンナビノイドである。2-AGは興奮したシナプス後膜から生成され、逆行性にシナプス前膜にあるカンナビノイドCB₁受容体に作用して神経伝達物質の遊離を抑制することが報告されてい

る。

そこで、ストレス関連ペプチドによる血中カテコールアミン（ノルアドレナリンとアドレナリン）増加への CB1 受容体遮断薬、カンナビノイド取り込み阻害薬、CB1 受容体刺激薬の脳室内前処置の影響を解析した。すべてのペプチドの脳室内投与による血中カテコールアミン（ノルアドレナリンとアドレナリン）増加は、CB 受容体刺激薬(WIN55212-2)、CB1 受容体刺激薬(ACEA)により抑制され、逆に CB1 受容体遮断薬(AM251)およびカンナビノイド取り込み阻害薬(AM404)により増強した(Shimizu et al., Eur. J. Pharmacol., 2010)。これらの成績から、アラキドン酸生成経路の生成物である MAG (=2-AG)は、アラキドン酸の前駆物質としての役割のみならず、強力なエンドカンナビノイドとして逆行性に作用し、CB1 受容体を介して興奮性の神経伝達物質の遊離を抑制することにより、中枢性交感神経-副腎髄質系の賦活を制御していることが明らかになった。

これらの成績から、ストレス関連疾患（高血圧症、消化性潰瘍、免疫能低下による発癌等）の発症の予防と治療に、CB1 受容体刺激薬、カンナビノイド取り込み阻害薬の有効性が期待できる。しかし、CB1 受容体刺激薬には大麻様の精神運動作用等の副作用が危惧されるが、カンナビノイド取り込み阻害薬は脳内の興奮性ニューロンに限局して作用することから、副作用の少ない治療薬として期待できる。

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 9 件）

(1) Shimizu T, Lu L, Yokotani K. Endogenously generated 2-AG plays an inhibitory role in bombesin- induced activation of central adrenomedullary outflow in rats. Eur. J. Pharmacol., 査読有, 2011 (in press)

(2) Shimizu T, Tanaka K, Hasegawa T, Yokotani K. Brain $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors are involved in the secretion of noradrenaline and adrenaline from adrenal medulla in rats. Eur. J. Pharmacol. 654, 査読有, 2011, 242-248.

(3) Shimizu T, Lu L, Yokotani K., Possible inhibitory roles of endogenous 2-arachidonoylglycerol during CRF-induced activation of central sympatho- adrenomedullary outflow in anesthetized rats. Eur. J. Pharmacol. 641, 査読有, 2010, 54-60.

(4) Shimizu T, Yokotani K. Acute cold exposure-induced down-regulation of CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A, in rat interscapular brown adipose tissue by sympathetically activated beta3-adrenoreceptors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 387, 査読有, 2009, 294-299.

(5) Shimizu T, Yokotani K. Effects of centrally administered prostaglandin E3 and thromboxane A3 on plasma noradrenaline and adrenaline in rats: Comparison with prostaglandin E2 and thromboxane A2. Eur. J. Pharmacol. 611, 査読有, 2009, 30-34.

(6) Shimizu T, Yokotani K. Brain cyclooxygenase and prostanoid TP receptors are involved in centrally administered epibatidine-induced secretion of noradrenaline and adrenaline from the adrenal medulla in rats. Eur. J. Pharmacol., 606, 査読有, 2009, 77-83.

(7) Sasaki T, Shimizu T, Wakiguchi H, Yokotani K. Centrally administered neuromedin U elevates plasma adrenaline by brain prostanoid TP receptor-mediated mechanisms in rats. Eur. J. Pharmacol. 592, 査読有, 2008, 81-86.

(8) Lu L, Shimizu T, Nakamura K, Yokotani K. Brain neuronal/inducible nitric oxide synthases and cyclooxygenase-1 are involved in the bombesin- induced activation of central adrenomedullary outflow in rats. Eur. J. Pharmacol. 590, 査読有, 2008, 177-184.

(9) Shimizu T, Yokotani K. Roles of the brain phospholipase C, 2-arachidonoylglycerol and arachidonic acid in the central activation of the sympatho-adrenomedullary outflow in rats (review). 自律神経、第 4 5 巻、査読有, 2008, 167-177.

〔学会発表〕（計 10 件）

(1) Shimizu T., Lu L., Yokotani K. Endogenously generated 2-arachidonoylglycerol plays an inhibitory role in corticotropin-releasing factor-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in rats. 14th International Congress of Endocrinology, 2010, Dec. 4, Kyoto (Japan).

(2) 清水孝洋, 盧連依, 横谷邦彦: 内因性に生成された 2-アラキドノイルグリセロールはコルチコトロピン放出因子による中枢性交感神経-副腎髄質系賦活に対し抑制性作用を示す. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年

3月16日、大阪.

(3) 清水孝洋, 横谷邦彦: 脳内エンドカンナビノイドはコルチコトロピン放出因子による中枢性交感神経-副腎髄質系賦活を抑制的に制御する. 第62回日本自律神経学会総会, 2009年11月5日、和歌山.

(4) 清水孝洋, 横谷邦彦: 急性寒冷暴露ラットの褐色脂肪組織において交感神経によるアドレナリン β 3受容体の活性化により CIDEA (cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A) の発現低下が惹起される. 第13回活性アミンに関するワークショップ, 2009年8月28日、津.

(5) 盧連依, 清水孝洋, 中村久美子, 横谷邦彦: 脳内の内因性NOによるCOXのS-ニトロシル化が中枢性に投与されたボンベンシンによる中枢性副腎髄質系賦活に関与する可能性について. 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月16日、横浜.

(6) 清水孝洋, 横谷邦彦: 中枢性に投与されたエビバチジンによる副腎髄質からのノルアドレナリンとアドレナリン分泌には脳内シクロオキシゲナーゼおよびプロスタノイドTP受容体に関与する. 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月16日、横浜.

(7) 清水孝洋, 横谷邦彦: バソプレシンにより惹起される中枢性副腎髄質系賦活において脳内2-アラキドノイルグリセロールは二方向性作用を示す. 第61回日本自律神経学会総会, 2008年11月6日、横浜.

(8) 岡田尚志郎, 山口奈緒子, 清水孝洋, 横谷邦彦: 脳室内投与したNMDAによる副腎髄質形賦活機構の薬理的解析. 第61回日本自律神経学会総会, 2008年11月6日、横浜.

(9) 盧連依, 清水孝洋, 中村久美子, 岡田尚志郎, 山口奈緒子, 佐々木剛, 横谷邦彦: ボンベンシンによる中枢性副腎髄質系賦活に関与する脳内NOSアイソフォームの解析. 第81回日本薬理学会年会, 2008年3月17日、横浜.

(10) 清水孝洋, 盧連依, 佐々木剛, 中村久美子, 山口奈緒子, 岡田尚志郎, 横谷邦彦: バソプレシンによる中枢性副腎髄質系賦活における脳内2-アラキドノイルグリセロールの二面性作用について. 第81回日本薬理学会年会, 2008年3月17日、横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横谷邦彦 (YOKOTANI KUNIHICO)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 30174858

(2) 研究分担者

清水孝洋 (SHIMIZU TAKAHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 00363276

田中健二郎 (TANAKA KENJIROU)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 30552260