

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591370

研究課題名（和文）視床下部室傍核の α 1アドレノセプター賦活による副腎髄質系賦活機構の解析研究課題名（英文）Role of α 1 adrenoceptor activation in the hypothalamic paraventricular nucleus on the adrenomedullary outflow in rats

研究代表者

岡田尚志郎 (OKADA SHOSHIRO)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：40203989

研究成果の概要（和文）：ストレス応答の重要な脳部位の一つである視床下部室傍核の興奮性アミノ酸 NMDA 刺激によるプロスタノイド、特にトロンボキサン A2 産生が副腎髄質からのカテコールアミン分泌に関与することを薬理的に解析した。室傍核の NMDA 刺激による室傍核のノルアドレナリン遊離および血中カテコールアミン（ノルアドレナリンおよびアドレナリン）増加が、当該部位に局所投与したトロンボキサン受容体遮断薬によって抑制された。以上の成績から、室傍核に投射するノルアドレナリン神経系および α 1アドレノセプターの副腎髄質からのカテコールアミン分泌における重要な役割が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) has been implicated in the regulation of several autonomic responses in the brain. The present study determined whether activation of α ₁-adrenoceptors is involved in the centrally administered NMDA-induced adrenomedullary catecholamine outflow, using urethane-anesthetized rats. Perfusion of the hypothalamic paraventricular nucleus with NMDA (0.3 and 1.0 mM) dose-dependently elevated both noradrenaline levels in the hypothalamic paraventricular nucleus and plasma catecholamine levels. These responses were abolished by co-administration of dizocilpine malate (MK-801, 0.1 mM), a selective non-competitive antagonist of the NMDA receptor and by co-administration of (+)-S-145 (2.5 mM), a selective competitive antagonist of the thromboxane A₂ receptor. These results suggest that activation of central α ₁-adrenoceptors is involved in the centrally administered NMDA-induced activation of adrenomedullary catecholamine outflow in rats. Furthermore, signaling cascades downstream of the α ₁-adrenoceptor in the hypothalamic paraventricular nucleus may play an important role in the process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：NMDA、ノルアドレナリン神経系、アドレノセプター、トロンボキサン、血中カテコールアミン

1. 研究開始当初の背景

(1) 外界からの攪乱要因によって引き起こされるストレス反応の異常あるいは破綻が、うつ病・不安障害・自律神経機能障害をはじめとするストレス関連疾患の発症に関与すると推測されている。ストレス情報は脳幹部ノルアドレナリン(NA)神経系を介してストレス反応の制御中枢の一つである室傍核に入力し、NA遊離亢進を引き起こすことが報告されている。従って、遊離亢進したNAが、室傍核に局在するアドレノセプター活性化を介して中枢性に副腎髄質系を賦活すると予想されるが、その詳細な機序は明らかではない。一方、我々は、麻酔下のラットで脳マイクロダイアリシス法を用い室傍核に局所投与した NMDA (グルタミン酸受容体刺激薬) が室傍核で TxA_2 を産生し、中枢性に副腎髄質系を賦活することを見いだしているが、 TxA_2 がオータコイドとして作用する脳内神経系はまだ明らかではない。最近、我々は室傍核に局所投与した NMDA が室傍核の NA 遊離および血中カテコールアミンを増加させ、これらの反応が TxA_2 受容体遮断薬の室傍核への局所前投与によって抑制されることを見いだした。興味深いことに α_1 アドレノセプター賦活により活性化するホスホリパーゼ C (PLC) が生成するジアシルグリセロール (DG) は、DG リパーゼおよびモノアシルグリセロール (MG) リパーゼの作用によってさらにアラキドン酸(AA)を産生しうる。(2) これらの知見に基づいて、以下の仮説を考案した。すなわち室傍核に存在する NMDA 受容体が賦活化されると、NA 神経終末からのノルアドレナリン遊離が亢進する。遊離亢進した NA は室傍核に局在する α_1 アドレノセプターを賦活化し、PLC-DG lipase-MG lipase 経路によりアラキドン酸から、さらにシクロオキシゲナーゼおよび TxA_2 合成酵素の作用によって TxA_2 が産生される。産生された TxA_2 はオータコイドとして NA 神経終末の TxA_2 受容体を介して作用し、副腎髄質からのアドレナリンおよびノルアドレナリン分泌に促進的に関与するという一連のシグナル伝達経路を想定した。

2. 研究の目的

本研究では、室傍核における NMDA 刺激に焦点を絞り、以下の実験を行うことによって上記仮説の妥当性を検証する。

(1) 脳マイクロダイアリシス法を用いて、麻酔下のラットで室傍核へ局所投与した NMDA の室傍核におけるノルアドレナリン遊離あるいは TxA_2 産生および血中カテコールアミンに及ぼす影響を、薬理的に解析し、NMDA 受容体刺激による中枢性副腎髄質系賦活機構に、 α_1 アドレノセプター賦活およ

びその下流にあるシグナル伝達系を介して産生される TxA_2 が促進的に関与するか否かを明らかにする。

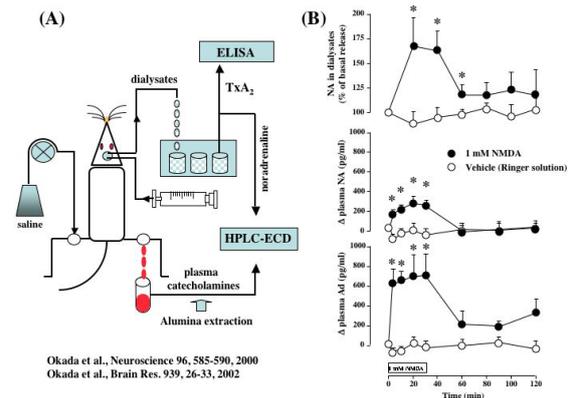
(2) 室傍核における NA 神経系、 α_1 アドレノセプターおよび TxA_2 (TxA_2 受容体) の関係を免疫組織化学法により、仮説の妥当性を形態学的に検証する。

3. 研究の方法

(1)

(A) に実験方法のアウトラインを示す。ウレタン麻酔したウイスター系雄性ラットを脳定位に固定し、室傍核にダイアリスプローブを挿入する。NMDA あるいは種々の遮断薬・阻害薬はダイアリスプローブに直接投与するか反対側の側脳室へ投与する。灌流液中の TxA_2 は ELISA で、ノルアドレナリンは HPLC-ECD で測定する。大腿動脈に留置したカニューレから経時的に採血した血中のカテコールアミンはアルミナ抽出後、HPLC-ECD で測定する。(B) に 1 mM NMDA を室傍核に投与した予備実験成績を示す。

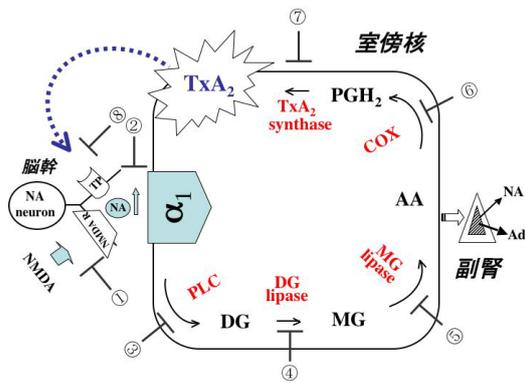
(2)



(C) に受容体遮断薬・酵素阻害薬 (①-⑧) を用いる薬理的解析のアウトラインを示す。以下の実験には 1 mM NMDA を投与した。この条件下で、① NMDA 受容体遮断薬 (MK-801 or AP-5) ② α_1 受容体遮断薬 (prazosin or heat) ③ PLC 阻害薬 (U-73122 or U-73343) ④ DG lipase 阻害薬 (RHC-80267) ⑤ MG lipase 疎外薬 (URB602) ⑥ COX 阻害薬 (インドメタシン) ⑦ TxA_2 合成酵素阻害薬 (フレグレイト) ⑧ TxA_2 受容体遮断薬 (S-145) 投与し、①-⑧の前処置が NMDA による室傍核の NA 遊離あるいは TxA_2 産生および血中カテコールアミン増加に及ぼす影響を検討し、上記仮説の妥当性を検証する。

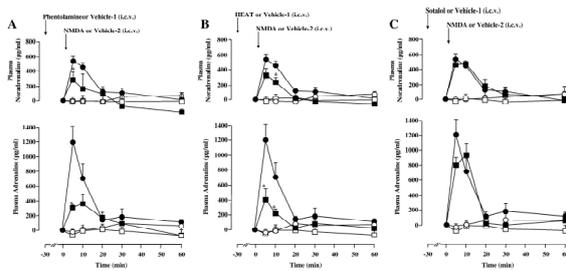
(C)

4. 研究成果

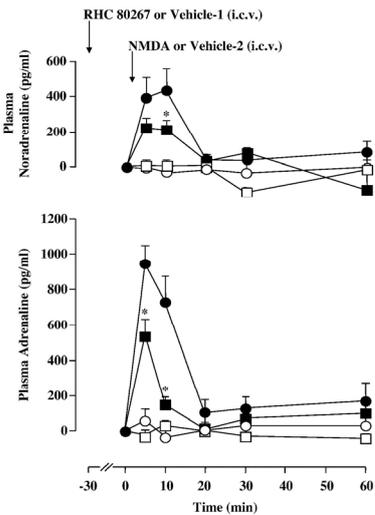


(1) ウレタン麻酔したラットの脳室内に投与した NMDA による血中カテコールアミン増加が、選択的アドレナリン α_1 受容体遮断薬 (HEAT)、PLC 阻害薬 (U-46619)、DG リパーゼ阻害薬 (RHC-80267)、MG リパーゼ阻害薬 (URB602) の脳室内前処置によっていずれも抑制ないし消失した。しかし、 β 受容体遮断薬 (sotalol) は無効であった。

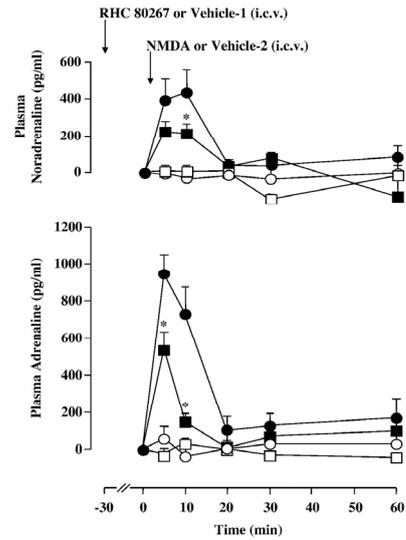
① アドレナリン作動薬の影響



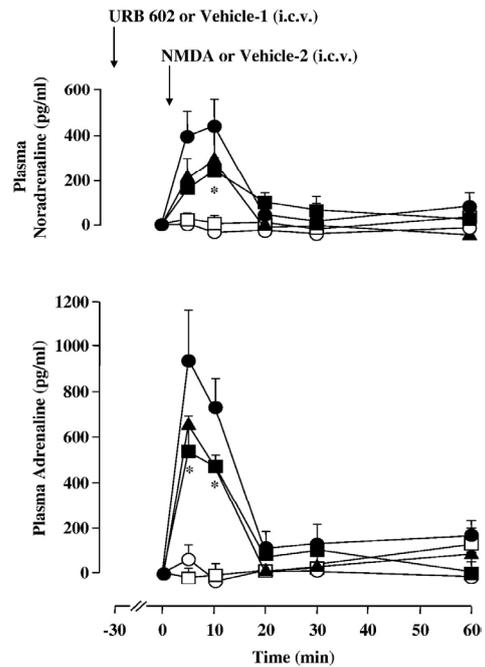
② PLC 阻害薬の影響



③ DG リパーゼ阻害薬の影響

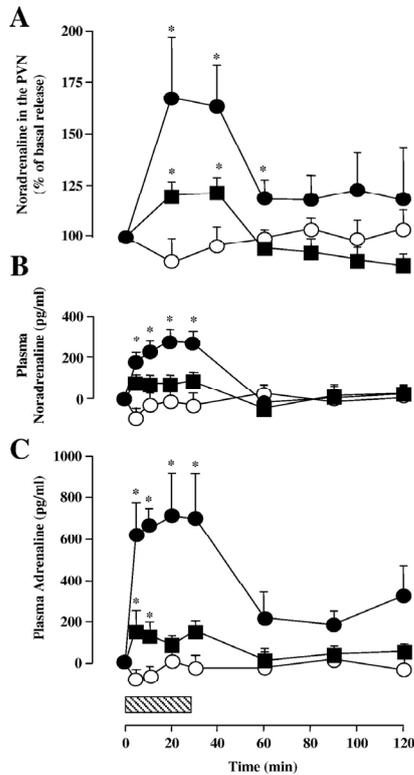


④ MG リパーゼ阻害薬の影響



(2) 視床下部室傍核にダイアリシスプローブ介して投与した 1 mM NMDA による室傍核のノルアドレナリン (NA) 遊離増加

および血中カテコールアミン(ノルアドレナリンおよびアドレナリン)増加がトロポンキサンA2受容体遮断薬(s-145)によって消失した。



[2] α アドレノセプター刺激薬フェニレフリン (0.3, 1 mM) あるいは PLC 刺激薬 m3M3FBS (0.1 mM) の室傍核への直接投与は、室傍核ノルアドレナリン (NA) 遊離および血中カテコールアミンのいずれも増加させたが、0.1 mM m3M3FBS (m3M3FBS の不活性体) 投与は影響しなかった (投稿準備中)。(2) さらに拘束ストレス負荷ラットの形態学的解析から、脊髄中間外側核 (IML) に注入した逆行性色素 (Fluoro Gold) で標識される PVN ニューロンにおいて、(a) 拘束ストレスが COX1、COX2、iNOS の発現を増加させること、(b) COX1、COX2、iNOS 阻害薬の腹腔内投与が拘束ストレスによる Fos 発現を減弱させることを証明した (Neuroscience, 170, 773-781, 2010)。(2) 拘束ストレス負荷したラットの血中カテコールアミン増加が、(a) PPAR gamma agonist (rosiglitazone, PGJ2) の腹腔内投与により抑制され、逆に、PPAR gamma antagonist (GW9662) の腹腔内投与によってさらに増強されること、(b) 拘束ストレスが経時的に PPAR gamma の核内移行を引き起こすことを報告した (Neuro 2010, 神戸)。麻酔ラットおよび覚醒ラットの実験から得られた成績は、うつ病・不安障害・自律神経機能障害など

トレスに起因する様々な病態の発症機序の解明に新たな視点を提供するという点で意義があり、新たな治療薬開発のための標的を考案する上で重要性が高いと考えられる。

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, Ogawa S, Okada S. Cyclooxygenase and nitric oxide synthase in the presympathetic neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus are involved in restraint stress-induced sympathetic activation in rats. *Neuroscience* 170, 773-881. 2010. 査読あり
- ② Okada S, Yamaguchi N. Alpha1-adrenoceptor activation is involved in the central N-methyl-D-aspartate-induced adrenomedullary outflow in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 640, 55-62. 2010. 査読あり
- ③ Yamaguchi N, Okada S. Cyclooxygenase-1 and -2 in spinally projecting neurons are involved in CRF-induced sympathetic activation. *Auton. Neurosci.*, 151, 82-89. 2009. 査読あり
- ④ 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.*, 148, 83-89. 2009. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① 岡田尚志郎, 山口奈緒子, 拘束ストレス負荷による血中カテコラミン増加の基盤となる脳内機構の薬理的解析, 第63回日本自律神経学会, 2010年10月, 横浜市
- ② 岡田尚志郎, 山口奈緒子, 拘束ストレス負荷による血中カテコラミン増加における PPAR gamma の役割, Neuro 2010 (第33回日本神経科学学会), 2010年9月, 神戸市
- ③ 岡田尚志郎, 山口奈緒子, 脳室内投与した CRF は脳内 α 1 アドレナリン作動性受容体の賦活を介して交感神経-副腎髄質系を賦活する, 第83回日本薬理学会年会, 2010年3月, 大阪
- ④ 岡田尚志郎, 山口奈緒子, 脳室内投与した CRF による交感神経-副腎髄質系賦活機構における脳内アドレナリン作動性受容体の役割, 第62回日本自律神経学会, 2009年10月, 和歌山
- ⑤ 岡田尚志郎, 山口奈緒子, 拘束ストレス負荷による血中カテコラミン増加における脳内炎症関連メディエーターの役割, 第32回日本神経科学学会, 2009年9月, 名古屋
- ⑥ 岡田尚志郎, 山口奈緒子, NMDA による中枢性副腎髄質系賦活における PLC の役

割、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月、横浜市

⑦ ○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 による副腎髄質系賦活機構の薬理的解析、第 61 回日本自律神経学会、2008 年 1 月、横浜市

〔図書〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 尚志郎 (OKDA SHOSHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：40203989