

機関番号：12102  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790628  
 研究課題名（和文） 拘束ストレスにより誘導される脳内因子の解析-交感神経系亢進持続の観点から-  
 研究課題名（英文） Role of COX and NOS in the presympathetic PVN neurons in restraint stress-induced sympathetic activation  
 研究代表者  
 山口 奈緒子 (YAMAGUCHI NAOKO)  
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員  
 研究者番号：50380324

研究成果の概要（和文）：交感神経系は中枢ストレス応答に重要な役割を担っている。本研究では、拘束ストレス負荷ラットを用いて、ストレス下での交感神経系活性化における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）の役割について検討した。その結果、ストレス応答の中枢である視床下部室傍核の下行性交感神経線維細胞体に存在する COX-1、COX-2 および誘導型 NOS が、ストレスによる交感神経系活性化に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Stress is one of the important factors to activate the sympathetic nervous system. In this study, I investigated whether brain COX and NOS can mediate restraint stress-induced sympathetic activation in rats. The present results suggest that COX-1, COX-2 and inducible NOS, but not neuronal NOS, in the presympathetic PVN neurons mediate acute restraint stress-induced sympathetic activation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：ストレス、シクロオキシゲナーゼ、一酸化窒素合成酵素、CRF、視床下部室傍核、交感神経系

## 1. 研究開始当初の背景

交感神経系は中枢ストレス応答の出力の1つとして重要な役割を担っている。ストレス時には、視床下部室傍核や青斑核などのストレス応答中枢を介して交感神経系が活性化され、心血管系やエネルギー代謝など全身性のストレス反応をもたらす。この持続的な活性化がうつ病や不安障害などのストレス

関連疾患を誘起する一因になると推測されている。

ストレス関連ペプチドであるコルチコトロピン放出因子（CRF）は、視床下部-下垂体-副腎皮質系（HPA系）の活性化のみならず、交感神経系の活動を亢進させる。私達はこれまでに、CRFによる中枢性交感神経系活性化機構について血中カテコールアミンお

よび交感神経節、副腎髄質の神経活動を指標に解析を行い、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を報告してきた。さらに最近、逆行性トレーサーにより標識した下行性交感神経線維細胞体のうち、視床下部室傍核と青斑核において、CRF が COX および NOS の各アイソザイムの発現を誘導すること、さらに、この現象が CRF 投与後の数時間にわたって持続するという興味深い知見を得た。持続的な CRF 反応性は、うつ病や不安障害などのストレス関連疾患を誘起する一因であると推測されており、私達の得た知見は、1) CRF を介した中枢性ストレス応答システムにおいて、COX および NOS がメディエーターとして働くこと、(2)両酵素による交感神経系亢進の持続がストレス応答を調節する可能性を示唆する。

COX および NOS がストレス時に脳内メディエーターとしてストレス応答に関与することは既に報告されているが、これらの先行研究では、ストレス応答における COX/NOS の役割が HPA 系や酸化ダメージとの関連でのみ解析されており、交感神経系機能の観点からの研究報告は見あたらない。これまでに拘束ストレス負荷ラットを用いて行った予備実験において、腹腔内投与した COX-2 阻害薬が、ストレスによって誘導された Fos 発現を抑制するという結果を得ている。COX および NOS によるストレス応答の調節機序を交感神経系亢進持続の観点から明らかにするために、さらに交感神経系を支配するニューロンにおいて詳細な解析が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、視床下部室傍核 (PVN) の下行性交感神経線維細胞体における COX および NOS 発現が、ストレスによる交感神経系亢進に関与するか否かを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 逆行性トレーサー

Wistar 系雄性ラット (体重約 250 g) を、ペントバルビタール (30 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・中間外側細胞柱に、4%フルオロ・ゴールド (FG) を各 50 nl 注入した。

### (2) COX および NOS 阻害薬の投与

トレーサー注入の 1 4 日後、拘束ストレス負荷開始の 30 分前に、COX-1 阻害薬 (SC-560)、COX-2 阻害薬 (NS-398)、iNOS

阻害薬 (*S*-methylisothiourea) もしくは nNOS 阻害薬 (7-nitroindazol) を腹腔内投与 (0.1 ml/kg, bw) した。

### (3) 拘束ストレス

酵素阻害薬投与の 30 分後、ラットに拘束ストレスを負荷した。予備実験において、30 分、1 時間、3 時間および 6 時間の拘束ストレスを負荷したところ、1 時間の拘束ストレスにより Fos 発現が最も増加したことから、以後の実験では 1 時間の拘束ストレス負荷を行った。

拘束ストレス (RS) 群は拘束ストレス終了直後に、一方コントロール (control) 群は home cage から出した直後に、ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下で組織採取された。まず、心臓穿刺により血液を採取した。その後、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。

### (4) 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。

### (5) 免疫組織染色

前頭断凍結切片を作製した後、Fos、COX-1、COX-2、誘導型 NOS (iNOS)、もしくは神経型 NOS (nNOS) に対する抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行った。Fos に対しては FITC 標識二次抗体を、COX および NOS アイソザイムに対しては Cy3 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 FG 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) 拘束ストレスによる血中カテコールアミン増加に及ぼす COX 阻害薬および NOS 阻害薬の影響

交感神経活動の指標の 1 つとして血中カテコールアミンレベルを測定した。拘束ストレスにより、血中ノルアドレナリンおよびアドレナリンは有意に増加した (Figs. 1, 2)。

拘束ストレスによる血中ノルアドレナリン増加は、すべての酵素阻害薬によって抑制された (Figs. 1, 2)。一方、ストレス負荷による血中アドレナリン増加は、COX-1 阻害薬、COX-2 阻害薬および iNOS 阻害薬によって抑制されたが、nNOS 阻害薬の影響は受けな

かった (Figs. 1, 2)。

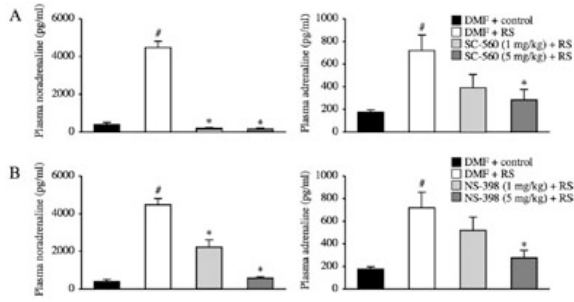


Fig. 1. 拘束ストレスによるカテコールアミン増加に及ぼす COX 阻害薬の影響. 左、ノルアドレナリン; 右、アドレナリン.

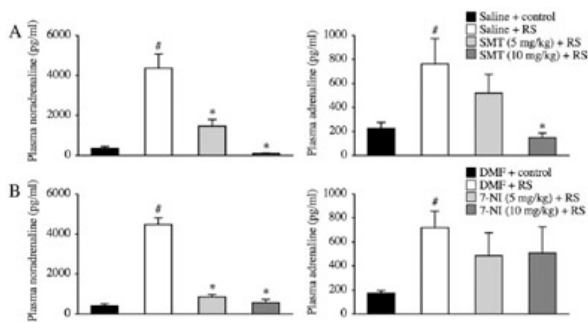


Fig. 2. 拘束ストレスによるカテコールアミン増加に及ぼす NOS 阻害薬の影響. 左、ノルアドレナリン; 右、アドレナリン.

(2) 拘束ストレスによる Fos 発現増加に及ぼす COX 阻害薬の影響

PVN においては、先行研究と同様に、3つの垂核の細胞群が逆行性に標識された。FG 標識細胞は、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認められた。以後の解析は、上記の3つの垂核について行った。

拘束ストレスは、PVN の PaDC、PaV および PaPo において、FG 標識細胞の Fos 発現を有意に増加させた (Fig. 3)。COX-1 阻害薬 (Fig. 3A) および COX-2 阻害薬 (Fig. 3B) はそれぞれ、拘束ストレスによる Fos 発現増加を有意に抑制した。

以上の結果から、拘束ストレスによる PVN・下行性交感神経線維細胞体の活性化には、COX-1 および COX-2 が関与している可能性が示された。

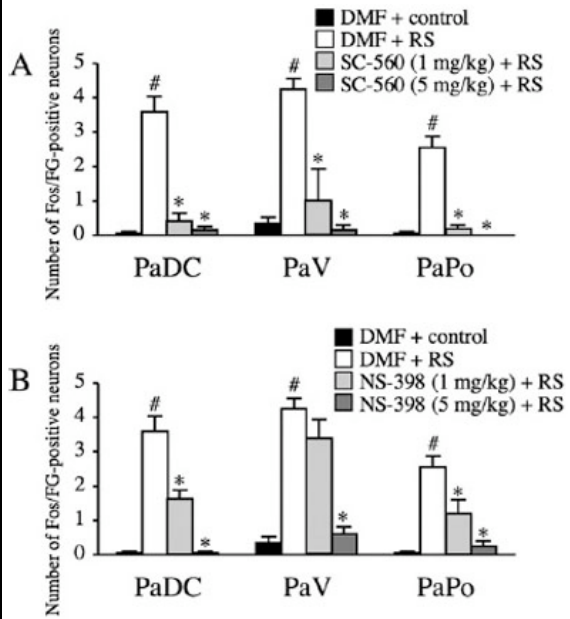


Fig. 3. 拘束ストレスによる Fos 発現増加に及ぼす COX 阻害薬の影響

(3) 拘束ストレスによる Fos 発現増加に及ぼす NOS 阻害薬の影響

拘束ストレスによって増加した、PVN・FG 標識細胞における Fos 発現は、iNOS 阻害薬によって有意に減少した (Fig. 4A)。一方、nNOS 阻害薬は、ストレスによる Fos 発現増加に影響しなかった (Fig. 4B)。

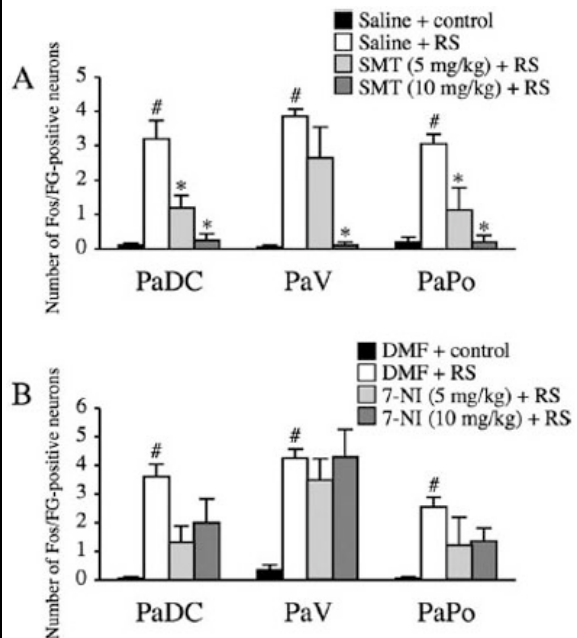


Fig. 4. 拘束ストレスによる Fos 発現増加に及ぼす NOS 阻害薬の影響

以上の結果から、拘束ストレスによる PVN・下行性交感神経線維細胞体の活性化に

は、iNOS が関与している可能性が示された。

(4) PVN・下行性交感神経線維細胞体における COX および NOS 発現に及ぼす拘束ストレスの影響

さらに本研究では、拘束ストレスによって、PVN・FG 標識細胞の COX および NOS 発現はどのように変化するかについて解析を行った。

Control 群では、COX-1、COX-2 もしくは iNOS を共発現した PVN・FG 標識細胞が少数存在した。一方、nNOS を共発現した PVN・FG 標識細胞は多く認められた。

拘束ストレスによって、COX-1、COX-2 もしくは iNOS を共発現した PVN・FG 標識細胞数は有意に増加した (Fig. 5)。しかし、拘束ストレスは nNOS を共発現した PVN・FG 標識細胞数には影響を与えなかった (Fig. 5)。

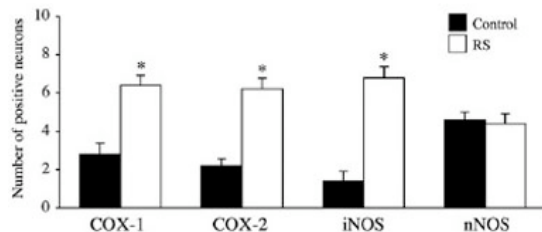


Fig. 5. PVN・FG 標識細胞における COX および NOS 発現に及ぼす拘束ストレスの影響

(5) まとめ

本研究において、血中カテコールアミンレベルおよび PVN・下行性交感神経線維細胞体の Fos 発現を交感神経系活性化の指標として、COX および NOS アイソザイムの阻害薬の影響を検討することにより、COX-1、COX-2 および iNOS が、拘束ストレスによる交感神経系の活性化に関与していること、またこれらの活性化に nNOS がほとんど関与していないことが明らかとなった。さらに、PVN・FG 標識細胞における COX および NOS 発現の解析の結果から、PVN・下行性交感神経線維細胞体において、拘束ストレスによって COX-1、COX-2 および iNOS の発現が増加することが示された。

nNOS および COX-2 に関しては、これまでにストレスによる HPA 系活性化や酸化ストレスとの側面から様々な報告がされているが、交感神経系活性化の観点からの研究はほとんどない。本研究によって、ストレスによる交感神経系活性化には COX-1、COX-2 および iNOS が関与することが初めて示された。加えて、HPA 系ストレス反応には重要である nNOS は交感神経系ストレス反応に

ほとんど関与しないことが示唆された。

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, 773-781, 2010. 査読有
- ② Okada S, Yamaguchi N,  $\alpha$ 1-Adrenoceptor activation is involved in the central N-methyl-D-aspartate-induced adrenomedullary outflow in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 640, 55-62, 2010. 査読有
- 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. 査読有
- 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. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Yamaguchi N, Tsuda MC, Sagoshi S, Nishimori K, Sakamoto T, Ogawa S, Role of oxytocin receptor in the regulation of social recognition in mice, 第 33 回日本神経科学大会, 2010 年 9 月, 神戸市
- ② Okada S, Yamaguchi N, 脳室内投与 CRF による交感神経-副腎髄質系賦活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総会, 2009 年 11 月, 和歌山市
- ③ Yamaguchi N, Okada S, Brain cyclooxygenase and nitric oxide synthase are involved in restraint stress-induced neuronal activation of spinally projecting neurons in rats, 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月, 名古屋市
- ④ Okada S, Yamaguchi N, Role of brain inflammatory mediators in the restraint stress-induced elevation of

plasma catecholamines, 第32回日本神経科学大会、2009年9月,名古屋市

[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

山口 奈緒子 (YAMAGUCHI NAOKO)  
筑波大学・大学院・人間総合科学研究科・  
研究員  
研究者番号：50380324

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者