

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790745

研究課題名（和文） ストレス反応における脳内プロスタノイド産生のメカニズム

研究課題名（英文） Brain cyclooxygenase-mediated mechanisms in stress response

研究代表者

田中 健二郎（TANAKA KENJIRO）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：30552260

研究成果の概要（和文）：ストレス反応の主要経路のひとつである交感神経-副腎髄質系の興奮に、プロスタノイド産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼを発現するラット視床下部室傍核の脊髄投射性（前-交感神経性）ニューロンの活性化が関わっていることを明らかにした。またこの交感神経-副腎髄質系の中枢性賦活機構に脳内シクロオキシゲナーゼのニトロシル化による活性増強が関わっている可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that pre-sympathetic neurons containing cyclooxygenase, a rate-limiting enzyme for the synthesis of prostanoids, in the hypothalamic paraventricular nucleus were involved in the activation of the sympatho-adrenomedullary outflow in rats. The present study also showed the possibility that the S-nitrosylation of brain cyclooxygenase is involved in the central activation of the sympatho-adrenomedullary outflow.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,000,000	300,000	1,300,000

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：ストレス科学

1. 研究開始当初の背景

交感神経-副腎髄質（SA）系は主要なストレス反応経路のひとつであり、この系の過剰な興奮は高血圧症、胃潰瘍、免疫機能低下による発癌などのストレスに起因する症状・疾患を引き起こす。申請者らはこれまで、SA系の賦活に脳内プロスタノイドが関与することを明らかにしてきた。またストレス関連ペプチドであるボンベシンのラット脳室内投与によるSA系の活性化が一酸化窒素合成酵素（NOS）阻害薬の脳室内前処置で抑制されたことなどから、SA系賦活中枢における脳内プロスタノイド産生に一酸化窒素（NO）が関わっている可能性が強まった。

Tianら（2008）は、活性化された神経細胞内においてCOX-NOS複合体が存在すること、

またNOがCOXのシステイン残基をニトロシル化することを報告している。一方、我々の研究室においても、ストレス関連ペプチドの脳室内投与に伴うSA系賦活への脳内NOS-COX系の関与を薬理的に明らかにしてきた。そして最近、SA系の制御中枢である視床下部室傍核（PVN）の脊髄投射性ニューロン（すなわち胸髄の交感神経節前ニューロンを介して腹腔神経節および副腎髄質を支配する前-交感神経性ニューロン）を逆行性トレーサーにより標識する実験系を確立した。同系を用いてこれまでに、脊髄投射性PVNニューロンの一部がカルチコトロピン放出因子の脳室内投与により活性化し、同時にNOSを発現していることを報告している。SA系の中枢性賦活機構におけるプロスタノイド産生のメカ

リズムを明らかにするために、PVN における COX および NOS に関するさらなる組織学的解析が必要である。

2. 研究の目的

ストレスによる SA 系の興奮には脳内プロスタノイド類が関わっているが、これらがどこでどのように産生され作用しているかはまだよく分かっていない。そこで本研究ではストレスに伴う脳内プロスタノイド産生機序の一端を明らかにするために、以下の二点について解析する。

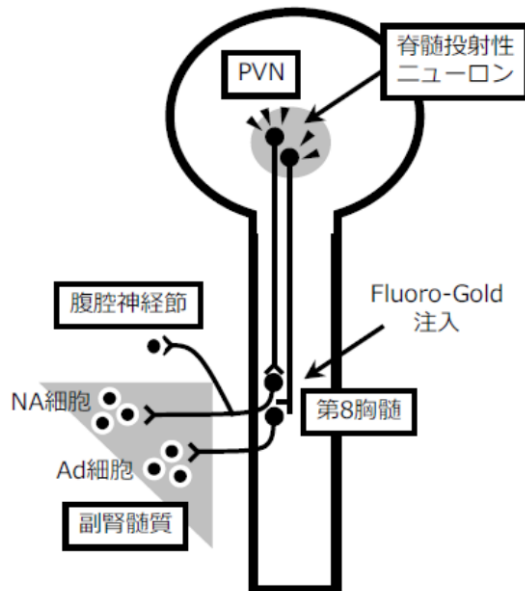
(1) ストレス関連分子の脳室内投与により活性化した脊髄投射性 PVN ニューロンにおいて、プロスタノイドの合成に関わる分子は発現しているか。

(2) ストレス関連分子の脳室内投与により活性化した脊髄投射性 PVN ニューロンにおいて、NO による COX 活性化は認められるか。

3. 研究の方法

(1) 脊髄投射性 PVN ニューロンの標識

ラットを用いて、腹腔神経節および副腎髄質を支配する交感神経節前ニューロンに下降性に投射する前-交感神経性の脊髄投射性ニューロンを PVN において標識するために、第 8 胸髄中間外側核に単シナプス逆行性トレーサー・Fluoro-Gold を注入した (図 1)。



【図 1】 第 8 胸髄に注入された Fluoro-Gold はシナプス前終末より取り込まれ、投射元の細胞体に達し蛍光を発する。Ad 細胞, アドレナリン分泌細胞; NA 細胞, ノルアドレナリン分泌細胞。

(2) ボンベシン脳室内投与および血中カテコールアミン測定

SA 系の興奮を誘発するためにストレス関連ペプチド・ボンベシンを脳室内投与した。SA 系の反応の指標として、血中アドレナリンおよびノルアドレナリン濃度の変化を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

(3) ボンベシン脳室内投与により活性化した脊髄投射性 PVN ニューロンにおける COX の検出

ボンベシン脳室内投与 1 時間後に脳を摘出し、Fluoro-Gold で標識された脊髄投射性 PVN ニューロンにおいてニューロン活性化のマーカーである Fos タンパクと COX-1 または COX-2 を免疫組織学的に二重蛍光染色した。

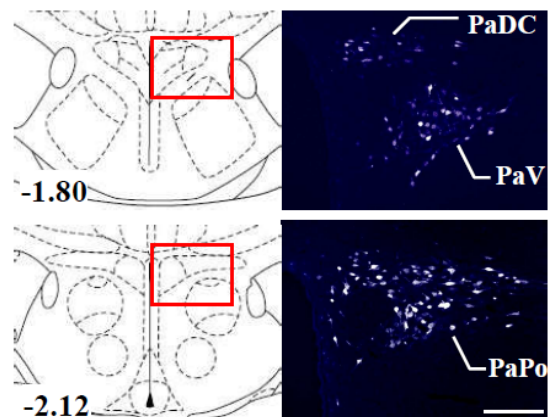
(4) 脊髄投射性 PVN ニューロンにおける COX のニトロシル化についての検討

ボンベシン脳室内投与 1 時間後、脊髄投射性 PVN ニューロンにおいて COX-1 とニトロシル化システインを免疫組織学的に二重蛍光染色した。

4. 研究成果

(1) PVN における前-交感神経性ニューロンの分布

副腎髄質を支配する脊髄の交感神経節前ニューロンに下降性に投射する前-交感神経性の脊髄投射性 PVN ニューロンを単シナプス逆行性トレーサー・Fluoro-Gold により標識した。Fluoro-Gold で標識された脊髄投射性ニューロンは PVN の dorsal cap, ventral part および posterior part に分布していた (図 2)。

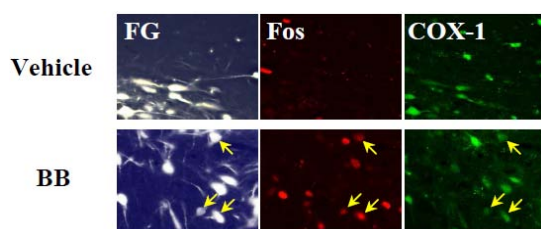


【図 2】 ラットアトラスに基づく PVN の図解 (左) と、左図枠内の部位において Fluoro-Gold で標識された脊髄投射性ニューロンの分布を示す組織像 (右)。PaDC、PaV、PaPo はそれぞれ PVN の dorsal cap, ventral part, posterior part を示す。左下の数字は bregma からの距離 (mm) を示す。Bar=200 μ m。

(Tanaka et al., Auton Neurosci 269, 63-69, 2012)

(2) 中枢性 SA 系賦活機構における PVN の COX の関与

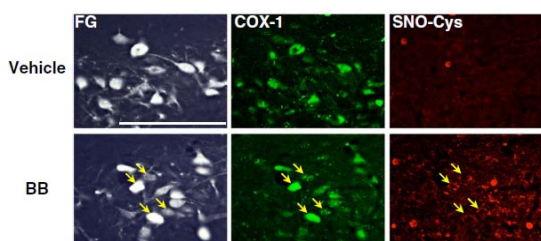
ボンベシン脳室内投与により活性化した脊髄投射性 PVN ニューロンにおいて、COX-1 および COX-2 に対する免疫組織染色を行った。Fluoro-Gold で標識された脊髄投射性 PVN ニューロンにおいて、ニューロン活性化のマーカーである Fos タンパクと COX-1 または COX-2 の発現を観察した。Fluoro-Gold で標識された脊髄投射性 PVN ニューロンにおける COX-1 および COX-2 の発現レベルは、ボンベシンによる影響を受けなかった。しかしながら、ボンベシンは PVN ニューロンにおける Fos の発現を増加させ、Fluoro-Gold/Fos/COX-1 および Fluoro-Gold/Fos/COX-2 の陽性細胞数を有意に増加させた (図 3)。



【図 3】 PVN の dorsal cap における Fluoro-Gold (左)、Fos (中)、COX-1 (左)。矢印は Fluoro-Gold/Fos/COX-1 陽性細胞を指している。コントロール (生理食塩水投与) 群 (上段) と比べてボンベシン投与群 (下段) では Fluoro-Gold/Fos/COX-1 陽性細胞数が顕著に増加している。BB, bombesin. (Tanaka et al., Auton Neurosci 269, 63-69, 2012)

(3) SA 系中枢性賦活機構における PVN の COX ニトロシル化

ボンベシン脳室内投与後、脊髄投射性 PVN ニューロンにおける COX-1 およびニトロシル化システインの発現を免疫組織学的に解析した。ボンベシンは PVN ニューロンにおけるニトロシル化システインの発現を増加させ、Fluoro-Gold/COX-1/ニトロシル化システインの陽性細胞数を増加させた (図 4)。



【図 4】 PVN の dorsal cap における

Fluoro-Gold (左)、COX-1 (中)、ニトロシル化システイン (左)。矢印は Fluoro-Gold/COX-1/ニトロシル化システイン陽性細胞を指している。コントロール (生理食塩水投与) 群 (上段) と比べてボンベシン投与群 (下段) では Fluoro-Gold/COX-1/ニトロシル化システイン陽性細胞数が顕著に増加している。BB, bombesin; SNO-Cys, S-nitroso-cysteine. Bar=100 μm. (Tanaka et al., Eur J Pharmacol 679, 40-50, 2012)

以上の結果から、ボンベシン脳室内投与が PVN の COX を介した中枢性 SA 系賦活機構を活性化させること、そしてこの活性化に COX のニトロシル化が関わっている可能性が示唆された。

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 Shimizu T, Tanaka K, Yokotani K. Stimulatory and inhibitory roles of brain 2-arachidonoylglycerol in bombesin-induced central activation of adrenomedullary outflow in rats. J Pharmacol Sci 121, 157-171, 2013. 査読有, DOI: 10.1254/jphs.12208FP
- ② Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Yokotani K. Brain phospholipase C, diacylglycerol lipase and monoacylglycerol lipase are involved in (±)-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in rats. Eur J Pharmacol 691, 93-102, 2012. 査読有, DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.017
- ③ Tanaka K, Shimizu T, Lu L, Nakamura K, Yokotani K. Centrally administered bombesin activates COX-containing spinally projecting neurons of the PVN in anesthetized rats. Auton Neurosci 269, 63-69, 2012. 査読有, DOI: 10.1016/j.autneu.2012.03.006
- ④ Tanaka K, Shimizu T, Lu L, Yokotani K. Possible involvement of S-nitrosylation of brain cyclooxygenase-1 in bombesin-induced central activation of adrenomedullary outflow in rats. Eur J Pharmacol 679, 40-50, 2012. 査読有, DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.01.005

[学会発表] (計 9 件)

- ① 田中健二郎ら, Centrally administered

bombesin induces S-nitrosylation of cyclooxygenase-1 in the spinally projecting neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in rats. 第 86 回 日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 23 日, 福岡国際会議場 (福岡)

② 田中健二郎ら, S-nitrosylation of cyclooxygenase in the hypothalamic paraventricular nucleus spinally projecting neurons is involved in bombesin-induced activation of central adrenomedullary outflow in rats. 第 85 回 日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 14 日, 京都国際会館 (京都)

③ 田中健二郎ら, Bombesin-induced activation of presympathetic and cyclooxygenase-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. 第 34 回 日本神経科学大会, 2011 年 9 月 15 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中健二郎 (TANAKA KENJIRO)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号: 30552260