

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390057

研究課題名(和文) ストレス防衛反応を担う神経伝達物質

研究課題名(英文) Neurotransmitters in the defense response

研究代表者

桑木 共之 (KUWAKI, Tomoyuki)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80205260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)： ストレス防衛反応に重要な役割を果たしている視床下部オレキシン含有神経細胞内に共存するオレキシン以外の神経伝達(修飾)候補物質が防衛反応に果たす役割を検討した。神経伝達阻害剤投与による薬理的検討ならびにオレキシン関連遺伝子改変(オレキシン欠損、オレキシン神経破壊、オレキシン神経細胞特異的小胞体グルタミン酸輸送体-2欠損)マウスを用いた実験から、オレキシン神経細胞内のグルタミン酸は覚醒や体温の維持には無関係であるものの、ストレス時の体温上昇の特に初期反応に重要であることが明らかになった。また、調べた限り、ストレスの種類によらず、全ての発熱反応に重要であると結論された。

研究成果の概要(英文)： We examined possible roles of neurotransmitter (modulator) candidates contained in the hypothalamic orexin neurons during the defense response against stressors. We performed pharmacological experiment using blockers for the putative cotransmitters and physiological experiment using genetically engineered model mice (orexin knockout mice, orexin neuron-ablated mice, orexin neuron-specific vesicular glutamate transporter-2 knockout mice). We found that glutamate in the orexin neurons play a pivotal role in stress-induced hyperthermia, especially in its early phase, although glutamate was not involved in the basal control of the vigilance state and body temperature. Importance of glutamate in the stress-induced hyperthermia was evident in all the type of stressors so far tested.

研究分野：環境生理学、神経生理学

キーワード：防衛反応、オレキシン、小胞体グルタミン酸輸送体-2、遺伝子改変マウス、体温調節、ストレス、発熱物質、低温環境

1. 研究開始当初の背景

生体が危険などのストレスにさらされた時の闘争・逃走反応を実現可能にする自律神経反応(循環・呼吸・体温の上昇によるエネルギー供給増加や神経伝達・筋収縮効率の上昇など:防衛反応)には視床下部が不可欠の役割を果たしている。私たちは、視床下部背内側核および脳弓周囲領域に存在するオレキシン含有ニューロンが防衛反応表出の遠心機構に参与しているのではないかという仮説を立て、これまでの研究によって肯定的結論を得た。その過程で、オレキシンのみならず、オレキシンニューロンに含まれるオレキシン以外の神経伝達(修飾)物質も防衛反応に重要な役割を担っている可能性が示唆された。しかしながら、オレキシンニューロンに共存するオレキシン以外の神経伝達(修飾)候補物質(グルタミン酸、ダイノルフィン、ガラニン、一酸化窒素、等)の内のどれが防衛反応に重要であるのかは未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オレキシンニューロンに共存するオレキシン以外の神経伝達(修飾)候補物質が防衛反応に果たす役割を検討することであった。

3. 研究の方法

(1) 脳室内投与用カニューレと心拍数・体温測定用テレメーターとの埋め込み手術を予め施しておいたマウスを用い、脳室内に各種の神経伝達阻害物質を前投与した後でストレスを与え、上述の候補物質それぞれの役割を検討する。

(2) オレキシン含有ニューロンでのみグルタミン酸の神経伝達物質としての機能を喪失させたマウスを作成する。オレキシン含有ニューロンの多くは vesicular glutamate transporter-2 (vGLUT2) を発現している。vGLUT2 遺伝子に lox-P 配列を挿入したマウス (Tong, et al. Cell Metab 5: 383-393, 2007) とオレキシンプロモーターの制御下に Cre 遺伝子を発現するようにしたマウス (Matsuki, et al. Proc Natl Acad Sci USA 106: 4459-4464, 2009) とを掛け合わせることで、オレキシンニューロン特異的 vGLUT2 欠損マウスを作成する。目的のマウスができたことの確認は、遺伝子型を尻尾の biopsy サンプルを用いた PCR 解析することによって行う。オレキシンニューロン特異的 vGLUT2 欠損の確認には、抗 vGLUT2 抗体と抗オレキシン抗体を用いた免疫 2 重染色を行う。

(3) オレキシンニューロン特異的 vGLUT2 欠損マウス、オレキシン欠損マウス、オレキシンニューロン特異的破壊マウスの 3 種のマウスを用い、各種のストレスを与えた時の防衛反応出力を測定し、対照野生型マウスと比較する。

4. 研究成果

(1) 共存伝達物質候補の役割に関する薬理学的研究

麻酔して人工呼吸した野生型マウスの脳室内に神経伝達物質阻害剤[オレキシン 1 受容体阻害剤の SB334867、オレキシン 2 受容体阻害剤の OX2 29、NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤の AP5、AMPA 型グルタミン酸受容体阻害剤の CNQX、一酸化窒素合成酵素阻害剤の L-NAME、オピオイド(ダイノルフィン)受容体阻害剤の Nor Binaltorphimine Dihydrochloride、ガラニン受容体阻害剤の galanin(1-13)-Bradykinin(2-9)] またはそれらの溶媒を前投与した後に脳内発熱物質である prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) を投与し、その後の褐色脂肪組織温度、直腸温、頸筋筋電図(震えの指標)の変化を観察した。その結果、グルタミン酸阻害剤を前投与したときのみ、体温上昇と震えが抑制された(図 1)。すなわち、防衛反応の成分の内の発熱反応にはグルタミン酸が重要であることが明らかになった。

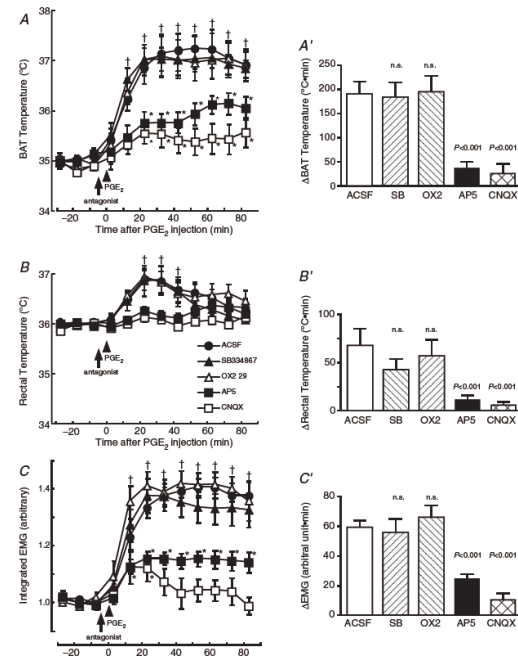


図 1. グルタミン酸受容体阻害剤による発熱・震え反応の抑制

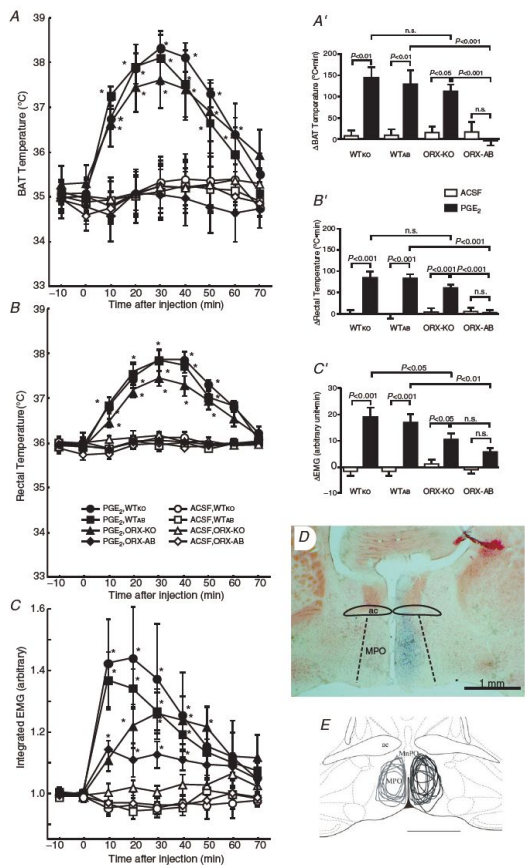
(2) オレキシンニューロン特異的 vGLUT2 欠損マウスを作成

それぞれの作成者からの譲渡により得たマウス(vGLUT2-loxP+/-と ORX-CRE+)の掛け合わせを 3 世代かけて行い、目的のマウス(vGLUT2-loxP+/+;ORX-CRE+ とその対照の vGLUT2-loxP+/+;ORX-CRE-)を得た。遺伝子型の確認は問題なく終了したが、組織学的確認には手間取っている。すなわち、抗 vGLUT2 抗体は神経終末を染色するものの、細胞体は殆ど染まらなかった。軸索輸送阻害剤のコルヒチンを前投与しておいても同様であった。In situ hybridization によって vGLUT2 の mRNA の定量を行う必要があると考えている。

(3) オレキシン関連遺伝子改変マウスを用いたストレス誘発体温上昇反応に関する研究

以前の研究結果から、保定ストレス時の体温上昇はオレキシン欠損マウス(KO)では正常だが、オレキシンニューロン特異的破壊マウス(AB)では欠落していることが明らかになっている(Zhang, et al. J Physiol 588: 4117-4129, 2010)。今回は、ストレスの種類によって関与する神経伝達物質が異なる可能性を検討するために、異なる種類のストレスを与えたときの体温上昇反応を比較検討した。

体温調節中枢である視索前野に PGE<sub>2</sub> を直接微量投与した場合の発熱反応は、保定ストレスと同様に KO マウスでは正常であったが、AB マウスで減弱していた(図 2)。なお、震え



反応は KO マウスでも減弱していた。  
 図 2. 内側視索前野刺激による体温上昇の比較

前述の視索前野刺激は麻酔下の実験しかできないので、麻酔の影響を除去するために PGE<sub>2</sub> を無麻酔自由行動下のマウス側脳室内に投与した。結果は同様であり、体温上昇は KO マウスで正常であったが AB マウスで減弱していた(図 3)。

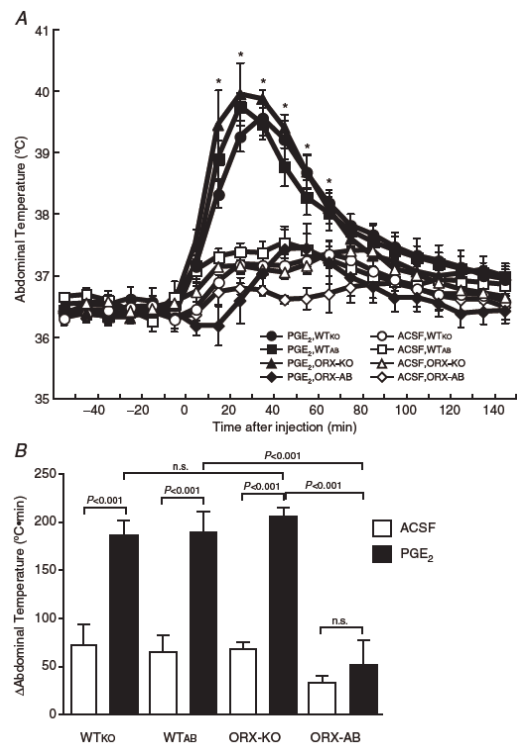


図 3. PGE<sub>2</sub> 脳室内投与による体温上昇の比較

低温(4°C)暴露ストレスにおいて、AB マウスは体温を維持することができなかった(図 4)。なお、行動性体温調節には差がなかった。また、高温暴露ストレスによる体温変化は AB マウスでも正常であった。

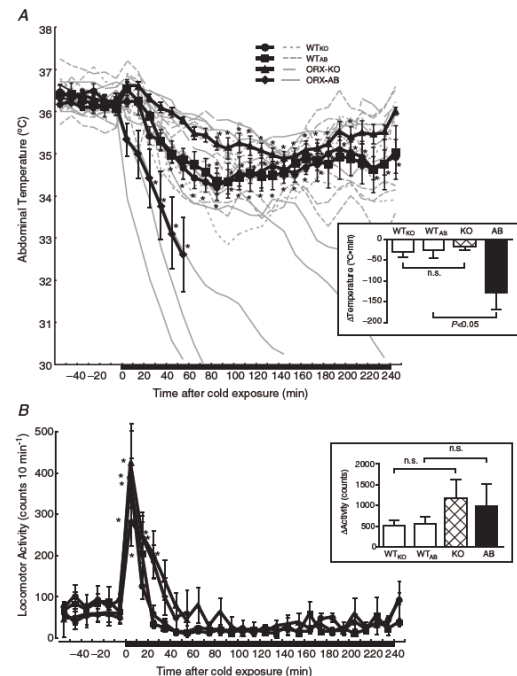


図 4. 低温暴露時の体温と行動量の推移

PGE<sub>2</sub> の脳室内投与、低温暴露のいずれにおいてもオレキシンニューロンが活性化されていることを免疫組織化学的に確認した(図 5)。なお、KO マウスにおけるオレキシンニューロンの確認はオレキシンニューロン特異的に GFP を発現させたマウスを利用した。



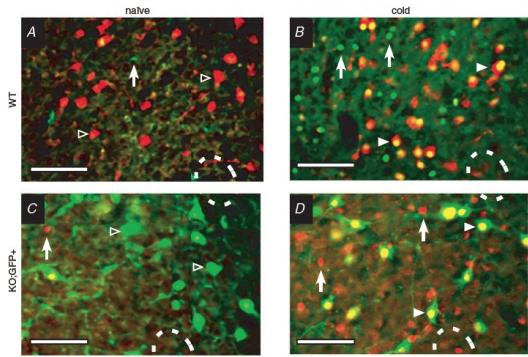


図5．低温ストレスによるオレキシンニューロンの活性化

異常が見られた AB マウスの神経系がオレキシンニューロン以外は正常であることを確認するために、褐色脂肪細胞支配の交感神経活動を調節している延髄縫線核に逆行性トレーサーのコレラ毒素サブユニットbを投与した後に視床下部を観察したところ、下行性神経細胞の分布や数に異常は見られなかった(図6)。

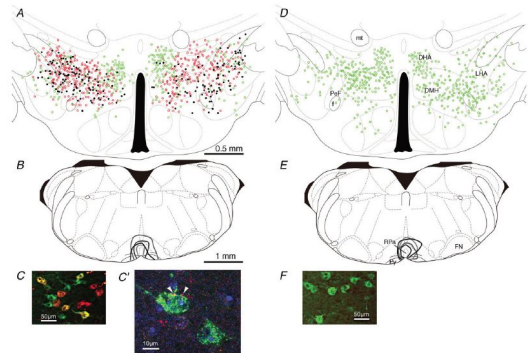


図6．野生型マウス(A)と AB マウス(D)の視床下部におけるオレキシンニューロン(赤)と縫線核投射ニューロン(緑)および2重陽性ニューロン(黒)の分布。

オレキシンニューロン特異的 vGLUT2 欠損マウスにおける防衛反応異常の可能性を各種のストレス負荷によって検討した。エアージェットストレスによる心拍数の上昇、保定ストレスによる体温上昇、低温暴露ストレスによる初期の体温維持、細菌感染ストレスによる初期の発熱が野生型マウスと比較して減弱していた。なお、無刺激時の安静時体温、睡眠覚醒リズム、および行動量には野生型マウスとほとんど差がなかった。

以上の(1)、(2)および(3)①~⑥を総合すると、オレキシンニューロン内のグルタミン酸は覚醒や体温の維持には無関係であるものの、ストレス時の体温上昇の特に初期反応に重要であることが明らかになった。また、調べた限り、ストレスの種類によらず、全ての発熱反応に重要であると結論された。

(4)本研究から派生したプロジェクトにおいて、麻酔からの覚醒にはオレキシンニューロンの活性化が必要であるが、それは単にオレキシンが覚醒を促すだけでなく、体温上昇も覚醒に重要だからであること、睡眠時の間欠的無呼吸はオレキシンニューロンを活性化すること、ならびにオレキシンニューロンは嗅覚刺激による鎮痛に必須である事も明らかになった。

#### 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 5 件)

Keiji Yamaguchi, Takahiro Futatsuki, Jumpei Ushikai, Chiharu Kuroki, Toshiaki Minami, Yasuyuki Kakihana, Tomoyuki Kuwaki: Intermittent but not sustained hypoxia activates orexin-containing neurons in mice. *Resp Physiol Neurobiol* 206:11-14, 2015, 査読有、DOI 10.1016/j.resp.2014.11.003

Yoshiko Takahashi, Wei Zhang, Kohei Sameshima, Chiharu Kuroki, Ami Matsumoto, Jinko Sunanaga, Yu Kono, Takeshi Sakurai, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki: Orexin neurons are indispensable for prostaglandin E<sub>2</sub>-induced fever and defence against environmental cooling in mice. *Journal of Physiology* 591: 5623-5643, 2013, 査読有、DOI 10.1113/jphysiol.2013.261271

Chiharu Kuroki, Yoshiko Takahashi, Youichirou Ootsuka, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki: The Impact of Hypothermia on Emergence from Isoflurane Anesthesia in Orexin Neuron-Ablated Mice. *Anesthesia and Analgesia* 116(5): 1001-1005. 2013, 査読有、DOI 10.1213/ANE.0b013e31828842f0

大塚曜一郎、桑木共之：交感神経活動調節の中樞神経回路. *Cardiovascular Frontier*, 4(1): 15-20, 2013. 査読無(招待原稿)

桑木共之：ストレスと中枢性循環調節. *呼吸と循環* 60(3): 275-282, 2012. 査読無(招待原稿)

〔学会発表〕(計 3 5 件)

山口桂司、二木貴弘、牛飼純平、黒木千晴、桑木共之：間欠的低酸素刺激はオレキシン神経を活性化する、第8回桜ヶ丘地区(基礎系)研究発表会、2015/1/28、鹿児島大学桜ヶ丘キャンパス

楠本-吉田郁恵、生駒葉子、岩元嘉志、迫はるか、大塚曜一郎、桑木共之：オプトジェネティクスを用いた自律神経機能を制御する神経回路の研究、第67回日本自律神経学会総会、招待講演、2014/10/30-31、ラフレさいたま、埼玉県さいたま市

Shogo Tashiro, Hideki Kashiwadani, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki: The odor-induced antinociceptive effect is mediated by orexin neurons. 15th World Congress on pain (IASP2014) La Rural Convention Center, Buenos Aires, Argentina 10/6-11/2014

山口蘭, 田代章悟, 加治屋勝子, 上村裕一, 桑木共之, 柏谷英樹: 視床下部オレキシンニューロンを介した匂い誘発性鎮痛の発現、日本神経科学学会、9/11-13/2014、パシフィコ横浜 (神奈川県)

Tomoyuki Kuwaki: Role of orexin neurons in the regulation of thermogenesis, 5th International Symposium on physiology and pharmacology on temperature regulation (PPTR) 2014, 招待講演、9/7-12/2014, Sukuza, Kruger National Park, South Africa

Hideki Kashiwadani, Shogo Tashiro, Ran Yamaguchi, Katsuko Kajiya, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki: Odor-induced analgesic effect in mice. FENS Forum 2014, 7/5-9/2014, Mico Congress Centre, Milan, Italy

生駒葉子, 桑木共之, 大塚曜一郎: Orexin contributes to feeding and drinking behavior induced by methamphetamine. 第91回日本生理学会大会、2014/3/16-18、鹿児島

Youichirou Ootsuka, Kohei Miyata, Yoko Ikom, Tomoyuki Kuwaki, Akihiro Yamanaka: The contribution of orexin system to integrated ultradian physiological pattern. 2014 Meeting of the Australasian Neuroscience Society, 招待講演、2014/1/28-31 Adelaide, Australia

Yoko Ikoma, Kohei Miyata, Tomoyuki Kuwaki, Youichirou Ootsuka: A role of glutamate co-released from orexin neurons in methamphetamine-induced autonomic physiological response. IUPS2013, 2013/6/21-26, Birmingham, UK

Chiharu Kuroki, Yoshiko Takahashi, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki: Impact of hypothermia on emergence from isoflurane anesthesia in orexin neuron ablated mice. EuroAnesthesia 2013, 優秀演題、2013/6/1-4, Barcelona, Spain

黒木千晴, 高橋佳子, 上村裕一, 桑木共之: オレキシンニューロン破壊マウスにおけるイソフルラン麻酔からの覚醒に与える低体温の影響、日本麻酔科学会第60回学術集会、優秀演題、2013/5/23-25、札幌

松元愛海, 鮫島光平, 窪凜太郎, 川瀧正典, 大塚曜一郎, 桑木共之: オレキシンニューロンに共存するグルタミン酸はストレス誘発性熱産生に重要である、第90回日本生理学会大会、2013/3/27-29、東京

Kohei Miyata, Youichirou Ootsuka, Tomoyuki Kuwaki: Ultradian basic rest-activity cycle in orexin deficient mice. 42nd SfN Meeting (Neuroscience 2012), 2012/10/13-17, New Orleans (USA)

桑木共之: 中枢性体温調節回路におけるオレキシン神経細胞の役割、日本神経科学学会、招待講演、2012/9/18-21、名古屋

Tomoyuki Kuwaki: SIDS from neurophysiology. 22nd Conference of the International Academy of Legal Medicine, 招待講演、2012/7/4-7, Istanbul (Turkey)

桑木共之: ストレスと自律機能、日本睡眠学会第37回定期学術集会、招待講演、2012/6/28-30、横浜

桑木共之: 睡眠・覚醒・ストレスに伴う体内環境調整におけるオレキシン神経の役割、第590回北里医学会招待学術講演会、招待講演、2012/5/29、北里大学(神奈川県)

Tomoyuki Kuwaki Yoshiko Takahashi, Wei Zhang, Kohei Sameshima, Chiharu Kuroki, Takeshi Sakurai, Yuichi Kanmura: Role of orexin neurons in prostaglandin E2-induced fever and the defense against environmental cooling. Experimental Biology 2012, 2012/4/21-25, San Diego (USA)

〔図書〕(計 1件)

Tomoyuki Kuwaki, Wei Zhang: Orexin neurons and emotional stress, in SLEEP HORMONES (volume 89 of Vitamins & Hormones), Academic Press, New York, pp.135-158, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)  
取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 統合分子生理学分野ホームページ  
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑木 共之 (KUWAKI, Tomoyuki)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 80205260

### (2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

大塚 曜一郎 (OOTSUKA, Youichirou)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・客  
員研究員 (Flinders University・Research  
Fellow)  
研究者番号：70302403

(4)研究協力者

柏谷 英樹 (KASHIWADANI, Hideki)  
楠本 郁恵 (KUSUMOTO, Ikue)  
張 薇 (ZHANG, Wei)  
宮田 紘平 (MIYATA, Kohei)  
松元 愛海 (MATSUMOTO, Ami)  
生駒 葉子 (IKOMA, Yoko)  
河野 悠 (KONO, Yu)  
鮫島 光平 (SAMESHIMA, Kohei)  
窪 凜太郎 (KUBO, Rintaro)  
川瀧 正典 (KAWATAKI, Masanori)  
牛飼 純平 (USHIKAI, Jumpei)  
岩元 嘉志 (IWAMOTO, Yoshiyuki)  
迫 はるか (SAKO, Haruka)  
石川 そでみ (ISHIKAWA, Sodemi)  
砂永 仁子 (SUNANAGA, Jinko)  
高橋 佳子 (TAKAHASHI, Yoshiko)  
黒木 千晴 (KUROKI, Chiharu)  
山口 桂司 (YAMAGUCHI, Keiji)  
二木 貴弘 (FUTATSUKI, Takahiro)  
田代 章悟 (TASHIRO, Shogo)  
上村 裕一 (KANMURA, Yuichi)  
山口 蘭 (YAMAGUCHI, Ran)  
永田 敬一郎 (NAGATA, Keiichiro)  
加治屋 勝子 (KAJIYA, Katsuko)  
桜井 武 (SAKURAI, Takeshi)  
山中 章弘 (YAMANAKA, Akihiro)