

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590903

研究課題名(和文) 視床下部室傍核の PPAR による副腎髄質からのカテコラミン分泌機構の解析

研究課題名(英文) Roles for PPAR gamma in the hypothalamic PVN in the catecholamin secretion from adrenal medulla in rats

研究代表者

岡田 尚志郎 (okada, shoshiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40203989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：急性拘束負荷(RS)によるラット血中カテコラミン増加は、RS負荷中の5%ブドウ糖持続的静脈内投与によって抑制されるが、PPAR antagonist (GW9662) の腹腔内前投与は、5%ブドウ糖持続的静脈内投与による抑制効果を妨げた。RSは時間経過(0～6時間)とともに、ラット視床下部室傍核のpreautonomic neuronの存在するdorsal part およびventral partにおけるPPAR 発現を増大させた。以上の実験成績から、視床下部室傍核のpreautonomic neuronのPPAR が副腎髄質からのカテコラミン分泌調節に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) is one of the regulatory centers for various stress responses. The present study determined whether PPAR in the PVN is involved in the restraint stress (RS)-induced catecholamine secretion from adrenal medulla in rat. The RS-induced elevation of plasma catecholamines was suppressed by continuous intravenous infusion of 5% glucose. In contrast, pretreatment with intra peritoneal injection with GW9662, an antagonist for PPAR, abolished the suppression effect. Western blot analyses showed the increase of levels of PPAR protein in the hypothalamus. Further more, by immunohistochemical analyses revealed that RS gradually increased the expression of PPAR in the dorsal part and ventral part of the PVN, where preautonomic neurons exist. These results suggest that PPAR in the preautonomic neurons in the PVN may be involved in RS-induced elevation of plasma catecholamines in rats.

研究分野：神経科学、特に視床下部室傍核における交感神経系の中枢制御機構

キーワード：hypothalamic PVN preautonomic neuron PPAR gamma plasma catecholamine restraint stress

1. 研究開始当初の背景

ストレス応答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。視床下部室傍核はストレス応答の制御中枢の一つであり、副腎髄質からのカテコラミン分泌を調節することに関与すると考えられている。我々はこれまで中枢性に投与した種々のストレス関連ペプチド(コルチコトロピン放出因子など)による血中カテコラミン増加が、シクロオキシゲナーゼ阻害薬の脳室内前処置によって抑制されることなどから、視床下部室傍核のプロスタノイド産生が副腎髄質からのカテコラミン分泌に促進的に関与すること、さらにこの促進反応にシクロオキシゲナーゼ遺伝子の転写因子である NF- κ B が関与することを薬理的に明らかにしてきた。しかし、視床下部室傍核において、副腎髄質からのカテコラミン分泌を抑制する機構について詳細はいまだに明らかではない。ところで、PPAR は末梢組織におけるブドウ糖代謝を調節する転写因子としてよく知られているが、ごく最近、急性拘束ストレスによって、ラット大脳皮質の PPAR 発現が増加し、腹腔内前投与した PPAR agonist は、RS ラットの脳皮質から調製したシナプトソームへのブドウ糖取り込み低下を抑制すると報告された。さらに PPAR agonist が急性拘束ストレスによるラットの心拍数増加、血中コルチコステロン増加および視床下部室傍核における Fos 発現増加を抑制することが報告された。これらの報告は PPAR 刺激がブドウ糖代謝との関連でストレス反応を抑制する可能性を示唆する。そこで我々もラット拘束ストレス負荷モデルを作製し、逆に 5%ブドウ糖を持続的に静脈内投与して拘束ストレスを負荷したところ、5%ブドウ糖の持続的静脈内投与は拘束ストレスによる血中カテコラミン増加を抑制するという予備実験成績が得られた。さらに PPAR antagonist (GW9662)を腹腔内に前投与した後、同様に 5%ブドウ糖を持続的に静脈内投与して拘束ストレス負荷した。興味深いことに、GW9662 は 5%ブドウ糖静脈内投与による抑制効果を妨げることを見いだした。これらの予備実験成績に基づいて、以下の仮説を考案した。すなわち、拘束ストレスにより視床下部室傍核において発現す

る PPAR は、副腎髄質からのカテコラミン分泌に対して抑制的に作用し、血中ブドウ糖を増加させると視床下部室傍核に存在する PPAR 活性化を介してさらにカテコラミン分泌を低下させるという可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ストレス応答の制御中枢の一つである視床下部室傍核における転写因子 PPAR に焦点をあて、ブドウ糖代謝に密接に関与する転写因子 PPAR の視床下部室傍核における発現動態が副腎髄質系賦活を負に調節するという機構を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 急性拘束ストレスラット ($\pm 5\%$ ブドウ糖静脈内投与)の経時的血中カテコラミンの測定

急性拘束負荷実験前日にウイスター系雄性ラット (300~350g) をペントバルビタール麻酔し、大腿動静脈にヘパリン化したカニューレを挿入し、皮下経路で頸部から引き出して盲栓しておく。

拘束ストレス負荷中、経時的に採血し、血中カテコラミンはアルミナ抽出した後、HPLC-ECD によって測定した。実験当日の血中カテコラミン(ノルアドレナリンおよびアドレナリン)の基礎値は、250~350 pg/ml ほぼ一定であった。GW9662 (PPAR antagonist) は、拘束負荷 30 分前に腹腔内投与した。

(2) 免疫組織化学染色

ウイスター系雄性ラットに対して、1、2、3、4 および 6 時間の拘束ストレスを負荷した。拘束ストレス負荷の終了直後に、ペントバルビタール麻酔下で 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。コントロール群 (RS 0 hr) のラットは、ストレスを負荷しないまま、ホームケージから出した直後に麻酔下で灌流固定を行い、脳を摘出した。

20 μ m 厚の前頭断凍結切片を作製した後、PPAR もしくは NF κ B に対する抗体を用いて、蛍光免疫組織化学染色を行った。また、DAPI を用いて核染色を行った。

4. 研究成果

(1) 急性拘束ストレス負荷による血中カテコラミン増加に及ぼす 5%ブドウ糖および GW9662 の及ぼす影響 (図 1、2)

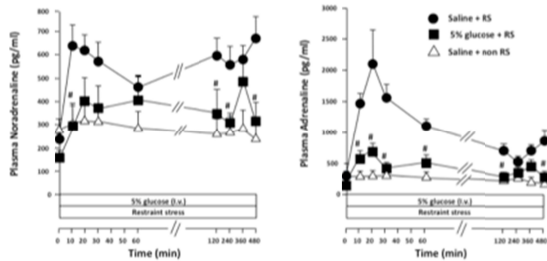


図 1. 急性拘束ストレス負荷による血中カテコラミン増加に及ぼす 5%ブドウ糖持続的静脈内投与の影響

急性拘束ストレス負荷によって、ラット血中カテコラミンは負荷後 30 分をピークにノルアドレナリンおよびアドレナリンともに増加した。この血中カテコラミン増加は、拘束ストレス負荷中の 5%ブドウ糖持続的静脈内投与 (1.2ml/H) によって抑制された。そこで糖代謝に密接に関与する転写因子 PPAR の影響を、PPAR アンタゴニスト (GW9662) を用いて薬理的に調べた。

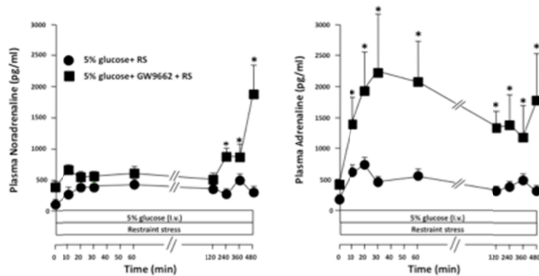


図 2. 急性拘束ストレス負荷による血中カテコラミン増加に及ぼす 5%ブドウ糖および GW9662 の及ぼす影響

PPAR antagonist (GW9662) の腹腔内前投与は、5%ブドウ糖持続的静脈内投与による抑制効果を妨げた。この実験成績から、内因性の PPAR が拘束ストレス負荷による血中カテコラミン増加に対して、抑制的に作用する可能性が推測された。

(2) 視床下部 PPAR の Western blot 解析

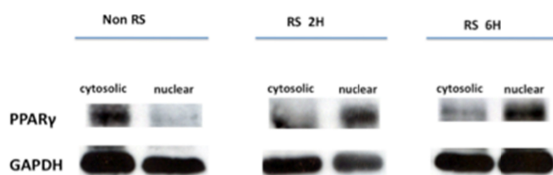


図 3. 視床下部室傍核における PPAR 発現の変化

急性拘束ストレス負荷によって、視床下部 PPAR の経時的な核内移行が認められた。そこでさらに、視床下部室傍核における PPAR の発現変化を免疫組織学的に検討した。

(3) 急性拘束ストレス負荷ラットの視床下部室傍核における PPAR および NF κ B の発現 (図 4、5)

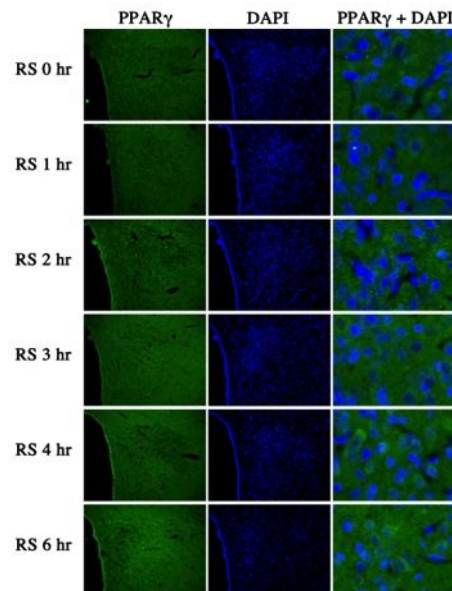


図 4. 急性拘束ストレスによる PPAR 陽性細胞の発現変化

急性拘束ストレス負荷によって、視床下部室傍核の preautonomic neuron における PPAR 発現は時間経過とともに増加し、3、4 時間後には、一部の細胞で核内移行も認められた。ウエスタンブロット解析で得られた成績に一致した。

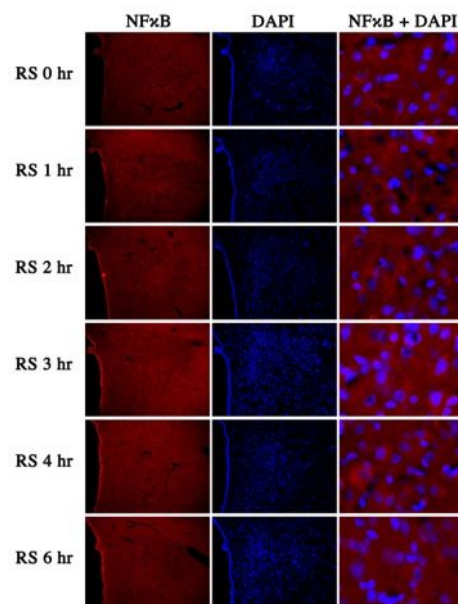


図 5. 急性拘束ストレスによる NF κ B 陽性細胞の発現変化

これに対して、NF κ B は、拘束ストレス負荷中、

発現の増加、核内移行のいずれも認められなかった。

(4) 結論

本研究では、ストレス応答の制御中枢の一つである視床下部室傍核の PPAR が、急性拘束ストレス負荷による副腎髄質からのカテコラミン分泌調節に関与するか否かを薬理学的および形態学的に調べた。急性拘束負荷によるラット血中カテコラミン増加は、拘束ストレス負荷中の 5%ブドウ糖持続的静脈内投与によって抑制されるが、PPAR antagonist (GW9662) の腹腔内前投与は、5%ブドウ糖持続的静脈内投与による抑制効果を妨げた。急性拘束ストレス負荷は時間経過(0~6 時間)とともに、ラット視床下部室傍核の preautonomic neuron の存在する dorsal part および ventral part における PPAR 発現を増大させた。これに対して NF B 発現には変化を認めなかった。以上の実験成績から、視床下部室傍核の preautonomic neuron の PPAR が副腎髄質からのカテコラミン分泌調節に抑制的に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Ando K, Kondo F, Yamaguchi N, Tachi M, Fukayama M, Yoshikawa K, Goshio M, Fujiwara Y, Okada S. Centrally administered isoproterenol induces sympathetic outflow via brain prostaglandin E2-mediated mechanisms in rats. *Auton Neurosci*. 査読有. 2015. 189. 1-7.

DOI: 10.1016/j.autneu.2014.12.002.

Tachi M, Kondo F, Fukayama M, Yoshikawa K, Matsuura K, Okada S. Mass spectrometric determination of prostanoids in rat hypothalamic paraventricular nucleus microdialysates. *Auton Neurosci*. 査読有. 2014. 181. 49-54.

DOI: 10.1016/j.autneu.2013.12.013.

DOI: 10.1186/1471-2202-13-149.

Tsunekawa K, Kondo F, Okada T, Feng GG, Huang L, Ishikawa N, Okada S. Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 (WDR35) stimulated by domoic acid in rat hippocampus: involvement of reactive oxygen species generation and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *BMC Neurosci*. 査読有. 2013. 14. 4.

DOI: 10.1186/1471-2202-14-4.

Harato M, Huang L, Kondo F, Tsunekawa K, Feng GG, Fan JH, Ishikawa N, Fujiwara

Y, Okada S. Bupivacaine-induced apoptosis independently of WDR35 expression in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. *BMC Neurosci*. 査読有. 13. 149.

Kakinuma Y, Okada S, Nogami M, Sano S, Kumon Y. Systemic inflammation impairs cardiac glucose uptake. *Int J Cardiol*. 査読有. 2012. 154. 203-204.

DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.10.066.

[学会発表](計 5 件)

館昌彦、近藤文雄、山口奈緒子、深山実、吉川和宏、岡田尚志郎. 2-DG は脳内プロスタノイド依存性に視床下部室傍核ノルアドレナリン遊離および血中カテコラミンを増加させる. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 18 日~20 日. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

三村郁、安藤一雄、山口奈緒子、近藤文雄、館昌彦、藤原祥裕、岡田尚志郎. 脳室内投与したイソプロテレノールは GABAB 受容体の賦活を介して血中ノルアドレナリンを増加させる. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 18 日~20 日. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

館昌彦、近藤文雄、深山実、吉川和宏、松浦克彦、岡田尚志郎. 自由行動下におけるラット視床下部室傍核灌流液中プロスタノイドの分析. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月 19 日~21 日. 東北大学(宮城県・仙台市)

近藤文雄、館昌彦、深山実、吉川和宏、岡田尚志郎. ラット視床下部灌流液中の神経伝達物質及びプロスタノイドの同時モニタリング. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月 19 日~21 日. 東北大学(宮城県・仙台市)

館昌彦、近藤文雄、深山実、吉川和宏、岡田尚志郎. ラット視床下部室傍核灌流液中プロスタノイドの質量分析法による測定. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013 年 3 月 21 日~23 日. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060702/04.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 尚志郎 (OKADA, Shoshiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 4 0 2 0 3 9 8 9