

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24592306  
研究課題名(和文)オレキシン受容体の機能解析 麻酔との関連

研究課題名(英文)Analysis of orexin-receptor functions

## 研究代表者

白阪 哲朗 (Shirasaka, Tetsuro)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：00274788

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)：神経ペプチドオレキシンA(OXA)を脳室内に投与して生じる血圧および心拍数上昇反応は、OX1Rの関与が大きかった。また、OXAの前頭前皮質(PFC)のNorepinephrine(NE)およびGlutamate(Glu)濃度増大は、オレキシン受容体を介する反応だった。OXAのPFCにおけるNEおよびGlu放出促進作用に対する麻酔薬の抑制作用は、GABAA受容体を介することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intracerebroventricular (i.c.v.) injection of orexin A(OXA) produces an increase in blood pressure and heart rate. The cardiovascular responses induced by i.c.v.-injection of OXA were mainly mediated by OX1-receptor rather than OX2-receptor. I.c.v.-injection of OXA increased NE and Glu mediated by OX1-receptor and OX2-receptor. These responses were inhibited by propofol and sevoflurane in a concentration dependent manner, but not by dexmedetomidine and ketamine. These results suggests that OXA increase NE and Glu in the prefrontal cortex mediated by GABAA receptor.

研究分野：麻酔科

キーワード：オレキシン 麻酔 睡眠と覚醒

1. 研究開始当初の背景 オレキシン(ORX)は視床下部から発見された生理活性ペプチドで、オレキシン-A(OXA)とオレキシン-B(OXB)が存在する。申請者らは、OXAあるいはOXBをラットの側脳室に投与すると交感神経活動が活性化され、血圧や心拍数が増大することを世界で初めて示した(Shirasaka et al, Am J Physiol 1999)。申請者はこの研究結果に関するレビュー(Shirasaka et al, Am J Physiol 2003)や本の一部(Shirasaka T. Orexin and the autonomic nervous system. Sakurai T (eds), 107-117, The Humana Press, 2005)を執筆した。OXAとOXBでこれらのパラメータに及ぼす影響とその大きさは異なった。それは、OXAとOXBのOX<sub>1</sub>RおよびOX<sub>2</sub>Rに対する親和性が異なるだけでなく、それぞれの受容体に結合した時に発現する作用が異なることが予想される。OX<sub>1</sub>RとOX<sub>2</sub>Rは、脳内の分布様式が異なり、作用発現に関連する神経伝達物質や神経細胞も異なるといわれている。よって結合するリガンドは同じでも、これらの受容体を介して発現する作用は異なることが予想できる。実際、ORXのレム睡眠とノンレム睡眠の調節機構において、これらの受容体は異なる役割を担う(Mieda et al. J Neurosci 2011)。また申請者らは、別の実験でOXAをラットの側脳室に投与するとプロポフォル(Pro)麻酔において、麻酔導入には影響しないが、選択的に覚醒を濃度依存性に促進することを示した。逆に、ORX受容体拮抗薬を脳室に投与すると選択的に覚醒が遅延した。同時に前頭前皮質(Prefrontal cortex;PFC)のノルエピネフリン(NE)およびドーパミン(DA)濃度を測定すると、OXAはNEおよびDAニューロンを活性化し、Pro麻酔からの覚醒が促進されることが明らかになった(Shirasaka et al, J Anesth 2010)。OXAの循環系および交感神経活動への影響におけるOX<sub>1</sub>RとOX<sub>2</sub>Rの役割。そして中枢のノルエピネフリン系、ドーパミン系、セロトニン系およびグルタミ

ン系に対する作用におけるOX<sub>1</sub>RおよびOX<sub>2</sub>Rの役割についても解明したい。

2. 研究の目的 上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は個々のORX受容体(OX<sub>1</sub>RおよびOX<sub>2</sub>R)を介して発現する作用について解明したい。研究期間内に以下のことを明らかにする。

1.OXAをマウスの側脳室に投与したときにOX<sub>1</sub>RあるいはOX<sub>2</sub>Rの各受容体を介して生じる血圧、心拍数および腎交感神経活動の変化。(OX<sub>1</sub>RあるいはOX<sub>2</sub>R遺伝子をノックアウトしたマウスを使用する)

2.OX<sub>1</sub>RおよびOX<sub>2</sub>R遺伝子の両方ノックアウトしたマウスそして両方の遺伝子が健常な野生型マウスにOXAを側脳室に投与したときの血圧、心拍数および腎交感神経活動の変化。

3. 以上の実験で、OXAの交感神経活動および心血管系活動調節機構における各ORX受容体(OX<sub>1</sub>RおよびOX<sub>2</sub>R)の役割を解明する。

4. 次に、1と2の実験を麻酔下で施行する。麻酔薬は、GABA作動薬であるPro、<sub>2</sub>受容体作動薬であるデクスメドミジン(Dex)、NMDA受容体拮抗薬であるケタミン(Ket)あるいは吸入麻酔薬であるセボフルラン(Sev)を使用する。この実験で各麻酔薬との相互作用について調べる。

5. 同様に、OX<sub>1</sub>RおよびOX<sub>2</sub>R遺伝子のどちらかの遺伝子をノックアウトしたマウス(OX<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> or OX<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>)、両方の遺伝子をノックアウトしたマウス(OX<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>;OX<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>)、そして両方の遺伝子が健常な野生型マウス(Wild Type)を使用する。これらのタイプのマウスに麻酔薬(Pro、Dex、KetあるいはSev)を投与したときのPFC(前頭前皮質)におけるNE、DA、5-HT、グルタミン(Glu)濃度の変化および意識レベル(EMG、EEG)の変化を調べる。

6. 次にPro、Dex、KetあるいはSev麻酔中にOXAをマウスの側脳室に投与したときに、OX<sub>1</sub>RあるいはOX<sub>2</sub>Rの各受容体を介して生

じる PFC の NE, DA, 5-HT, グルタミン濃度の変化および意識レベルの変化を調べる。

7. 5 と 6 の実験で、各麻酔薬および OXA 投与による PFC の NE, DA, 5-HT, Glu 濃度に及ぼす影響と意識レベルの変化における各 ORX 受容体 (OX<sub>1</sub>R および OX<sub>2</sub>R) の役割を解明する。

3. 研究の方法 動物は、生後 20 週の 4 種類の遺伝子タイプ (wild type, OX<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, OX<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, OX<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>;OX<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) の雄性マウスを用いる。各種のノックアウトマウスは、桜井ら (Sakurai T. Nat Rev Neurosci 2007) から提供していただく。最初にネブタール麻酔下でマウスの頭部を脳定位固定装置 (Narishige; 現有) に固定して左側脳室 (bregma から後方 0.8 mm, midline から外側 1.5 mm, 骨表面から深さ 2.5 mm) に薬物投与に用いるガイドカテテル (24G ステンレス; 2.0 mm 長) を挿入する。同時に皮質脳波 (EEG) を測定するためのステンレス製のネジ (+A ナベ; ユニクロ) を前頭部の頭蓋骨に留置し、歯科用セメント (Quick Resin; SHOFU) で固定する。10 日間以上の回復期において、左右の大腿動静脈に血圧測定および薬物投与に用いるカテテル (SP 31, PE-10; 夏目) を挿入する。カテテルは皮下を通して頸背部から外に出す。動脈圧カテテルは血圧測定のために圧変換器 (Coulb; 現有) に連結し、心拍数は血圧波形から算出する。板状筋から筋電図 (EMG) を記録するために頸背部に電極 (AS633; COONER WIRE) を固定する。腎交感神経は、後腹膜からアプローチする。左の腎交感神経に電極 (AS633) をかけてシリコン (Sil 604S-A; Semicosil) で固定したのち閉腹する (Shirasaka et al. Am J Physiol 1999)。手術操作終了後は、マウスを専用の自作ケージに入れて麻酔から完全に覚醒した意識下自由行動下で記録する。脳波上覚醒期 (8:00-16:00) に実験を施行する。側脳室への薬物投与 (volume 1 μl) は、30 秒以上かけて gas-tight syringe (10 μl; Hamilton) と微量

注入ポンプ (ESP-64; Eicom; 現有) を用いて持続投与する。測定する全てのパラメータは増幅 (ML135; Power Lab) して Power Lab system (ADIML785; 現有) を介しパソコン

(XPS8300; DELL) でモニターして同時に記録する。記録はハードディスクに一時的に保存して、後に DVD に保存する。動物モデル作成は、研究分担者の矢野武志と研究協力者の内村修二が行う。

動物実験モデルを作成し、各パラメータが安定した後、10 分間のコントロールを測定後、以下の実験を各遺伝子タイプ (wild type, OX<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, OX<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, OX<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>;OX<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) のマウスに施行する。ノックアウトマウスの標的遺伝子がノックアウトされているか実験終了後に調べる。マウス脳から RNA を抽出 (TaqMan RNA-to c<sub>T</sub> Kit; ライフテック ノロジーズ ジャパン) してリアルタイム PCR システム (Thermal Cycler Dice Real Time System Single MRQ; TAKARA) で解析する。(実験は研究代表者の白阪哲朗と研究分担者の矢野武志が施行する)

1. 側脳室に OXA (0.3, 1.0, 3.0 nmol) を投与して血圧 (BP)、心拍数 (HR)、腎交感神経活動 (RSNA) および脳波 (EEG)、筋電図 (EMG) を記録する。各遺伝子タイプのマウスで反応を比較し、各受容体を介した反応を考察する。
2. 次に麻酔下で 1 と同様の実験を施行する。静脈麻酔薬であるプロポフォール (Pro)、デクスメトミジン (Dex)、ケタミン (Ket) および吸入麻酔薬であるセボフルラン (Sev) について調べる。初めにこれらの麻酔薬を単独で投与して BP, HR, RSNA, EMG および EEG の変化を記録し、これらのパラメータが安定したところで OXA を脳室に投与して反応を調べる。マイクロダイアリスの実験を施行する。上述したように各遺伝子のマウスの脳

室に薬物投与用のカテーテルを留置する。マイクロダイアリシスに用いる透析プローベ用のガイドカニューラ(26G ステンレス; 4.0 mm長)を、脳室カテを留置した対側のPFC(bregmaから前方1.9 mm, midlineから外側0.5 mm, 骨表面から深さ3.8 mm)に留置する。同時にEEG測定のためのステンレス製のネジを前頭部の頭蓋骨に留置し、歯科用セメントで固定する。EMG測定のための電極を頸背部の板状筋に装着する。10日間以上の回復期において、実験を施行する。PFCに留置したガイドカニューラに透析プローベ(Eicom Corp., Kyoto, Japan)を挿入する。プローベにリンゲル液を2  $\mu$ l/minの速度で灌流し、サンプル(10  $\mu$ l)は5分毎に収集しモノアミンおよびグルタミン濃度は検出器(HTEC-500 Eicom; 現有)を用いてHPLCで分析する。分析カラムは、モノアミンにはEicompak SC-50DS、グルタミンにはEicompak GU-GELを使用。移動相は、100mMリン酸ナトリウム緩衝液、2.0mMデカンスルホン酸ナトリウム、134  $\mu$ M EDTA、1%メタノールを含有する。記録はパソコンのハードディスクに一時的に保存して最終的にDVDに保存する。動物実験モデルを作成し、少なくとも3時間のデータ収集後(ピークが安定するのを待つ)、以下の実験を各遺伝子タイプ(wild type,  $OX_1R^{-/-}$ ,  $OX_2R^{-/-}$ ,  $OX_1R^{-/-}; OX_2R^{-/-}$ )のマウスに施行する。

1. GABA受容体作動薬であるPro (800  $\mu$ g/kg/min)を60分間持続静脈内投与した時の各モノアミンおよびグルタミン濃度の変化を調べる。他に  $\alpha_2$ 受容体作動薬であるDex (0.1  $\mu$ g/kg/min)、NMDA受容体拮抗薬であるKet (5 mg/kg/min)をそれぞれ60分間持続静脈内投与し、各測定物質濃度の変化を調べる。また、吸入麻酔薬のSev (2%)についても同様に調べる。この

実験は、マウスのケージを密閉してケージ内に酸素(2l/min)とSevを混合して投与する。これらの各麻酔薬で反応を認めた場合は、濃度依存性についても調べる。また、変化をもたらす麻酔薬で拮抗薬があるもの(Pro; GABA<sub>A</sub>zine, Dex; Yohimbine)については、麻酔薬の作用について拮抗薬の効果を調べる。

2. 次に1で用いる麻酔薬を投与して、各麻酔薬に対する各モノアミンおよびグルタミン濃度の変化が安定したら脳室内にOXA(0.3, 1.0, 3.0 nmol)を投与し、それによって生じる各パラメータの変化を調べる。各遺伝子タイプのマウスで反応を比較し、各受容体を介した反応を考察する。

#### 4. 研究成果

神経ペプチドオレキシンA(OXA)を脳室内に投与して生じる血圧および心拍数上昇反応は、オレキシン受容体 ( $OX_1R$ ,  $OX_2R$ ) のうち  $OX_1R$  を介した反応は  $OX_2R$  を介した反応より大きく  $OX_1R$  の関与が大きかった。また、OXAを脳室内に投与した時の前頭前皮質(PFC)のNorepinephrine(NE)およびGlutamate(Glu)濃度増大は、オレキシン受容体 ( $OX_1R$ ,  $OX_2R$ ) を介する反応だった。この反応は、麻酔薬のPropofol およびSevofluraneで濃度依存性に抑制されたが、DexmedetomidineとKetamineではこの抑制効果は認めなかった。これよりOXAのPFCにおけるNEおよびGlu放出促進作用に対する麻酔薬の抑制作用は、GABA受容体を介することが示唆された。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

白阪 哲朗 (TETSURO Shirasaka)

宮崎大学医学部・麻酔生体管理学講座・准教授

研究者番号： 00274788

(2)研究分担者

矢野 武志 (TAKESHI Yano)

宮崎大学医学部・集中治療部・助教

研究者番号： 80521707

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：