

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670354

研究課題名(和文)ヘモグロビン由来ペプチド・ヘモプレッシンの中枢性ストレス反応経路抑制作用

研究課題名(英文)Inhibitory role of a hemoglobin-derived peptide hemopressin in stress pathway

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヘモグロビン由来ペプチド・ヘモプレッシン(RVD-ヘモプレッシン)がマリファナの受容体であるカンナビノイドCB1受容体を介して、交感神経-副腎髄質系の興奮を中枢性に抑制することを示した。また交感神経-副腎髄質系の中枢制御に、視床下部室傍核の脊髓投射性(前交感神経性)ヘモグロビン含有ニューロンが関わっている可能性を示した。これらはストレス反応の中枢制御におけるRVD-ヘモプレッシンの臨床応用に関する基礎データとなり得る。

研究成果の概要(英文)：This study exhibited that RVD-hemopressin, a hemoglobin-derived peptide, inhibited the activation of sympatho-adrenomedullary outflow through brain cannabinoid CB1 receptors. We also represented a possibility that spinally projecting (pre-sympathetic) hemoglobin-containing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus contribute to a central modulation of sympatho-adrenomedullary outflow. These findings provide basic data for the therapeutic use of RVD-hemopressin in the central regulation of stress response.

研究分野：神経生物学

キーワード：ヘモプレッシン ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

ヘモグロビンは赤血球の酸素運搬体として古くから知られてきた。近年これがニューロンにも存在し (Schelshorn et al., J Cereb Blood Flow Metab, 2009)。その $\alpha$ 鎖から切り出されるヘモプレシンと呼ばれる生理活性ペプチドがマリファナの受容体であるカンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体のリガンドとして機能することが報告された (Gomes et al., FASEB, 2009)。一方、研究代表者らはこれまでストレス関連分子 (ボンベシン、バソプレシン、コルチコトロピン放出因子) のラット脳室内投与が脳内アラキドン酸カスケードを介して交感神経-副腎髄質 (SA) 系を活性化し、さらに活性化した SA 系が脳内 CB<sub>1</sub> 受容体を介して抑制されることを明らかにしてきた (Shimizu et al., Eur J Pharmacol, 2004; 2005; 2008)。このことから、SA 系賦活の脳内 CB<sub>1</sub> 受容体を介した抑制に内因性カンナビノイドが関わっている可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

SA 系の興奮は脳内 CB<sub>1</sub> 受容体を介して抑制されるが、その内因性リガンドおよび産生部位、作用機序はまだよく分かっていない。本研究では麻酔下のラットを用いて、次の二点を薬理学的および組織学的解析により明らかにする。

(1) 活性化した SA 系に対するヘモプレシンの脳内 CB<sub>1</sub> 受容体を介した抑制作用

(2) SA 系賦活中枢である視床下部室傍核 (PVN) におけるヘモプレシンの発現

## 3. 研究の方法

(1) SA 系に対するヘモプレシンの作用

SA 系に対するヘモプレシンの作用を検討するために、ヘモプレシン前処置がボンベシン脳室内投与による SA 系賦活に及ぼす効果について血中カテコールアミン濃度を指標に解析した。

ラットをウレタン (1.2 g/kg weight, 腹腔内投与) 麻酔下にて脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨に小孔を開けた。側脳室に挿入したステンレスカニューレよりヘモプレシン (RVD-Hp, 30 or 100 nmol) を脳室内投与した (コントロール群には蒸留水を投与した)。30 分後、同カニューレよりボンベシン (1 nmol) を脳室内投与し、大腿動脈に留置したポリエチレンカニューレより採血した (ボンベシン投与後 10, 30, 60, 90, 120 分)。血清中のカテコールアミンをアルミナ抽出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりノルアドレナリンおよびアドレナリンを定量した (Shimizu et al., Eur J Pharmacol, 2012; Tanaka et al., Eur J Pharmacol, 2012)。

さらに、SA 系に対するヘモプレシンの作用が脳内 CB<sub>1</sub> 受容体を介したものを確かめ

るために、ヘモプレシンの作用が CB<sub>1</sub> 受容体遮断薬により阻害されるかを検証した。

先と同様の手順でウレタン麻酔下にてラット頭部を固定し、CB<sub>1</sub> 受容体遮断薬・リモナバント (90 or 180 nmol) を脳室内投与した。30 分後、ヘモプレシン (RVD-Hp, 100 nmol) を脳室内投与した。さらに 30 分後、ボンベシン (1 nmol) を脳室内投与し、大腿動脈より採血した (ボンベシン投与後 10, 30, 60, 90, 120 分)。血清中のノルアドレナリンおよびアドレナリンを HPLC により定量した。コントロール群にはリモナバントに代えて溶媒 (DMF; N,N-ジメチルホルムアミド) を投与した。

(2) PVN におけるヘモグロビン $\alpha$ 鎖の検出

ボンベシン脳室内投与によって活性化した PVN 脊髄投射性ニューロンおよびその近傍の細胞において、ヘモプレシンの産生源であるヘモグロビンの発現を組織学的に解析した。

PVN 脊髄投射性ニューロンを単シナプス逆行性トレーサーのフルオロゴールド (FG) を用いて標識した。ラットをペントバルビタール (50 mg/kg weight, 腹腔内投与) 麻酔下にて、背部中央を 4-5 cm 切開した。脊髄定位固定装置に固定し、椎弓を削り脊髄を露出した。副腎髄質および腹腔神経節を主に支配する第 8 胸髄中間外側核にマイクロシリンジに繋いだ歯科用注射針 (30G) を挿入し、FG (4% in sterile saline) を 40 nl/min の速度で左右それぞれ 200 nl 注入した。切開部を縫合してケージに戻した (Tanaka et al., Auton Neurosci, 2012)。

2 週間のトレーサー移行期間と安静を保った後、(1)と同様の手順でウレタン麻酔下にてラット頭部を固定し、ボンベシン (1 nmol) を脳室内投与した (コントロール群には生理食塩水を投与した)。1 時間後、心臓より灌流固定し脳を摘出した。摘出した脳をクリオスタット (HM505E, Thermo Scientific) にて薄切した。FG で標識された PVN 脊髄投射性ニューロンが分布する領域 (Bregma -1.80 ~ -2.04 mm) を含む新鮮凍結切片を用いて、ヘモグロビン $\alpha$ 鎖とニューロン活性化のマーカーである Fos を免疫組織学的に蛍光二重染色した (Tanaka et al., Neuroscience, 2010; Auton Neurosci, 2012)。組織像を蛍光顕微鏡 (AX70, Olympus) および撮影装置 (DP70, Olympus) にて観察・撮影した。

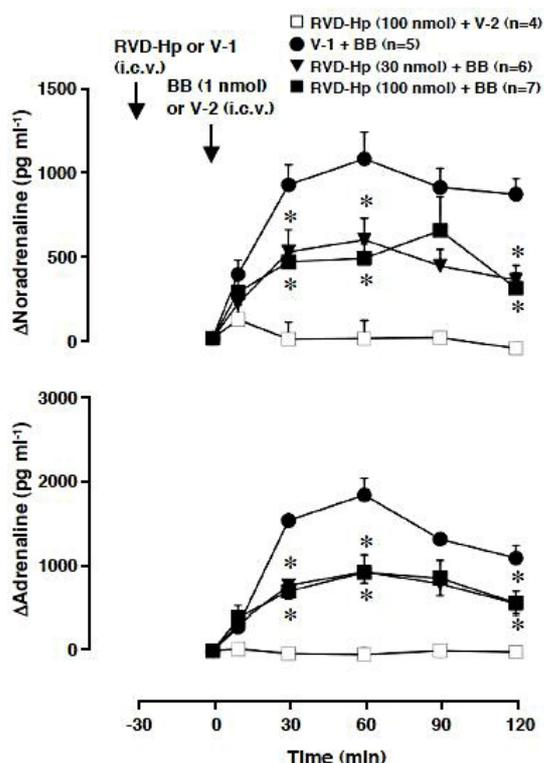
## 4. 研究成果

(1) SA 系に対するヘモプレシンの作用

ボンベシンのラット脳室内投与によって上昇した血中カテコールアミン濃度は、ヘモプレシン (脳室内投与) の前処置によって有意に抑制された (図 1)。このことからヘモプレシンがボンベシンによる SA 系の興奮を抑制する可能性が示された。

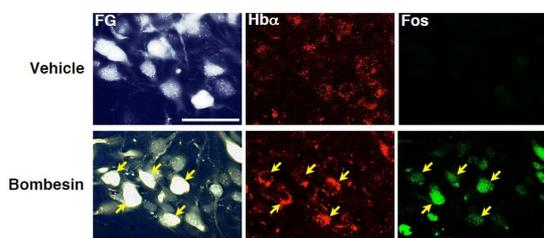
またリモナバント (180 nmol, 脳室内投与)

はヘモプレシン前処置によるボンベシン誘導性血中カテコールアミン上昇の抑制を阻害した。このことから、ヘモプレシンによるSA系賦活の抑制がCB<sub>1</sub>受容体を介したものであることが示唆された。



【図1】ボンベシン脳室内投与によるノルアドレナリン(上段)およびアドレナリン(下段)の血中濃度上昇に対するヘモプレシン(RVD-Hp)前処置の効果。(Tanaka et al., Br J Pharmacol 171, 202-213, 2014)

(2) PVNにおけるヘモグロビン $\alpha$ 鎖の検出  
ボンベシンのラット脳室内投与によって活性化されたPVNの脊髄投射性ニューロンにおいてヘモグロビン $\alpha$ 鎖の発現を認めた(図2)。このことからSA系の制御機構にPVNのヘモグロビン含有ニューロンが関わっている可能性が示唆された。



【図2】ボンベシン脳室内投与による脊髄投射性ヘモグロビン含有PVNニューロンの活性化。FG, Fluoro-Gold; Hb $\alpha$ , hemoglobin  $\alpha$ -chain. Scale bar = 50  $\mu$ m. (Tanaka et al., Br J Pharmacol 171, 202-213, 2014)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Shimizu T, Tanaka K, Shimizu S, Higashi Y, Yawata T, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Yuri K, Saito M: Possible inhibitory role of endogenous 2-arachidonoylglycerol as an endocannabinoid in ( $\pm$ )-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in the rat. Neuropharmacol, in press, 査読有, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.03.034

Tanaka K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Nakamura K, Taniuchi K, Dimitriadis F, Yokotani K, Saito M: Brain RVD-haemopressin, a haemoglobin-derived peptide, inhibits bombesin-induced central activation of adrenomedullary outflow in the rat. Br J Pharmacol 171: 202-213, 2014, 査読有, DOI: 10.1111/bph.12471

Tanaka K, Shimizu T, Higashi Y, Nakamura K, Taniuchi K, Dimitriadis F, Shimizu S, Yokotani K, Saito M: Central bombesin possibly induces S-nitrosylation of cyclooxygenase-1 in pre-sympathetic neurons of rat hypothalamic paraventricular nucleus. Life Sci 100: 85-96, 2014, 査読有, DOI: 10.1016/j.lfs.2014.01.079

Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Dimitriadis F, Shimizu S, Yokotani K, Saito M: Possible involvement of brain prostaglandin E2 and prostanoid EP3 receptors in prostaglandin E2 glycerol ester-induced activation of central sympathetic outflow in the rat. Neuropharmacol 82: 19-27, 2014 査読有, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.03.005

[学会発表](計9件)

Tanaka K, Yuri K: Expression of hemoglobin in presympathetic neurons of rat hypothalamic paraventricular nucleus with bombesin-induced activation. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015.3.21-23, 神戸国際会議場・展示場(兵庫)

Tanaka K, Shimizu T, Saito M, Yuri K: Centrally administered bombesin activates hemoglobin-containing pre-sympathetic neurons in rat hypothalamic paraventricular nucleus.

第 37 回日本神経科学大会, 2014.9.11-13,  
パシフィコ横浜 ( 神奈川 )

田中健二郎, 清水孝洋, 谷内恵介, 中村久美子, 横谷邦彦, 齊藤源顕: ボンベシン脳室内投与により活性化したラット視床下部室傍核前交感神経性ニューロンにおけるヘモグロビンおよびヘモグロビン由来ペプチドの発現. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014.3.19-21, 東北大学百周年記念会館川内萩ホール・仙台国際センター ( 仙台 )

## 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

### (2) 研究分担者

清水 孝洋 ( SHIMIZU, Takahiro )  
高知大学・教育研究部医療学系・准教授  
研究者番号 : 00363276

中村 久美子 ( NAKAMURA, Kumiko )  
高知大学・教育研究部医療学系・技術専門  
職員  
研究者番号 : 30398052