

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09331

研究課題名(和文) 室傍核におけるノルアドレナリン神経系 - CRF連関はストレス反応持続に関与するか？

研究課題名(英文) Is the connection between noradrenergic nervous system and CRF in the hypothalamic paraventricular nucleus involved in the sustained-stress responses?

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、交感神経系活性化を制御する脳部位の視床下部室傍核に投射するノルアドレナリン神経系およびストレス関連ペプチドCRFに焦点をあて、ストレス関連疾患の発症に繋がる持続的な交感神経系活性化をもたらす機序を検討した。拘束ストレス負荷ラットは、脳内CRF-1受容体およびノルアドレナリン神経系を活性化することによって、室傍核におけるアドレナリン受容体賦活およびプロスタノイド(PGE2およびTxB2)産生増加し、血中カテコールアミン(ノルアドレナリンおよびアドレナリン)を増加することが示唆された。さらに、プロスタノイド合成に関与するCOX2発現増加が、持続性ストレス応答に関与することが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスに曝露されると、心拍数や血圧の増加のような心血管系の反応、血中カテコールアミン値(ノルアドレナリンおよびアドレナリン)増加など様々な交感神経系反応が引き起こされる。この反応は一般的に一過性であるが、長期にわたって持続すると有害となり、消化性潰瘍、狭心症、あるいはうつ病といったストレス関連疾患が発症すると推測されている。持続的な交感神経系反応によるストレス関連疾患発症機序として、脳内ノルアドレナリン神経系の投射するPVNにおいて、CRFおよびプロスタノイドが誘導されることを見いだした。この実験成績は、うつ病をはじめとするストレス関連疾患の新たな治療法への開発へ繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the noradrenergic nervous system projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), an integrative output site for sympathetic homeostasis, and the stress-related peptide CRF to investigate the mechanisms for sustained sympathetic nervous system activity with regard to stress-related diseases. Restraint-stressed rats showed adrenergic receptor activation and increase in prostanoid (PGE2 and TxB2) production in the PVN by activating CRF-1 receptors and noradrenaline nervous system in the brain, resulting in the increase in blood levels of catecholamines (noradrenaline and adrenaline). Furthermore, it was speculated that the increased expression levels of COX2, a prostanoid synthesizing enzyme, is involved in the sustained-stress responses.

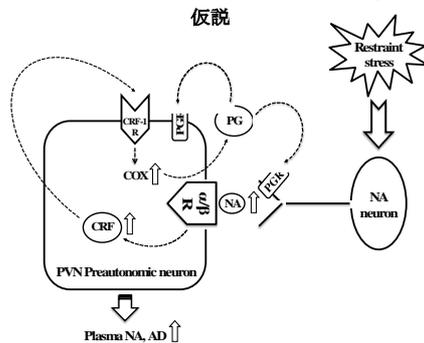
研究分野：神経科学

キーワード：ストレス ノルアドレナリン CRF 交感神経系 室傍核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

さまざまなストレス刺激は、脳幹部のノルアドレナリン (NA) 含有神経系を活性化させる。活性化した NA 含有神経系は、ストレス応答の出力中枢の一つである視床下部室傍核 (PVN) に投射し、当該神経核の もしくは アドレナリン受容体の賦活を介して、血中カテコラミン [ノルアドレナリン (NA) およびアドレナリン (AD)] 増加などのストレス反応を引き起こすと考えられている。一方、ストレス関連ペプチドである CRF は、発見当初は視床下部 下垂体 副腎皮質系ホルモンとして同定されたが、Brown ら⁽¹⁾により、中枢性に投与した CRF が血圧・心拍数上昇、血中カテコラミン増加などを引き起こすことが明らかにされ、CRF は脳内神経伝達物質としてストレスによる交感神経-副腎髄質系の賦活に関与することが示唆されている。しかし、NA 含有神経系が、脳内神経伝達物質としての CRF と関連して交感神経-副腎髄質系の持続的賦活に関与するか否か、そのシグナル伝達経路は不明である。我々はこれまでの麻酔ラットを用いた薬理的解析から⁽²⁾⁻⁽⁴⁾、CRF が脳内の CRF-1 受容体、シクロオキシゲナーゼ (COX)、視床下部室傍核 (PVN) のトロンボキサン A_2 (TxA₂) もしくはプロスタグランジン E_2 (PGE₂) を介して血中カテコラミンを増加させること、さらに CRF 投与によって活性化した PVN の preautonomic neuron 内における COX 1 および COX2 の発現増加⁽⁵⁾を明らかにしてきた。以上の実験成績から、CRF による血中カテコラミン持続性増加反応には、PVN の preautonomic neuron に局在する CRF-1 受容体およびその下流の COX の発現増加によって産生増強されるプロスタノイドが重要であると推測された。そこでラットに拘束ストレス (RS) を負荷し、血中カテコラミン増加反応に及ぼす CRF-1 受容体遮断薬 CP-154,526 の影響を検討したところ、血中カテコラミン増加が抑制されることを見出した。この実験成績は、ストレス時に内因性 CRF が脳内 CRF-1 受容体の賦活を介して血中カテコラミンを持続的に増加させることを示唆する。さらに最近我々は、PVN に α_1 もしくは アドレナリン受容体刺激薬を微量注入すると血中カテコラミンが増加することを報告した⁽⁶⁾。これらをまとめて、以下の仮説を考案した。すなわち、拘束ストレスによって活性化した PVN に投射する



NA 神経終末から遊離した NA が、PVN の preautonomic neuron に局在する もしくは 受容体 (/ R) を賦活し、神経伝達物質として CRF 遊離を亢進する。遊離した CRF は当該神経細胞の CRF-1 受容体 (CRF-1R) を賦活し、下流に局在すると予想される COX の活性化を介してプロスタノイド (PG) を産生する。産生増強されたプロスタノイドは、オータコイドとして近傍のプロスタノイド受容体 (PGR) に対して促進的に作用し、血中カテコラミン (NA および AD) 増加を持続させるという仮説を考えた (図)。

2. 研究の目的

本研究では、PVN の preautonomic neuron に投射する脳内 NA 含有神経系に着目し、ラット急性拘束ストレスモデルを用いて、PVN 内で (1) 拘束ストレスによって活性化する NA 神経系の作用発現に必須な もしくは アドレナリン受容体の賦活を介して CRF が遊離し、(2) 遊離した CRF が CRF-1 受容体の賦活を介してプロスタノイドを産生増強することによって、持続性のストレス反応を引き起こす可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 急性拘束ストレス負荷ラットの PVN における微量生体物質の脳マイクロダイアリシス法による解析 (岡田)

PVN の透析液中の NA 遊離量を指標にして、拘束ストレス負荷によって PVN に投射する NA 神経系が活性化するかを確認する。次に CRF およびプロスタノイド (PGE₂ および TxB₂: TxA₂ は半減期が短いので、安定代謝物の TxB₂ を測定する) の変化を調べる。拘束ストレス負荷の 1 週間前に、PVN にガイドカニューレを固定し、実験前日に鼠径動静脈に採血用および補液用のカニューレを留置する。拘束ストレスは 120 分間負荷する。

(2) PVN の preautonomic neuron における / アドレナリン受容体の形態学的解析 (山口)

既報に従って、逆行性色素 (フルオロゴールド) を胸髄の IML に微量注入し、PVN の preautonomic neuron を標識したラットを作製する。このラットの PVN における / アドレナリン受容体の発現を免疫組織化学法により形態学的に解析する。

(3) 急性拘束ストレスを負荷したラット PVN における微量生体物質の薬理的解析 (岡田・山口)

PVN 透析液中の NA 遊離、CRF 遊離、PGE₂ および TxB₂ 産生に及ぼす受容体遮断薬および酵素阻害

薬の影響を検討する。実験群にはダイアリシスプローブを介して、 α_1 / アドレナリン受容体遮断薬（フェントラミン/プロプラノロール）CRF-1 受容体遮断薬（CP-154,526）COX 阻害薬（インドメタシン）PGE₂ EP₃ 受容体遮断薬（L-798106）および TxA₂ 受容体遮断薬（SQ29548）を PVN に局所投与する。対照群には、生理食塩水を投与する。

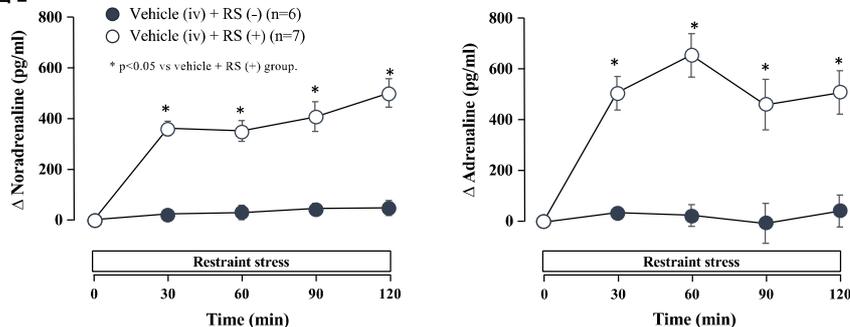
(4)急性拘束ストレスを負荷したラット PVN におけるストレス関連メディエーター分子の生化学的解析（岡田・山口）

PGE₂ および TxA₂ の合成酵素（COX 1、COX2、トロンボキサン合成酵素）およびその発現に関与すると予想される転写因子（NFκB、PPAR）のタンパク質発現レベルおよび mRNA レベルをウェスタンブロットングおよび定量 PCR によって調べる。さらに受容体遮断薬および酵素阻害薬を脳室内前投与の影響を調べる。実験には、室傍核を含む 500 μm のスライスから両側の室傍核をパンチアウトした試料を用いる。

4. 研究成果

(1) 急性拘束ストレス（Restraint stress）負荷ラットの血中カテコラミンレベルの解析および視床下部室傍核における微量生体物質の脳マイクロダイアリシス法による解析を行った。120 分間の急性拘束ストレス負荷により、血中カテコラミンレベルはノルアドレナリンおよびアドレ

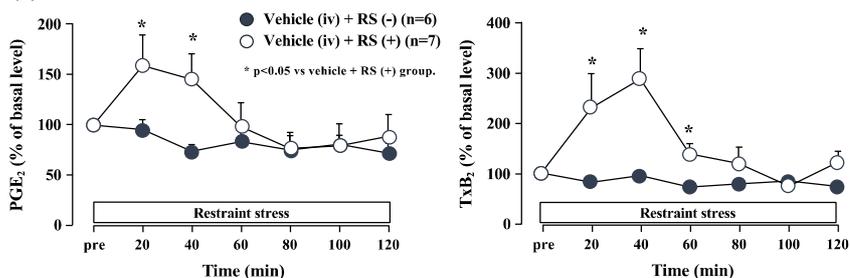
図 1



ナリンともに有意に上昇した（図 1：投稿準備中）。ノルアドレナリンに比べてアドレナリンがより優位に増加する傾向は、先行研究と一致し、拘束ストレス負荷条件が適切であることが示された。

さらに、急性拘束ストレスを負荷したラットの視床下部室傍核から経時的に透析液を採取し、質量分析法により透析液中の微量生体物質の同時一斉定量を行った。その結果、急性拘束ストレス負荷により室傍核における PGE₂ および TxB₂ 産生が有意に増加することを明らかにした（図 2：

図 2



投稿準備中）。拘束ストレス負荷によって PVN における内因性の PGE₂ および TxB₂ 増加を証明できたことは、これまでの麻酔下における薬理的解析を裏付けることになった。

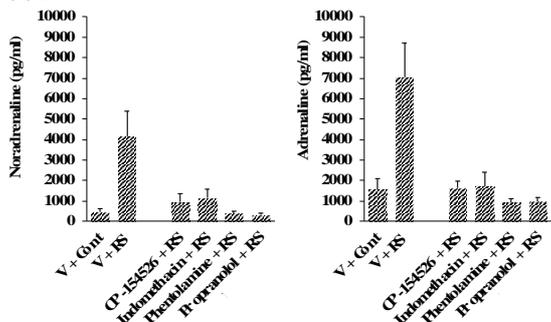
上記とは別に CRF サンプルング用のストレス負荷実験群を作製し、視床下部室傍核から経時的に透析液を採取した。これらの透析液中の CRF 含量については、30 年度、令和元年度にかけて継続して実験を行ったが、CRF の回収率の不安定性のために CRF の基礎レベル値が一定にならず、いったん中断した。今後検討を続ける予定である。

(2) 拘束負荷したラット PVN の preautonomic neuron における α_1 / アドレナリン受容体の発現動態の解析は、市販の抗 α_1 / アドレナリン受容体抗体の入手および染色性の条件検討に難渋した。しかし、これまでに脳室内投与した CRF による PVN における α_1 1B 受容体と Fos との共発現を多数確認しており、これらの実験成績を基にして、今後さらに検討を進める予定である。

(3) 平成 29 年度に得られた実験成績に基づいて、視床下部室傍核において、拘束ストレス負荷による血中カテコラミン増加に関与するシグナル伝達経路を明らかにするために、実験群（拘束ストレス負荷 + 薬物処置）および対照群（拘束ストレス負荷 + 薬物無処置、拘束ストレス負荷な

し + 薬物無処置) を作製し、各種受容体遮断薬および酵素阻害薬を用いて薬理的に解析した。当初はダイアリシスプローブを介して、各種受容体遮断薬もしくは酵素阻害薬をそれぞれ PVN に局所投与する予定であったが、まず全体像を把握するために、 / アドレナリン受容体遮断薬 (フェントラミン/プロプラノロール)、CRF-1 受容体遮断薬 (CP-154526)、COX 阻害薬 (インドメタシン) の脳室内前投与の影響を調べた。その結果、対照群 (生理食塩水) に比べて、これら薬物の脳室内前投与によって拘束ストレス負荷による血中カテコールアミン増加は全て有意

図 3



に抑制された (図 3: 投稿準備中)。この実験成績は、麻酔ラット脳室内投与した CRF による血中カテコラミン増加に関する CRF-1 受容体、 / アドレナリン受容体、COX からなるシグナル伝達経路が、拘束ストレス負荷したラット脳内においても作動している可能性を示唆する。今後は、これらの遮断薬を PVN に局所投与することによって、PVN におけるシグナル伝達経路の解析につなげる予定である。

(4) 6 時間拘束ストレス負荷した PVN の COX2 および PGE₂ 合成酵素 (mPGES-1) の mRNA レベルは増加した (投稿準備中)。誘導型酵素である COX2 および PGE₂ 合成酵素の mRNA レベルの増加が明らかになったことから、交感神経系の持続的ストレス反応の機序の一つとして、これら酵素の誘導が示唆された。さらに、転写因子 NFκB 阻害薬 PDTC を脳室内前投与しておくこと、拘束ストレス負荷によるこれらの mRNA レベル増加を抑制する傾向であることがわかり、さらに解析を進めている。また、パンチアウトしたサンプルからのウエスタンブロットによるタンパク質レベルの解析については、リプローブした内部標準 (アクチン) の検出は良好な再現性が得られたが、目的タンパク質の一次抗体についてはデータとするには未だ不十分な状況である。

【まとめ】既報に加え^{(2)~(6)}、3 年間にわたる実験成績を以下にまとめる。拘束ストレス負荷により遊離すると予想される内因性 CRF が PVN に投射する脳内 NA 含有神経系を活性化し、その終末から遊離した NA が室傍核に局在する もしくは 受容体を賦活することによって、血中 NA および AD を増加することが示唆された。この血中カテコラミン増加には、室傍核における もしくは アドレナリン受容体の下流のプロスタノイド産生シグナル系の活性化による PGE₂ および TxB₂ 産生の関与が示唆された。さらに、これらプロスタノイド合成酵素の転写因子である NF B が、COX2 および PGE₂ 合成酵素の mRNA 量を増加させることによって、持続性ストレス応答を引き起こす可能性が推察された。なお PVN における内因性 CRF 遊離の測定が今後の課題である。

< 引用文献 >

- (1) Brown et al., Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology*, 111(3), 1982, 928-931.
- (2) Okada et al., Brain phospholipase C and diacylglycerol lipase are involved in corticotropin-releasing hormone-induced sympatho-adrenomedullary outflow in rats. *Eur J Pharmacol.*, 475(1-3), 2003, 49-54.
- (3) Okada et al., Brain nuclear factor kappa B is involved in the corticotropin-releasing factor-induced central activation of sympatho-adrenomedullary outflow in rats. *Eur J Pharmacol.*, 584(1), 2008, 207-212.
- (4) Yamaguchi et al., Adrenal adrenaline- and noradrenaline-containing cells and celiac sympathetic ganglia are differentially controlled by centrally administered corticotropin-releasing factor and arginine-vasopressin in rats. *Eur J Pharmacol.*, 564(1-3), 2007, 94-102.
- (5) Yamaguchi and Okada, Cyclooxygenase-1 and -2 in spinally projecting neurons are involved in CRF-induced sympathetic activation. *Auton Neurosci.*, 151 (2), 2009. 82-89.
- (6) Okada and Yamaguchi, Possible role of adrenoceptors in the hypothalamic paraventricular nucleus in corticotropin-releasing factor-induced sympatho-adrenomedullary outflow in rats. *Auton Neurosci.*, 203, 2017, 74-80.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hagihara M, Kuroki Y, Ariyoshi T, Higashi S, Fukuda K, Yamashita R, Matsumoto A, Mori T, Mimura K, Yamaguchi N, Okada S, Nonogaki T, Ogawa T, Iwasaki K, Tomono S, Asai N, Koizumi Y, Oka K, Yamagishi Y, Takahashi M, Mikamo H.	4. 巻 23(1)
2. 論文標題 Clostridium butyricum Modulates the Microbiome to Protect Intestinal Barrier Function in Mice with Antibiotic-Induced Dysbiosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 31954979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.100772.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi N, Mimura K, Okada S.	4. 巻 863
2. 論文標題 Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype in the paraventricular hypothalamic nucleus mediates corticotropin-releasing factor-induced elevation of plasma noradrenaline levels in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 172693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2019.172693.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi N, Mimura K, Okada S.	4. 巻 848
2. 論文標題 GABAB receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate -adrenoceptor-induced elevations of plasma noradrenaline in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 88-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2019.01.029.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lin Y, Chen Y, Ukaji T, Okada S, Umezawa K.	4. 巻 72(3)
2. 論文標題 Isolation of ketomycin from Actinomycetes as an inhibitor of 2D and 3D cancer cell invasion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Antibiot (Tokyo).	6. 最初と最後の頁 148-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-018-0129-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shoshiro Okada, Masahiko Tachi, Naoko Yamaguchi.
2. 発表標題 Thromboxane A2 in the paraventricular nucleus of the hypothalamus participates in 2-deoxyglucose-induced sympathetic activation in freely moving rats.
3. 学会等名 Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2019). Chicago, IL, USA. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaguchi, Yoshihiko Kakinuma, Kaoru Mimura, Tomiko Yakura, Munekazu
2. 発表標題 Glucose infusion inhibits restraint stress-induced sympathetic activation in rats. Naok
3. 学会等名 Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2019). Chicago, IL, USA. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口奈緒子, 柿沼由彦, 三村郁, 矢倉富子, 内藤宗和, 岡田尚志郎
2. 発表標題 グルコース投与によるストレス誘導性交感神経系活性化の抑制 Glucose infusion inhibits restraint stress-induced sympathetic activation in rats.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学学会大会 (NEURO2019) (新潟)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田尚志郎
2. 発表標題 ストレスによる血中カテコールアミン遊離・分泌の中枢性調節
3. 学会等名 第84回日本温泉気候物理医学会 総会・学術集会 (岡山) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口奈緒子、三村郁、岡田尚志郎
2. 発表標題 プロスタグランジンE2は視床下部室傍核のEP3受容体サブタイプを介してCRFによる血中ノルアドレナリン増加を調節する
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaguchi N, Mimura K, Okada S.
2. 発表標題 GABAB receptor in the hypothalamic paraventricular nucleus mediates α -adrenoceptor activation-induced elevation of plasma noradrenaline in rats
3. 学会等名 第91回日本薬理学会年会 , 第18回国際薬理学・臨床薬理学会議(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoko Yamaguchi, Yoshihiko Kakinuma, Kaoru Mimura, Shoshiro Okada
2. 発表標題 Glucose infusion ameliorates restraint-stress elevation of plasma adrenaline levels and impairment of cardiac function in rats
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 編集 野村隆英、石川直久、梅村和夫 分担 中枢神経系作用薬	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 368
3. 書名 シンプル薬理学 改訂第6版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山口 奈緒子 (Yamaguch Naoko) (50380324)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	