

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590236

研究課題名（和文）

ストレス下での、神経ペプチド W、B の自律神経機能調節機構の解明

研究課題名（英文） Effects of Neuropeptide W, and B on autonomic nervous system

研究代表者

入鹿山 容子 (IRUKAYAMA YOKO)

筑波大学・分子行動科学研究コア・研究員

研究者番号：90312834

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規神経ペプチド W, B (NPW、NPB)、その受容体である NeuropeptideB/Wreceptor (NPBWR1) の、ストレス下での自律神経機能調節における役割について、NPBWR1 欠損マウスを用いて解析した。NPBWR1 欠損マウスは野生型マウスと比較して、尿中カテコールアミン量が増加していた。急性ストレス下での NPW-NPBWR1 系の役割を解明するため、ストレス負荷モデルを作成し、テレメトリーシステムを用いて、心拍数、行動量、体温を観察しながら NPBWR1 欠損マウス、野生型マウスに intruder (侵入者、C57/BL6J マウス) を 30 分間接触させ、内分泌系のホメオスタシスの攪乱を行った後、それらのパラメータの変化を比較した結果、野生型と比較して NPBWR1 欠損マウスは、心拍数の定常状態への回復が非常に遅いということが判明した。また、NPBWR1 欠損マウスでは心肥大程度が亢進していた。さらにアンジオテンシン II 投与による心肥大病態モデルを作成した場合においても、NPBWR1 欠損マウスは、野生型マウスと比較して有意に心肥大が悪化した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we analyzed of the neuropeptide W (NPW) its receptor (NPBWR1), in autonomic functional regulation under stress, using NPBWR1 deficient (*Npbwr1*^{-/-}) mice. The urinary catecholamines amount of *Npbwr1*^{-/-} mice was increased. To elucidate the role of NPW-NPBWR1 on acute stress, we created a stress model after having contact with the intruder, C57/BL6J mice for 30 minutes. We monitored heart rate, activity, and body temperature using a telemetry system. In *Npbwr1*^{-/-} mice, recovery to the steady state of the heart rate after contact with the intruder was very slow compared with wild type mice. In *Npbwr1*^{-/-} mice, cardiac hypertrophy was increased in comparison with wild-type mice. After administration of angiotensin II to *Npbwr1*^{-/-} mice, the cardiac hypertrophy deteriorated significantly as compared with wild-type mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,500,000 円	450,000 円	1,950,000 円
23 年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
24 年度	500,000 円	150,000 円	650,000 円
年度			
年度			
総計	3,400,000 円	1,020,000 円	4,420,000 円

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：生理活性、ストレス、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国では、社会生活からのストレスに起因するうつ状態や、食欲不振、不眠などの自律神経障害、免疫系の機能低下による感染症、心身症など様々な作業関連疾患の発症が問題となっている。このようなストレス反応は、主に視床下部に存在するストレスホルモンといわれる神経ペプチドによって制御されることが明らかとなっている。

今回我々は、神経ペプチドであるニューロペプチド W (NPW) /ニューロペプチド B (NPB) とその受容体 NPBWR1 に焦点をあてて、ストレス下での内分泌・神経系の関連的応答についての研究を行った。NPBWR1 及び NPBWR2 は、オピオイド・ソマトスタチン様受容体として、ヒトのゲノム DNA からクローニングされた。NPBWR1 及び NPBWR2 は、ヌクレオチドレベルで 70%、アミノ酸レベルで 64%の相同性を持つ。両受容体の相同分子種は霊長類の数種で単離されているが、げっ歯類において NPBWR2 は確認されていない。近年、これら両受容体の内在性リガンドとして、NPW と NPB が同定された。これらの神経ペプチド NPB、NPW は、Edinger-Westphal 核、腹側被蓋野、背側縫線核、青斑核等に発現が見られ、含有神経は扁桃体に投射している。また、NPBWR1 は、扁桃体中心核に局在していることが報告され、これらのペプチド-受容体系が感情の制御やストレス反応に関連していると考えられている。また、手術侵襲ストレス下では、NPBmRNA の発現が増加し、コルチコトロピン放出因子 (CRF) を介して食欲の抑制に作用していることがわかった。これらのことからストレス下において、NPB-NPBWR1 系は、コルチコステロンの分泌亢進や交感神経トーンを上昇させることによりストレスに対処していることが予想される。また、NPB と NPW の受容体である NPBWR1 は、扁桃体中心核に局在し、情動の形成に重要な役割を持つことが、遺伝子改変マウスの解析により明らかになりつつある。さらに、ヒトでも NPBWR1 と NPBWR2 の機能を一塩基多型の遺伝子解析を通じて分析し、情動形成や性格との関連を明らかにするための研究が進んでいる。ヒト NPBWR1 には、A404T というアミノ酸置換 (Y135F) を伴 SNP が、ヒト NPBWR2 にはアミノ酸置換 (Q206R) を伴う SNP (A617G) が存在する。それらのアリアルをヘテロでもつ被験者は、NPBWR1 で約一割、NPBWR2 で二割と判明している。これら一塩基多型を持つ人を対象として、表情認知タスクにおける脳機能の

違いを fMRI と行動実験を用いて検討した結果、顕著な違いが判明している。

2. 研究の目的

ストレス下での NPW による自律神経制御に関する役割を解明することを本研究の目的とした。そのために NPBWR1 欠損マウスを用いてストレス下で自律神経パラメータを野生型マウスと比較検討し、心肥大病態との関連性について検討した。

3. 研究の方法

I. NPBWR1 欠損マウスを用いた、ストレスによる自律神経系制御の評価 急性ストレスに対する自律神経系制御の評価

定常状態での NPBWR1 欠損マウス、野生型の尿を 24 時間蓄尿し、尿中カテコールアミンの量を調べる。

ストレス下での NPW/B-NPBWR1 系の役割を解明するためストレス負荷モデルを作成する。具体的には、テレメトリーを用いて血圧、心拍数、行動量、体温を観察しながら NPBWR1 欠損マウス、野生型マウスに intruder (侵入者、C57/BL6J マウス) を 30 分間接触させ、内分泌系のホメオスタシスの攪乱を行った後、それらのパラメータの変化を比較する。マウスに急性、あるいは慢性的にストレス (侵入者と接触) を負荷した場合の心拍数、行動量、体温を測定する。

NPBWR1 欠損マウス、野生型マウスで定常状態の心電図をテレメトリーにて測定し心電図の変化を比較する。さらに一定期間負荷をかけた場合の心電図を比較し、R 波間隔などを観察し自律神経制御における役割を解明する。

II. NPBWR1 欠損マウスを用いた NPB/NPW 系の心・血管系に対する作用の評価 心肥大モデルでの評価

NPBWR1 欠損マウスと野生型マウスに 14 日間、浸透圧ミニポンプにてアンジオテンシン II を持続投与したのち、血圧、心拍数を測定する。心肥大の状態は心エコーにて解析したのち、左心室重量、組織学的所見 (ヘマトキシリン-エオジン、マッソントリクローム染色) を観察する。同様に組織から total RNA

を調整し、心肥大マーカーであるミオシン重鎖サブタイプ発現変動を定量PCRにて調べる。NPBWR1欠損マウス、野生型それぞれのマウスでの、尿中カテコールアミンの濃度を調べる。

4. 研究成果

NPBWR1欠損マウスにおける、24時間蓄尿中カテコールアミン量、定常状態での血圧、心拍数、体温を測定した。NPBWR1欠損マウスの24時間の尿中ノルアドレナリン値は、野生型マウスに比べて有意に高かった(325 ng/24h vs. 222 ng/24h) (Fig. 1)。また、NPBWR1欠損マウスは、野生型と比較して収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、心拍数には差はなかった。一方、NPBWR1欠損マウスは、特にオスにおいて、野生型と比較して顕著に体重の増加が認められるとともに(27.7g vs. 28.9g; 12週令)、左心室重量の増加が観察された(114mg vs. 132mg) (TABLE. 1)。さらに、NPBWR1欠損マウスと野生型マウスの心機能をエコーにて評価した結果、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室後壁厚、駆出率等に有意な差はなかった(TABLE. 1)。

また、NPBWR1は扁桃体に存在することから、不安や恐怖といった感情を行動や自律神経系の反応と結びつける、扁桃体から脳幹、視床下部への出力系(CRH系など)に対して、NPBWR1が抑制性の役割を担っていると推測される。急性ストレス下でのNPW-NPBWR1系の役割を解明するため、ストレス負荷モデルを作成し、テレメトリーシステムを用いて、心拍数、行動量、体温を観察しながらNPBWR1欠損マウス、野生型マウスにintruder(侵入者、C57/BL6Jマウス)を30分間接触させ、内分泌系のホメオスタシスの攪乱を行った後、それらのパラメータの変化を比較した結果、野生型と比較してNPBWR1欠損マウスは、心拍数の定常状態への回復が有意に遅いということが判明した。

(intruderとの接触2時間後の心拍数の増加率; WT:112.9±70.7%, N=5, NPBWR1欠損マウス:125.1±69.5%, N=6, p<0.05, intruderとの接触3時間後の心拍数の増加率; WT:104.5±24.7%, N=5, NPBWR1欠損マウス:114.6±58.8%, N=6, p<0.05) (Fig. 2)。さらにテレメトリーによる血圧の測定からR波間隔の周波数解析を行った結果、NPBWR1欠損マウスではR波間隔が短い傾向が観察され、間接的に交感神経有意な状態にあることが判明した。また、麻酔下でマウスの腎血管支配の交感神経を単離して、交感神経活動を直接測定する方法を確立したが、NPBWR1欠損マウスを用いた解析まではできなかった。今後、このマウスの交感神経活動を測定していく予定である。

また、NPBWR1欠損マウスと野生型マウスに、アンジオテンシンIIを14日間インフュージョンすることにより、交感神経活動亢進を模

倣したモデルを作成し、血圧、心拍数を測定した結果、NPBWR1欠損マウスで、有意な収縮期血圧、左心室重量の増加(TABLE. 2)が認められた。さらに、心肥大マーカーであるミオシン重鎖サブタイプ発現変動を定量PCRにて調べた結果、NPBWR1欠損マウスで発現が増加している傾向がみられた。これらのことから、NPBWR1欠損マウスは野生型と比較して、正常状態で自律神経系の亢進が観察され、さらにアンジオテンシンII負荷により、心肥大が悪化する傾向がみられることが判明した(TABLE. 2)。今後、自律神経系亢進による心肥大との関連性について、詳しく検討していく予定である。

Fig.1 定常状態での24時間尿中カテコールアミン量

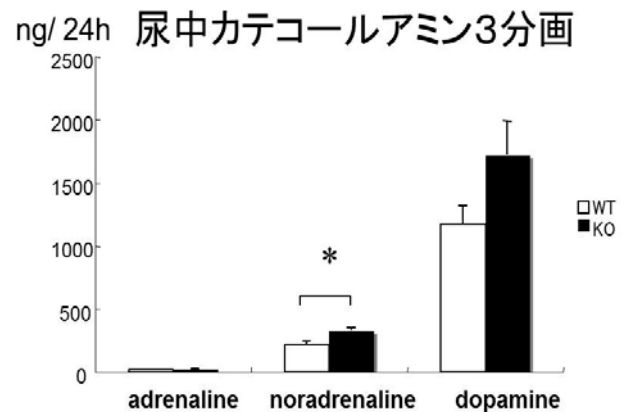


TABLE 1. Gravimetric Data and In Vivo Cardiac Function of NPBWR1KO Mice at Basal Condition

	WT	NPBWR1KO
BW (g)	27.7 ± 0.4	28.9 ± 0.2*
Systolic BP (mmHg)	106.3 ± 2.0	102.9 ± 3.6
Diastolic BP (mmHg)	72.8 ± 3.6	70.3 ± 3.8
Mean BP (mmHg)	81.9 ± 3.2	81.9 ± 3.2
HR	635.9 ± 31.9	626.6 ± 31.9
HW (mg)	114.3 ± 3.4	131.9 ± 6.0*
LWV (mg)	90.1 ± 2.3	105.1 ± 4.7*
HW/BW (mg/g)	4.13 ± 0.1	4.32 ± 0.2
LWV/BW (mg/g)	3.25 ± 0.1	3.55 ± 0.1
Echocardiography		
LVEDD (mm)	2.93 ± 0.1	2.40 ± 0.7
LVEED (mm)	1.36 ± 0.1	1.24 ± 0.4
LVESD (mm)	53.45 ± 2.6	49.10 ± 12.8
FS (%)	88.8 ± 1.7	85.57 ± 22.1
EF (%)	0.85 ± 0.1	0.96 ± 0.2
PWT (mm)		

Data were analyzed by ANOVA Bonferroni test and are reported as mean ± SE (n=6). BW indicates body weight; BP, blood pressure; HR, heart rate; HW, heart weight; LWV, left ventricular weight; LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVESD, left ventricular fractional shortening; IVS, interventricular septum; and PWT, posterior wall.

Fig.2 侵入者接触後の心拍数の変化 (%)

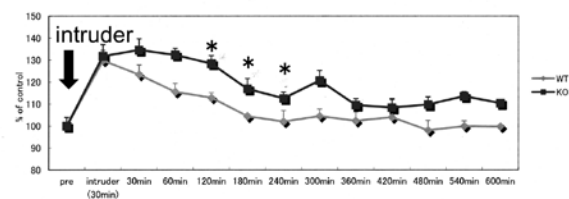


TABLE.2 アンジオテンシン II による左室肥大の比較

	Left ventricle (μm)
WT saline	9.3 ± 0.3 (n=7)
KO saline	10.3 ± 0.21 (n=7) *
WT All infusion	10.7 ± 0.88 (n=4)
KO All infusion	11.5 ± 0.78 (n=6)

* $P < 0.05$ vs. WT saline

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 2 件)

① Noriya Watanabe, Mari Wada, Yoko Irukayama-Tomobe, Yousuke Ogata, Natsuko Tujino, Mika Suzuki, Naoki Furutani, Takeshi Sakurai, and Masashi Yanagisawa et. A Single Nucleotide Polymorphism of the Neuropeptide B/W receptor-1 Gene Influences the Evaluation of Facial Expressions *PLoS ONE* Vol. 7 issue 4, 1-10, DOI: 10.1371, 2012. (査読あり)

② Ruby Nagata-Kuroiwa, Naoki Furutani, Junko Hara, Mari Hondo, Makoto Ishii, Tomomi Abe, Michihiro Mieda, Natsuko Tsujino, Toshiyuki Motoike, Yuchio Yanagawa, Tomoyuki Kuwaki, Miyuki Yamamoto, Masashi Yanagisawa, and Takeshi Sakurai. Critical role of neuropeptide B/W receptor 1 signaling in social behavior and fear memory. *PLoS ONE* Vol.6 1-12, DOI: 10.1371, 2011. (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入鹿山 容子 (IRUKAYAMA YOKO)
筑波大学・分子行動科学研究コア・研究員
研究者番号：90312834

(2) 研究分担者

村越 伸行 (MURAKOSHI NOBUYUKI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：80447218

櫻井 武 (SAKURAI TAKESHI) (22 年度の
み)

金沢大学・医学系・教授
研究者番号：60251055