

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791182

研究課題名(和文) GLP-1による中枢性交感神経系賦活における孤束核ノルアドレナリン神経系の役割

研究課題名(英文) Role of noradrenergic neurons in GLP-1-induced central sympathetic outflow

研究代表者

山本 雅樹 (YAMAMOTO, MASAKI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20571037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、シクロオキシゲナーゼ阻害薬を用いて、麻酔ラット脳室内に投与したGlucagon-like peptide-1(GLP-1)が、脳内プロスタノイド依存性に血中カテコラミンを増加させることを明らかにしてきた。本研究では脳室内投与したGLP-1による血中カテコラミン増加機構に、視床下部室傍核における内因性のプロスタノイドの産生が関与するかどうかを、脳マイクロダイアリシス法にLC/MS/MS法を組み合わせたプロスタノイド一斉分析測定系を用いて検証した。GLP-1は、視床下部室傍核灌流液中のTxB₂、PGE₂およびPGF₂を増加させたが、PGD₂および15d-PGJ₂は変化しなかった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we used liquid chromatography ion trap tandem mass spectrometry (LC-ITMSn) to simultaneously quantify four prostanoids, thromboxane (Tx) B₂, PGE₂, PGD₂ and 15-deoxy- Δ 12,14 (15d)-PGJ₂ in PVN microdialysates from urethane-anesthetized rats. The quantification limits were estimated to be 0.05 ng/mL for TxB₂, 0.025 ng/mL for PGE₂, 0.1 ng/mL for PGD₂, and 0.5 ng/mL for 15d-PGJ₂. The RSD% obtained from all prostanoids was <15%, indicating an acceptable level of reproducibility. LC-ITMSn analysis of rat PVN microdialysates revealed that TxA₂ may play an important role in adrenomedullary outflow evoked by centrally administered N-methyl-D-aspartate, corticotrophin-releasing factor and glucagon-like peptide-1. This is the first study to use LC-ITMSn to analyze prostanoid levels in rat PVN microdialysates. This LC-ITMSn method will be useful for investigating the potential involvement of prostanoids in brain function.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：GLP-1 トロンボキサンA₂ 1アドレノセプター Fos 視床下部室傍核 LC/MS/MS

1. 研究開始当初の背景

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、当初腸管粘膜のL細胞から遊離されるペプチドホルモンとして同定され、特異的GLP-1受容体 (GLP-1R) を介して、グルコース依存的インスリン分泌亢進、グルカゴン分泌抑制などに関与すると考えられている。このことからGLP-1R刺激薬はII型糖尿病の治療薬として有望視され、既にGLP-1分解酵素阻害薬が実用化されている。しかしGLP-1は中枢神経系にも存在することが知られており、脳内GLP-1産生細胞が延髄弧束核尾側に局在し、弧束核からの上行性GLP-1含有神経線維およびGLP-1Rは、視床下部をはじめ視床、大脳皮質にわたり広範囲に分布することがすでに明らかにされている。これらの知見をもとに、ラット脳室内投与したGLP-1が血圧、脈拍数を増加させ、自律神経機能調節に関与すると考えられている視床下部室傍核においてc-Fos発現を誘導することなどが報告されている。申請者らの研究室でも、脳室内投与したGLP-1が脳内プロスタノイド依存性に血中カテコラミンを増加させること (中枢性交感神経系賦活) を既に報告している。従ってGLP-1は脳内においてはホルモンとしてではなく神経伝達物質/神経伝達調節因子として作用し、自律神経系機能を調節すると推測されるが、これらGLP-1の作用とプロスタノイドのような脳内生理活性物質との相互作用に関する詳細な作用機序についてはいまだ明らかではない。一方、申請者の研究室のAraiらは、ウレタン麻酔したラット脳室内に投与したGLP-1による血中カテコラミン (ノルアドレナリンおよびアドレナリン) 増加が、シクロオキシゲナーゼ阻害薬インドメタシン脳室内前投与により消失し、さらに血中アドレナリン増加のみが、トロンボキサン合成酵素阻害薬フレグレイトおよびトロンボキサン受容体 (+)S-145前処置によって抑制されると報告している。しかし、脳室内投与したGLP-1による血中カテコラミン増加に、視床下部室傍核の内因性プロスタノイドが関与するか否かは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究ではストレス応答制御中枢の一つである視床下部室傍核に焦点をあて、脳内GLP-1による血中カテコラミン増加機構に当該部位における内因性プロスタノイドが関与するか否かを、またあわせて、さらに古典的伝達物質の関与を明らかにするために、以下の実験を行う。ウレタン麻酔したラット脳室内に微量投与したGLP-1が、視床下部室傍核において内因性プロスタノイド (PGE₂, TxA₂, PGF₂α, PGI₂) および神経伝達物質 (5-HT, GABA, グルタミン酸, ACh) 遊離を促進するか否かを脳マイクロダイアリシス法とLC-MS法を組み合わせることによって一斉分析する。なおポジティブコントロールとしてNMDAおよびCRFも検討する。

3. 研究の方法

In vivo microdialysis 実験は既報 (Neuroscience, 2000) に従ってウレタン麻酔下 (1.0 g/kg, i.p.) に行う。ウイスター系雄性ラット (体重 約300g) の鼠径動静脈にカニキュレを留置する。鼠径動脈からは経時的に採血し、鼠径静脈へは生理食塩水を注入する (1.2 ml/時間)。ラットを脳定位に固定しPVNにマイクロダイアリシスプローブ (直径 220 μm, 膜長 1mm) を挿入する。ダイアリシスプローブを毎分 2 μl の流速で灌流し、3時間静置する。GLP-1は脳室内 (5 μl) に投与する。灌流液は20分ごとに回収し (40 μl)、内因性プロスタノイド (PGE₂, TxA₂, PGF₂α) 用および神経伝達物質用に20 μlずつ分注して-80℃で、分析まで保存した。灌流液中の内因性プロスタノイド (PGE₂, TxA₂, PGF₂α) および神経伝達物質 (セロトニン, GABA, グルタミン酸, ACh) は、有機溶媒抽出し、減圧乾固したのち、LC/MS/MS法によって分析定量した。血漿カテコラミンは、アルミナ抽出した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて電気化学的に測定した。

4. 研究成果

(1) 検量線と再現性

各プロスタノイドの検量線はTXB₂: 0.05-1 ng/mL, PGE₂: 0.02-0.4 ng/mL, PGD₂: 0.1-2 ng/mL, 15-deoxy-PGJ₂: 0.2-4 の濃度範囲において相関係数はいずれも0.997以上であり、良好な直線性が得られた。

Table 1
Linearities and limits of quantification for the analyzed standard prostanoids.

Prostanoids	Slope ^a	Intercept ^a	Linear range (ng/mL)	r ²	LOQ (ng/mL)
TxB ₂	2.46 ± 0.270	0.002 ± 0.027	0.05-1	0.999	0.05
PGE ₂	7.43 ± 0.774	-0.031 ± 0.027	0.02-0.4	0.998	0.025
PGD ₂	0.928 ± 0.165	-0.031 ± 0.020	0.1-2	0.999	0.1
15d-PGJ ₂	0.926 ± 0.125	-0.081 ± 0.054	0.2-4	0.997	0.5

^a Values are expressed as the mean ± S.D. (n = 5).

(2) 標準品プロスタノイドのクロマトグラム

標準品プロスタノイドはいずれも良好な分離を示した。

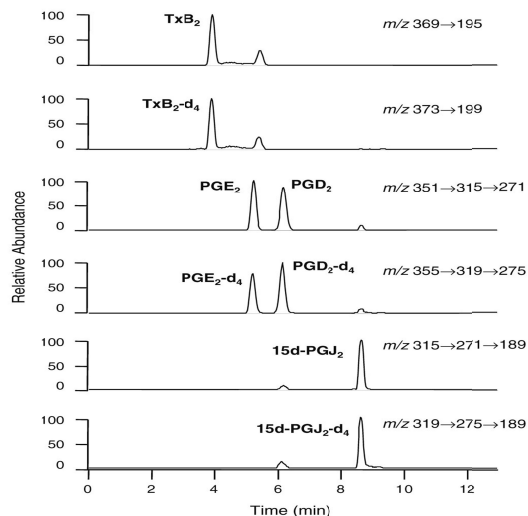


Fig. 1. Reconstructed ion chromatograms for standard prostanoids, TxB₂, PGE₂, PGD₂ and 15d-PGJ₂ and their internal standards from LC-ITMS analysis.

(3) 回収率

各プロスタノイドの回収率を求めた(n=6)。回収率が94.3-103%、変動係数が3.7-14.8%と良好な結果であった。

Table 2
Precision (RSD%) and accuracy (RE%) of the LC-ITMS² method for the analysis of prostanoids in sterile Ringer's solution.

Prostanoids	Fortified concentration (pg/ml)	Intra-day		Inter-day			
		Measured concentration (pg/ml) ^a	RSD (%)	RE (%)	Measured concentration (pg/ml) ^a	RSD (%)	RE (%)
TxB ₂	100	101 ± 150	148	1.0	993 ± 12.0	12.7	-0.7
	200	202 ± 144	7.1	1.0	204 ± 14.6	7.2	1.5
	500	489 ± 322	6.6	-2.2	509 ± 25.7	5.1	1.8
PGE ₂	40	37.7 ± 5.3	13.9	-5.7	41.0 ± 3.8	9.1	2.5
	80	80.0 ± 4.8	6.0	0.0	79.5 ± 4.5	5.7	-0.6
	200	196 ± 18.9	5.0	-3.0	198 ± 12.2	3.6	-1.0
PGD ₂	200	194 ± 23.9	12.3	-3.2	200 ± 15.3	9.6	0.0
	400	394 ± 34.4	8.7	-1.5	400 ± 20.1	5.0	0.0
	1000	988 ± 36.9	3.7	-1.2	962 ± 60.9	6.3	-3.9
15d-PGJ ₂	400	394 ± 48.6	12.3	-1.6	415 ± 33.7	12.9	3.8
	800	793 ± 86.2	8.4	-0.9	771 ± 79.3	10.3	-3.6
	2000	2070 ± 95.9	4.7	3.3	2090 ± 114	5.5	4.6

^a Values are expressed as the mean ± S.D. (n = 6).

(4) ポジティブコントロールとして、視床下部に 1.5 mM NMDA を局所投与した場合の、灌流液中のプロスタノイドの黒間とグラムを示す。TXB₂ (m/z 369 → m/z 195)、PGE₂ および PGD₂² (m/z_{1,351} → m/z 315 → m/z² 271)、15-deoxy-PGJ₂ は m/z 315 → m/z 271 → m/z 189) をモニターイオンとして選択した。標準品同様、分離は良好であった。

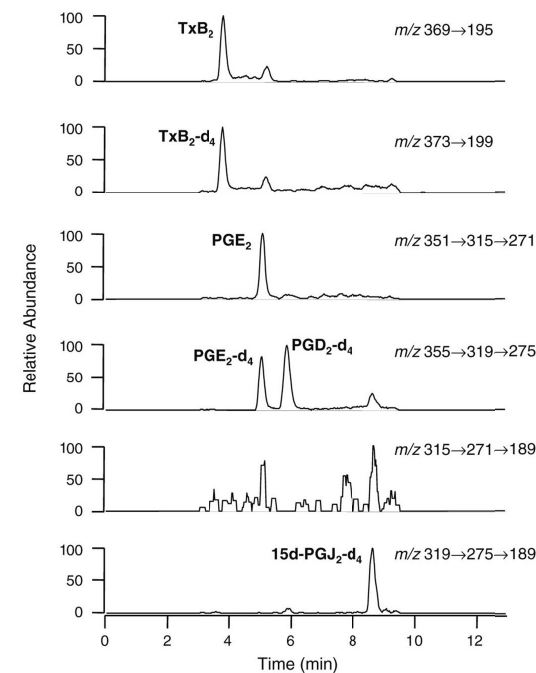


Fig. 2. Reconstructed ion chromatograms for prostanoids from LC-ITMS analysis of PVN microdialysates 60 min after 1.5 mM NMDA perfusion. The peaks of TxB₂ and PGE₂ are clearly visible.

(5) 脳室内投与した CRF (A) および GLP-1 (B) は視床下部室傍核の TxB₂ を増加させた。

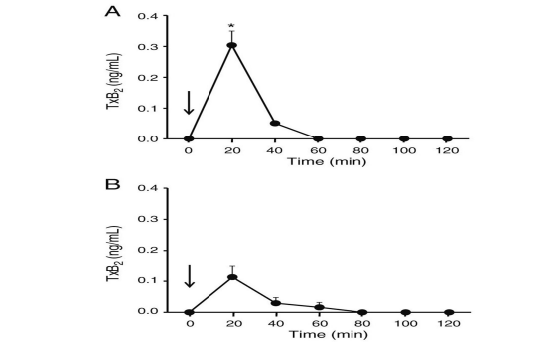
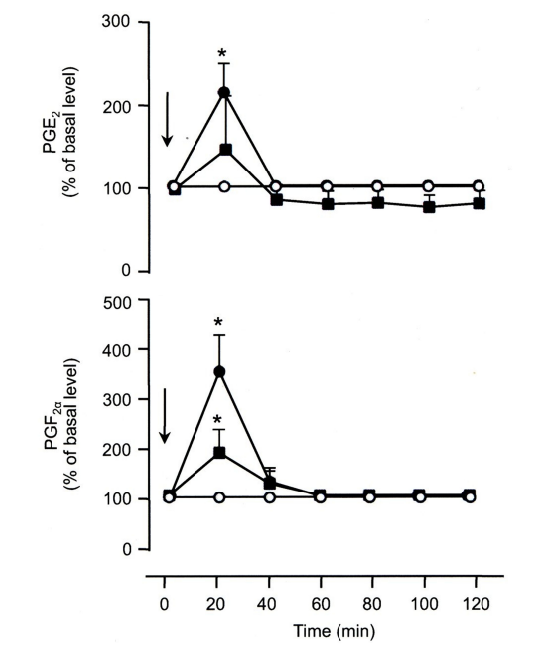
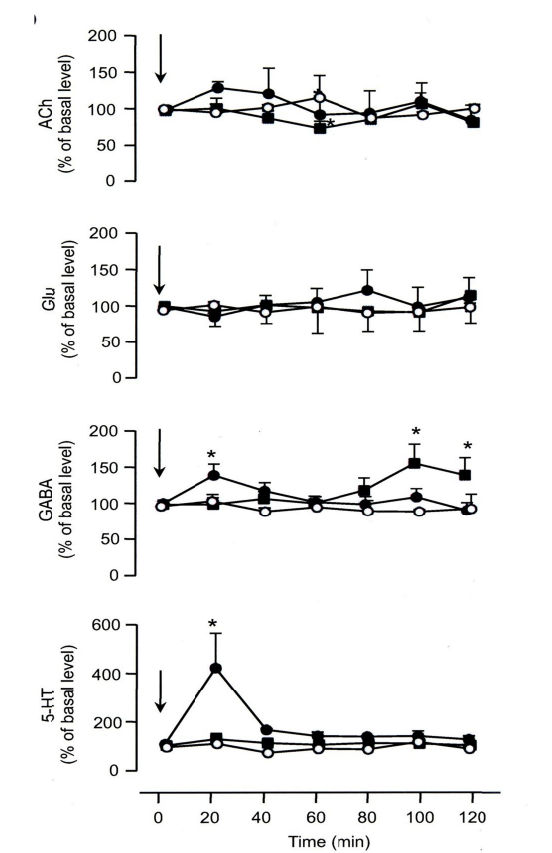


Fig. 4. Effects of centrally administered CRF and GLP-1 on microdialysate TxB₂ levels. (A) CRF and (B) GLP-1 were intracerebroventricularly administered. Arrow indicates the administration of CRF (1.5 nmol/animal) in A and GLP-1 (3 nmol/animal) in B. Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 3). *Significantly different (P < 0.05) from the respective vehicle-treated controls.

(6) 脳室内投与した CRF および GLP-1 は視床下部室傍核の PGE₂ および PGF_{2α} を増加させた。(○) vehicle (Ringer's solution); (●) CRF; (■) GLP-1. Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n=3).



(7) 脳室内投与した CRF は視床下部室傍核の GABA および 5-HT を増加させたが、GLP-1 は変化を及ぼさなかった。(○) vehicle (Ringer's solution); (●) CRF; (■) GLP-1. Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n=3).



以上の実験成績から、脳室内投与した GLP-1 は視床下部室傍核灌流液中のプロスタノイド TxB_2 、 PGE_2 および $\text{PGF}_{2\alpha}$ を増加させたが、神経伝達物質の 5-HT、GABA、グルタミン酸、ACh の遊離には影響を与えなかった。今後は、マイクロダイアリシスおよび LCM/MS/MS を組み合わせた本測定系を用いて、自由行動下のラットにおける視床下部室傍核の生理活性物質の変動について検討を加える予定である。

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 1 件)

田村 玲子, 満田 直美, 石原 正行, 山本 雅樹, 佐藤 哲也, 高杉 尚志, 細川 卓利, 久川 浩章, 藤枝 幹也, 脇口 宏, 浜田 文彦. 腎血管性高血圧を合併した神経線維腫症 1 型の乳児例. 小児高血圧研究会誌. 査読有. 2012. 9, 1, 58-62.

[学会発表](計 8 件)

浦木 諒, 大石 拓, 満田 直美, 山本 雅樹, 堂野 純孝, 藤枝 幹也. 気管支喘息と鑑別を要した 2 症例. 第 65 回中国四国小児科学会. 2013 年 11 月 2 日. 鳥取県米子市(米子コンベンションセンター)

大石 拓, 菊地 広朗, 満田 直美, 玉城 涉, 山本 雅樹, 佐藤 哲也, 堂野 純孝, 久川 浩章, 藤枝 幹也. 喘息発作のために入院を要した児の発作誘発因子についての検討. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013 年 5 月 11 日. 神奈川県横浜市(パシフィコ横浜)

大石 拓, 菊地 広朗, 満田 直美, 玉城 涉, 山本 雅樹, 佐藤 哲也, 堂野 純孝, 久川 浩章, 藤枝 幹也. 喘息発作のために入院を要した児の発作誘発因子についての検討 感染症を中心に. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 2013 年 4 月 20 日. 広島市(広島国際会議場)

山本 雅樹, 玉城 涉, 松下 憲司, 佐藤 哲也, 久川 浩章, 堂野 純孝, 満田 直美, 大石 拓, 菊地 広朗, 藤枝 幹也. 心筋症を合併したミトコンドリア呼吸鎖異常症の姉妹例. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 2013 年 4 月 19 日. 広島市(広島国際会議場)

山本 雅樹, 山田 修, 黒寄 健一, 津田 悦子, 大内 秀雄, 宮田 茂樹. 肺血栓塞栓症(PTE) \ 深部静脈血栓症(DVT) にヘパリン起因性血小板減少症(HIT) を合併した小児例. 第 19 回日本小児肺循環器研究会. 2013 年 2 月 2 日. 東京都港区(笹川記念会館)

Masayuki Ishihara, Yusuke Kitamura, Masaki Yamamoto, Mariko Araki, Hisashi

Takasugi, Sumitaka Dohno, Mikiya Fujieda, Hiroshi Wakiguchi, Kenichiro Miura, Takashi Igarashi. A case of distal renal tubular acidosis with bilateral renal calcification in a 1-month-old infant. 第 10 回日韓小児腎臓病セミナー 2012. 2012 年 5 月 12 日. 東京都千代田区(駿河台日本大学病院 3 階講堂)

藤枝 幹也, 唐澤 里江, 高杉 尚志, 山本 雅樹, 片岡 功一, 遊道 和雄, 脇口 宏. 川崎病における抗 Peroxiredoxin2(Prx2) 抗体の存在と意義. 第 115 回日本小児科学会学術集会. 2012 年 4 月 22 日. 福岡市(福岡国際会議場・福岡サンパレス&ホール)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅樹 (YAMAMOTO, MASAKI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 20571037