

氏名(国籍)	張 ^{ちゃん} 赫 ^{ひよく} 起 ^き (韓国)		
学位の種類	博士(体育科学)		
学位記番号	博甲第4453号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	ストレス時のACTH分泌における脳内Orexin 2 Receptorの関与		
主査	筑波大学教授	学術博士	西平賀昭
副査	筑波大学助教授	医学博士	征矢英昭
副査	筑波大学助教授	医学博士	大森肇
副査	筑波大学助教授	医学博士	徳山薫平

論文の内容の要旨

(目的)

本博士論文では、ストレス時の血中 ACTH 分泌応答の HPA 軸（視床下部-下垂体-副腎軸）調節機構において、オレキシン神経の作用を担う受容体（OX1R と OX2R）のうち OX2-RA の関与を明らかにするため、以下の5つの課題を検討した。（課題1）OX-A 誘発性 ACTH 分泌応答における OX-2R の関与、（課題2）遊泳運動ストレス時の脳内オレキシン神経の活性度、（課題3）遊泳運動ストレス時の血中 ACTH 分泌における OX-2R の関与、（課題4）走運動ストレス時の脳内オレキシン神経の活性度、（課題5）走運動ストレス時の血中 ACTH 分泌応答に及ぼす OX-2R の関与。

(対象と方法)

実験には9週齢の Wistar 系雄ラット（埼玉実験動物供給所：250～300g）を用いた。ラットには実験動物用固形飼料（オリエンタル酵母工業社）と蒸留水を自由に与えた。07：00～19：00 を明期とする明暗サイクルで、室温 22±1℃、湿度 60±10% に調節した環境で飼育した。飼育期間中には体重変化を測定すると共に、ハンドリングを行った。研究課題1, 3, 5では実験に入る前に一週間の予備飼育を経て側脳室内カニューレーションと外頸静脈カニューレーションを行った。一方、研究課題1ではラットを対照群（saline and vehicle）および異なる濃度での OX-2RA 前投与群（0, 0.1 or 1μg/10μl）の5群に分け、いずれのラットにも OX2-RA 投与10分後に OX-A（1nmol）を ICV 投与した。採血は投与10分後に行い、得られた血液は遠心分離により血漿を分離し、RIA を用いて血漿中（以下血中）ACTH 濃度を測定した。

研究課題2では、ラットに35～37℃の水槽（40×46；水深×内径）で10分間の遊泳ストレスを負荷した。遊泳ストレス負荷終了後、ラットはケージに戻し、90分後に灌流固定を施した。固定後、脳を摘出して-80℃で保存した。凍結した脳はクリオスタット（Zeiss社製、505E、ドイツ）を用いて40μmの前額断切片を作成し免疫組織化学染色法を用いてオレキシンおよびc-Fosを可視化した。

研究課題3では、手術の回復後、中性温（35～37℃）の水槽（40×46；水深×内径）で10分間の遊泳ストレスを負荷した。ACTH分泌の変化を調べるために遊泳ストレス前後に採血し、遠心分離させた血漿か

ら RIA（放射免疫測定法）を用いて血中 ACTH 濃度を測定した。

研究課題 4 では、LT 強度を基準として、LT 以下と以上の強度で 30 分間のトレッドミル走運動を行わせ、研究課題 2 と同様な分析を行った。

研究課題 5 では、vehicle と OX2-RA の 0.1 あるいは 1 μ g/10 μ l をラットの脳室内に投与し、その 10 分後から研究課題 4 と同様に走運動を開始させ、運動開始後 10、30 分の時点で採血を行った。血液サンプルから血中乳酸、血糖、血中 ACTH 濃度を測定した。

（結果）

研究課題 1：OX-A 誘発性血中 ACTH 分泌応答における OX-2R の関与

OX-A 誘発性の血中 ACTH 分泌応答は濃度依存的に抑制された。最大抑制率は 1 μ g の OX2-RA の濃度で有意な減弱が認められた。

研究課題 2：遊泳ストレス時における脳内オレキシン神経の活性化

遊泳ストレス時に有意な蓄積増加がみられ、遊泳ストレスによる視床下部外側野のオレキシン神経の活性化が明らかとなった。

研究課題 3：遊泳ストレス誘発性血中 ACTH 分泌応答における OX-2R の関与

10 分間の遊泳ストレス誘発性の血中 ACTH 分泌応答は OX2-RA の ICV 前投与により有意に減弱させた。

研究課題 4：走運動ストレス時の脳内オレキシン神経の活性化

LT 以上の走運動ストレス時に有意な蓄積増加がみられ、走運動ストレスによる視床下部外側野のオレキシン神経の活性化が明らかとなった。

研究課題 5：走運動ストレス誘発性血中 ACTH 分泌応答における OX-2R の関与

走運動ストレス誘発性 ACTH 分泌応答は OX2-RA の ICV 前投与により濃度依存的に減弱し、1 μ g の OX2-RA 濃度で有意な減弱を示した。

（考察）

本研究では、ストレス誘発性の血中 ACTH 分泌の脳内調節機構における OX-2R の関与を明らかにすることを目的にした。そのために、本研究では OX2-RA を用い、意識下のラットで生化学的な効果を検証する *in vivo* 研究を行った。これまで、OX-2R の脳内分布を示すいくつかの研究において、OX-2R がストレス反応の最終共通経路として知られる視床下部室傍核（PVN）に多く局在することから、ストレス時の血中 ACTH 分泌応答は PVN 近傍の OX-2R を介して行われる可能性が以前から示唆されてきた。しかし、直接的な証拠を示す研究はなく、いまだ決着をみない。そこで本研究により、OX-1R と OX-2R の両受容体に同じ親和性をもつ OX-A、ならびに、OX-A・OX-B 共に活性化するストレスに着目、それらにより惹起される血中 ACTH 分泌応答に対する OX-2R の役割を明らかにした。OX-A は OX-1R と OX-2R との親和性がほぼ同一であることや、OX-B より OX-2R に対する親和性が若干高い（EC₅₀ OX-A = 34nm, EC₅₀ OX-B = 60nm）ため、本研究では OX-A による ACTH 分泌応答に及ぼす OX-2R の関与を調べた。一方、ストレスは OX-A 再び OX-B も活性するため両受容体に同等の親和性をもつ OX-A の使用が必須と考えたからでもある。その結果、OX2-RA の前投与により OX-A 誘発性の血中 ACTH 濃度は、OX-A 濃度依存的に減弱させた。また、遊泳・走運動ストレス誘発性の血中 ACTH 分泌応答にも OX-2R の関与することも明らかとなった。

本研究では、遊泳・走運動がラットにおいて脳内のオレキシン神経を活性化させると共に、OX-A・遊泳・走運動誘発性の ACTH も OX-2R を一部介することが明らかとなった。オレキシンは CRH だけではなく、AVP の上昇にも関わっている。一方、遊泳ストレスは脳内 CRH、走運動ストレスは脳内 AVP の関与が大

きいことも知られている。したがって、本博士論文の結果は、CRH 調節型遊泳ストレスも、AVP 調節型走運動ストレス (Alexander et al., 1991 ; Smoak et al., 1991 ; Soya, 2001) も、共に、OX-2R による促進効果を受けることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本博士論文は、脳内オレキシン作用を担う受容体 (OX-1R と OX-2R) のうち OX-2R が、OX-A による血中 ACTH 分泌応答に一部関与すること、さらに遊泳及び走運動ストレスに対する血中 ACTH 分泌応答にも一部関与することを初めて明らかにした点で独自性が高い。すなわち、運動時のパフォーマンス発揮やエネルギー調節の一部が脳内オレキシンシステム、とりわけ OX-2R を介して行われる可能性が示唆され、運動時のストレス反応を担う脳機構の一端を示すだけでなく、オレキシンの新たな生理作用を示す知見として評価できる。

よって、著者は博士 (体育科学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。