

研究課題名	アナフィラキシー低血圧時の交感神経興奮を惹起する脳内機構の全容解明
フリガナ	タニダ マモル
代表者名	谷田 守
所属機関（機関名） （役職名）	金沢医科大学 医学部 生理学Ⅱ講座 准教授
本助成金による 発表論文、学会発表	<p>発表論文</p> <p>1, Kuda Y#, Tanida M#*, Chen F, Kurata Y, Shibamoto T. Anaphylaxis stimulates afferent vagal nerve activity and efferent sympathetic nerve activity in the stomach of anesthetized rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2019 Aug 1;317(2):R337-R345. # equal contribution, * Corresponding author</p> <p>2, Tanida M*, Zhang T, Sun L, Song J, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Shibamoto T. Anaphylactic hypotension causes renal and adrenal sympathoexcitation and induces c-fos in the hypothalamus and medulla oblongata. Exp Physiol. 2018 Jun;103(6):790-806. * Corresponding author</p> <p>学会発表</p> <p>1, Mamoru Tanida, Sympathetic regulation in anaphylactic shock or feeding suppression. The 9th FOPS 2019, Kobe, Japan March 29</p> <p>2, 谷田 守、アナフィラキシーショック時の交感神経調節機構、第 33 回日本 shock 学会総会シンポジウム、東京、2018 年 6 月</p>

研究結果要約

アナフィラキシーが惹起されると、低血圧や呼吸困難など重篤な状態へ発症することが多い為、迅速に対応できる治療法の開発が急務である。我々の先行研究において、ラットを卵白アルブミンで感作させて抗原投与でアナフィラキシーを惹起させると交感神経腎臓枝と腰椎枝が活性化することを見出している。交感神経系の調節機構として、脳・延髄の神経核（弧束核-延髄腹外側部）を經由する動脈圧受容器反射経路や、自律神経調節部位や脳・視床下部が存在するが、アナフィラキシー時に脳内でどのような調節経路が関与しているかよくわかっていない。そこで、本研究はラットにおいてアナフィラキシー低血圧時における交感神経系制御機構を明確にすることを目的に、脳内での神経連絡網を同定することを試みた。

その結果、脳内の視床下部室傍核、延髄孤束核、吻側延髄腹側野及び尾側延髄腹側野における c-fos 陽性細胞数が増大していた。さらに延髄 GABA シグナルやカテコラミンニューロンなどの関与

も認めた。今後は、視床下部と延髄の連絡経路をより詳細に同定することや分子経路の探索を行うことで、アナフィラキシーによる交感神経活性化作用の脳内機構の全貌を明らかにすることが期待される。

研究目的

アナフィラキシーは、免疫グロブリン E (IgE) に依存した過敏反応が多く、食物、薬品、麻酔薬等の物質に対して反応する。食物や食品添加物によるアナフィラキシーや食物アレルギーにおいては、抗原暴露から 30 分程度でアナフィラキシーが惹起され、重篤な状態へ発症することが多い為、迅速に対応できる治療法の開発が急務である⁽¹⁾。

アナフィラキシーによる主たる死因は低血圧や呼吸困難で、我々の先行研究においても、卵白アルブミンで感作させたラットに抗原を投与すると、アナフィラキシー低血圧による交感神経活動の増大が引き起こされる^(2,3,4)。特に我々は、ラットにアナフィラキシーを惹起すると、腎臓を支配する交感神経系が興奮することや⁽²⁾、マウスではアナフィラキシー時には腎臓交感神経が初期で低下して後期に増大する二相性の反応の存在を見出した⁽⁵⁾。動物種差が存在するが、アナフィラキシー低血圧を回復させる為には、交感神経系を活性化させ、循環血液量増大を促すことが有効である。

交感神経系の調節機構として、脳・延髄の神経核（弧束核-延髄腹外側部）を経由する動脈圧受容器反射が存在するが、我々の研究から麻酔下ではラットではなくてマウスのアナフィラキシー低血圧時の交感神経興奮作用に動脈圧受容器が関与することがわかった⁽⁵⁾。従って、アナフィラキシー低血圧時に増大する腎臓交感神経活動反応を惹起する経路として動脈圧受容器反射に関与する脳・延髄での神経連絡が考えられるが、詳細な作用経路については、よくわかっていない。そこで本研究では、アナフィラキシー低血圧時における交感神経系制御機構を明確にすることを目的に、脳内での神経連絡網を同定する。具体的には、脳・延髄での神経回路網の確立を基盤として、視床下部-延髄の連絡網の解明に着手する。これらの研究成果は、食物によるアナフィラキシー低血圧の予防・治療法の開発に応用することが可能である。

研究計画及び研究手法

アナフィラキシー低血圧における腎臓交感神経の調節機構において、延髄の交感神経制御ニューロンの基盤確立と視床下部-延髄連絡網の解明を目的とする。具体的には以下の 2 点について生理学的及び神経解剖学的に検討する。また、胃機能に関する自律神経-脳内機序の解析も行った。

実験 1, アナフィラキシー低血圧時における動脈圧受容器反射の延髄神経核の役割

動物実験により、免疫組織化学染色法と *in vivo* 電気生理実験法を用いて以下の 2 つの実験を想定して研究を進めて、予備検討より覚醒下ラットでの実験を行う。

a) 延髄の動脈圧受容器反射を調節する神経核で機能するニューロンの組織学的同定

これまでの研究よりラットのアナフィラキシー低血圧で延髄弧束核の (NTS)、吻側延髄腹側野 (RVLM) 及び尾側延髄腹側野 (CVLM) の *c-fos* 陽性細胞が増えることが分かっている (データ未発表)。この *c-fos* 陽性細胞について、動脈圧受容器反射に関与するカテコラミンニューロン⁽⁶⁾、GABA ニューロン、又はグルタミン酸含有ニューロン、以上の 3 つのニューロンの内、*c-fos* 陽性細胞が共局在しているか免疫組織化学染色法で検討する。

b) 延髄神経核で機能するニューロンを電気生理学的に解析する

実験 1-a) でアナフィラキシー低血圧時に延髄神経核 (NTS, RVLM, CVLM) で発現するニューロンを明確にしている為、該当する神経核へ神経伝達物質受容体阻害剤 (GABA とグルタミン酸の場合) を微量投与した際にラットのアナフィラキシー低血圧による腎臓交感神経活動増大反応が減弱するか検討する。またカテコラミンニューロンの場合は、カテコラミン合成酵素の *sh-RNA* を組み合わせたアデノ随伴ウイルスを該当神経核へ導入してカテコラミンニューロンノックダウンラットを作製して、同様にアナフィラキシー低血圧による腎臓交感神経活動増大反応を観察する。

実験 2, アナフィラキシー低血圧時における視床下部神経核と延髄神経核との神経連絡網の解明

視床下部には、腎臓交感神経活動の調節に関与する神経核として、弓状核 (ARC)、室傍核 (PVN)、背内側核 (DMH) が存在しており⁽⁷⁾、先行研究でラットのアナフィラキシーで PVN の *c-fos* 陽性細胞が増大することがわかっているが⁽⁸⁾、本研究では、ラットを用いて PVN 以外の神経核での *c-fos* 発現についても検討する。次にアナフィラキシー低血圧で *c-fos* 陽性細胞が増えた視床下部神経核について、実験 1 で明らかにする延髄の神経核との連絡網を明確にするために、ラットの延髄神経核 (NTS) に逆行性神経トレーサーを微量注入して、アナフィラキシー低血圧による交感神経興奮時の視床下部神経核と延髄神経との神経連絡を組織学的に明らかにする。

実験 3, 胃自律神経へのアナフィラキシーの影響と動脈圧受容器反射経路(計画から外れて実施)

我々の先行研究から、卵白アルブミンで感作したラットに抗原を投与してアナフィラキシー低血圧を惹起すると胃内圧亢進、胃排出遅延及び胃動脈血管収縮が観察されている (6)。そこで、この反応に胃自律神経系が関与するか確認するために、以下の実験を行った。

a) 胃交感神経遠心路、胃迷走神経遠心路へ及ぼすアナフィラキシー低血圧の影響について、麻酔下ラットで解析する。

b) 胃交感神経切除ラット又は胃迷走神経ラットを作製して、アナフィラキシー低血圧による胃機能反応が消失するか解析する。

結果と考察

【結果】

実験 1, アナフィラキシー低血圧時における動脈圧受容器反射の延髄神経核の役割

a) 延髄の動脈圧受容器反射を調節する神経核で機能するニューロンの組織学的同定

①麻酔下において卵白アルブミンで感作したラットに卵白アルブミンを投与したラットでアナフィラキシー低血圧を惹起して腎臓交感神経活動増大と低血圧が確認された。その際の延髄の神経核である NTS, CVLM, RVLM における c-fos 陽性細胞数がコントロールラットと比較して増大した。

②アナフィラキシー低血圧時に確認された延髄 NTS で増大する c-fos 陽性細胞を GABA 合成酵素である GAD69 抗体で二重免疫化学染色すると、共局在していた。

③アナフィラキシー低血圧時に確認された延髄 RVLM で増大する c-fos 陽性細胞をカテコラミン合成酵素である tyrosine hydroxylase 抗体で二重免疫化学染色すると、共局在していた。

④アナフィラキシー低血圧時に確認された延髄 RVLM と CVLM で増大する c-fos 陽性細胞をグルタミン作動性神経マーカーである vGluT1 抗体で二重免疫染色を行ったが、vGluT1 抗体陽性細胞の検出ができなかった。従って、c-fos 陽性細胞が vGluT1 陽性細胞と共局在しているか解析できなかった。

b) 延髄神経核で機能するニューロンを電気生理学的に解析する

実験 a) から延髄孤束核での GABA シグナルの重要性が示唆されたことから、GABA-A 受容体である muscimol を NTS の投射先である CVLM へ微量注入する実験を行った。しなしながら、領域が非常に狭い CVLM への微量投与が適切に実施できなかった為、延髄 NTS から CVLM への GABA シグナルがアナフィラキシー低血圧時の交感神経増大作用に果たす役割については明確にできなかった。また、RVLM へのカテコラミン合成酵素の sh-RNA を組み合わせたアデノ随伴ウイルス微量投与実験においても、同様に、領域が非常に狭い RVLM への微量投与が適切に実施できなかった為、RVLM におけるカテコラミンシグナルがアナフィラキシー低血圧時の交感神経増大作用に果たす役割については明確にできなかった。

実験 2, アナフィラキシー低血圧時における視床下部神経核と延髄神経核との神経連絡網の解明

本研究では、麻酔下ラットにおいて、卵白アルブミンで感作したラットに卵白アルブミンを投与したラットでアナフィラキシー低血圧を惹起して腎臓交感神経活動増大と低血圧が確認された。そ

の際の視床下部の神経核での c-fos 陽性細胞の発現は PVN のみにて有意に増大しており、他の神経核である ARC, DMH, VMH での c-fos 陽性細胞数はコントロールラットと同じ程度であった。さらに、延髄神経核との神経連絡を確認するために、NTS に逆行性神経トレーサーを注入したところ、NTS への注入に成功したラットが 2 匹/5 匹中のみにて成功しており、1 匹中 2 匹のラットで逆行性神経トレーサー陽性細胞と PVN での c-fos 陽性細胞が共局在していた。

実験 3, 胃自律神経へのアナフィラキシーの影響と動脈圧受容器反射経路(計画から外れて実施)

アナフィラキシー低血圧時に胃の遠心性交感神経活動が増大したが、遠心性迷走神経は変化しなかった。交感神経切除はアナフィラキシーによる胃排出の減少反応を抑制したが、血管抵抗増大反応には影響を及ぼさなかった。迷走神経切除はアナフィラキシーによる胃機能変化に影響を及ぼさなかった。

【考察】

実験 1, アナフィラキシー低血圧時における動脈圧受容器反射の延髄神経核の役割

本研究において、ラットアナフィラキシー低血圧時に脳・延髄で神経活動が変化する部位を免疫化学染色法で解析したところ、延髄 NTS における GABA ニューロンと RVLM におけるカテコラミンニューロンが活性化することがわかった。これらの神経核は動脈圧受容器反射経路のみならず、交感神経腎臓枝や血圧を調節する神経核であるため、アナフィラキシー低血圧時に惹起される交感神経遠心路活性化は、延髄の神経核を介する調節機構が存在することを示唆している。

一方で、この仮説をさらに検討するために、NTS から CVLM への GABA シグナルや RVLM におけるカテコラミンニューロンの役割を阻害剤投与やウイルス導入による RNA 干渉法で検討を行ったが、いずれも実験条件が不安定かつ正確に標的神経核に注入することができなかった。今後は、実験方法を見直して、微量注入装置(nano ject)導入による神経核への注入方法の再検討を行うことや、遺伝子組換えマウスを導入して、Cre-loxp システムにより標的領域特異的遺伝子欠損マウスを導入することも視野に入れて今後の実験を推し進める必要が考えられる。

実験 2, アナフィラキシー低血圧時における視床下部神経核と延髄神経核との神経連絡網の解明

本研究において、自律神経経路の調節部位である視床下部の神経核について、ラットアナフィラキシー低血圧時に変化する部位を同定したところ、ARC, DMH, VMH では c-fos 陽性細胞が変化しなかったが、PVN において c-fos 陽性細胞が有意に増大した。PVN における交感神経調節機構については我々の先行研究においても示唆しており⁹⁾、この実験データから、ラットアナフィラキシー低血圧時では、視床下部 PVN と延髄経路を介して交感神経遠心路が活性化されることを示唆してい

る。また、PVNにはCRHニューロン、オキシトシンニューロン、AVPニューロン、TRHニューロンなどが局在しており、どのニューロンのc-fos陽性細胞が増えているかについては、明らかにできなかった。しかしながら、我々の先行研究において、ラットアナフィラキシー低血圧時には、血中バソプレシンが上昇することを報告している⁽¹⁰⁾。従って、PVNで増大したc-fos陽性細胞はAVPニューロンである可能性が高いが、今後更なる解析を行う必要がある。

延髄神経核であるNTSと視床下部PVNとの神経連絡について、逆行性神経トレーサーをNTSに注入したラットでアナフィラキシー低血圧を惹起した際のPVNでのc-fos陽性細胞と共局在するか免疫組織化学手法で解析を行った結果、1匹のみアナフィラキシー低血圧時にPVNのc-fos陽性細胞とNTSからの逆行性トレーサーが共局在していた。このことから、アナフィラキシー低血圧時の交感神経活性化の脳内経路に視床下部PVN-延髄NTS経路が関与している可能性を見出した。しかしながら、アナフィラキシー低血圧時に活性化する延髄RVLMやCVLMと視床下部との連絡はよくわかっておらず、今後さらなる研究が必要になる。

実験3, 胃自律神経へのアナフィラキシーの影響と動脈圧受容器反射経路(計画から外れて実施)

本研究では、アナフィラキシー低血圧時に惹起される胃機能変化(胃内圧亢進、胃排出遅延、及び胃血管収縮)に自律神経系がどのように関与するか解析を行った。その結果、アナフィラキシー低血圧時には胃迷走神経遠心路は変化せず、胃交感神経遠心路が増大した。さらに、胃交感神経切除はアナフィラキシーによる胃排出遅延を減弱した。これらの実験事実はアナフィラキシー低血圧時の胃排出遅延作用には交感神経系が関与している可能性が考えられる。一方で、アナフィラキシー時には、肥満細胞の脱顆粒に伴うヒスタミン、セロトニン、インターロイキンなどのサイトカインが放出される。これらの物質がアナフィラキシーによる胃内圧亢進作用や胃血管収縮作用に関与している可能性があるため、今後更なる解析が必要になる。

本研究で得られた成果は「Experimental Physiology」「Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.」に投稿論文として受理されている。今後はさらにデータを取得して可能な限り国際誌に発表する。

今後の研究活動について

ラットアナフィラキシー低血圧時に交感神経活性化を惹起させる脳内機構について解析を行ったところ、脳内で活性化される部位の同定と神経連絡路の同定を行った。主に免疫組織学的解析と電気生理学的解析による検討であったが、今後は脳内神経核に存在する神経細胞について、分子生物学的解析による神経細胞内カスケードの探索や視床下部-延髄の神経核における神経連絡解析をさらに発展する必要があると考えている。具体的には、視床下部PVNの細胞内シグナル経路と延髄

NTS のシグナル経路の全容を明らかにして、どのような分子機序で交感神経活性化が惹起されるかについて解析を行う必要がある。

また、実験方法として高精度のラット脳内標的部位への薬液微量注入法を確立する必要がある。今後は、微量注入用の機器導入を含めてさらなる改善を見込んでいる。

参考文献

- 1) Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Bock SA, Schmitt C, et al., Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol* 2005 115:584-91.
- 2) Sun L, Tanida M, Wang M, Kuda Y, Kurata Y, Shibamoto T. Effects of anesthetics on the renal sympathetic response to anaphylactic hypotension in rats. *PLoS One*. 2014 Nov 25;9(11):e113945
- 3) Song J, Tanida M, Shibamoto T, Zhang T, Wang M, Kuda Y, Kurata Y. The Role of Lumbar Sympathetic Nerves in Regulation of Blood Flow to Skeletal Muscle during Anaphylactic Hypotension in Anesthetized Rats. *PLoS One*. 2016 Mar 21;11(3):e0150882.
- 4) Wang M, Tanida M, Shibamoto T, Kurata Y. Alpha-adrenoceptor antagonists and chemical sympathectomy exacerbate anaphylaxis-induced hypotension, but not portal hypertension, in anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Oct 15;305(8):R900-7.
- 5) Zhang T, Tanida M, Uchida K, Suzuki Y, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Tominaga M, Shibamoto T. Mouse Anaphylactic Hypotension Is Characterized by Initial Baroreflex Independent Renal Sympathoinhibition Followed by Sustained Renal Sympathoexcitation. *Front Physiol*. 2017 Sep 7;8:669.
- 6) Kuda Y, Shibamoto T, Zhang T, Yang W, Tanida M, Kurata Y. Gastric vascular and motor responses to anaphylactic hypotension in anesthetized rats, in comparison to those with hemorrhagic or vasodilator-induced hypotension. *J Physiol Sci*. 2018 May;68(3):253-260.
- 7) Hall ME, do Carmo JM, da Silva AA, Juncos LA, Wang Z, Hall JE. Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014 Feb 18;7:75-88.
- 8) Castex N, Fioramonti J, Fargeas MJ, Bueno L., c-fos expression in specific rat brain nuclei after intestinal anaphylaxis: involvement of 5-HT₃ receptors and vagal afferent fibers. *Brain Res*. 1995 Aug 7;688(1-2):149-60.
- 9) Tanida M, Gotoh H, Yamamoto N, Wang M, Kuda Y, Kurata Y, Mori M, Shibamoto T. Hypothalamic Nesfatin-1 Stimulates Sympathetic Nerve Activity via Hypothalamic ERK Signaling. *Diabetes*. 2015 Nov;64(11):3725-36.

10) Wang M, Shibamoto T, Kuda Y, Sun L, Tanida M, Kurata Y. Angiotensin II and vasopressin are involved in the defense system against anaphylactic hypotension in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* 2014 May 15;731:38-43.

以上