

副腎髄質における P2X₄ 受容体を介した Brain-derived neurotrophic factor の発現と TrkB の役割

杉山 弘 起

神奈川歯科大学大学院環境病理学講座

(指導：槻木恵一教授)

(受付：2014年1月7日)

緒 言

脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, 以下 BDNF) は神経成長因子やニューロトロフィン-3-4/5, -6, -7などを含むニューロトロフィンファミリーに属しており, 主に中枢神経系に発現し, 神経細胞の生存, 分化維持, 保護に重要な役割を果たしている¹⁾。BDNFはチロシン受容体キナーゼと P75 ニューロトロフィン受容体に結合し, 特に Tyrosine receptor kinase B (以下 TrkB) に高親和性を示している²⁾。TrkBは肝臓のクッパー細胞, 副腎を含む内分泌系, 中枢神経と末梢神経の両方に発現しており³⁾, BDNFが結合した TrkBは, 受容体の二量体化し, リン酸化することで細胞内チロシンキナーゼの活性化を促している。これらの過程では多くの細胞内シグナル伝達カスケードが誘起することで, 生物学的反応を引き起こす⁴⁾。しかし, 神経系以外における BDNF と TrkB の相互作用は十分に理解されていない。

BDNFは, うつ状態⁵⁾ 統合失調症⁶⁾, アルツハイマー⁷⁾, パーキンソン病⁸⁾などの精神疾患に関わっており, 中枢神経系の BDNF 量の変化は神経疾患の発病に重要な役割を果たしている^{9,10)}。

また, BDNF と TrkB の相互作用の例として, 急性拘束ストレスは海馬の BDNF 量を減らし¹¹⁾, さらに, 脳下垂体の TrkB の量を減らす¹²⁾。

我々は以前, BDNF の発現は急性ストレス時のラットの唾液腺で増加し¹³⁾, そして咀嚼により海馬の BDNF レベルが上昇することを報告した¹⁴⁾。このことにより, BDNF は末梢組織のストレスにより発現増加し, ストレスに対する生理活性応答に関与していることが明らかとなった。

過去の研究から以下の事が明らかとなっている。体内のストレス応答は, 視床下部-下垂体-副腎軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA 軸) および交感神経-副腎髄質軸 (sympathetic-adrenal-medullary axis, SAM 軸) の活性化により誘発される^{15,16)}。Cannon が提唱するところによると, 副腎髄質を経由する SAM 軸の活性化は「闘争と逃走の神経」に影響を与えることが知られている^{17,18)}。副腎髄質は交感神経節が分化してできた内分泌器官であり, 交感神経系と密接に関わっている¹⁸⁾。ストレスへの応答として, 副腎髄質から放出したカテコラミンは α 受容体, β 受容体に結合し, 全身の代謝率の増加を引き起こす^{19,20)}。例えば, α 受容体の活性化は血管収縮の効果をもち, β 受容体活性化は心拍出量の増加をおこす。肝臓では α 受容体と β 受容体 (またはそのいずれか) がグリコーゲンの低下経路で高血糖を引き起こす^{21,22,23)}。

著者らは以前, 生体外のリコンビナント BDNF の刺激により, クロマフィン細胞由来の PC12 からカテコラミンが放出される事を報告した²⁴⁾ (Fig. 1)。また, ラットに急性拘束ストレス負荷後における副腎髄質のクロマフィン細胞から, タンパクレベルと TrkB の mRNA の著しい増加を示すことを実証した²⁴⁾ (Fig. 1)。しかし, 急性拘束ストレス後の副腎髄質において, 体内のカテコラミン放出時における TrkB 発現の役割に関してはまだ解明されていない。そこで, 著者らは急性拘束ストレス下の副腎髄質 TrkB の発現と役割, および BDNF の発現と局在を調査した。さらに著者らは, 副腎髄質内のストレス反応に対する BDNF と TrkB の相互作用を検討した。

近年, グリア細胞のうちミクログリアでは, Adenosine 5'-triphosphate (以下 ATP) で刺激することで

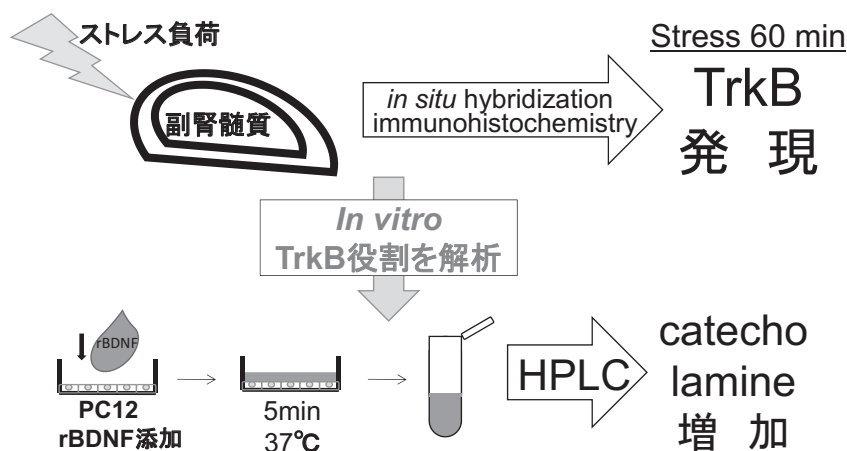


Fig. 1 vitroにおいて副腎髄質細胞に発現する TrkBは catecholamine を放出することが示唆された²⁴⁾。

BDNFが遊離され、ATPレセプターの遮断でBDNFの放出は抑制されることが報告された²⁵⁾。また、アストロサイトでは、ATP刺激でBDNFの発現が増加することが証明されている²⁶⁾。即ち、BDNFの産生あるいは放出にATP受容体からのシグナルが関与していることが示されている。さらに、ストレス条件下でATPは著明に増加しストレス関連機構の調節に関与している²⁷⁾。特に副腎皮質束状層細胞にATP受容体が存在し、グルココルチコイド（以下、GC）の産生により副腎皮質刺激ホルモン（adrenocorticotropic hormone, ACTH）によるGCの発現を促進していることが示唆されている²⁸⁾。副腎はストレスと密接な関連を持つ臓器であり、ATPがその副腎産生ストレス関連蛋白の制御に関連していることから、副腎髄質におけるBDNF発現にATP受容体が関与している可能性があることから、BDNF産生機序について検討した。

材料および方法

ラット副腎髄質由来クロマフィン細胞（以下PC12）を使用してTrkB受容体がマウス抗TrkBモノクローナル（clone47/TrkB）（Biosciences）によって活性化されることを確認した。この実験の目的は、体内の内発性BDNFにより活性化されたTrkBの役割を区別し、それによってTrkBの役割を明らかにするためである。

1. PC12の添加実験

1) 抗体添加実験

PC12を、IV型コラーゲンでコートした培養皿に播種した。そして37°C 5% CO₂以下でウシ胎児血清10%を添加したRPMI1640で培養を行った。添加実験において、PC12のTrkシグナル伝達は、K252a（Trk受容体のチロシン酸化阻害剤）を10 μg/ml添

加して5分間インキュベートした。その後、5分間30 μg/mlの抗TrkBモノクローナル（clone47/TrkB）を反応させた。対照群として無血清培地を反応させた。処理後、培地を高速液体クロマトグラフィーを用いてアドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミンの量を測定した。

2) ATP・UTP添加実験

P2X₄受容体とP2Y₂受容体がBDNF発現に影響を及ぼすか確認するため、P2X₄およびP2Y₂受容体のリガンドであるATP（Sigma）と、P2Y₂受容体のリガンドであるuridine 5'-triphosphate（以下UTP, Sigma）をPC12に添加した。まずPBSにて細胞を洗浄し、無血清培地に30分保温した後、ATPおよびUTP（各100 μMol）を1時間反応させた。処理後、各群の細胞を回収し解析した。対照群として無血清培地を反応させた。

さらに、P2X₄受容体とP2Y₂受容体阻害によるBDNF発現の変化を解析するため、阻害剤であるSuramin（100 μMol, Sigma）を1時間反応させた後、ATPを同様に添加した。そして培養液はBDNF ELISA解析に、細胞はBDNFのmRNAの解析に用いた。

2. 実験に使用した動物

Sprague-Dawleyラット（日本SLC）、オス9週令を使用した。ラットは固形飼料と水を自由に摂ることができる環境で、12時間ごとに明暗をくり返し、温度22 ± 3°C条件の下において飼育した。全てのラットは7時-11時の間にジエチルエーテル（和光純薬工業）を吸入させ、ソムノペンチル（共立製薬）を腹腔内に注入し、サンプリングを行った。この実験は神奈川歯科大学動物実験倫理委員会によって承認され、神奈川

歯科大学動物実験ガイドラインに即して実行した。

ラットは4匹ずつコントロール群, ストレス群, ストレス+アゴニスト群, 副腎摘出ストレス+アゴニスト群の4つのグループに分けた。コントロール群は拘束ストレス非負荷にし, 非コントロール群は, Tsukinokiらのプロトコール^{13,14)}に従い, 急性拘束ストレスを負荷した。急性拘束ストレスを起こすために, ラットを仰臥位で木の板の上(18×25 cm)に革ベルトで固定し, すべての足は体の正中45°で粘着テープで固定し60分拘束ストレス負荷した。以前の研究では副腎髄質のTrkBのmRNAとタンパク発現が最も高値であったときの方法である²⁴⁾。ストレス+アゴニスト群と副腎摘出ストレス+アゴニスト群においてはTrkB作用抗体を, 60分拘束ストレス後, セボフルランで深い麻酔下で尾静脈注射を用いて投与した。

副腎のBDNFの局在と役割を解明するため, 我々は60分の拘束ストレス前にラットに交感神経遮断薬としてプロプラノロール(5 mg/kg i.p.)を投与した。

3. 血液採取

心臓穿刺により7時-11時の間に採取を行った。血液サンプルはEDTAを含んだVenoject II管(Terumo)の中に入れた。チューブはただちに氷の上におき, 4°C, 15分, 760×gで遠心分離した。血漿は-20°Cで保存してから高速クロマトグラフィーで解析した²⁹⁾。

4. 血漿と細胞培養培地のカテコルアミン分析評価

血漿中のカテコルアミンと, 培地中のアドレナリン, ノルアドレナリン, そしてドーパミンは, 高速クロマトグラフィーにより分画後分析した。それぞれのサンプルは水溶性材料を取り除くために陽イオン交換フルカラムを通過し, そしてカテコルアミンはLC-8030カラム上で分離した。(Toso Co) ジフェニルエディレンジアミンとフェリシアン化カリウムで合成した蛍光剤を用いて470 nm波長の放出と355 nm励起波長を使って測定した²⁴⁾。

5. 副腎におけるTrkBとBDNF mRNAのPCR

1) RNA抽出とcDNA合成

-80°Cで保存しておいた副腎に1 mlのRNA抽出試薬(ISOGEN; ニッポンジーン)を加えホモジナイズした。5分間室温で放置した後, 0.2 mlクロロホルムを加えて15秒間強く振盪, 2分間室温でインキュベートした後, 遠心分離(15,000 × g, 15分間, 4°C)した。上層の水層を別のチューブに回収してこれに0.5 mlのイソプロパノールを加え5分間室温でインキュベートした後, 再度遠心分離(15,000 × g, 15分間, 4°C)し上清を取り除き, 75%エタノールを加えて残ったRNAペレットを洗浄後, TE (pH 7.5, ニッポンジーン)に溶解し全RNA量を回収した。次に, 4 μgの

RNAを使用し, First Strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche)を使用し, cDNA合成を行った。

2) PCR反応

cDNAにTaq(TAKARA EX), Tag緩衝液(10×EX), dNTP混合液, プライマー, ddH₂Oを加え, サーマルサイクラー(TAKARA)にてRT-PCRを行った。TrkB増幅のために使用したプライマー配列はforward; 5-ATAACGGAGACTACACCTGATGG-3 reverse; 5-AGCTGACTGTTGGTGTATGCC-3 (PCR product: 505 bp) (Invitrogen)³⁰⁾である。BDNF増幅のために使用されたプライマー配列はforward, 5-CAAAAGGCCAACTGAAGC-3 reverse; 5-CGC-CAGCCAATTCTCTTT-3 (PCR product: 169 bp) (Invitrogen)³¹⁾である。インターナルコントロールとして, GAPDHを使用した。そのプライマー配列はforward, 5-CCTTCATGACCTCAACTAC-3 reverse; 5-TTCACACCCATCACAAAC-3 (PCR product: 306 bp) (Invitrogen)²⁴⁾である。

PCRの条件は94°C 30秒, 58°C 30秒, そして72°C 60秒を30サイクル, 続いて最終伸長は72°C 5分であった。増幅PCR産物は3%アガロースゲル電気泳動で分画し, エチジウムブロマイドにて染色した。そしてLAS3000 (FUJIFILM)を使って撮影した。

6. BDNFのReal-time PCR

前述と同様にRNA抽出後, cDNA合成した。そしてLight Cycler[®]にてReal-time PCRを行った。Light Cycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche)を使用し, BDNFのプライマーは日本遺伝子研究所において合成し, 配列は5-CAGGGGCATAGACAAAAG-3 (forward), 5-CTTCCCCTTTTAAATGGTC-3 (reverse; 167 bp)^{13,14,32)}である。対象として, β-actinを使用し同様にPCRを行った。プライマー配列は以下の通りである: 5-CCTGTATGCTCTGGTCGTA-3 (forward), 5-CCATCTCTTGCTCGAAGTCT-3 (reverse; 260 bp)³²⁾。変性は95°C 10分で行われた後に, セグメント1 (95°C 10秒), セグメント2 (60°C 10秒)そしてセグメント3 (72°C 10秒)を40サイクル繰り返した。その後, アガロースゲル電気泳動と, 融解分析を行って, PCR産物の合成を確認した。遺伝子発現は, β-actin mRNAに対するBDNF mRNA比で求めた。

7. 副腎におけるBDNF mRNAのISH

BDNF mRNAの相補RNAのプロローブは, ラットBDNF相補cDNAの2659-2778ベースに対応した断片の119 bpに基づいて作成した。(Promega)³³⁾ 11-UTPに標識されたジゴキシゲニンは, ラットBDNFの一本鎖のcDNAプロローブはDIGのラベリングキットSP6/T7を使って作成した^{24,34)}。ISHは, 4 μmの組織切片

を使用した。パラフィン切片は37°C 15分のプロラインキナーゼK1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に浸透した。ハイブリダイズは、ハイブリダイゼーション溶液に溶解したDIG-11-UTP標識の一本鎖cRNAプローブを使用し、37°C 16時間行った。ハイブリダイゼーション後、mRNAは非放射線性のジゴキシゲニン核酸検出キット (Roche) 使用し染色して、検出した。

8. 副腎のBDNFタンパクの免疫組織化学染色

ラット副腎の組織を、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液に6時間固定し、パラフィン包埋を行った。連続的な4 μm の切片をそれから作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。免疫組織化学染色はシンプルステインrat MAX-POを使用した。(Nichirei Biosciences) スライドは15分3% H_2O_2 メタノールで処理した。切片はそれから室温で1時間BDNF抗ウサギポリクローナル抗体で処理した。リン酸緩衝食塩水で洗浄後、切片をペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgAである2次抗体と室温で30分反応させた。染色は5分間トリス緩衝液に0.0003%の過酸化水素を含んだ0.02%ジアミノベンジン3塩酸塩で作成し、切片は、その後ヘマトキシリンにて対比染色を行った。ネガティブコントロールとしてウサギIgGを一次抗体として使用した。

9. 培養上清中のBDNF量のELISA解析

シャーレ内の培養上清を回収し上清中のBDNF量をELISAで解析した。回収された培養上清は、直ちに遠心分離され細胞成分を排除した上清のみを用いた。ELISAは、BDNF Emax[®] ImmunoAssay System (Promega) を用いて通法に従った。

10. 統計分析

統計解析にはSPSS ver. 17.0 (SPSS) を使用し、クラスカル・ウォリス検定後、マン・ホイットニーのU検定、またはANOVA検定後、Tukey-Kramer法により解析を行った。P値は<0.05で統計学的な有意差があると定義した。

結 果

1. TrkB受容体の性質

細胞は抗TrkB受容体 (clone47/TrkB)、そしてK252aTrkB阻害剤を作用させ、培地内のカテコラミンの放出を測定した。それぞれの実験群のアドレナリンレベルは以下の通りである。コントロール群、2500 \pm 1.291 pg/mL アゴニスト群、230.8 \pm 62.49 pg/mL K252a+アゴニスト群、4500 \pm 3.512 pg/mL アゴニスト群のノルアドレナリン濃度と他のすべての実験群のノルアドレナリン濃度の間で有意差があった。しかし、K252a+アゴニスト群とコントロール群の間で有意差はなかった (Fig. 2a)。

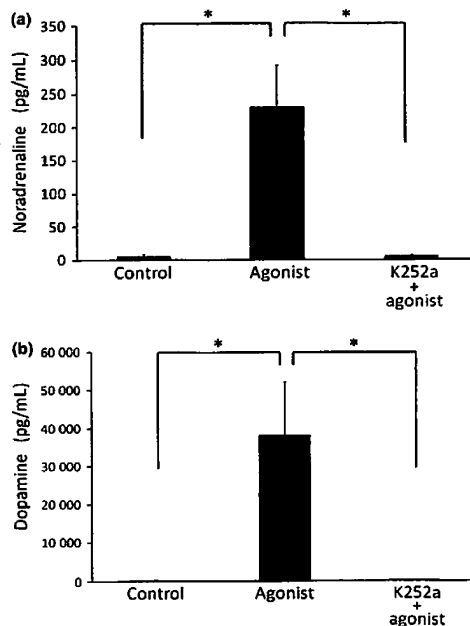


Fig. 2 Characterization of anti-tyrosine receptor kinase B (TrkB).

PC12 cells were treated with anti-TrkB (clone 47/TrkB) and/or TrkB inhibitor, K252a. Levels of noradrenaline (a) and dopamine (b) in the media were then assayed by HPLC. (a) Significant differences in noradrenaline levels were seen between the agonist group and all other groups. Data were analyzed by the Mann-Whitney U-test and the Kruskal-Wallis test (* p <0.05; n =4 per group; error bars=SD). (b) Significant differences in dopamine levels were seen between the agonist group and all other groups. Data were analyzed by the Mann-Whitney U-test and the Kruskal-Wallis test. (* p <0.05; n =4 per group; error bars=SD). Adrenaline was not detected in any group. (Kondo Y et al: Journal of Neurochemistry 124: 224-232, 2013のFig. 1を許可を得て転載)

意差はなかった (Fig. 2a)。

それぞれの実験群のドーパミンレベルは以下の通りである。コントロール群、3738 \pm 109.2 pg/mL; アゴニスト群、38087.8 \pm 14032.5 pg/mL; K252a+アゴニスト群、295.8 \pm 84.98 pg/mL。アゴニスト群のドーパミンレベルと他の実験のドーパミンレベルの間に有意差があった。しかし、K252a+アゴニスト群とコントロール群に差はなかった (Fig. 2b)。アドレナリンは検出できなかった。

2. TrkB作用抗体を使用した刺激と60分ストレス後のカテコラミンレベル

TrkB作用抗体経由の受容体刺激を60分間ラットに与えてカテコラミンの放出を詳しく調べた。それぞれの実験群のアドレナリンレベルは以下の通りである。コントロール群、431.5 \pm 247.6 pg/mL; ストレス

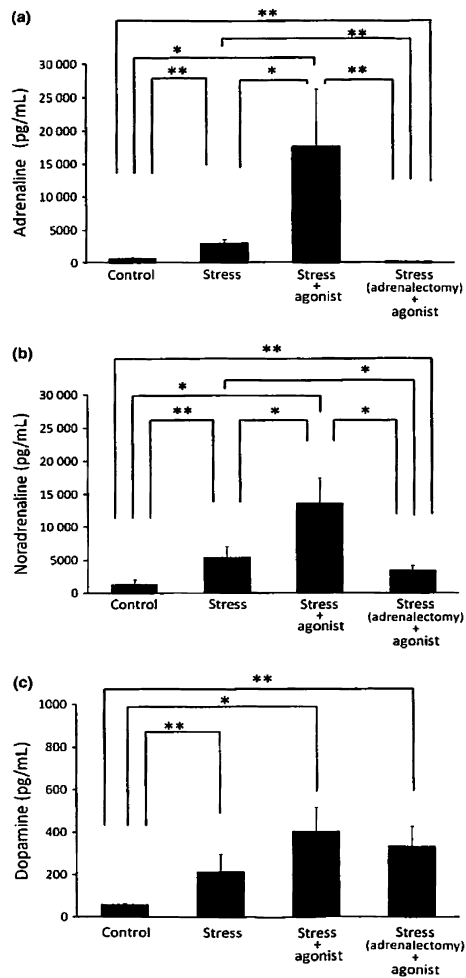


Fig. 3 In vivo catecholamine levels after stimulation with TrkB expressed in the adrenal medulla after 60-min stress using TrkB agonist antibody.

Rats were stimulated with TrkB agonist antibody after 60-min immobilization stress. Levels of adrenaline (a), noradrenaline (b) and dopamine (c) in blood were assayed by HPLC. (a) Significant differences in adrenaline levels were seen between each group. Data were analyzed by the Mann-Whitney U-test and the Kruskal-Wallis test. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 4-6$ per group; error bars=SD). (b) Significant differences in noradrenaline levels were seen between each group. Data were analyzed by the Mann-Whitney U-test and the Kruskal-Wallis test. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 4-6$ per group; error bars=SD). (c) Significant differences in dopamine levels were seen between the control group and all other groups, but there were no significant differences between the stress + agonist and stress groups, or between the stress + agonist and stress (adrenalectomy)+agonist groups. Data were analyzed by the Mann-Whitney U-test and the Kruskal-Wallis test. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 4-6$ per group; error bars=SD). (Kondo Y et al: Journal of Neurochemistry 124: 224-232, 2013のFig. 2を許可を得て転載)

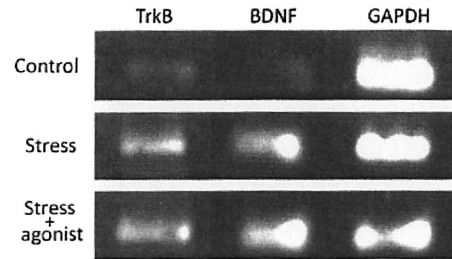


Fig. 4 RT-PCR analysis of tyrosine receptor kinase B (TrkB) and Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in adrenal glands after 60-min stress.

RT-PCR analysis detected mRNA expression of BDNF and TrkB in the stress and stress + agonist groups. In the control group, very little BDNF and TrkB mRNA expression was observed. (Kondo Y et al: Journal of Neurochemistry 124: 224-232, 2013のFig. 3を許可を得て転載)

群, 3260.5 ± 462.9 pg/mL; ストレス+アゴニスト群, 17689.5 ± 8676.9 pg/mL; 副腎摘出ストレス+アゴニスト群, 2500 ± 1300 pg/mLで各群のアドレナリンレベル間で有意差があった (Fig. 3a)。

それぞれの実験群のノルアドレナリン濃度は以下の通りである。コントロール群, 1357.0 ± 677.7 pg/mL; ストレス群, 6053.8 ± 1585.8 pg/mL; ストレス+アゴニスト群, 13737.8 ± 3754.9 pg/mL; 副腎摘出ストレス+アゴニスト群, 3550.8 ± 614.7 pg/mL。同様に各群のノルアドレナリン濃度間で有意差があった (Fig. 3b)。

それぞれの実験群のドーパミンレベルは以下の通りである。コントロール群, 61.5 ± 5.2 pg/mL; ストレス群, 254.0 ± 62.5 pg/mL; ストレス+アゴニスト群, 405.5 ± 111.0 pg/mL; 副腎摘出ストレス+アゴニスト群, 338.5 ± 78.5 pg/mL。コントロール群のドーパミンレベルと他のすべての群のドーパミンレベルで有意差があった (Fig. 3c)。

コントロール群, ストレス群, そしてストレス+アゴニスト群において無処置のラットと擬似オペレーションしたラット間で有意差はなかった。副腎摘出ストレス+アゴニスト群と擬似オペレーションラット+ストレスアゴニスト群で有意差はなかった。

3. 60分ストレス間の副腎のTrkB mRNAとBDNF mRNAの発現

RT-PCRを使用し60分拘束ストレス時の副腎のTrkB mRNAとBDNF mRNAの発現を分析した。60分ストレス後, ストレス群とストレス+アゴニスト群は, コントロール群と比較して, 副腎でのBDNF mRNAは著しく発現上昇した。同様にTrkB mRNAはコントロール群と比較して弱く上方制御した (Fig.

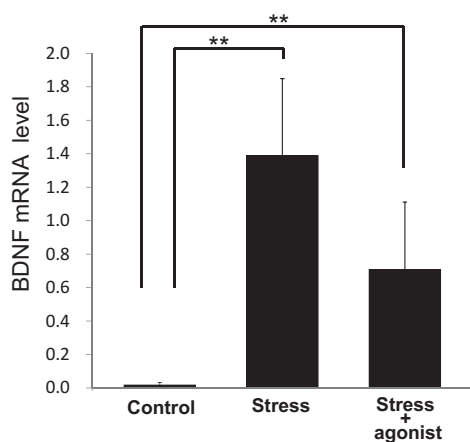


Fig. 5 Quantitative real-time PCR analysis of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA levels in adrenal glands after 60-min stress.

BDNF mRNA levels in the adrenal glands of immobilized rats after 60 min was assayed by real-time PCR. Data are expressed as BDNF/b-actin mRNA ratios. BDNF mRNA levels were calculated to be: 0.021 ± 0.017 for the control group (non-stress), 1.254 ± 0.400 for the stress group, and 0.830 ± 0.344 for the stress + agonist group. Significant differences in BDNF mRNA levels were seen between the control group and all other groups. Data were analyzed by the Mann-Whitney U-test and the Kruskal-Wallis test (** $p < 0.01$; $n = 6$ per group; error bars = SD). (Kondo Y et al: Journal of Neurochemistry 124: 224-232, 2013のFig. 4を許可を得て転載)

4)。無処置のラットと擬似オペレーションしたラット間の発現に有意差はなかった。

4. 60分ストレス間の副腎のBDNF mRNAのReal-time PCR

副腎のBDNF mRNAはReal-time PCRにて分析を行った。BDNF/ β -actin mRNA比率はコントロール群、ストレス群、そしてストレス+アゴニスト群の対照群で計算した。BDNF/ β -actin mRNA比率は以下の通りである。コントロール群, 0.021 ± 0.017 ; ストレス群, 1.254 ± 0.400 ; ストレス+アゴニスト群, 0.830 ± 0.344 コントロール群と他の群の間で有意差があった。ストレス群と、ストレス+アゴニスト群の間で有意差はなかった (Fig. 5)。無処置のラットと擬似オペレーションをしたラットの間で有意差はなかった。

5. 60分ストレス後の副腎でのBDNF mRNAのISH

著者らはISHにより60分ストレス後の副腎におけるBDNF mRNAを分析した。高レベルのBDNF mRNAの発現が、ラットの精巣上体細胞のポジティブコントロールで検出できた。センスプローブで反応した切片ではシグナルは確認できなかった。コントロール群ではハイブリダイゼーションシグナルは副腎

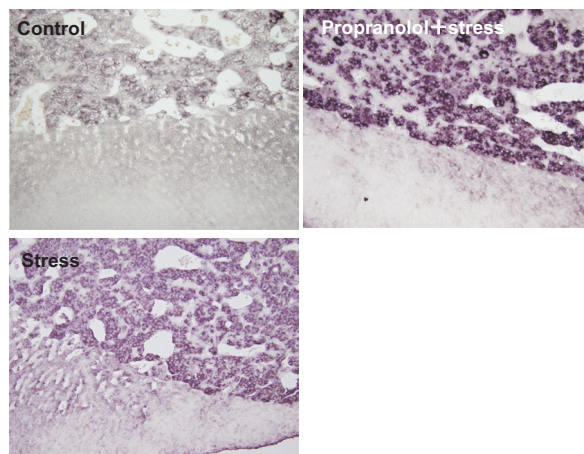


Fig. 6 In situ hybridization for Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in adrenal gland after 60-min stress.

In the control group, BDNF mRNA was weakly expressed in the adrenal medulla, but was not expressed in the adrenal cortex. In the stress and propranolol + stress groups, BDNF mRNA was expressed in the adrenal medulla, but was not expressed in the adrenal cortex. Scale bar = 200 μ m. (Kondo Y et al: Journal of Neurochemistry 124: 224-232, 2013のFig. 5を許可を得て転載)

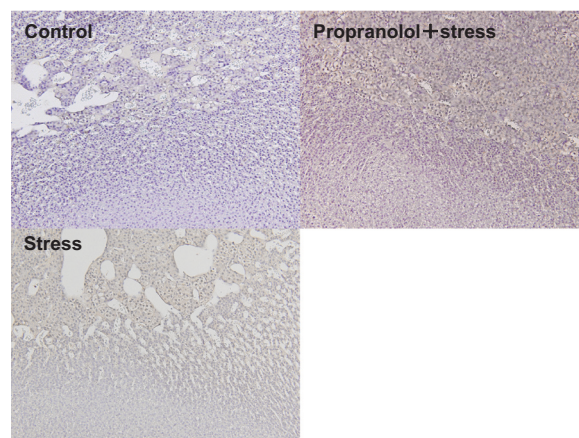


Fig. 7 Immunohistochemistry for Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein in adrenal gland after 60-min stress.

In the control group, BDNF protein was weakly detected in the adrenal medulla, but was not detected in the adrenal cortex. In the stress and propranolol + stress groups, BDNF protein was detected in the adrenal medulla, but was not detected in the adrenal cortex. Scale bar = 200 μ m. (Kondo Y et al: Journal of Neurochemistry 124: 224-232, 2013のFig. 6を許可を得て転載)

髄質細胞で弱くあらわれ、副腎皮質細胞ではシグナルは確認できなかった。ストレス群ではハイブリダイゼーションシグナルは副腎髄質細胞で強く現れ、副腎

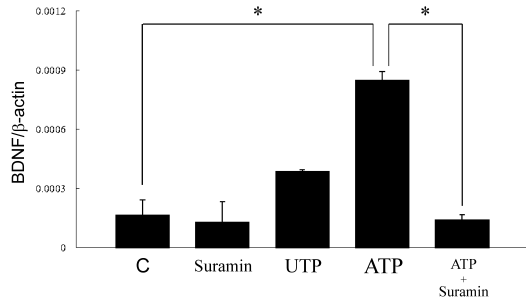


Fig. 8 Quantitative real-time PCR analysis of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA levels in PC12.

BDNF mRNA levels in PC12 was assayed by real-time PCR. Data are expressed as BDNF/b-actin mRNA ratios. BDNF mRNA levels were calculated to be: 0.00016 ± 0.00008 for the control group, 0.00085 ± 0.00004 for the after exposure to ATP group, 0.00038 ± 0.00001 for the after exposure to UTP group, 0.00013 ± 0.00010 for the after exposure to Suramin group, 0.00014 ± 0.00003 for the pretreated 30 min before ATP stimulation group. Significant differences in BDNF mRNA levels were seen between the after exposure to ATP group and the control group or the pretreated 30 min before ATP stimulation group. Data were analyzed by the ANOVA test and the Tukey-Kramer test (*p<0.05; n=5 per group; error bars=SD).

(杉山弘起ら 唾液腺BDNFの標的臓器と考えられる副腎髄質におけるATP受容体の発現についての研究 神奈川歯学 48(2), 2013の図2を許可を得て転載)

皮質では確認できなかった。さらにプロプラノロール+ストレス群において、ハイブリダイゼーションシグナルは副腎髄質細胞で強く現れ、副腎皮質細胞では確認できなかった (Fig. 6)。無処置のラットと擬似オペレーションしたラット間の発現の差異はなかった。センスプローブではこれらの細胞にハイブリダイゼーションシグナルを検知することが出来なかった。

6. 60分ストレス後の副腎におけるBDNFタンパク免疫組織化学染色

コントロール群においてBDNFタンパクは副腎髄質で弱く検出された。一方で副腎皮質では検出されなかった。ストレス群において、BDNFタンパクは副腎髄質では検出できたが、副腎皮質では検出できなかった (Fig. 7)。同様に、プロプラノロール+ストレス群ではBDNFタンパクは副腎髄質で検出できた。一方で、副腎皮質では検出できなかった。無処置のラットと擬似手術したラット間で発現の違いはなかった。ストレスが加わった副腎髄質のBDNFタンパクの検出はリコンビナントBDNFの競合により無効になった。

7. PC12におけるBDNF mRNA発現誘導の解析

コントロール群では0.00016 ± 0.00008, ATP添加

群では0.00085 ± 0.00004, UTP添加群では0.00038 ± 0.00001であった。コントロール群と比較して, ATP添加群で有意差 (p<0.05) が認められたが, UTP添加群では増加傾向は認められたが有意差はなかった (Fig. 8)。

次にATP受容体阻害によるBDNF発現への影響を調べるために, 阻害剤Suraminを用いてBDNF発現量を定量PCRにて確認した。その結果, Suraminのみ添加した群は0.00013 ± 0.00010を示し増加を認められなかった。さらに, Suramin+ATP添加群は0.00014 ± 0.00003を示し発現上昇は統計学的に認められなかった (Fig. 8)。

以上の結果より, ATP添加によりPC12細胞にBDNFの産生が有意に増加し, UTP添加群は増加傾向を示した。

8. PC12における培養上清中のBDNF量のELISA解析

培養上清中のBDNF量は, コントロール群, ATP添加群, UTP添加群いずれも検出限界値以下であった。以上の結果より, 培養細胞からはBDNFの放出は認められなかった。

考 察

1. 抗TrkB (clone 47/TrkB) の使用について

抗TrkB (clone 47/TrkB) がTrkB作用抗体として作用するかどうか検討し, 作用することを確認した。そして作用後, 有意なカテコラミンがPC12から放出されている事を確認した (Fig. 2ab)。さらに, カテコラミンの放出はK252aチロシンキナーゼ阻害剤によって完全に遮断することができた。この結果により抗TrkB (clone 47/TrkB) がTrkB作用抗体として作用しうることが証明できた。

この結果はBDNF刺激で得られた結果に似ている²⁴⁾。この実験ではアドレナリンは検出限界以下であった。アドレナリンはフェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼによるノルアドレナリンのメチル化によって合成される。このフェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼの活性化は副腎皮質ホルモンの存在に必須である³⁵⁾。

著者らの*in vitro*実験では, クロマフィン細胞実験を用いた実験を行ったため, アドレナリンは検出できなかったものと考えられる。Qianらは, 複数のマウスのモノクローナル抗体がTrkB作用抗体として機能すると報告している³⁶⁾。加えて, Tsaoらは, 抗TrkB抗体をTrkB作用抗体として*in vivo*実験に使用している³⁷⁾。従ってTrkB作用抗体として抗TrkB (clone 47/TrkB) の使用は適切であると考えられる。

2. ラット急性拘束ストレス実験の先行研究からの経過

以前の研究では、ラットの60分急性拘束ストレス下での副腎髄質における TrkB mRNA とタンパク発現は有意に上昇した²⁴⁾。この実験により、副腎髄質での TrkB の発現がストレス反応で重要な役割をしている可能性を示唆した。そして本研究では TrkB 作用抗体 (clone 47/TrkB) を使用し60分ストレス後のカテコラミンの放出を検討した。作用抗体で刺激したラットは無刺激なラットと比較して血中カテコラミン濃度は有意な増加を示したが、60分ストレス後作用薬で刺激した副腎摘出モデルラットでは増加しなかった (Fig. 3a-c)。このデータは副腎髄質の TrkB によるシグナル伝達はカテコラミンの放出を起こすことを示唆している。

副腎摘出したラットモデルでは、カテコラミンレベルは低い (Fig. 3a-c)。血中カテコラミンは主に、副腎髄質由来であるが、副腎髄質と同様に他の様々な器官から放出される³⁸⁾。副腎摘出モデルラットから検出されたカテコラミンは、副腎髄質以外の臓器から由来するカテコラミンであると考えられている。

TrkB, BDNF mRNA は RT-PCR において、60分ストレス後の副腎において発現しており、BDNF mRNA は Real-time PCR により60分ストレス後に副腎で検出した (Fig. 4,5)。この結果は60分ストレス後の副腎での BDNF と TrkB の発現はカテコラミンの放出を誘発することを示唆する。

著者らは60分ストレス後の副腎における BDNF 発現の局在を調査するため、ISH と免疫組織化学染色を行った。BDNF は副腎髄質に局在することが判明した (Fig. 6,7)。60分ストレスにおいて副腎髄質で発現した BDNF と TrkB の発現はカテコラミンの放出を誘発すると示唆される。つまり、カテコラミンの放出は SAM 軸経路でのニコチン受容体の活性化と同様に副腎髄質での BDNF による自己分泌シグナル伝達により誘起されたと考えられる。一方 Tsukinoki ら (2007年) の研究から、BDNF はラットの顎下腺で30分拘束ストレス後に発現し、血漿 BDNF は顎下腺での BDNF の発現に寄与していると示唆した¹⁰⁾。よって著者らの結果は副腎以外の供給源由来の BDNF の存在を考慮しなければならない。

副腎皮質の自己分泌シグナル伝達に関して³⁹⁾、 β アドレナリン受容体は副腎髄質で発現し、そして、自己分泌シグナル伝達によってカテコラミンの放出で調節されることが報告されている。従って、BDNF-TrkB 相互作用の自己分泌を経由したカテコラミン放出機構は、副腎髄質においても機能していることが考えられる。

3. BDNF-TrkB 相互作用のポジティブフィードバックループについて

プロプラノロール投与後に、60分ストレスに負荷したラットの副腎において BDNF は副腎髄質に局在していた。(Fig. 6,7) これは、BDNF と TrkB 相互作用は副腎髄質でポジティブフィードバックループの役割をしている事を示唆している。ただし、これに関しては神経伝達とシナプス伝達の観点からさらに研究を重ねて、このポジティブフィードバックの機構を証明する必要がある。ポジティブフィードバックループは腸管神経系や副腎皮質のアルドステロン分泌などの恒常性維持に関与する神経系にも存在する^{40,41)}。加えて Cortez らによると、副腎髄質で発現する β アドレナリン受容体はポジティブフィードバック経路でカテコラミンの放出を制御することを示している³⁹⁾。従って、副腎髄質が BDNF-TrkB 相互作用のポジティブフィードバックループの役割担っている可能性もある。Higo 他は、重篤なストレスは神経細胞の小胞体ストレスを引き起こし、細胞死につながると示唆している⁴²⁾。このことは SAM 軸の崩壊につながるであろう。SAM 軸の崩壊を阻止するために重篤なストレスが神経損傷を引き起こす時に SAM 軸に変わる経路としてポジティブフィードバックループが働く可能性があると考えられる。

4. TrkB シグナルカスケードについて

TrkB には3つの主要なシグナルカスケードがある。ホスホリパーゼ C- γ (PLC- γ) 経路、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3-K)-Akt キナーゼ経路そして Ras-MAPK 経路がある⁴³⁾。特に、ホスホリパーゼ C- γ 経路は、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸の活性化によって小胞体からカルシウム放出を引き起こす⁴³⁾。それゆえ、BDNF と TrkB 相互作用により活性化された PLC- γ 経路経路で細胞内カルシウム濃度の増加が起こり、これによりカテコラミンの開口分泌が誘導されたと示唆している。ストレス反応は、体内で複数の機構により制御される⁴⁴⁾。

4. BDNF におけるストレス応答について

副腎髄質では、BDNF はストレスが作用している間に重要な役割を果たし、いくつかの遺伝子と神経ペプチドの発現を調節している可能性が非常に高い⁴⁵⁾。それゆえ、副腎髄質で発現した BDNF はカテコラミン放出以外のストレス応答の役割を演じることが可能である。今後、ストレス応答でのシグナル伝達の経路と役割を解明することが必要である。

5. 副腎髄質における ATP, UTP と ATP 受容体について

さらに、ATP は細胞間情報伝達物質として様々な

生理機能に関与していることが知られている⁴⁶⁾。一方 ATP 受容体は、P2 プリン受容体とも呼ばれ、ATP、UTP などの細胞外液のヌクレオチドをアゴニストとする細胞膜上の受容体の総称である。これら受容体は、P2X 受容体と P2Y 受容体の 2 つに分類されている⁴⁷⁾。P2X 受容体は P2X₁ から P2X₇ までの 7 つのサブタイプがあり、これらはイオンチャンネル型 ATP 受容体であり、非選択性陽イオンチャンネルを形成すると考えられている。P2Y 受容体は 7 つ以上のサブタイプがあり、G タンパク共役型受容体である。ATP 受容体のうち P2X₄ 受容体と P2Y₂ 受容体は神経系細胞の BDNF 産生や細胞からの放出に関与している。

そこで、RT-PCR にて PC12 細胞に P2X₄ 受容体および P2Y₂ 受容体の遺伝子発現が認められることを確認したのち、これら ATP 受容体刺激が BDNF の産生を増加するか検討した。ATP は P2Y₂ 受容体および P2X₄ 受容体と親和性が高く、UTP は P2Y₂ 受容体をリガンドとしている²⁶⁾。ATP および UTP 添加実験では、ATP 添加により有意に BDNF mRNA の発現が増加した。UTP 添加では増加傾向を示したものの有意差は認められなかった。Takasaki らのアストロサイトをを用いた検討でも UTP は増加傾向を示すが有意な差がなく、ATP で著明な増加を示していた²⁶⁾。これは、ATP が P2Y₂ 受容体および P2X₄ 受容体の 2 つの受容体と親和性が高いことと関連しているのかもしれない。

さらに、ATP および UTP 添加刺激による培養上清の BDNF 量を ELISA で測定したところ、培養上清中にはコントロール群と比較して有意な増加を認めなかった。従って、これらの受容体は BDNF の放出には関与していないことが示唆された。P2Y₂ 受容体は、涙液の分泌促進を行うことが報告されており、分泌機構に関与する受容体である⁴⁸⁾。今回の結果から、BDNF の放出および BDNF の産生にも関連が弱いことから、副腎髄質での発現の意義についてさらなる検討が必要である。

結 論

1. 抗 TrkB (clone 47/TrkB) が TrkB 作用抗体として作用することを実証した。この研究は、60 分ストレス条件下でのラット副腎髄質の TrkB が TrkB 作用抗体によりカテコラミン放出を誘起することを示唆する初めての研究である。
2. BDNF 発現は、ラットの副腎髄質で確認できた。よって BDNF は副腎髄質で自己分泌機能をもつ可能性がある。
3. 副腎髄質では急性ストレス条件下で BDNF-TrkB 相互間の自己分泌を通したポジティブフィードバック

ループの役割をする可能性がある。

4. 副腎髄質の ATP 受容体のうち P2X₄ 受容体が BDNF 産生に関して強く関係していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究の御指導とご協力を戴きました神奈川歯科大学大学院環境病理学講座榎木恵一教授に深謝申し上げます。また、適切な御教示と御校閲を賜りました東海大学医学部基盤診療学系病理診断学近藤裕介先生に感謝する次第です。さらに、論文作成に終始御協力いただきました神奈川歯科大学大学院環境病理学講座の皆様、並びに東雅啓特任助教に感謝申し上げます。本研究は神奈川歯科大学大学院環境病理学講座戦略基盤研究費で行われた。

本論文は Yusuke Kondo, Masahiro To, Juri Saruta, Takashi Hayashi, Hiroki Sugiyama and Keiichi Tsukinoki: Role of TrkB expression in rat adrenal gland during acute immobilization stress; *J Neurochem* 124: 224-32, 2013 の一部、および杉山弘起, 近藤裕介, 東雅啓, 猿田樹理, 鎌田要平, 榎木恵一; 唾液腺 BDNF の標的臓器と考えられる副腎髄質における ATP 受容体の発現についての研究; 神奈川歯学 48(2), 2013 の一部をまとめたものである。

References

1. Cirulli F, Alleva E. The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Front Neuroendocrinol* **30**: 379-395, 2009.
2. Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol* **25**: 237-258, 2010.
3. García-Suárez O, González-Martínez T, Perez-Perez M, Germana A, Blanco-Gélaz MA, Monjil D F, Ciriaco E, Silos-Santiago I, Vega JA. Expression of the neurotrophin receptor TrkB in the mouse liver. *Anat Embryol (Berl)* **211**: 465-473, 2006.
4. Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* **25**: 77-107, 2004.
5. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry J. M, Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry* **57**: 1068-1072, 2005.
6. Tan YL, Zhou DF, Zhang XY. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenic patients with tardive dyskinesia: association with dyskinetic movements. *Schizophr Res* **74**: 263-270, 2005.
7. Michalski B, Fahnestock M. Pro-brain-derived neu-

- rotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* **111**: 148-154, 2003.
8. Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Aqid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *NeuroReport* **10**: 557-561, 1999.
 9. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* **26**: 115-123, 2005.
 10. Tsukinoki K, Saruta J, Muto N, Sasaguri K, Sato S, Tan-Ishii N, Watanabe Y. Submandibular glands contribute to increases in plasma BDNF levels. *J Dent Res* **86**: 260-264, 2007.
 11. Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, Sekimoto M, Toné S, Senba E. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci Res* **28**: 103-110, 1997.
 12. Givalois L, Marmigère F, Rage F, Ixart G, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. Immobilization stress rapidly and differentially modulates BDNF and TrkB mRNA expression in the pituitary gland of adult male rats. *Neuroendocrinology* **74**: 148-159, 2001.
 13. Tsukinoki K, Saruta J, Sasaguri K, Miyoshi Y, Jinbu Y, Kusama M, Sato S, Watanabe Y. Immobilization stress induces BDNF in rat submandibular glands. *J Dent Res* **85**: 844-848, 2006.
 14. Lee T, Saruta J, Sasaguri K, Sato S, Tsukinoki K. Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression. *Brain Res* **1195**: 43-49, 2008.
 15. Harris GW. *Neural Control of the Pituitary Gland*. Edward Arnold, London, 1955.
 16. Chen E, Miller GE. Stress and inflammation in exacerbations of asthma. *Brain Behav Immun* **21**: 993-999, 2007.
 17. Cannon WB. *Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage*. D. Appleton, New York, 1929.
 18. Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* **130**: 601-630, 2004.
 19. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*: 9th edition, WB Saunders Co., Philadelphia, 1996.
 20. Barrett KE, Brooks HL, Boitano S, Barman SM. *Ganong's Review of Medical Physiology*: 23rd edition, McGraw-Hill Co., New York, 2009.
 21. Keiver KM, Hochachka PW. Catecholamine stimulation of hepatic glycogenolysis during anoxia in the turtle *Chrysemys picta*. *Am J Physiol* **261**: R1341-R1345, 1991.
 22. Katz MS, Dax EM, Gregerman RI. Beta adrenergic regulation of rat liver glycogenolysis during aging. *Exp Gerontol* **28**: 329-340, 1993.
 23. Sharara-Chami RI, Zhou Y, Ebert S, Pacak K, Ozcan U, Majzoub JA. Epinephrine deficiency results in intact glucose counterregulation, severe hepatic steatosis and possible defective autophagy in fasting mice. *Int J Biochem Cell Biol* **44**: 905-913, 2012.
 24. Kondo Y, Saruta J, To M, Shiiki N, Sato C, Tsukinoki K. Expression and role of the BDNF receptor-TrkB in rat adrenal gland under acute immobilization stress. *Acta Histochem Cytochem* **43**: 139-147, 2010.
 25. Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW. P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci* **18**: 3518-28, 2009.
 26. Takasaki I, Takarada S, Tatsumi S, Azegami A, Yasuda M, Fukuchi M, Tabuchi A, Kondo T, Tabuchi Y, Tsuda M. Extracellular adenosine 5'-triphosphate elicits the expression of brain-derived neurotrophic factor exon IV mRNA in rat astrocytes. *Glia* **56**: 1369-79, 2008.
 27. Eldred JA, Sanderson J, Wormstone M, Reddan JR, Duncan G. Stress-induced ATP release from and growth modulation of human lens and retinal pigment epithelial cells. *Biochem Soc Trans* **31**: 1213-5, 2003.
 28. 川村将弘. 副腎皮質研究の醍醐味 ステロイドホルモンからATPへ. *慈恵医大誌* **123**: 333-46, 2008.
 29. Saruta J, Iida M, Kondo Y, To M, Hayashi T, Hori M, Sato S, Tsukinoki K. Chronic stress induces neurotrophin-3 in rat submandibular gland. *Yonsei Med J* **53**: 1085-92, 2012.
 30. Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M. A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci* **25**: 1343-1353, 2005.
 31. Aliaga E, Silhol M, Bonneau N, Maurice T, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. Dual response of BDNF to sublethal concentrations of beta-amyloid peptides in cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis* **37**: 208-217, 2010.
 32. Saruta J, Kondo Y, Sato C, Shiiki N, Tsukinoki K, Sato S. Salivary glands as the source of plasma brain-derived neurotrophic factor in stressed rats engaged in biting behavior. *Stress* **13**: 238-247, 2010.
 33. Ottem EN, Beck LA, Jordan CL, Breedlove SM. Androgen-dependent regulation of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B in the sexually dimorphic spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Endocrinology* **148**: 3655-3665, 2007.

34. Saruta J, Tsukinoki K, Sasaguri K, Ishii H, Yasuda M, Osamura YR, Watanabe Y, Sato S. Expression and localization of Chromogranin A gene and protein in human submandibular gland. *Cells Tissues Organs* **180**: 237-244, 2005.
35. Wurtman RJ, Axelrod J. Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J Biol Chem* **241**: 2301-2305, 1966.
36. Qian MD, Zhang J, Tan XY, Wood A, Gill D, Cho S. Novel agonist monoclonal antibodies activate TrkB receptors and demonstrate potent neurotrophic activities. *J Neurosci* **26**: 9394-9403, 2006.
37. Tsao D, Thomsen HK, Chou J, Stratton J, Hagen M, Loo C, Garcia C, Sloane DL, Rosenthal, Lin JC. TrkB agonists ameliorate obesity and associated metabolic conditions in mice. *Endocrinology* **149**: 1038-1048, 2008.
38. Nakata Y. Histochemical studies on catecholamine with reference to the paraganglia. *Acta Neuroveg (Wien)* **26**: 75-92, 1964.
39. Cortez V, Santana M, Marques AP, Mota A, Rosmaninho-Salgado J, Cavadas C. Regulation of catecholamine release in human adrenal chromaffin cells by b-adrenoceptors. *Neurochem Int* **60**: 387-393, 2012.
40. Gallo-Payet N, Grazzini E, Côté M, Chouinard L, Chorvátová A, Bilodeau L, Payet MD, Guillon G. Role of Ca²⁺ in the action of adrenocorticotropin in cultured human adrenal glomerulosa cells. *J Clin Invest* **98**: 460-466, 1996.
41. Bertrand PP, Thomas EA. Multiple levels of sensory integration in the intrinsic sensory neurons of the enteric nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**: 745-755, 2004.
42. Higo T, Hamada K, Hisatsune C, Nukina N, Hashikawa T, Hattori M, Nakamura T, Mikoshiba K. Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP3 receptor. *Neuron* **68**: 865-878, 2010.
43. Rose CR, Blum R, Kafitz KW, Kovalchuk Y, Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *BioEssays* **26**: 1185-1194, 2004.
44. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* **89**: 535-606, 2009.
45. Liu X, Serova L, Kvetnanský R, Sabban EL. Identifying the stress transcriptome in the adrenal medulla following acute and repeated immobilization. *Ann N Y Acad Sci* **1148**: 1-28, 2008.
46. 津田 誠, 井上和秀. 慢性疼痛における細胞外ヌクレオチドとその受容体の役割. *生化学* **81**: 884-890, 2009.
47. 井上和秀. 神経障害性疼痛発症メカニズムとその制御. *臨床神経学* **49**: 779-782, 2009.
48. Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, Nakata K. P2Y2 receptor stimulation increases tear fluid secretion in rabbits. *Research Article* **21**: 782-787, 2000.