

ハムスターの冬眠を制御する 中枢神経機構解明に関する研究

新谷光輝、田村 豊、塩見浩人

Studies for central nervous regulatory systems of hibernation in Syrian hamsters

Mitsuteru Shintani, Yutaka Tamura and Hirohito Shiomi

ABSTRACT

Many mammals hibernate in order to survive periods of limited resources and/or low ambient temperature. It is well known that brains of hibernating mammals are protected against a variety of detrimental stress. Such protection is associated with a number of physiological adaptations inducing hypothermia, increased antioxidant defense and metabolic arrest. Based on these evidences, it is widely accepted that the mechanism of hibernation has possibility to apply to the medical treatment of encephalopathy including brain trauma, brain ischemia and alzheimer's disease. Therefore, we investigated the central regulatory system of hibernation in Syrian hamsters and identified the three phases-specific regulatory systems.

はじめに

哺乳類の冬眠は、冬期の環境温度低下や食物量減少などに対して活動を休止することによりやり過ごす適応行動である。また同時に、冬眠は恒温動物である哺乳類が恒温性を維持するための代謝活動を著しく低下させ、生命維持を図る戦略的行動でもある。冬眠行動をとる哺乳類としては、アナグマが有名であるが、アナグマ以外にもゾウハリネズミ¹⁾、ハリモグラ²⁾、コウモリ³⁾、ハムスター⁴⁾、地リス⁵⁾、ヤマネ⁶⁾など、180種以上の哺乳類で冬眠行動が観察されている。さらに最近、霊長類であるキツネザル⁷⁾が冬眠することも報告されており、冬眠が一部の特殊な種のみに見られる行動ではないことが明らかにされてきている。

冬眠時、動物の体温は摂氏数度の環境温度近く(Fig. 1)、あるいは極端な場合、氷点下まで下降することが知られている。恒温動物である哺乳類の体温は視床下部で制御されていることから、体温を含む冬眠時の劇的な生理機能変化は視床下部を中心とする中枢神経系により制御されているという考え方が広く受け入れられている。さらに、冬眠時の低体温状態においても、脳幹の聴覚反応が記録されること⁸⁾ や過度の温度低下に対しては産熱反応が起きる⁹⁾ ことなどから、冬眠中においても生命維持のための脳幹機能が維持されていることも明らかにされている。このような背景をもとに、地リス、ヤマネ、ハムスターなどを用いて多くの研究者が“冬眠物質”の同定を含めた冬眠機構の解明を試みているが、今だその詳細は明らかにされていない。

冬眠動物が低体温に対する耐性を獲得していることは、冬眠中の生理機能が維持されていること、あるいは、覚醒後に生体侵襲が認められないことから明らかである¹⁰⁾。さらに、冬眠中の動物に細菌や発がん性物質の投与や、致死量の放射線照射でも感染症やがん、放射線障害を起こさないことが知られている^{11, 12, 13)}。したがって、冬眠は低温に対する耐性だけでなく生活環境に存在する有害な刺激から生体を保護するシステムであり、冬眠時の生理機能を制御

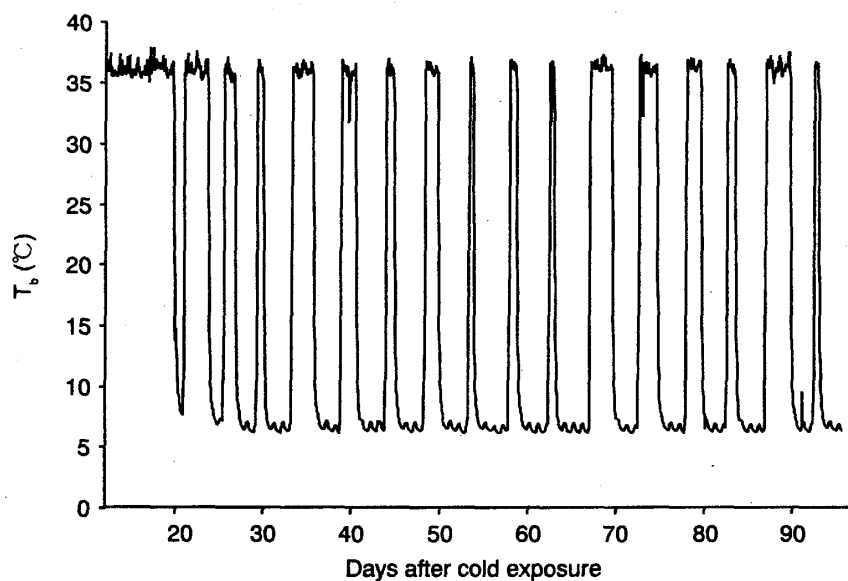


Fig. 1. The relationship of changes in T_b with time (days) after exposure to cold in hamsters. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C.

する機構の解明は、脳挫傷、脳虚血、アルツハイマー病を含んださまざまな医療技術の進歩に寄与する大きな可能性を秘めていると考えられる。

本著は、体温を指標にハムスターの冬眠を制御する中枢神経機構を解明することを目的とし、以下の項目で得られた知見を記したものである。

1. ハムスターの冬眠導入を制御する中枢神経機構

1-1. 冬眠ハムスターの体温に対する中枢アデノシン系の関与

アデノシンは神経伝達機能の調節に関与する神経修飾因子であり中枢性の体温下降作用を有することが知られている。Leeらは、冬眠中の地リスにおいて脳内アデノシン A1 受容体数が増加していることを報告¹⁴⁾しており、アデノシンが冬眠制御に関与する可能性を論じてきた。しかし、アデノシンによる詳細な冬眠制御機構は不明である。そこでまず著者らは冬眠可能な哺乳類であるシリアンハムスターを用いて、体温に対するアデノシンおよびアデノシンの前駆物質アデニンヌクレオチドの作用を検討したところ、いずれの物質とも30分後をピークとした体温下降作用が認められた(Fig. 2)。ところでプリン物質が結合する受容体はP1 (アデノシン受容体) とP2受容体 (ATP受容体) に大別される。さらに、アデノシン受容体はA1、A2a、A2bおよびA3受容体に分類される。そこでアデノシン、およびATPがいずれの受容体サブタイプを介して体温下降作用を発現しているかを選択的受容体拮抗薬を用いて検討した。Fig. 3で示したよ

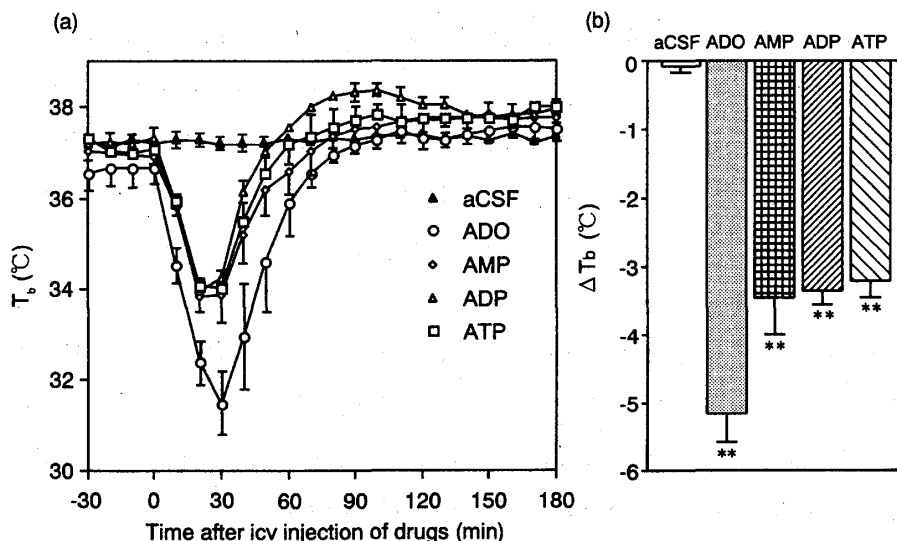


Fig. 2. Effects of adenosine (ADO) and adenine nucleotides on the body temperature (T_b) in hamsters.

The plots (a) show the time-related changes in T_b after intracerebroventricular (icv) injection of ADO or adenine nucleotides. ACSF, ADO (400 nmol), ATP (400 nmol), ADP (400 nmol) or AMP (400 nmol) was injected into the left lateral ventricle, respectively. The column graph (b) shows the changes in T_b at the peak-effect time (30 min) of the respective compounds. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Each value represents the mean \pm SEM of T_b or ΔT_b . Differences where $p < 0.01$ (**) in ΔT_b compared with aCSF were considered significant. Six animals were designated in each experimental group.

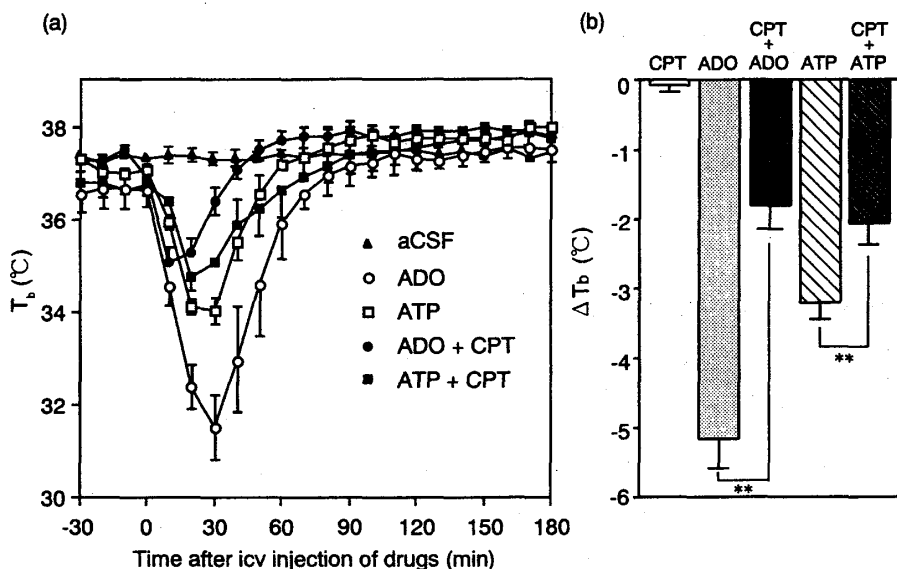


Fig. 3. Effects of icv injection of 8-cyclopentyltheophylline (CPT, 3 nmol) on icv injection of ADO- and ATP-induced hypothermia in hamsters. The plots (a) show the time-related of changes in T_b after icv injection of drugs. ACSF, ADO (400 nmol) or ATP (400 nmol) or was injected into the left lateral ventricle, respectively. CPT (3 nmol) was concomitantly injected into the left lateral ventricle with either ADO or ATP. The column graph (b) shows the changes in T_b at the peak-effect time of the respective compounds. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Each value represents the mean \pm SEM of T_b . Differences where $p < 0.01$ (**) in T_b compared with aCSF were considered significant. Six animals were designated in each experimental group.

うに、アデノシンおよびATPの体温下降作用はA1受容体拮抗薬のCPTの併用投与により有意に抑制された。また、今回データとして示さなかったが、アデノシンの体温下降作用はA2受容体非選択的拮抗薬のDMPX 3 nmolでは抑制されないこと、およびATPの体温下降作用は非選択的P2受容体拮抗薬のスラミン 2 nmolの併用投与では抑制されないことを確認している。したがって、アデノシンおよびアデニンヌクレオチドの体温下降作用は主としてアデノシンA1受容体を介して発現していると考えられる。

急性投与実験で得られた知見に基づき、冬眠時の体温下降、および低体温維持における中枢アデノシン系の関与について検討した。また、本実験では持続的冬眠期を体温が下降する導入期、低体温が持続する維持期、正常体温まで体温が上昇する覚醒期の三相に細分した(Fig. 4)。Fig. 5で示したように、導入期および維持期にCPT、DMPXを側脳室内投与すると、導入期におけるCPTの投与においてのみ体温上昇が観察された。また、Table1で示したように、CPTの投与によって体温上昇が惹起されるのは体温下降開始29時間までであった。これらの結果より、導入期の体温下降には脳内のアデノシンA1受容体の活性化が重要であり、アデノシンA2受容体の関与は少ないことが示唆された。したがって、脳内におけるATPもしくはアデノシンの遊離増加が冬眠へのトリガーとして重要であると考えられる。また、冬眠開始30時間後以降はCPTによる体温上昇が認められなかったことから、低体温が持続している維持期は中枢アデノシン系とは異なるシステムによって制御されていることが示唆された。

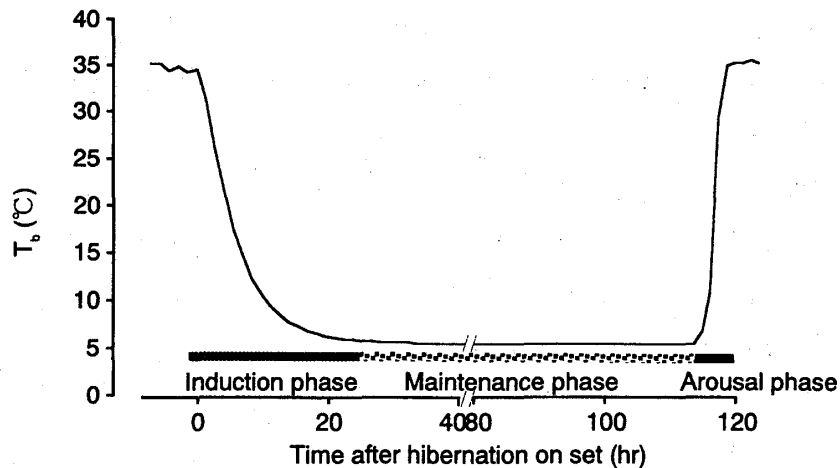


Fig. 4. Time-related in T_b at different phases of a typical hibernation cycle in hamsters. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C.

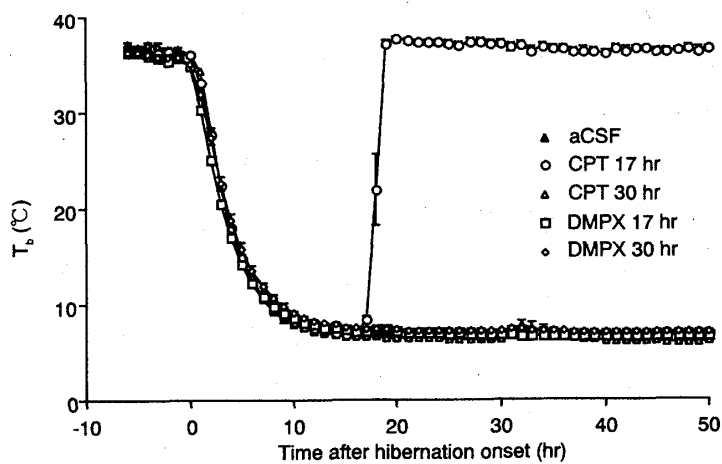


Fig. 5. Effects of CPT and 3,7-dimethyl-1-propargylzanthine (DMPX) on the T_b in hibernating hamsters. In this experiment, hamsters which had completed more than the third hibernation cycle were used. ACSF, CPT (3 nmol) or DMPX (3 nmol) microinjected into the left lateral ventricle 17 and 30 hr after hibernation onset, respectively. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Each value represents the mean \pm SEM of T_b . Six animals were designated in each experimental group.

Table 1. Time-related validity of CPT in T_b elevation of hibernating hamsters

| Injection time | 17 hr | 27hr | 28 hr | 29 hr | 30 hr |
|-----------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Percentage of arousal | 100 % (6 / 6) | 67 % (4 / 6) | 33 % (2 / 6) | 17 % (1 / 6) | 0 % (0 / 6) |

In this experiment, hamsters which had completed more than the third hibernation cycle were used. CPT (3 nmol) microinjected into the left lateral ventricle 17, 27, 28, 29 and 30 hr after hibernation onset, respectively. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Each value represents percentage of arousal hamsters at each time point.

これまでの行動薬理的な検討により冬眠導入期の体温下降にアデノシンA1受容体を介する中枢アデノシン系が重要な役割を果たすことが示唆された。そこで、この知見を生化学的に裏付ける目的で各ステージにおける視床下部アデノシン含量、およびアデノシンA1受容体のBmax値変化を調べた。寒冷暴露1ヶ月後の時点における視床下部アデノシン含量はコントロール値と比較して有意な変化は認められなかった(Fig. 6)。一方、アデノシンA1受容体数はコントロール値と比較して有意に増加していた(Fig. 7)。この結果から、冬眠への準備段階としてアデノシンに対する反応性を高めるために受容体のup-regulationが必要なのではないかと考えられる。

導入期である体温下降開始10時間後の時点においてアデノシンA1受容体のBmax値は有意に減少していた。RuizらはアデノシンA1受容体が高濃度の作動薬に曝されると細胞膜上の受容体が細胞内へ移行し細胞膜上の受容体数が減少するinternalizationが起こることを報告している¹⁵⁾。したがって、導入期のアデノシンA1受容体のBmax値減少はA1受容体が高濃度のアデノシンに曝された結果を反映しているものと考えられる。すなわち、導入期の体温下降は中枢アデノシン系の活性化により惹起されていることが裏付けられた。体温下降開始10時間後の時点におけるアデノシン含量については、統計的に有意ではないが増加傾向が認められた。アデノシン含量がその後減少していくことをあわせて考えると、冬眠開始初期には著しい組織アデノシン含量の増加があったものと推測される。すなわち、寒冷暴露だけでは組織アデノシン含量は増加しないことから、細胞内アデノシン含量の増加が冬眠へ移行するトリガーとなっている可能性が示唆された。

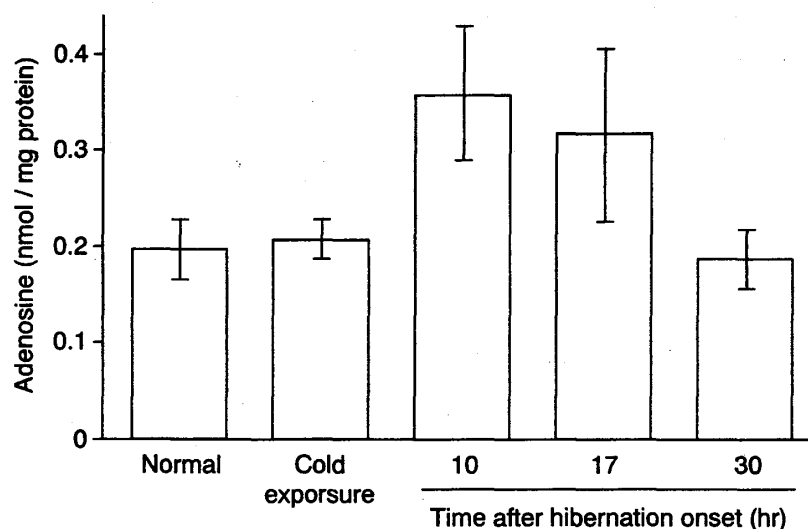


Fig. 6. Changes in adenosine contents on hypothalamus in cold exposure (for one month) and hibernation (10, 17 and 30 hr after hibernation onset) in hamsters. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Each column represents the mean \pm SEM of adenosine contents in the hypothalamus. Six animals were designated in each experimental group.

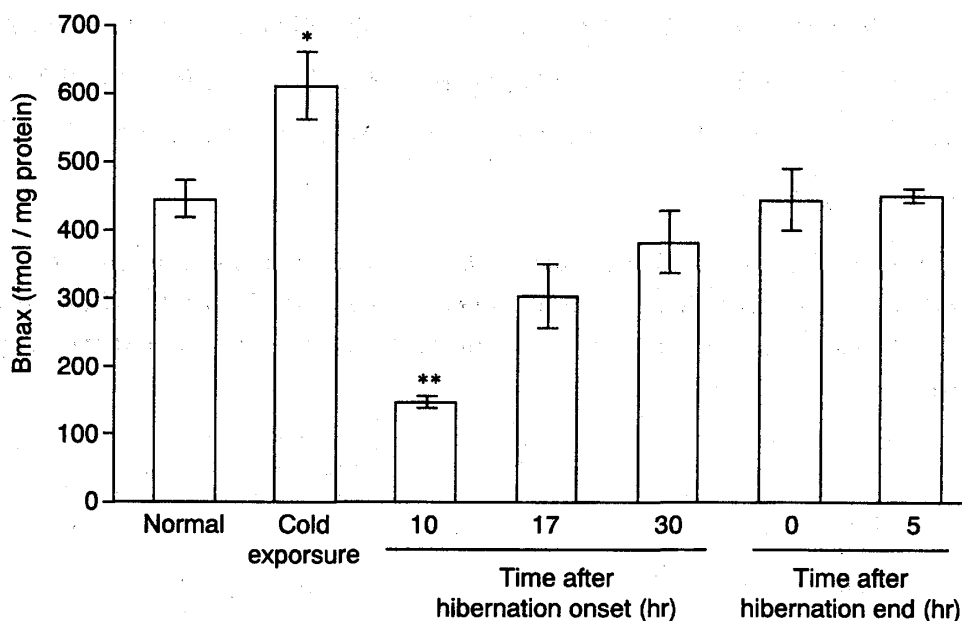


Fig. 7. Changes in Bmax of adenosine A1 receptor on hypothalamus in the cold exposure (for one month), hibernation (10, 17 and 30 hr after hibernation onset) and post-hibernation (0 and 5 hr after hibernation end). Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Each column represents the mean \pm SEM of Bmax of adenosine A1 receptor in the hypothalamus. Differences where $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) compared with normal values were considered significant. Six animals were designated in each experimental group.

また、低体温が持続している維持期においてアデノシン含量に変化は認められず、アデノシンA1受容体数はコントロールレベルへと戻りつつあった。受容体数の回復は細胞外に遊離しているアデノシン量が減少したことを意味している。これは、維持期の時点でCPTを投与しても冬眠が解除されなかった結果を支持するものであり、低体温維持における中枢アデノシン系の関与は少ないことが受容体レベルの検討においても裏付けられた。

1-2. CHAの体温下降作用部位の同定

視床下部は自律神経の高位中枢であると同時に、破壊実験により直腸温が上昇することから1885年にAronsohn, Sachsらにより体温調節中枢であることが提唱された。以来、多くの研究者が、電気生理学的手法を用いた温度刺激実験¹⁶⁾、実質内微量投与実験¹⁷⁾、スライス標本実験¹⁸⁾などの様々な実験により、体温調節中枢として最も重要な部位であることを報告してきた。視床下部は視策前野(preoptic area; PO)、前視床下部(anterior hypothalamus; AH)、背内側核(dorsomedial hypothalamus; DMH)、腹内側核(ventromedial hypothalamus; VMH)、外側核(lateral hypothalamus)、後視床下部(posterior hypothalamus; PH)に大きく分類され、それぞれの部位は体温調節と密接に関係していることが報告されている^{19, 20, 21, 22)}。そこで著者らはアデノシンの体温下降作用における脳内作用部位を同定する目的で、視床下部の各神経核にアデノシンA1受容体選択的作動薬N⁶-cyclohexyladenosine(CHA)を実質内微量投与した。Table 2に示したように、CHAをPO、AH、

DMH, PHの各部位へ微量投与するとそれぞれ体温下降作用が発現したが、AHへの微量投与で最も強力な体温下降作用が観察された。一方、VMH, LHに投与しても体温変化は観察されなかった。これらの結果より、CHAによる体温下降作用はAHを中心とした内側視床下部が作用部位であることが同定された。

Table 2. Changes in ΔT_b following independent CHA (0.3 nmol) microinjections into the preoptic area (PO), anterior hypothalamus (AH), dorsomedial hypothalamus (DMH), ventromedial hypothalamus (VMH), lateral hypothalamus (LH) and posterior hypothalamus (PH) of hamsters.

| Regions | ΔT_b | n | Regions | ΔT_b | n |
|---------|-------------------------|---|---------|-----------------------|---|
| PO | $-2.31 \pm 0.73^{**}$ | 6 | VMH | -0.69 ± 0.44 | 6 |
| AH | $-7.37 \pm 0.92^{**\#}$ | 6 | LH | -0.11 ± 0.05 | 6 |
| DMH | $-0.92 \pm 0.32^*$ | 6 | PH | $-2.78 \pm 0.55^{**}$ | 6 |

Each value represents the mean \pm SEM of ΔT_b . The respective values of ΔT_b were measured at peak-time after CHA injection. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test followed with Mann-Whitney U-test compared with the respective groups microinjected with aCSF alone (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$), and differences where $p < 0.05$ (#) between CHA-sensitive sites verified with the one-way ANOVA followed by the Sheffe's post hoc test were considered significant.

1-3. アデノシンの体温下降作用機序

ハムスターは、行動性調節と自律性調節の2つの調節機構により熱産生と熱放散のバランスをとることで体温を一定に制御している。自律性調節における熱産生機構としては骨格筋におけるふるえ熱産生(shivering thermogenesis; ST)や褐色脂肪組織(brown adipose tissue; BAT)における非ふるえ熱産生(non-shivering thermogenesis; NST)が重要な役割を果たしている²³⁾。一方、熱放散は血管拡張などにより行われる。STには adrenalin β_2 受容体²⁴⁾が、NSTには β_3 受容体が関与する²⁵⁾ことが知られており、血管運動を含めて自律神経系の機能が体温調節に重要な役割を果たしていると考えられる。体温下降を誘発するためには熱産生反応の抑制、熱放散反応の促進、あるいは両反応系の機能亢進のいずれかが考えられるが、アデノシンがどのような機序によって体温下降作用を発現しているかは不明である。そこで著者らは、異なる環境温下に曝露したハムスターに、CHAを側脳室内投与することで検討した。Fig. 8に示したように、CHAの側脳室内投与によって発現する体温下降作用は環境温度の低下と相関していた。通常、体温が下降するとSTやNSTにより熱産生が亢進するが、少なくとも本実験中STは観察されなかった。したがって、CHAの体温下降は主として熱産生抑制によるものであり、観察された体温下降は熱産生が抑制された結果、環境温によって体が冷やされていく過程を反映していると考えられる。

しかし、ProtorらはCHAの側脳室投与による血圧下降が末梢血管拡張によることを報告²⁶⁾しており、熱放散の促進も同時に起こっている可能性が考えられる。正常体温は、皮膚中の自由神経終末に存在する cold receptor や warm receptor を含んだ体中の温度感受性受容体からの情報を視床下部で受け取り、thermo-sensitive neurons (warm-sensitive neurons、cold-sensitive neurons) の活性を変化させ、適切な効果器応答を惹起することで一定に保たれている²⁷⁾。CHAが作用するA1受容体はGi蛋白共役型受容体であり、主にシナプス前膜に存在して神経伝達物質の遊離に対して抑制的に機能すると考えられている²⁸⁾。したがって、アデノシンは神経伝達を抑制しこれら thermo-sensitive neurons の活性を変化させることで熱産生を抑制すると推察される。堀らはこのthermosensitive neuronsがCHAの作用部位であるAHに存在していることを報告している²⁹⁾。また、AHは皮膚上の cold receptor, warm receptor を含んだ体中の温度受容器からの求心性シグナルを受け取っていることが報告されている³⁰⁾。まとめると、冬眠導入期の体温下降はアデノシンがAHを中心とした内側視床下部のA1受容体を活性化し、末梢からの求心性シグナルを抑制することによりBATなどにおける熱産生を抑制して惹起されると推察される。

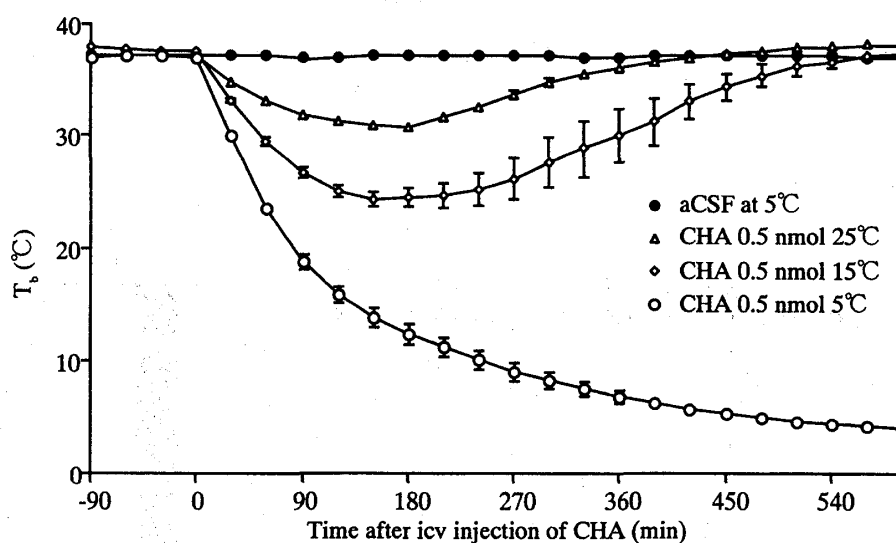


Fig. 8. Time-related hypothermic effects of icv CHA (opened symbols) or aCSF (closed circle at 5 °C) in hamsters exposed to different ambient temperatures (25 °C: triangle; 15 °C: rhombus; 5 °C: circle). ACSF or CHA (0.5 nmol) was injected into the left lateral ventricle, respectively. Decreases in T_b are expressed as the mean \pm SEM. The T_b values until 360 min (at 25 °C) and until 450 min (15 °C) were significantly lower than those of the aCSF-injected group from 30 min after CHA injection. However, the T_b (at 5 °C) values were always significantly lower than those of the aCSF-injected group 30 min after CHA microinjection. Six animals were designated in each experimental group. The T_b values of the CHA-microinjected groups at different ambient temperatures were compared with the aCSF group by repeated measures two-way ANOVA, followed by post hoc test (Dunnett test). The T_b values within each group were statistically analyzed by repeated measures one-way ANOVA, followed by post hoc test (Dunnett test) compared with the value obtained at time 0.

2. 冬眠ハムスターの低体温維持に関与する中枢機構

オピオイドペプチドはオピオイド受容体に結合して鎮痛作用や腸管運動抑制作用などのモルヒネ様作用を発現する一群のペプチドの総称であり、中枢神経系および末梢神経系に広く分布している。オピオイド受容体は μ 、 δ 、 κ 受容体に分類され、 μ 受容体はさらに $\mu 1$ 、 $\mu 2$ 受容体に細分される^{31, 32}。また、 μ 、 δ 、 κ 受容体に選択的に結合する内因性リガンドとして β -エンドルフィン(β -End)、メチオニン-エンケファリン(Met-Enk)、ダイノルフィンA(Dyn-A)などが中枢神経系に分布することも知られている^{33, 34}。オピオイドペプチドは生体の警告系である痛覚伝達に関与するが、心理的あるいは身体的ストレス下においても動態が変化することから、ストレスに対する防御因子として機能していることも明らかにされている^{35, 36}。ところでHandlerらはラットの側脳室にオピオイドペプチドを投与すると体温が下降することを報告しており³⁷、痛覚のみならず体温制御にオピオイドペプチドが関与する可能性を示している。さらに、地リスに、 μ 、 δ -オピオイドペプチド受容体作動薬のD-Ala²-D-Leu⁵-enkephalinを慢性投与することにより冬眠が誘発される³⁸ことや、非選択的オピオイド受容体拮抗薬のナロキソンを側脳室内投与すると地リスの冬眠継続時間が短縮する³⁹ことなども報告されており、冬眠にオピオイドペプチドが関与する可能性も示唆されている。そこで著者らは、非冬眠ハムスターの体温に対するオピオイドペプチドの作用について検討した。オピオイドペプチドのうち、内因性 μ -オピオイ

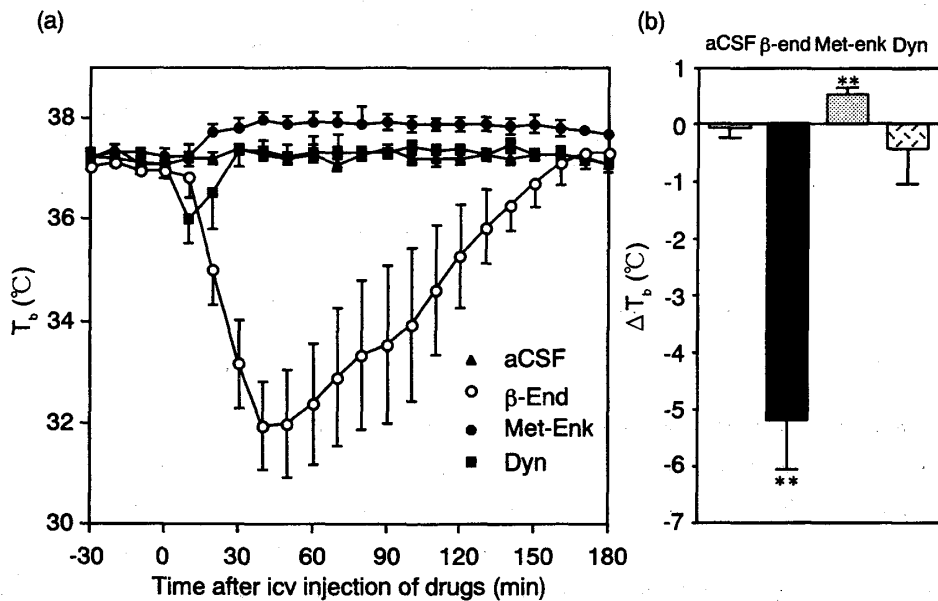


Fig. 9. Effects of β -endorphin (β -End) Methionine-enkephalin (Met-Enk) and Dynorphin A (Dyn) on the T_b in hamsters. The plots (a) show the time-related changes in T_b after icv injection of β -End, Met-Enk or Dyn. ACSF, β -End (0.1 nmol), Met-Enk (10 nmol) or Dyn (10 nmol) was injected into the left lateral ventricle, respectively. The column graph (b) shows the changes in T_b at the peak-effect time (30 min) of the respective compounds. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Each value represents the mean \pm SEM of ΔT_b . Differences where $p < 0.01$ (**) in ΔT_b were considered significant. Six animals were designated in each experimental group.

ドペプチド受容体作動薬 β -End 0.1nmol の側脳室内投与で Fig. 9 で示したような体温下降が観察された。この結果より、冬眠時体温制御にオピオイドペプチドが関係していることが推察されたため、導入期、および維持期の体温変化における中枢オピオイド系の関与について検討を行った。体温下降開始 17 時間後にナロキソン 10 nmol を側脳室内投与しても体温変化は観察されなかった。一方、体温下降開始 27、28、29、30 時間後の時点におけるナロキソン 10 nmol の側脳室内投与では、時間経過と共に覚醒個体数が増加し 30 時間後においてはすべての個体が覚醒した (Table 3)。これらの結果から、冬眠導入に中枢オピオイド系は関与しないが、6°C の体温が持続されている維持期には中枢オピオイド系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、受容体サブタイプの同定を行うために、冬眠ハムスターの側脳室に選択的オピオ

Table 3. Time-related validity of naloxone in T_b elevation of hibernating hamsters

| Injection time | 17 hr | 27hr | 28 hr | 29 hr | 30 hr |
|-----------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| Percentage of arousal | 0 % (0 / 6) | 0 % (0 / 6) | 17 % (1 / 6) | 67 % (4 / 6) | 100 % (6 / 6) |

In this experiment, hamsters which had completed more than the third hibernation cycle were used. Naloxone (10 nmol) microinjected into the left lateral ventricle 17, 27, 28, 29 and 30 hr after hibernation onset, respectively. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Each value represents percentage of arousal hamsters at each time point.

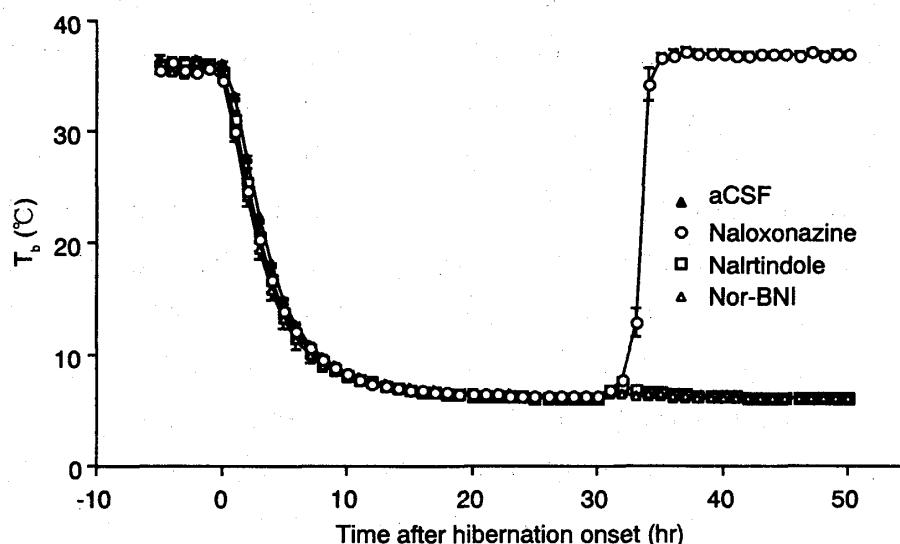


Fig. 10. Effects of opioid receptor antagonist on the T_b during maintenance phase of hibernating hamsters. In this experiment, hamsters which had completed more than the third hibernation cycle were used. Naloxonazine (10 nmol), naltrindole (10 nmol) or Nor-BNI (10 nmol) microinjected into the left lateral ventricle 30 hr after hibernation onset, respectively. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C. Each value represents the mean \pm SEM of T_b . Six animals were designated in each experimental group.

イド受容体拮抗薬を投与したところ、 $\mu 1$ 受容体選択的拮抗薬ナロキソナジンの投与で冬眠は解除されたが、 δ 、 κ 受容体選択的拮抗薬の投与では体温に影響を及ぼさなかった(Fig. 10)。これらの結果は、ハムスターの冬眠時低体温は $\mu 1$ -オピオイド受容体を介して制御されていること、および δ 、 κ -オピオイド受容体は低体温維持には関係しないことを示唆している。

したがって導入期の体温下降はA1受容体の活性化によって惹起されるという結果を合わせて考察すると、導入期の体温下降は、アデノシンA1受容体を介するアデノシン系、維持期の低体温は $\mu 1$ 受容体を介するオピオイド系により制御されており、体温下降開始27時間後から30時間後の間に制御系が切り替わることが明らかとなった。

3. 冬眠ハムスターの覚醒に関与する中枢機構

3-1. 覚醒期の体温上昇に関与する中枢、および末梢機構

ハムスターや地リスは冬眠期間中、低体温状態を何ヶ月間も維持するのではなく、代謝最終産物の排泄、あるいは睡眠をとるために中途覚醒する。この覚醒時に見られる体温上昇は約3時間で完了する。これまでの検討で、著者らは冬眠時の体温下降や低体温維持は熱産生の抑制により誘導されることを明らかにしてきた。したがって、ハムスターが冬眠から覚醒するための急激な体温上昇を引き起こすには、熱産生機構の抑制を解除、再賦活化する必要がある。

熱産生を促進する中枢性の内因性生理活性物質としてthyrotropin-releasing hormone (TRH)が知られている。TRHは下垂体より thyroid-stimulating hormone (TSH) を分泌するホルモンとして1970年にScally, Guilleminらによって単離され、構造決定がなされた最初の視床下部ホルモンである。TRHはTRH受容体に作用して生理活性を発現するが、TRH受容体は下垂体前葉以外に視床下部を含む中枢神経系に広く分布している⁴⁰⁾ことから、ホルモンとしての機能と同時に、神経伝達物質あるいは神経修飾因子としての機能を有していると考えられている^{41, 42)}。まず著者らは、TRHが冬眠覚醒時の体温上昇に関与するか否かを、抗TRH抗体を用いて検討した。通常冬眠ハムスターは触刺激により覚醒するが、この触刺激による覚醒は抗TRH抗体を側脳室に前投与しておくことにより惹起されなかった。これにより、冬眠からの覚醒には脳内におけるTRHの遊離が必要不可欠であることが明らかとなった(Fig. 11)。また今回の検討では、抗TRH抗体は高分子であり血液脳関門を通過して下垂体門脈まで到達できるとは考えづらい。したがって、TRHの活性化によって惹起される覚醒期の熱産生は下垂体-甲状腺系を介した内分泌作用ではなく、脳内において神経伝達を賦活化させる神経作用を介して発現しているものと考えられる。

ところで、ハムスターなどのげっ歯類では食物摂取や寒冷暴露時に骨格筋収縮によるふるえ熱産生⁴³⁾に加えて、褐色脂肪組織(brown adipose tissue: BAT)で熱産生が亢進することが知られている⁴⁴⁾。そこで、冬眠からの覚醒期にいずれの熱産生機構に関与するかを、BAT温、産熱中枢である視床下部の脳内温度、体温、および行動量を測定することにより検討した。Fig.12に示したように、冬眠からの覚醒時、まずBAT温の上昇が観察され、それに引き続き脳内温度、体温の順で温度上昇が確認された。また、覚醒初期にはふるえ熱産生の指標である行動量の増加は

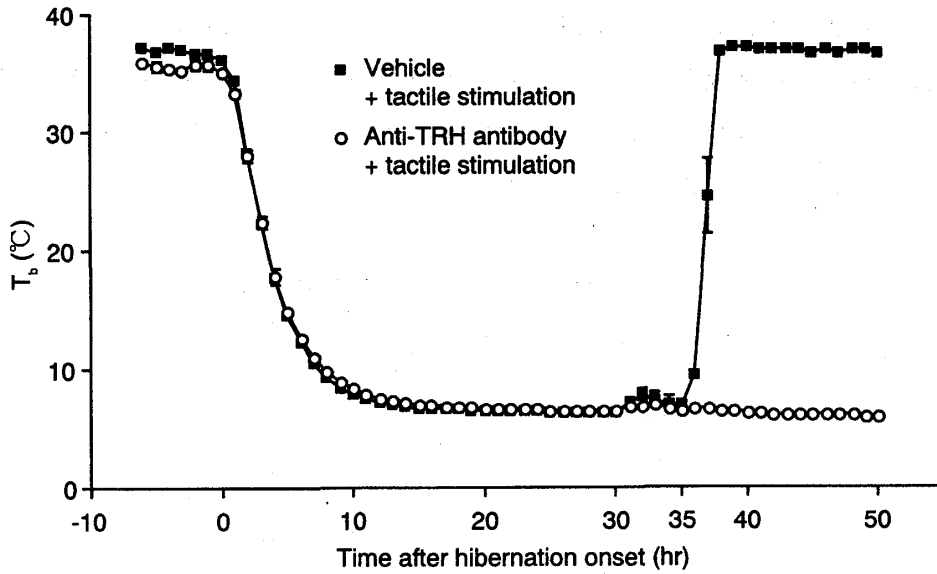


Fig. 11. Effects of anti-TRH antibody on tactile stimulation-induced T_b increases in hibernating hamsters. In this experiment, hamsters which had completed more than the third hibernation cycle were used. Tactile stimulation was delivered to hamsters 35 hr after hibernation onset. Anti-TRH antibody ($10\mu\text{l}$) was microinjected into left lateral ventricle 5 hr before tactile stimulation at an ambient temperature of 5°C . Although no effect was elicited with icv injection of antibody vehicle 0.01 M phosphate buffered saline containing 0.1% sodium azide, 0.2% gelatin (data is not shown). Each value represents the mean \pm SEM of T_b . Six animals were designated in each experimental group.

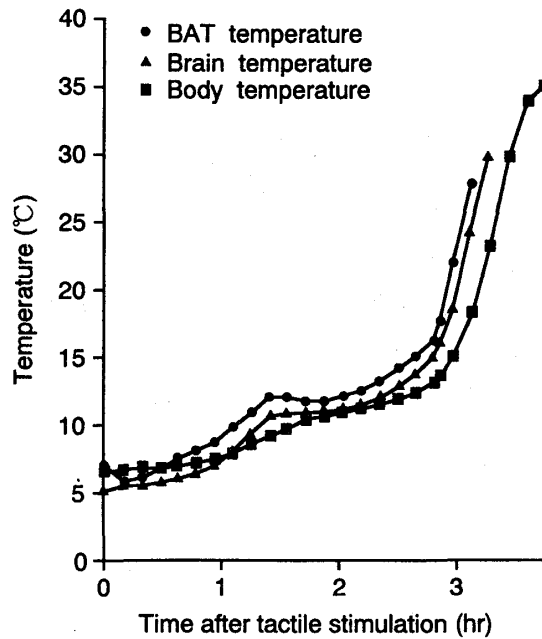


Fig. 12. The relationship of changes in T_b , brain temperature or intrascapular brown adipose temperature (T_{BAT}) with time (hr) after tactile stimulation in hibernating hamster. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5°C .

確認されなかったが、体温が10℃を超えたあたりから行動量の増加が確認された(Fig. 13)。これらの結果より覚醒期の体温上昇は、まずBATで産生された熱が機能回復に必要な脳などの器官を暖め、血液循環や呼吸が増強することで骨格筋におけるふるえ熱産生がさらに加わることにより惹起されるものと示唆される。

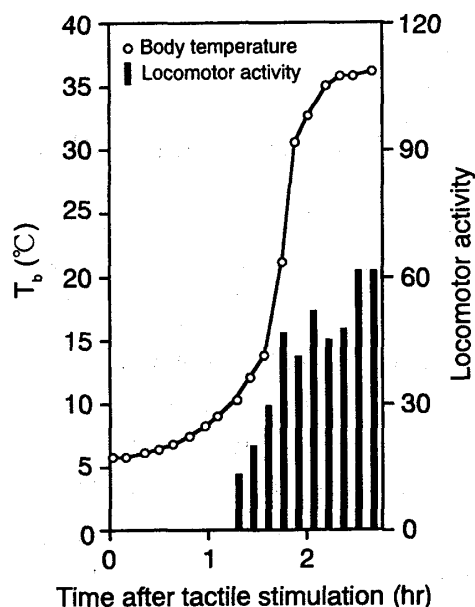


Fig. 13. The relationship of changes in T_b or locomotor activity with time (hr) after tactile stimulation in hibernating hamster. Experiments were conducted at an ambient temperature of 5 °C.

3-2. TRHの体温上昇機構

これまでに、脳内でTRHが遊離することにより冬眠からの覚醒が惹起されること、および覚醒時の熱産生にはBATが重要な効果器として機能していることを明らかにした。そこで著者らは、TRHがBATにおける熱産生を亢進するか否かについて検討した。Fig. 14で示したように、TRHを側脳室内投与するとBAT温は直腸温に先行して上昇し、BAT温の上昇は直腸温の上昇よりも顕著であった。この結果より、TRHはBATにおける熱産生を亢進することが示唆された。そこで次に、TRHの体温上昇作用機構について検討を進めた。BATは脊髄の第2～第5頸髄(Th 2～5)から投射された交感神経系が豊富に分布していることから交感神経支配を受けていることが知られている⁴⁵⁾。さらに、甲状腺ホルモンのトリヨードサイロニン(T_3)やチロキシン(T_4)がBAT中のUCP mRNAを増加させることから甲状腺ホルモンによる制御も受けられていると考えられる⁴⁶⁾。そこでTRHの体温上昇作用は神経系とホルモン系のいずれを介して発現しているかを、交感神経切除法、血清中甲状腺ホルモンの定量を行うことにより検討した。Fig. 15で示したように、TRHによるBAT温上昇はBATに投射している交感神経線維を切除することにより有意に抑制された(Fig. 15)。また、TRHを側脳室内投与しても血清 T_3 、 T_4 量に変化は認められなかった

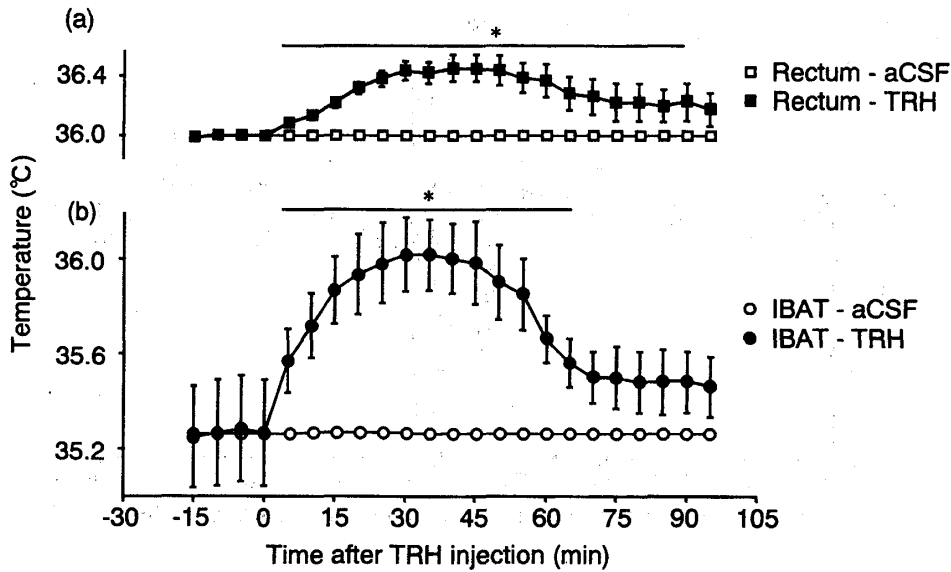


Fig.14. Time-related hyperthermic effects of icv injection with TRH (closed symbols) or aCSF (open symbols) on rectal temperature (T_{rec} ; squares in a) and T_{IBAT} (circles in b) in isoflurane-anesthetized hamsters. ACSF or TRH (552 pmol) was injected into the left lateral ventricle, respectively. Experiments were conducted at an ambient temperature of 23 °C. Values of T_{rec} and T_{IBAT} represent the respective mean \pm SEM. Differences where $p < 0.01$ (**) in ΔT_{IBAT} or ΔT_{rec} compared with the value obtained at time 0 were considered significant. Six animals were designated in each experimental group.

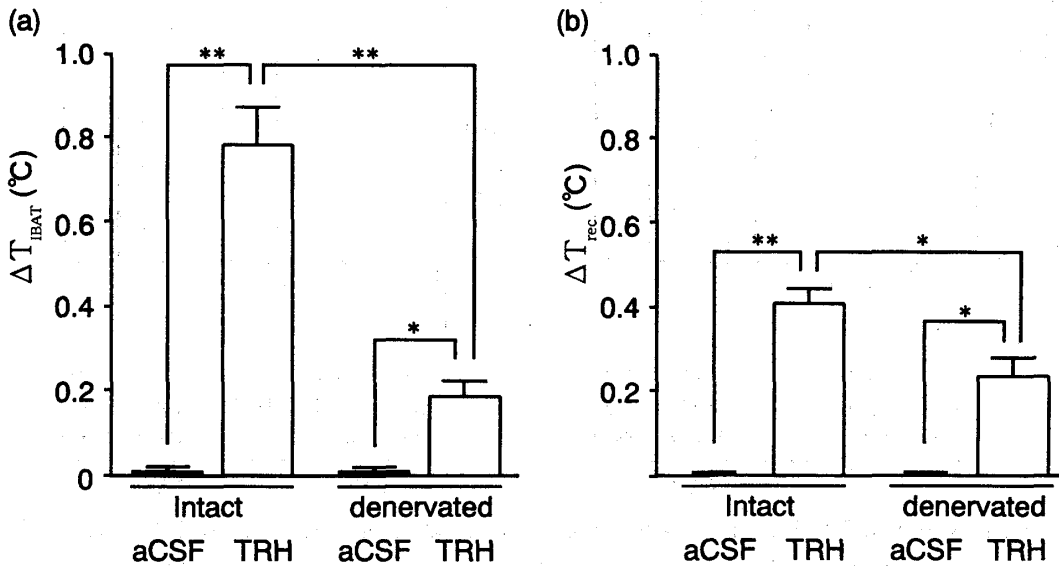


Fig. 15. Effects of bilateral denervations of the IBAT-innervating nervous system on the maximal changes in T_{IBAT} (ΔT_{IBAT} in a) and T_{rec} (ΔT_{rec} in b) on icv injection of TRH in isoflurane-anesthetized hamsters. ACSF or TRH (552 pmol) was injected into the left lateral ventricle, respectively. The peak time of maximal change of ΔT_{IBAT} and ΔT_{rec} were 30 and 40 min after TRH injection, respectively. Experiments were conducted at an ambient temperature of 23 °C. Each column represents the mean \pm SEM of either ΔT_{IBAT} or ΔT_{rec} . Differences where $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) in ΔT_{IBAT} or ΔT_{rec} were considered significant. Six animals were designated in each experimental group.

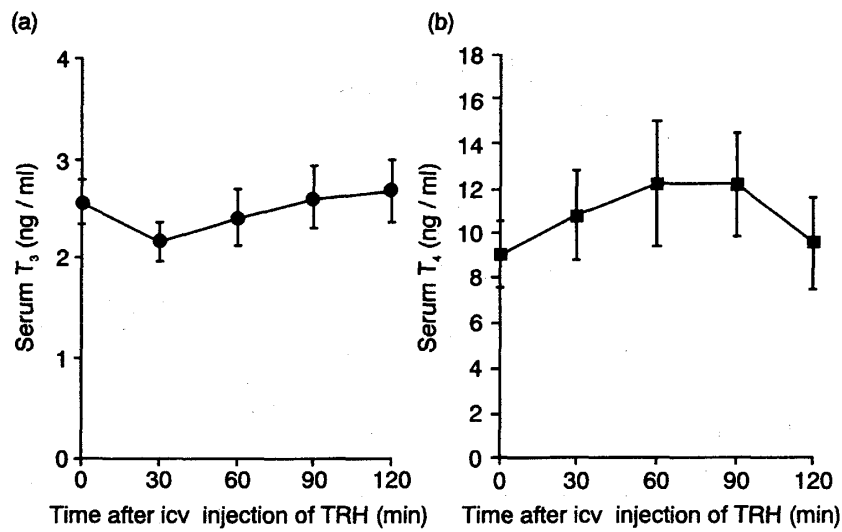


Fig. 16. Time-related changes in serum triiodothyronine (T_3 , a) or tyrosine (T_4 , b) after icv injection of TRH in isoflurane-anesthetized hamsters. TRH (552 pmol) was injected into the left lateral ventricle. Experiments were conducted at an ambient temperature of 23 °C. Each value represents the mean \pm SEM of T_3 or T_4 in serum. Six animals were designated in each experimental group.

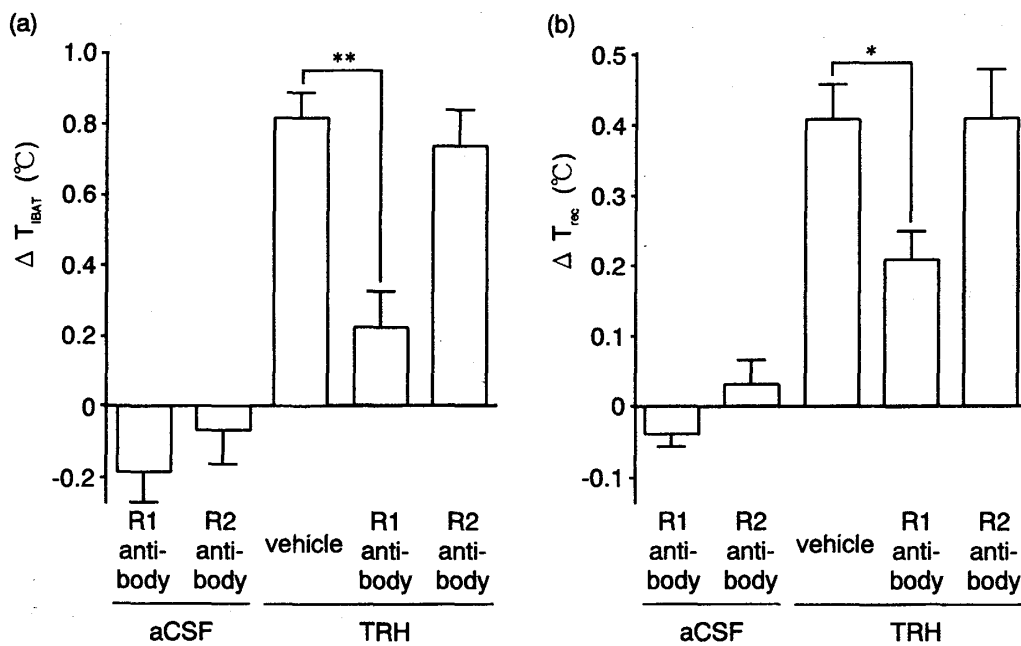


Fig. 17. Effects of anti-TRH-R1 and anti-TRH-R2 antibodies on ΔT_{IBAT} (a) and ΔT_{rec} (b) with icv injection of TRH in isoflurane-anesthetized hamsters. Vehicle, anti-TRH-R1 (dilution; 1:10 in aCSF), anti-TRH-R2 (dilution; 1:10 in aCSF) or TRH (552 pmol) was injected into the left lateral ventricle, respectively. Both antibodies were injected 30 min before icv TRH. ΔT_{IBAT} and ΔT_{rec} were respectively measured at 30 and 40 min after TRH injection. Experiments were conducted at an ambient temperature of 23 °C. Each column represents the mean \pm SEM of ΔT_{IBAT} or ΔT_{rec} . Differences where $p < 0.05$ (*) in ΔT_{IBAT} or ΔT_{rec} between TRH-injected and antibody-pretreated groups were considered significant. Six animals were designated in each experimental group.

(Fig. 16)これらの結果より、脳内投与により惹起される TRH の体温上昇は、ホルモン系ではなく交感神経系を介して発現しているものと考えられる。

TRH 受容体は type-1 (TRH-R1) と type-2 (TRH-R2) の 2 つのサブタイプに細分されるが、近年、TRH-R1^{47, 48)}、TRH-R2^{49, 50, 51)}ともにクローニングされ、その分布が明らかになった。TRH-R1 は下垂体および視床下部を含む中枢神経系に比較的広く分布しており、TRH-R2 は下垂体には分布せず視床などに局在することが報告されている。そこで TRH の体温上昇作用がいずれの受容体サブタイプを介して発現しているかを TRH の特異的結合を阻害しうる希釈倍率の受容体抗体(データ未掲載)を用いて検討した。Fig. 17 で示したように TRH の体温上昇作用は抗 TRH-R1 抗体により減弱され、抗 TRH-R2 抗体では影響を受けなかった。この結果から、TRH の体温上昇作用は TRH-R1 を介して発現することが示唆された。また、有意ではないが抗 TRH-R1 抗体の単独投与で BAT 温がわずかに下降したことから、正常時の体温調節に TRH-R1 を介した中枢 TRH の関与していることが推察される。

次に著者らは、TRH の体温上昇作用における脳内作用部位を検索した。TRH を、DMH、PO、AH、VMH へ実質内微量投与すると BAT 温上昇が観察されたが、LH、PH への投与では観察されなかった(Table 4)。BAT 温上昇が観察された部位の中でも PO、DMH では他の TRH 感受性部位よりも大きな温度上昇が惹起された。したがって、TRH の体温上昇作用部位は DMH、PO を中心とした内側視床下部であることが示唆された。PO、AH、DMH、VMH を含む視床下部神経

Table 4. Changes in T_{IBAT} and T_{rec} following TRH (552 pmol) microinjections into the hypothalamic nucleus of isoflurane-anesthetized hamsters.

| Brain region | ΔT_{IBAT} | | ΔT_{rec} | | n |
|--------------|-------------------|--------------------|------------------|---------------|----|
| | aCSF | TRH | aCSF | TRH | |
| PO | 0.03 ± 0.06 | 0.60 ± 0.06**,#,++ | 0.00 ± 0.00 | 0.29 ± 0.06** | 6 |
| AH | 0.02 ± 0.05 | 0.34 ± 0.03** | 0.00 ± 0.00 | 0.19 ± 0.060* | 6 |
| VMH | 0.01 ± 0.04 | 0.25 ± 0.03** | 0.00 ± 0.00 | 0.22 ± 0.03** | 9 |
| DMH | 0.02 ± 0.05 | 0.68 ± 0.07**,#,++ | 0.00 ± 0.00 | 0.34 ± 0.07** | 6 |
| LH | 0.02 ± 0.04 | 0.03 ± 0.02 | 0.00 ± 0.00 | 0.01 ± 0.01 | 10 |
| PH | 0.03 ± 0.06 | 0.02 ± 0.02 | 0.00 ± 0.00 | 0.01 ± 0.01 | 6 |

Each value represents the mean ± SEM of ΔT_{IBAT} or ΔT_{rec} . The respective values of ΔT_{IBAT} and ΔT_{rec} were measured at 30 and 40 min after TRH injection. Experiments were conducted at an ambient temperature of 23°C. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test followed with Mann-Whitney U-test compared with the respective groups microinjected with aCSF alone (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$). As for the TRH-sensitive sites, differences where $p < 0.01$ (#; compared with ΔT_{IBAT} for AH) and $p < 0.01$ (++; compared with ΔT_{IBAT} for VMH) were considered significant when verified with the one-way ANOVA followed by the Sheffe's post hoc test between any 2 sites.

核の活性化、もしくは脱抑制によりBATの熱産生が亢進されることが報告されている^{52, 53, 54, 55})。また堀らは、PO/AHスライス標本にTRHを電気泳動的微量投与すると、cold-sensitive neuronsが活性化され、warm-sensitive neuronsは抑制されることを報告している⁵⁶)。したがって、TRHはPO、AH、DMH、VMHに存在しているthermo-sensitive neuronsの活性を変化させることによりBATにおける熱産生亢進を惹起するものと考えられる。さらに、HeuerらはPO、およびDMHに高密度のTRH-R1 mRNAが発現していること、およびTRH-R2 mRNAは検出できないことを報告しており⁵⁷)、TRHの体温上昇に関与する受容体サブタイプの分布も、微量投与実験における結果を支持するものであると考えられる。

結語および今後の展望

以上の知見より、ハムスターの冬眠は、導入期はアデノシンA1受容体を介した中枢アデノシン系、維持期は μ 1オピオイド受容体を介した中枢オピオイド系、覚醒期はTRH-R1受容体介した中枢TRH系という冬眠時期に特異的な中枢神経機構により制御されていると結論される。

様々なストレスによって副腎髄質からグルココルチコイドが分泌することは広く受け入れられているが、このストレスに起因したグルココルチコイド量増加がアデノシンA1受容体数を増加させるという報告がある。したがって冬眠の準備段階であるアデノシンA1受容体のup-regulationに、慢性的な寒冷ストレスに生体が曝されることによって合成誘導されたグルココルチコイドが関係している可能性も考えられるため、冬眠とグルココルチコイドとの関係を追求していく予定である。また、本著では記載しなかったが、冬眠導入時間を解析してみると約9割の個体が暗期(17:00~9:00)の時間帯に冬眠を誘発することから、冬眠は体内のサーカディアンリズムと密接な関係にあることが推察される。サーカディアンリズムを支配する生物時計の所在として、視床下部の視交叉上核が知られている。この視交叉上核に着目して冬眠と生体リズムを研究課題とし、分子生物学的、行動薬理的、免疫組織学的手法などを用いて研究を進めていく方針である。

引用文献

1. Lovegrove B.G., Raman J. and Perrin M.R., *J. Comp. Physiol.*, **171**, 1-10 (2001).
2. Grigg G.C., Beard L.A. and Augee M.L., *Comp. Biochem. Physiol.*, **92**, 609-612 (1989).
3. Toro I. and Viragh S., *Z. Zellforsch Mikrosk Anat.*, **69**, 403-417 (1966).
4. Chatfield P.O. and Lyman C.P., *Am. J. Physiol.*, **163**, 566-574 (1950).
5. Kayser C., *Arch. Sci. Physiol.*, **6**, 193-212 (1952).
6. Lachiver F., *Seances Soc. Biol. Fil.*, **146**, 245-248 (1952).
7. Dausmann K.H., Glos J., Ganzhorn J.U. and Heldmaier G., *Nature*, **429**, 825-826 (2004).
8. Hamill N.J., McGinn M.D. and Horowitz J.M., *J. Comp. Physiol.*, **159**, 167-72 (1989).
9. Heller H.C. and Colliver G.W., *Am. J. Physiol.*, **227**, 583-589 (1974).

10. Zhou F., Zhu X., Castellani R.J., Stimmelmayer R., Perry G., Smith M.A. and Drew K.L., *Am. J. Pathol.*, **158**, 2145-2151 (2001).
11. Grodums E.I. and Dempster G., *Can. J. Microbiol.*, **17**, 359-63 (1971).
12. Kemper G.B. and Ruben R.L., *Comp. Biochem. Physiol.*, **73**, 445-50 (1982).
13. Saikova V.A. and Sverdlov A.G., *Radiobiologia*, **23**, 182-6 (1983).
14. Lee T.F., Nummerger F. and Wang L.C.H., *Life in the cold*, Westview press, Boulder, 316-322 (1993).
15. Ruiz A., Sanz J.M., Gonzalez-Calero G., Fernandez M., Andres A., Cubero A. and Ros M., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1310**, 168-714 (1996).
16. Nakayama T. Hammel H, Hardy J.D. and Eisenman J.S., *Am. J. Physiol.*, **204**, 1122-1126 (1963).
17. Feldberg W. and Myers R.D., *J. Physiol.*, **184**, 837-855 (1966).
18. Kelso S.R. Perlmutter M.N. and Boulant J.A., *Am. J. Physiol.*, **242**, 77-84 (1981).
19. Minokoshi Y., Saito M. and Shimazu T., *Am. J. Physiol. Regul. Inter. Comp. Physiol.*, **251**, 1005-1008 (1986).
20. Kobayashi A., Osaka T., Namba Y., Inoue S. and Kimura S., *Brain Res.*, **827**, 176-184 (1999).
21. Monda M., Viggiano A. and De Luca V., *Brain Res.*, **887**, 344-349 (2000).
22. Nakamura K., Matsumura K., Kaneko T., Kobayashi S., Katoh H. and Negishi M., *J. Neurosci.*, **22**, 4600-4610 (2002).
23. Hensel H., *Mpnogr. Physiol. Soc.*, **38**, 1-321 (1981).
24. Waldeck B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**, 434-436 (1976).
25. Nichols D. and Locke R., *Physiol. Rev.*, **64**, 1-64 (1984).
26. Proctor K.G., Stojanov and Bealer S.L., *Am. J. Physiol.*, **261**, 457-462 (1991).
27. Hensel H., *Mpnogr. Physiol. Soc.*, **38**, 1-321 (1981).
28. Sebastiao A.M. and Ribeiro J.A., *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 341-346 (2000).
29. Hori T., Nakashima T., Kiyohara T. and Shibata M., *Neurosci. Lett.*, **31**, 283-288 (1982).
30. Khalilov E. and Dymnikova L.P., *Neirofiziologia*, **13**, 365-370 (1981).
31. Adler B., Goodman R.R. and Pasternal G.W., *In Handbook of chemical neuroanatomy*, Vol 9, Elsevier, Amsterdam., 359-393.
32. Mansour A., Khachaturian H., Lewis M.E. et al., *J. Neurosci.*, **7**, 2445-2465 (1987).
33. Bloom F., Batenberg E., Rossier J.K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 1591-1595 (1978).
34. Kawai Y., Inagaki S. and Shiosaka S. et al., *Brain Res.*, **297**, 21-32 (1984).
35. Rauhala P., Idanpaan-Heikkila J.J., Lang A., Tuominen R.K. and Mannisto P.T., *Am. J. Physiol.*, **268**, 758-765 (1995).
36. Wu S., Wong M.C., Chen M., Cho C.H. and Wong T.M., *J. Biomed. Sci.*, **11**, 726-731 (2004).
37. Handler C.M., Piliero T.C., Geller E.B. and Alder M.W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 847-855 (1994).
38. Oeltgen P.R., Nilekani S.P., Nuchols P.A., Spurrier W.A. and Su T.P., *Life Sci.*, **43**, 1565-74 (1988).

39. Beckman A.L. and Lladós-Eckman C., *Brain Res.*, **328**, 201-205 (1985).
40. Ogawa N., Yamawaki Y., Kuroda H., Nukina I., Ota Z. et al., *Peptides*, **3**, 669-677 (1982).
41. Griffiths E.C., *Psychoneuroendocrinology*, **10**, 225-235 (1985).
42. Horita A., Carino M.A. and Lai H., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 311-332 (1986).
43. Waldeck B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**, 434-436 (1976).
44. Nichols D. and Locke R., *Physiol. Rev.*, **64**, 1-64 (1984).
45. Derry D. and Daniel H., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **48**, 160-167 (1970).
46. Ribeiro M.O., Carvalho S.D., Schultz J.J., Chiellini G., Scanlan T.S., Bianco A.C. and Brent G.A., *J. Clin. Invest.*, **108**, 97-105 (2001).
47. Straub R.E., Frech G.C., Joho R.H. and Gershengorn M.C., *Proc. Acad. Sci. USA.*, **87**, 9514-9518 (1990).
48. Zhao D., Yang J., Jones K.E., Gerald C., Suzuki Y., et. al., *Endocrinology*, **130**, 3529-3536 (1992).
49. Cao J., O'Donnell D., Vu H., Payza K., Pou C., et. Al., *J. Biol. Chem.*, **273**, 32281-32287 (1998).
50. Itadani H., Nalamura T., Itoh J., Iwasa H., Kanatani A., et. Al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**, 68-71 (1998).
51. O'Dowd B.F., Lee D.K., Huang W., Nguyen T., Cheng R., et. Al., *Mol. Endocrinol.*, **14**, 183-193 (2000).
52. Chen X.M., Hosono T., Yoda T., Fukuda Y. and Kanosue K., *J. Physiol.*, **512**, 883-892 (1998).
53. Cao W.H., Fan W. and Morrison S.F., *Neurosci.*, **126**, 229-240 (2004).
54. Madden C.J. and Morrison S.F., *Am. J. Physiol. Regul. Inter. Comp. Physiol.*, **286**, 320-325 (2004).
55. Minokoshi Y., Saito M. and Shimazu T., *Am. J. Physiol. Regul. Inter. Comp. Physiol.*, **251**, 1005-1008 (1986).
56. Hori T., Yamasaki M., Asami T., Koga H. and Kiyohara T., *Neuropharmacology*, **27**, 895-901 (1988).
57. Heuer H., Schafer M.K., O'Donnell D., Walker P. and Bauer K., *J. Comp. Neurol.*, **428**, 319-336 (2000).