

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09419

研究課題名(和文)新規視床下部ホルモンによる新たなストレス応答機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of CRF by a novel hypothalamic hormone

研究代表者

蔭山 和則 (Kageyama, Kazunori)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30343023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部室傍核(PVN)で産生されるcorticotropin-releasing factor (CRF)は、ストレス反応における視床下部-下垂体-副腎(HPA)系の主要な調節因子である。43アミノ酸残基のは乳類RFアミドペプチド pyroglutamylated RFamide peptide (QRFP)の受容体であるGpr103は、げっ歯類のPVNにも発現を認めており、ストレス反応への関与が示唆された。視床下部細胞において、QRFP添加により、CRF mRNAとCRFの転写活性は有意に増加した。

研究成果の概要(英文)：Pyroglutamylated RFamide peptide (QRFP), an important regulator of metabolism and energy homeostasis, has orexigenic effects. QRFP acts via a specific receptor, Gpr103. Gpr103 mRNA is expressed in the rat hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). In the PVN, corticotropin-releasing factor (CRF) is produced in response to stress, stimulates the release of adrenocorticotrophic hormone from the anterior pituitary. Gpr103a and Gpr103b mRNA, and Gpr103 (a and b) proteins were expressed in the hypothalamic cells. The Gpr103 mRNA and protein levels were increased by QRFP. QRFP also stimulated CRF mRNA levels and CRF promoter activity directly in 4B cells following their transfection with the CRF promoter. QRFP stimulated cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation. PKC-dependent signaling would be upstream of the CREB phosphorylation. Thus, QRFP-dependent pathways are involved in the regulation of CRF gene expression in the hypothalamus.

研究分野：内分泌

キーワード：視床下部 ストレス CRF

## 1. 研究開始当初の背景

生体の最も重要なストレス応答系は脳視床下部-下垂体-副腎系であり、その機能は最上位ホルモンの脳視床下部 CRF により調節されている。米国 Salk 研究所の Vale 博士らは、CRF を同定し、CRF を中心としたストレス応答機構を確立したが、申請者は同研究室に留学する機会を得て、下垂体及び血管における CRF 受容体の機能解析に従事した。申請者はこれまで、*in vivo* では CRF ノックアウトマウスを、*in vitro* では、本邦で初めて視床下部不死化細胞を用いて、視床下部 CRF についての研究を行ってきた。CRF を発現する視床下部不死化細胞は、現在でもその使用は国内外数箇所に限られている。これまでに、ストレス応答における性差の機序やホメオスターシス機構を解明した。

## 2. 研究の目的

血中脂質や血糖値の上昇は、脳視床下部で感知され、摂食行動を抑制させる。ストレスはこれら摂食行動に影響を与えることで、代謝の変化をもたらす。結果、ストレスは高血圧、糖尿病、虚血性心疾患などの生活習慣病を引き起こす。しかしながら、代謝因子の変化や摂食因子が、CRF を中心とした視床下部でのストレス応答機構に与えるメカニズムは未だ明らかではない。申請者は、代謝及びエネルギーホメオスターシスに重要なホルモンである glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が、視床下部細胞において、CRF 遺伝子発現を活性化させ、更に高血糖が同反応を増強させることを明らかにした。近年発見された代謝及び摂食行動に重要な kisspeptin や pyroglutamylated RFamide peptide (QRFP) の受容体 GPR54 と GPR103 は視床下部室傍核に強く発現し、代謝及び

エネルギーホメオスターシスに関係してストレス反応への関与が示唆されるが、明らかでない。特に、43 アミノ酸残基のほ乳類 RF アミドペプチド QRFP は、G タンパク質共役型受容体 (Gpr) の一種である Gpr103 にフルアゴニストの活性を有し、代謝や摂食行動に重要なホルモンと報告されている。本研究では、これら新規ペプチドの視床下部における統御機構と働きを検討することによって、代謝や摂食因子との相関から新たなストレス応答機構の機序を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

視床下部 4B 細胞を培養し、Gpr103 mRNA 発現を調べた。また、Western blot 法により、QRFP 添加による Gpr103 蛋白発現の変化について検討した。

Real time-PCR 法により、 $\beta$ 2-microglobulin をコントロールとして使用し、QRFP 添加後の CRF mRNA を評価した。さらに CRF 遺伝子 5' -promoter-luciferase fusion gene 導入により CRF の転写活性を評価した。各種 protein kinase (PK) 阻害剤の前添加によって、QRFP による CRF 転写活性調節作用の変化につき検討した。また、QRFP 添加によるリン酸化 CREB (pCREB) 蛋白発現の変化について、Western blot 法により調べ、PKC 阻害剤による影響について検討した。

これらの実験を 3 回行って解析した。統計学的処理は ANOVA を用い、引き続き Fisher's protected least-significant difference post-hoc test を行った。P < 0.05 の危険率をもって有意とした。

## 4. 研究成果

視床下部 4B 細胞において Gpr103a/b mRNA の発現を確認した。また、QRFP

添加後、24 時間での Gpr103 蛋白の有意な増加がみられた。

QRFP 100 nM 添加により、CRF mRNA は 24 時間で、CRF の転写活性は 6 時間で有意に増加した。CRF mRNA は用量依存的な増加もみられ、100 nM、1  $\mu$ M で有意に増加した。CRF 転写活性は QRFP 100 nM で有意な増加を認めた。QRFP による CRF 転写活性の増加は、PKA 阻害剤 (H89、PKAi)、PKC 阻害剤 (Ro-32-0432、BIM) の前投与により抑制された。pCREB 蛋白発現は、QRFP 添加後 1 時間で有意に増加した。PKC 阻害剤 (Ro-32-0432) の前投与により pCREB 蛋白発現の抑制がみられた。

ラット視床下部 4B 細胞において Gpr103a/b mRNA 発現と Gpr103 蛋白発現を確認した。Gpr103 はラット視床下部に発現していることが知られており、QRFP はラット視床下部において Gpr103 を介して CRF ニューロンを活性化すると考えられる。また、本研究において Gpr103 蛋白レベルは QRFP 依存性に増加を示した。

視床下部 4B 細胞において、QRFP は CRF mRNA 発現とプロモーター活性を増加させた。PKA・PKC 阻害薬の前投与により QRFP 添加後の CRF プロモーター活性は抑制されたことから、QRFP による CRF 遺伝子発現には、PKA 及び PKC 経路の関与が示された。Gpr103 受容体は G $\alpha$ q 受容体であり、QRFP の作用により Ca<sup>2+</sup> 及び PKC 経路が活性化されると考えられる。本研究では PKA 経路を介した CRF 遺伝子発現の増加も示されており、QRFP による pCREB 蛋白発現の増加も確認した。更に、PKC 阻害薬の前投与により CREB リン酸化は抑制された。以上から、QRFP による CRF 遺伝子発現には、PKA 及び PKC 経路の関

与が示され、PKC 経路及び Ca<sup>2+</sup>依存性シグナルが pCREB 経路の上流にあると考えられた。

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 5 件)

1. Kageyama K, Murasawa S, Niioka K, Otsuka F, Yagi H, Daimon M. Regulation of gonadotropins by urocortin 2 in gonadotropic tumor L $\beta$ T2 cells. *Neurosci Lett* 27:63-67, 2017. 査読有り
2. Asari Y, Kageyama K, Nakada Y, Tasso M, Takayasu S, Niioka K, Ishigame N, Daimon M. Inhibitory effects of a selective Jak2 inhibitor on adrenocorticotrophic hormone production and proliferation of corticotroph tumor AtT-20 cells. *Oncotargets Ther* 10:4329-4338, 2017. 査読有り
3. 蔭山和則. そのACTHは、本当に下垂体から? *総合診療* 27, 1081, 2017. 査読無し
4. Yamashita M, Kageyama K, Murakami H, Sugiyama A, Yanagimachi M, Sato E, Murasawa S, Matsui J, Tamasawa N, Daimon M. The Evaluation of Adrenal Function in Two Cases of Hypocortisolism Accompanied by Liver Cirrhosis. *Intern Med* 55:765-768, 2016. 査読有り
5. Ishigame N, Kageyama K, Takayasu S, Furumai K, Nakada Y, Daimon M. Regulation of the expression of corticotropin-releasing factor gene by pyroglutamylated RFamide peptide in rat hypothalamic 4B cells. *Endocr J* 63:919-297, 2016. 査読有り

6. Terui K, Kageyama K, Nigawara T, Moriyama T, Sakihara S, Takayasu S, Tsushima Y, Watanki Y, Yamagata S, Sugiyama A, Murasawa S, Nakada Y, Suda T, Daimon M. Evaluation of the (1-24) adrenocorticotropin stimulation test for the diagnosis of primary aldosteronism. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 17:1-6, 2016. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Kageyama K, Daimon M. Symposium: Epigenetic regulation of POMC gene and proliferation in corticotroph tumor cells. International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016

2. Ishigame N, Kageyama K, Takayasu S, Daimon M. Possible stimulatory effects of pyroglutamylated RFamide peptide (QRFP) on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: regulation of corticotropin-releasing factor gene by QRFP in rat hypothalamic cells. International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016

3. Asari Y, Kageyama K, Nakada Y, Daimon M. Inhibitory effects of a selective Jak2 inhibitor on adrenocorticotrophic hormone production and proliferation of corticotroph tumor AtT-20 cells. International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016

4. Nakada Y, Kageyama K, Ishigame N, Daimon M. Diagnostic development of growth hormone-releasing peptide-2 test in thyrotropin-producing pituitary adenomas. International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕なし  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
蔭山 和則 (KAGEYAMA, Kazunori)  
弘前大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：30343023

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )