

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20891

研究課題名(和文) レプチンによる視床下部CRFニューロン調節メカニズム：蛍光可視化マウスによる検討

研究課題名(英文) Mechanism of hypothalamic Corticotropin Releasing factor regulation by Leptin

研究代表者

山形 聡 (Yamagata, Satoshi)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50769940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：CRFニューロン蛍光可視化マウス(CRF-Venusマウス)の視床下部室傍核Venus陽性ニューロンには、グルタミン酸作動性入力およびGABA作動性入力が存在することが確認された。またCRFニューロン選択的ChR2発現マウス(ChR2-mCherry/CRF-iCre Neo)を用いた検討では、ほぼ全てのCRFニューロンにChR2が発現した。CRFニューロンは青色光により脱分極・発火した。CRFニューロンへの青色光照射によりPVHや他の脳内領域においてc-Fos発現が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コルチコトロピン放出因子(CRF)はストレス応答における視床下部-下垂体-副腎軸の要であると同時に、摂食に関与すると言われている。しかし詳細なメカニズムは解明されていない。またレプチンによるCRFニューロンの調節機構は明らかになっていない。CRF-Venus Neoマウスは、CRFニューロンが蛍光可視化されるため電気生理学的手法や形態学的検証を可能にし、CRFニューロンのはたらきを解明するための重要なツールとなる。

研究成果の概要(英文)：In the whole cell patch-clamp recording, Venus-positive neurons in the PVH of CRF-Venus mice have glutamatergic and GABAergic inputs. In a study using CRF neuron-selective ChR2-expressing mice (ChR2-mCherry / CRF-iCre Neo), almost all CRF neurons expressed ChR2(mCherry). CRF neurons were depolarized and fired by blue light. Blue light irradiation of CRF neurons increased c-Fos expression in the PVH and other brain regions.

研究分野：内分泌学

キーワード：Leptin CRF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レプチンは脂肪細胞から分泌されるペプチドホルモンで、摂食抑制やエネルギー代謝に関与している。レプチンが視床下部弓状核のプロオピオメラノコルチン(POMC)ニューロン上のレプチン受容体(Ob-Rb)に結合すると、POMCのプロセッシングが促され副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)とメラノサイト刺激ホルモン(MSH)が生成される。MSHは視床下部室傍核(PVN)のCRFニューロンに発現するメラノコルチン受容体4(MC4R)を介しCRFの分泌が促進される。我々は、視床下部培養細胞(N39)を用いた *in vitro* の実験系において、レプチンがレプチン受容体(Ob-Rb)の下流シグナルである JAK-STAT 系における STAT3 のリン酸化を介し CRF およびウロコルチン(Ucn)2/3 遺伝子発現を増加させることを明らかにした (Yamagata S et al. Peptide, 2013)。しかし *in vivo* の生理的条件下において、レプチンがいかなる視床下部局所回路や液性因子を介して CRF ニューロンを刺激するのかは明らかでない。

2. 研究の目的

そこで CRF ニューロン蛍光可視化マウス(CRF-Venus Neo マウス)を用いた電気生理学的手法を用い、レプチンが CRF ニューロンに直接的または間接的に作用するか検証することを目的とした。

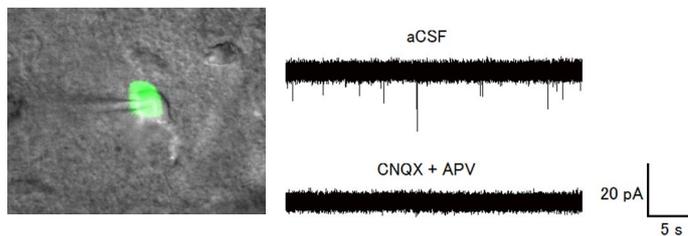
3. 研究の方法

CRF-Venus Neo マウスの視床下部 PVN 急性スライスを用いて、パッチクランプ法による電気生理学的手法および免疫組織化学や *in situ* hybridization などの形態学的手法を用いた。

4. 研究成果

(1) CRF-Venus マウスのゲノムから Neo カセットが除去された改良型 CRF-Venus Neo マウスを作成した。CRF-GFP Neo マウスを用い、PVN の CRF ニューロンへの抑制性 GABA 作動性入力とグルタミン作動性入力の存在を確認した。

図: Venus(CRF)ニューロン同定を EPSC 観察する。Venus ニューロンを同定後、ガラスピペットの先端をアプローチさせ whole cell clamp を行う。-60 mV 電位固定下で内向きの EPSC が観察され、Glu 作動性チャネル阻害薬(CNQX および AP5)でブロックされたことから Glu 作動性入力の存在が観察された。



(2) CRF-Venus Neo マウスを用いた CRF ニューロン分布の検討では、視床下部室傍核、扁桃中心核、分界条床核、脚橋被蓋核、バリントン核、下オリーブ核に Venus の発現を認めた (Kono J et al., Brain Struct Funct.222:1705-1732,2017)。

(3) 我々は以前視床下部 N39 細胞において、培養液へのレプチン添加によりレプチン受容体(Ob-Rb)の遺伝子発現が亢進することを報告した (Peptide, 2013)。N39 細胞は胎児マウス視床下部の培養細胞なので adult mouse の脳とは異なるものであり、またこの細胞系には室傍核以外の視床下部細胞も混在しているため、レプチン受容体は CRF (Venus)ニューロン上に発現していない可能性もあると考えられる。CRF-Venus マウスの視床下部 CRF ニューロンにおいてレプチン受容体が発現しているのか、引き続き検証を行う予定である。

(4) CRF ニューロンのはたらきを解明する目的で、以下の検証も行った。新たに作製された Rosa26 部位に ChR2-mCherry 配列をノックインしたマウス (Rosa^{ChR2/+}) と CRF-iCre マウスを交配し(Cre/loxP システム)、CRF ニューロン選択的に ChR2 を発現させた(Rosa^{ChR2/+}; CRF^{iCre/+})。このマウスの PVH では、ほぼ全ての CRF ニューロンに ChR2 が発現した。

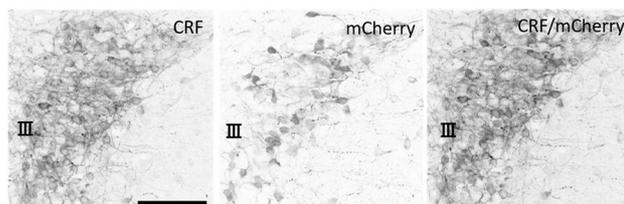


図: CRF と mCherry の蛍光二重染色 (視床下部室傍核)。ほぼ全ての CRF ニューロンに、mCherry の共存が認められた。

in vitro の検討において、CRF ニューロンは青色光により脱分極・発火した。TTX は青色光による

CRF ニューロンの発火を阻害した。これは電位依存性 Na チャネルの開口により CRF ニューロンの発火が引き起こされたことを表す。また Cd は青色光による CRF ニューロンの発火を抑制しなかった。これは青色光による CRF ニューロンの発火が外部からの伝達物質によって引き起こされたものではないことを表す。in vivo の検討では CRF ニューロンへの青色光照射により PVH や他の脳領域で c-Fos 発現が増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satoshi Yamagata, Isumi Akiba, Tatsuya Sato, Katsuya Uchida, Li Zhou, Rie Natsume, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi
2. 発表標題 Creation and application of CRF neuron-selective channelrhodopsin-2 expressing mouse
3. 学会等名 The 2017 Japan-NIH joint Symposium
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山形 聡, 秋庭 伊澄, 周 麗, 夏目 里恵, 阿部 学, 崎村建司, 井樋慶一
2. 発表標題 CRFニューロン選択的チャネルロドプシン2 (ChR2) 発現マウスの作成と応用
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----