

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06858

研究課題名(和文) 海馬神経ネットワークにおけるニューロメジンUの生理的役割とその応用

研究課題名(英文) A physiological role for Neuromedin U in the hippocampal neuronal network and the application

研究代表者

濱田 幸恵 (Hamada, Sachie)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：00399320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はラット海馬CA1領域において、ニューロメジンU(NMU)1型または2型受容体の共局在比が星状細胞マーカーよりも神経マーカーの方が高いこと。さらに、海馬スライス標本を用いた細胞外記録測定では、NMUはCA3-CA1シナプスにおける集合興奮性シナプス後電位を増強することを明らかにした。細胞外記録後c-Fos染色を行った結果、NMUはCA1領域のFos陽性細胞数を増加させたが、GABAニューロンマーカーと共局在するFos陽性細胞数の割合を減少させたことが明らかになった。これらの結果は、NMU受容体の活性化が海馬のCA1領域におけるGABA作動性ニューロン活動に寄与することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ニューロメジンU(NMU)が海馬の集合興奮性シナプス後電位を増強させることを明らかにした。研究代表者はNMU受容体を特異的に刺激することにより、より効率的にシナプス伝達を増強できるのではないかと考えている。シナプスでの情報伝達の効率が上がれば認知機能が高まると考えられているため、NMU受容体アゴニストが認知症改善薬として有益であると考えている。NMUの学習障害改善作用について検討しているのは、国内外において我々のグループのみであり、NMUが認知症の中核症状に効果をもつか今後検討したい。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we demonstrated that the colocalization ratio of Neuromedin U (NMU) type 1 or type 2 receptors was higher with neuronal nuclei (a neuronal marker) than with glial fibrillary acidic protein (an astrocyte marker) in the hippocampal CA1 region of rats. Moreover, we revealed that the bath application of NMU (1 microm) enhanced extracellular field excitatory postsynaptic potentials at Schaffer collateral-CA1 synapses in rat hippocampal slices. After extracellular recordings, we examined the pattern of neuronal activation induced by NMU using c-Fos immunohistochemistry (Fos-IR). Histological analyses revealed that NMU increased Fos-IR in the CA1 region, but reduced the proportion of Fos-IR colocalized with glutamic acid decarboxylase (a GABA neuron marker). These results suggest that the activation of NMU receptors contributes to GABAergic neuronal activity in the CA1 region of the hippocampus.

研究分野：神経薬理学

キーワード：海馬 神経ペプチド ニューロメジンU

1. 研究開始当初の背景

ニューロメジン U (NMU) は 1985 年に豚の脊髄より単離された神経ペプチドである。ヒトから両生類まで幅広い動物種から同定され、異なる動物種の間でも構造がよく保存されていたことから重要な生理的役割があるのではないかと考えられていた。しかし、その役割は長期間不明であった。2000 年になり、放射性ヨードを組み込んだ NMU の発光を測定することでオーファン受容体 FM-3 と FM-4 が NMU 受容体 1 (NMUR1) と NMU 受容体 2 (NMUR2) であると同定された。また、同時期に Szekeres らがイノシトールリン酸の濃度を測定することによって FM-3 が NMUR1 であることを同定している。

NMU 受容体が同定されたことにより、NMU の作用の解明が進んでいる。その作用は末梢組織では平滑筋の収縮、中枢組織ではストレス応答の制御、概日リズムの調節、摂食抑制作用が知られており、中枢組織におけるこのような NMU の作用は視床下部に発現している NMU 受容体によるものだとされている。摂食量の減少や運動量の増加、体重減少は視床下部における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンを介したものであることが明らかになっている。このような作用から、視床下部における NMU についてはメタボリックシンドロームに対する抗肥満薬として期待されており、研究が進んでいる。

中枢組織において、in situ hybridization 法により視床下部と海馬 CA1 野に NMU 受容体が発現することが明らかになっている。NMU と学習における関係についての研究は lipopolysaccharide (LPS) 誘発学習障害モデルマウスを用いて行われている。この研究では LPS によりミクログリアが活性化し、海馬 CA1 野において IL-6 や TNF- α が産生され、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) が減少することが確認されており、これらの変化が学習障害の原因であると考えられている。NMU を脳室内投与することで、海馬 CA1 野において BDNF が増加することが確認されており、この BDNF の増加によって学習が改善したとされている。

海馬は短期記憶を司っており記憶の形成に非常に重要な組織である。なかでも CA1 野は統合された情報を記憶として脳内の他の部位へ出力し、固定化する役割をもっており、そのメカニズムに CA3-CA1 シナプス結合における long-term potentiation (LTP) が含まれるのではないかと考えられている。また、BDNF が海馬の可塑性に関与していることが明らかになっているため、BDNF の増加による学習改善に海馬の可塑性も関与しているのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

NMU は内在性の摂食抑制物質と考えられており、運動量、体温上昇、酸素消費量とエネルギー消費量を増加させる。その作用は、視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンニューロンを介していると考えられている。NMU 受容体については視床下部の報告が多く、海馬機能についての基礎研究は進んでおらず詳細な解析が必要である。本研究において、視床下部弓状核で産生する NMU が、弓状核と海馬 CA1 領域に直接的な投射がないにも関わらず、CA1 に NMU 受容体がなぜ存在するのか、学術的な問いについて明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

本研究では 4~6 週齢雄性 Wistar ラットを用いた。

NMU 受容体の局在の検討

In situ hybridization 法により NMUR2 が CA1 錐体細胞層に多く発現することが明らかになった。しかし、ニューロンに存在するのかグリアに存在するのか確かな受容体発現部位については明らかにされていない。そこで本研究では、海馬 CA1 野における NMUR1、NMUR2、アストロサイトマーカー (GFAP)、神経細胞マーカー (NeuN) の検出をそれぞれの蛋白質に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡を用いて解析した。

細胞外記録法

神経細胞において NMU がシナプス応答に対してどのような影響を及ぼすのか検討するために field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) の測定を行った NMU を灌流せずに 1 分間に 1 度の刺激を 60 分間与えた標本をコントロール群とし、NMU を灌流した標本を NMU 処置群とした。

NMUによる最初期遺伝子の発現誘導

細胞外電位記録法によって、NMUを灌流することでfEPSPの振幅が増加することが明らかになった。このfEPSP増加の要因を探るために細胞外電位記録法を行ったスライスに対し、蛍光免疫染色を行い海馬CA1野の錐体細胞層における最初期遺伝子(c-Fos)陽性細胞の数をカウントした後、c-Fos陽性細胞と共発現するグルタミン酸輸送体(EAAC1)またはGABA合成酵素(GAD)との割合を検出した。本研究では、過去の報告にもあるようにc-Fosを神経細胞活性マーカーとして用いた。コントロール群はACSFのみを灌流し、60分間、1分間に1度刺激を与えたスライスを用いた。NMU灌流群はfEPSP測定の際にNMUを含むACSFを灌流し、60分間、1分間に1度刺激を与えたスライスを薄切したものをを用いた。

NMU刺激によるシナプス応答への影響

上述した免疫染色の結果を受けて、NMU受容体の生理機能について時間分解能が優れている電気生理学的手法の一つであるスライスパッチクランプ法を用い解析を行う。海馬CA1領域は、CA3領域からくるシェーファー側枝という軸索とシナプス結合しており、記憶に重要であると考えられている。そこで、本研究ではCA3-CA1シナプス伝達に注目し興奮性シナプス電流または抑制性シナプス電流に対する影響について検討した。

4. 研究成果

海馬CA1野のNMUR1陽性細胞において、GFAPを共発現している割合は $5.7 \pm 3.7\%$ ($n = 4$)であったが、NeuNを発現している割合は $59.5 \pm 10.1\%$ ($n = 4$)であった。NMUR2陽性細胞において、GFAPを発現している割合は $4.5 \pm 3.1\%$ ($n = 4$)であったが、NeuNを発現している割合は $46.5 \pm 12.2\%$ ($n = 4$)であった。いずれの場合もNeuN陽性細胞の割合が有意に高かった($p < 0.05$)。このことから、これら2つの受容体はアストロサイトではなく、神経細胞に発現していると考えられた。次に、海馬スライス標本を用いてCA3-CA1シナプスにおけるfEPSPのNMU灌流下による影響を検討したところ、fEPSPの振幅はNMU処置群で有意に高かった($p = 0.034$)。このfEPSPを測定したスライス標本を用いて神経活性化マーカーであるc-Fos陽性細胞の数を検討したところ、コントロール群では 70.32 ± 9.68 個 ($n = 8$)、NMU処置群では 102.67 ± 11.59 個 ($n = 8$)となりc-Fos陽性細胞の数はNMU処置群で有意に高かった($p = 0.047$)。さらに、c-Fos陽性細胞と共発現するEAAC1の割合はコントロール群で $52.9 \pm 13.1\%$ 、NMU処置群で $59.6 \pm 13.5\%$ ($n = 7$)となり有意な変化は見られなかった。c-Fos陽性細胞と共発現するGADの割合はコントロールで $42.6 \pm 10.4\%$ 、NMU処置群で $34.7 \pm 7.2\%$ ($n = 6$)となり有意に少なかった($p = 0.048$)。また、スライスパッチクランプ法を用いてEPSCを測定したところNMUの灌流前後でEPSCの大きさに有意差が認められなかった。EPSC測定の際と同じ大きさの刺激を用いてIPSCを測定したところNMUの灌流によりIPSCの振幅に有意な減少が認められた($p = 0.009$)。

以上の結果から、NMUはGABAニューロンの活動を抑制することにより、海馬CA3野から海馬CA1野への興奮性シナプス伝達を増強することが考えられた。海馬におけるシナプス可塑性は記憶や学習に関わると考えられており、今回のNMUによるfEPSPの増強は海馬の可塑性に影響し、記憶や学習の機能に関与すると考えられる。本研究では、NMUがGABAニューロンの活動を抑制する分子メカニズムまでは明らかにできなかったが、今後詳細なNMU受容体サブユニットの機能を解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前野圭徹, 矢部瑞紀, 濱田幸恵, 石橋仁
2. 発表標題 海馬CA1野に発現するニューロメジンU受容体の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 関東支部会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------