

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17998

研究課題名（和文）視床下部室傍核CRFニューロンによる交感神経活性化：脳脊髄神経路の同定と機能解析

研究課題名（英文）Activation of the sympathetic nervous system by CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: functional analysis of the cerebrospinal pathway

研究代表者

村澤 真吾（Murasawa, Shingo）

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：70829390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）： CRF遺伝子特異的Cre発現マウスに対してCre依存のGFP発現ウイルスベクターを注入することにより、CRFニューロンが脊髄まで直接一次投射していることが確認された。脊髄では後外側路から側索に神経線維の集簇が見られた。また、一部CRFニューロンがnNOS陽性細胞に近接しており、CRFニューロンが交感神経節へ直接投射していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRFニューロンと交感神経の関係を明らかにすることで、ストレス性の高血圧や自律神経失調症などのメカニズムを明らかとすることができる。今回の研究で、CRFニューロンと交感神経の直接的な神経路を同定することができ、上記のような疾患のメカニズム解明に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）： The present study confirmed that CRF neurons project directly primary to the spinal cord by injecting Cre-dependent GFP-expressing viral vectors into CRF gene-specific Cre-expressing mice. In the spinal cord, a cluster of nerve fibers was observed from the dorsolateral fasciculus to the lateral funiculus. In addition, some CRF neurons were in close proximity to nNOS-positive cells, suggesting that CRF neurons project directly to the sympathetic ganglia.

研究分野：神経内分泌

キーワード：CRFニューロン 視床下部 交感神経

1. 研究開始当初の背景

我々が生存するためには、血圧・心拍数・体温・体液量や浸透圧などを一定に保つことが不可欠である。しかし、生体内外には恒常性を脅かす様々な要因(「ストレス」)が存在する。それらのストレス侵襲に抗し、あるいは適応して、生体の恒常性を維持するために最も重要な脳内部位が視床下部室傍核(PVH)である。

PVHは内分泌系と自律神経系の中核であり複雑な構造と機能を有する。バゾプレシンとオキシトシンは大細胞のほか前交感神経ニューロンでも産生され、これらは脳幹部や脊髄へ投射して自律神経調節に与る。一方、脳室内CRF投与により血圧・心拍数が著明に増加することから(Itoi et al., *Neuropharmacology* 1994), CRFニューロンも交感神経を活性化することが示唆される。しかし交感神経系調節におけるCRFニューロン一次投射領域や脊髄への下降性神経路、これらを調節するメカニズムなどは知られていない。

最近我々は、CRF-iCre ノックインマウス(Itoi et al., *Endocrinology* 2014)を用いた検討で、PVHのCRFニューロンが正中隆起以外にも複数の脳内領域[視床下部外側索(LH)、視床室傍核(PVT)、外側結合腕傍核(LPB)、中脳水道周囲灰白室(PAG)、延髄孤束核(NTS)、腹外側網様体(VLR)、青斑核(LC)など]に直接投射することを世界で初めて発見した(Horio et al., 投稿中)。しかも極めて興味深いことに、CRFニューロンの細胞体は投射領域に対応してPVH内で亜核(subnuclei)を形成し、亜核ごとに投射領域が異なっている(ibid)。したがって、PVH内の亜核はそれぞれの異なる生理作用に関与するものと考えられる。CRFニューロン選択的チャンネルロドプシン2発現マウス(CRF-ChR2)のPVHに青色光を照射してCRFニューロンを選択的に発火させると上記一次投射野のすべてにおいてc-Fos発現が増加することから(山形ら、第40回日本神経科学大会2017年7月報告)、これらの投射神経路が機能的であることが実証された。また最近、CRF受容体1型(CRFR1)-iCreマウス、および、CRF受容体2型(CRFR2)-iCreマウスが新たに開発された。

2. 研究の目的

上述のような背景から研究代表者村澤は、生体に不可欠な恒常性維持システムの一つである自律神経系(交感神経系)とPVHのCRFニューロンの関連性に着目した。高血圧の発症には遺伝因子のほか環境因子の関与が指摘されており、とくに、慢性的なストレスは高血圧の危険因子である。そこで、ストレス応答中枢である視床下部CRFニューロンと自律神経系との関連性を明らかにすることにより、高血圧発症ならびに増悪メカニズムを解明し、さらに新たな治療法・予防法の開発に寄与することができると考えた。そのために本研究では、PVHのCRFニューロン亜核の中から自律神経(交感神経)調節に関与するものを同定し、それらが一次投射ニューロンを経て脊髄側索に至るまでの神経路を明らかにする。さらに、それらがどのような機能を担っているのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

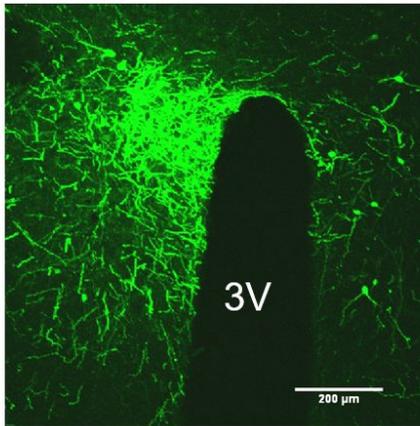
CRFニューロン - 交感神経系における神経路の同定

CRF-iCre Neoマウス(CRF-iCreマウスからNeoカセットを除去した)を用いてPVHから脊髄に投射する神経路と、交感神経系に関与するCRFニューロン亜核を同定する。まず、PVHにCre依存的GFP/WGA発現AAVベクター(GFPにより一次投射ニューロンを同定、WGAはシナプスを超えて二次ニューロンまで同定可能)を注入することにより順行性にPVHから脊髄側索に至る下降神経路を同定した。GFPの同定はGFP免疫染色によって行った。また脊髄においてGFPと同時にnNOS(神経型一酸化窒素合成酵素)の免疫染色を行うことで、交感神経節との位置関係を確認した。

4. 研究成果

(1) PVH (Cre依存的GFP/WGA発現AAVベクター注入部位)

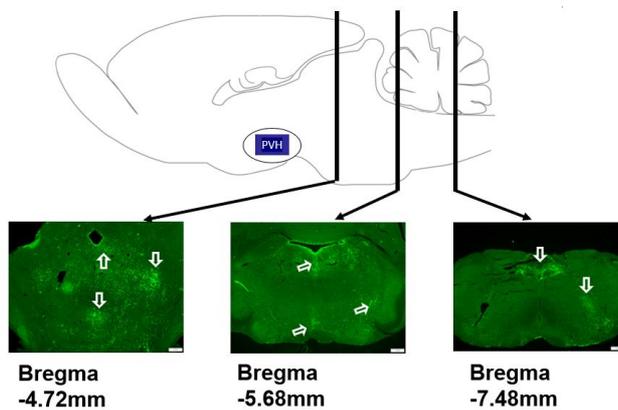
注入側のPVHにGFP染色陽性ニューロンが多数確認された。



3V: third ventricle

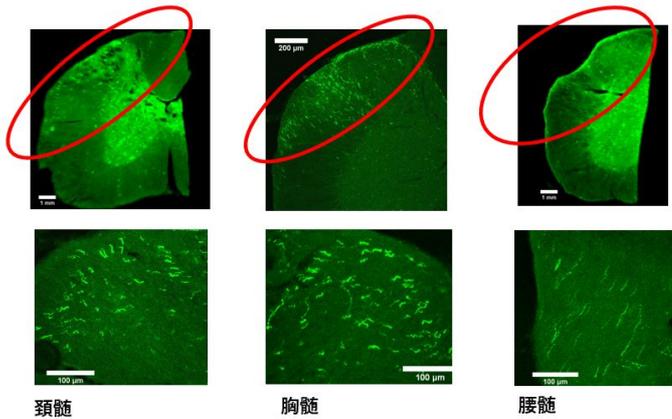
(2) CRF ニューロン脳内下行経路

脳内各部位を下行する CRF ニューロンが確認された。



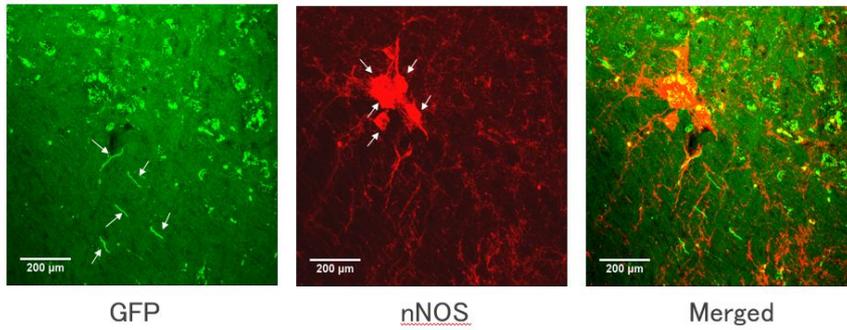
(3) 脊髄における CRF ニューロン局在

脊髄外側路から側索に神経線維が集簇



(4) 脊髄における GFP/nNOS2 重免疫染色

胸髄レベルで nNOS 抗体陽性ニューロンの細胞体と GFP 陽性ニューロンの神経線維が近接していることが確認された。



上述の実験結果により、我々が開発したCRF-iCre Neo マウスにCre 依存的 GFP/WGA 発現ベクターを注入することにより、CRF ニューロンの投射系を明らかにすることができた。CRF ニューロンは脊髄へと直接投射しており、かつ胸髄レベルでは nNOS 抗体陽性ニューロンの近傍に見られることから、CRF ニューロンが視床下部室 PVH より直接脊髄へ投射していることが示唆された。

今後は光遺伝学的手法などを用いて、CRF ニューロンによる自律神経系調節機能を明らかにしていくことが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	井樋 慶一 (Itoi Keiichi)		
研究協力者	佐藤 達也 (Sato Tatsuya)		
研究協力者	内田 克哉 (Uchida Katsuya)		
研究協力者	アシュラフ タルクダ - (Ashraf Talukder)		

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
---------	---------