

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591343

研究課題名(和文) 視床下部においてプロラクチン放出ペプチドがストレス性緊急応答を制御するメカニズム

研究課題名(英文) Regulatory mechanism for processing acute stress responses in the hypothalamus by prolactin-releasing peptide

研究代表者

井樋 慶一 (Itoi, Keiichi)

東北大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：60232427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：プロラクチン放出ペプチド(PrRP)は延髄ノルアドレナリン(NA)作動性ニューロン内に共存する。そこで、PrRPとNAが視床下部室傍核(PVN)内でコルチコトロピン放出因子(CRF)ほか神経内分泌ニューロンの活性化に与ることを検証した。まず、延髄から延髄からPVNに直接投射するPrRP含有NAニューロンが、ストレスにより活性化されること、PrRPとNAが協調的にはたらくことが証明された。次に、CRF-Venus knockin mouse視床下部スライスを用いNAはグルタミン酸作動性入力を介しCRFニューロンを刺激性に調節することが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Prolactin-releasing peptide (PrRP) is colocalized with noradrenaline (NA) in the medulla. We examined whether PrRP and/or NA are involved in activation of neuroendocrine neurons, including corticotropin-releasing factor (CRF) neurons, in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). It was demonstrated that PrRP-containing NA neurons are activated by stress, and that NA and PrRP work in a cooperative manner in the PVN. Using a PVN slice of the CRF-Venus knockin mouse, it was shown that NA stimulates CRF neurons via glutamatergic inputs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：ノルアドレナリン ストレス 視床下部 副腎皮質ホルモン 脳幹部 神経ペプチド パゾプレシン CRF

### 1. 研究開始当初の背景

プロラクチン放出ペプチド (PrRP) は G タンパク共役型オーファン受容体リガンドとして発見されたプロラクチン放出活性を有するペプチドであるが、視床下部の神経内分泌ニューロンには存在しないので、生理的なプロラクチン分泌調節因子ではないと考えられている。ところが、PrRP は延髄でノルアドレナリン (NA) 作動性ニューロン内に共存していることがわかり、NA と共にストレス性神経伝達に関わる可能性が浮上した。なぜなら、NA は延髄から視床下部にストレス性緊急応答シグナルを伝える重要な神経伝達物質だからである。

我々は、無麻酔ラット視床下部室傍核 (PVN) において PrRP と NA が協調的にはたらき副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) や AVP 分泌を促すことを発見した。これは PrRP が、PVN におけるストレス制御に関与することを裏付けるものである。視床下部膜分画に脳内最大の PrRP 結合能が認められることもこの考えを支持する。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、ストレスにตอบสนองして PrRP 含有ニューロンの活動性が増加し、その結果、NA と共に PrRP が視床下部内に分泌され、両者によってコルチコトロピン放出因子 (CRF) をはじめとする神経内分泌ニューロンが活性化されることを検証する。

### 3. 研究の方法

ラットを用いた in vivo の実験系で、逆行性色素を PVN に注入後、出血ショックなどのストレスを負荷し、延髄から PVN に直接投射する PrRP 含有 NA ニューロンが活性化されることを明らかにする。

視床下部 CRF ニューロンに直接 PrRP が作用するか否かを明らかにするため、CRF ニューロンを蛍光可視化するための実験動物を開発する。遺伝子ターゲティングにより、CRF-Venus knockin mouse を作成する。このマウス視床下部スライスを用いて CRF ニューロンのパッチクランプを行う。

### 4. 研究成果

Fluorogold (FG) を PVN に注入後、出血ショックを負荷したラットで、延髄の PrRP ニューロン内に FG と c-Fos の両者が発現することが確かめられた。したがって、延髄から PVN に直接投射する PrRP 含有 NA ニューロンが、ストレスにより活性化されることが証明された。

実験ツールとして新たな遺伝子改変マウスが作成された。すなわち、相同組換えにより CRF 遺伝子座に Venus が挿入された CRF-Venus knockin mouse である。CRF-Venus 脳内で Venus 発現は概ね CRF 発現に一致して認められ、PVN において糖質

コルチコイド欠乏状態において Venus 発現強度および CRF 発現率が増加したことから、CRF ニューロンの性格を示すことが確認された。CRF-Venus knockin mouse の PVN を含む視床下部スライスを作成し、電気生理実験を行った。その結果、CRF ニューロンにはグルタミン酸作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンが入力することが証明された。また、NA はグルタミン酸作動性入力を介して CRF ニューロンを刺激性に調節することが明らかにされた。PrRP をはじめとするペプチドが CRF ニューロンに及ぼす影響は現在検討中である。

### 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7件)

1. Uchida K, Taguchi Y, Sato C, Miyazaki H, Kobayashi K, Kobayashi T, Itoi K. Amelioration of improper differentiation of somatostatin-positive interneurons by triiodothyronine in a growth-retarded hypothyroid mouse strain. *Neuroscience Letters* 559, 111-116, 2014. 査読有

2. Kageyama K, Itoi K, Iwasaki Y, Niioka K, Watanuki Y, Yamagata S, Nakada Y, Das G, Suda T, Daimon M. Stimulation of corticotropin-releasing factor gene expression by FosB in rat hypothalamic 4B cells. *Peptides* 51:59-64, 2014. 査読有

3. 井樋慶一. CRF ニューロン調節メカニズム解明を目指した遺伝子改変動物の作成と応用. *ACTH Related Peptides* 24, 42-43, 2013. 査読無

4. Keiichi Itoi, Shinji Ohara, Kazuto Kobayashi. Selective Ablation of Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase Neurons in the Brain by Immunotoxin-Mediated Neuronal Targeting: New Insights into Brain Catechol-aminergic Circuitry and Catecholamine-Related Diseases. *Advances in Pharmacology* 68, 155-166, 2013. 査読有

5. Kasahara Y, Sato K, Takayanagi Y, Mizukami H, Ozawa K, Hidema S, So KH, Kawada T, Inoue N, Ikeda I, Roh SG, Itoi K, Nishimori K. Oxytocin receptor in the hypothalamus is sufficient to rescue normal thermoregulatory function in male oxytocin receptor knockout mice. *Endocrinology* 154, 4305-4315, 2013. 査読有

6. 井樋慶一. イムノトキシンニューロンターゲティング法を用いた脳内ストレス応答系の検討. *ACTH-Related Peptides* 23, 34-36, 2012. 査読無

7. Itoi K, Sugimoto N, Suzuki S, Sawada

K, Das G, Uchida K, Fuse T, Ohara S, Kobayashi K. Targeting of locus ceruleus noradrenergic neurons expressing human interleukin-2 receptor  $\alpha$ -subunit in transgenic mice by a recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38: a study for exploring noradrenergic influence upon anxiety-like and depression-like behaviors. *Journal of Neuroscience* 31, 6132-6139, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計 29 件)

1. 井樋慶一, Ashraf Hossain Talukder, 小澤遼, 布施俊光, 佐藤隆幸, 菅谷琢磨, 山崎真弥, 阿部学, 夏目里恵, 崎村建司. 視床下部 CRF ニューロン蛍光可視化動物を用いた研究の展望. 第 41 回自律神経生理研究会, 日本光電(株)本社研修センター, 東京, 2013 年 12 月 7 日

2. 河野順子, Greti Aguilera, Ying Liu, Sam Clokie, 内田克哉, 元池郁子, 木下賢吾, 布施俊光, 井樋慶一. ラット視床下部室傍核における糖質コルチコイド応答遺伝子のゲノムワイド解析. 第 40 回日本神経内分泌学会, 宮崎, 2013 年 10 月 26 日

3. Ashraf H. Talukder, 布施俊光, 内田克哉, 杉本直哉, 小澤遼, 山崎真弥, 阿部学, 夏目里恵, 崎村建司, 井樋慶一. コルチコトロピン放出因子産生ニューロン蛍光可視化マウスの視床下部室傍核における蛍光タンパク質局在の検討. 第 40 回日本神経内分泌学会, 宮崎, 2013 年 10 月 26 日

4. Ryo Ozawa, Ashraf Hossain Talukder, Takuma Sugaya, Takayuki Sato, Yuya Yoshida, Naoya Sugimoto, Kenji Sakimura, Toshimitsu Fuse, Keiichi Itoi. Development of a mouse line for visualizing corticotropin-releasing factor (CRF) neurons: a study for electrophysiological characterization of CRF neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. 第 36 回内藤カンファレンス, 分子からみたエネルギーバランスと摂食行動の制御. シャトラーゼ ガトーキングダム サッポロ, 札幌, 2013 年 9 月 10 日

5. 井樋慶一, Ashraf H. Talukder, 布施俊光, 杉本直哉, 小澤遼, 内田克哉, 山崎真弥, 阿部学, 夏目里恵, 崎村建司. コルチコトロピン放出因子産生ニューロン蛍光可視化マウスの作出と蛍光タンパク質脳内局在の検討. 包括的ネットワーク夏のワークショップ, 名古屋国際会議場, 名古屋, 2013 年 8 月 30 日

6. Ashraf H. Talukder, Toshimitsu Fuse, Junko Kono, Naoya Sugimoto, Ryo Ozawa, Katsuya Uchida, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Rie Natsume, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi. Histological characterization of mice expressing fluorescent proteins selectively in the corticotropin-releasing

factor neurons in the brain. 第 36 回日本神経科学学会, 京都国際会議場, 京都, 2013 年 6 月 10 日

7. Ashraf H. Talukder, Toshimitsu Fuse, Junko Kono, Naoya Sugimoto, Ryo Ozawa, Katsuya Uchida, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Rie Natsume, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi. Immunocytochemical characterization of the mouse brain expressing fluorescent proteins selectively in the corticotropin-releasing factor neurons. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, Gonryo-Kaikan, Sendai, May 10, 2013

8. 井樋慶一, 内田克哉, 半田篤志, アシユラフ・ホセイ・タルクダー, 大原慎司, 小林和人. イムノトキシンを用いた青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロン破壊法の開発—パーキンソン病における青斑核変性は病態といかなる関連性を有するか? 第 20 回カテコールアミンと神経疾患研究会, 品川プリンスホテル 東京, 2013 年 4 月 27 日

9. 井樋慶一. CRF ニューロン調節メカニズム解明を目指した遺伝子改変動物の作成と応用. 第 24 回間脳・下垂体・副腎系研究会, シンポジウム講演. ロシユダイアグノスティクス社, 東京, 2013 年 3 月 23 日

10. T. Fuse, K. Uchida, H. Yokohashi, T. Aiyoshizawa, Y. Iwasaki, K. Kinoshita, G. Das, C. Tanaka, H. Tomita, S. Ohara, K. Kobayashi, K. Itoi. A microarray-based screen for transcription factors expressed in fetal pontine noradrenergic neurons and examination of their functional roles in catecholamine-synthesizing enzyme gene expression. *Neuroscience* 2012, Oct. 14, 2012, New Orleans, LA, USA.

11. K. Itoi, Y. Liu, K. Kinoshita, S. Clokie, D. C. Kline, G. Aguilera. Genome wide analysis of glucocorticoid-responsive genes in the hypothalamic paraventricular nucleus region in rats. *Neuroscience* 2012, Oct. 13, 2012, New Orleans, LA, USA

12. Sugimoto N, Fuse T, Tsubokawa H, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Uchida K, Das G, Sakimura K, Itoi K. Generation of corticotropin-releasing factor (CRF)-Venus knock-in mouse for studying the regulatory mechanism of CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience* 2012, Oct. 13, 2012, New Orleans, LA, USA

13. 杉本直哉, 布施俊光, 坪川宏, 山崎真弥, 阿部学, 夏目里恵, 内田克哉, Gopal Das, 岡野悠太郎, 崎村建司, 井樋慶一. CRF-Venus ノックインマウスを用いた CRF ニューロン調節メカニズムの検討. 第 39 回日本神経内分泌学会学術集会, 2012 年 9 月 28 日, 北九州

14. 相吉澤輝洋, 澤田圭介, 内田克哉, 布

施俊光、小林和人、井樋慶一. 青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンに発現する転写因子群の発現過程における発現変動の検討. 第 39 回日本神経内分泌学会学術集会, 2012 年 9 月 28 日, 北九州

15. Aiyoshizawa A, Itoi K. The expression analysis of transcription factors screened in locus coeruleus of mouse embryo. 日本神経科学学会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋国際会議場, 名古屋

16. Fuse Toshimitsu, Kaneko Takuji, Yamazaki Maya, Abe Manabu, Natsume Rie, Sakimura Kenji, Itoi Keiichi. Visualization of CRH neurons by generating mCRH-iCre knock-in mouse. 日本神経科学学会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋国際会議場, 名古屋

17. Haruka Yokohashi, Toshimitsu Fuse, Katsuya Uchida, Akihiro Aiyoshizawa, Yasumasa Iwasaki, Kengo Kinoshita, Akira Okazaki, Gopal Das, Keisuke Sawada, Chiaki Tanaka, Hiroaki Tomita, Shinji Ohara, Kazuto Kobayashi, Keiichi Itoi. Screening of transcription factors expressed in the fetal pontine noradrenergic neurons and examination of their functional roles in catecholamine-synthesizing enzyme gene expression. 日本神経科学学会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋国際会議場, 名古屋

18. Itoi K. Selective Ablation of Dopamine Beta-Hydroxylase Neurons (Subpopulation of TH Neurons) in the Brain: New Insights into Brain Catecholaminergic Circuitry and Catecholamine-Related Diseases. Xth International Catecholamine Symposium, Concurrent Scientific Session 3, Theme A: TH: Regulation of Function and Expression, Asilomar Conference Grounds, CA, USA, September 11, 2012

19. 井樋慶一, Gopal Das. 視床下部室傍核 (PVN) における最初期遺伝子産物 FosB のストレス応答発現の動態. 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 2012 年 4 月 21 日, 名古屋国際会議場, 名古屋

20. 井樋慶一, 内田克哉, 布施俊光, Gopal Das, 横橋悠, 富田博秋, 小林和, 岩崎泰正. FACS-array 法を用いた新規カテコールアミン合成調節因子の同定. 東北内分泌研究会, 2012 年 4 月 7 日, 長陵会館記念ホール, 仙台

21. 井樋慶一. イムノトキシンニューロンターゲット法を用いた脳内ストレス応答系の検討. 第 23 回間脳・下垂体・副腎系研究会. シンポジウム: HPA 系の基礎研究 update. 2012 年 3 月 31 日, ロシュダイアグノスティクス本社ビル, 東京

22. 金子卓司, 布施俊光, 山崎真弥, 阿部学, 夏目里恵, 崎村建司, 井樋慶一. CRH 神経細胞可視化を目的とした CRH-Cre ノックイン

マウスの開発. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, パシフィコ横浜, 横浜

23. Yokohashi H, Fuse T, Uchida K, Sawada K, Aiyoshizawa A, Das G, Tomita H, Tanaka C, Konishidta K, Kobayashi K, Iwasaki Y, Itoi K. A FACS-array analysis of transcripts expressed in fetal pontine noradrenergic neurons and identification of transcription factors regulating the enzyme genes involved in catecholamine symteesis. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, パシフィコ横浜, 横浜

24. Das G, Uchida K, Itoi K. Stress-induced c-Fos and FosB expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. 第 38 回日本神経内分泌学会, 2011 年 11 月 26 日, 都道府県会館, 東京

25. 岩崎泰正, 蔭山和則, Gopal Das, 西山充, 布施俊光, 内田克哉, 須田俊宏, 吉田昌則, 井樋慶一. AP1 ファミリー転写因子 (Fos/Jun) が CRH 遺伝子転写活性に及ぼす影響. 第 38 回日本神経内分泌学会, 2011 年 11 月 26 日, 都道府県会館, 東京

26. 澤田圭介, 横橋悠, 岩崎泰正, 内田克哉, 布施俊光, Gopal Das, 相吉澤洋, 小林和人, 井樋慶一. 脳内ノルアドレナリン作動性ニューロン選択的転写因子の同定と、それらがカテコールアミン合成酵素遺伝子プロモーター活性に及ぼす影響の検討. 第 38 回日本神経内分泌学会, 2011 年 11 月 26 日, 都道府県会館, 東京

27. Itoi K, Uchida K, Fuse T, Iwasaki Y, Yokohashi H, Okazaki A, Sawada K, Das G, Kobayashi K, Tomita H, Tanaka C, Kinoshita K, Ohara S. Identification of novel transcription factors for catecholamine gene expression based upon the comprehensive analyses of transcripts in fetal pontine noradrenergic neurons by FACS-array technology. *Annual Meeting of the Society for Neuroscience* November 16, 2011, Washington DC, USA

28. 井樋慶一, 杉本直哉, 鈴木恵綾, 澤田圭介, ダスゴパール, 内田克哉, 布施俊光, 大原慎司, 小林和人. トランスジェニックマウスを用いたヒト IL-2 受容体  $\alpha$  サブユニット発現青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンターゲット法: ノルアドレナリン作動性ニューロンが不安様行動およびうつ様行動に及ぼす影響. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 15 日, パシフィコ横浜, 横浜

29. 横橋悠, 内田克哉, 布施俊光, 岩崎泰正, 木下賢吾, 岡崎彰, ダスゴパール, 澤田圭介, 田中千晶, 富田博秋, 大原慎司, 小林和人, 井樋慶一. 橋領域ノルアドレナリン作動性ニューロン発現遺伝子の網羅的解析に基づく新規カテコールアミン合成酵素調節因子の

同定 チロシン水酸化酵素プロモーター下  
緑色蛍光蛋白質発現マウス胎仔を用いた検  
討．第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月  
15 日、パシフィコ横浜、横浜

〔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〕

ホームページ等  
<http://www.bio.is.tohoku.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井樋 慶一 (ITOI, KEIICHI)  
東北大学・大学院情報科学研究科・教授  
研究者番号：60232427

### (2) 研究分担者

布施 俊光 (FUSE, TOSHIMITSU)  
東北大学・大学院情報科学研究科・助教  
研究者番号：50401039

内田 克哉 (UCHIDA, KATSUYA)  
東北大学・大学院情報科学研究科・助教  
研究者番号：40344709

### (3) 連携研究者

坪川 宏 (TSUBOKAWA, HIROSHI)  
東北福祉大学・健康学部・教授  
研究者番号：30227467

崎村 建司 (SAKIMURA, KENJI)  
新潟大学・脳研究所・教授  
研究者番号：40162325