

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461372

研究課題名(和文) CRFニューロン蛍光可視化動物を用いた視床下部局所回路調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploring the regulatory mechanism of hypothalamic local circuitry using a mouse line for visualizing CRF neurons by a fluorescent protein

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：コルチコトロピン放出因子(CRF)ニューロン蛍光可視化マウス(CRF-Venus)を用い視床下部に入力する神経伝達物質による局所回路調節機構を明らかにした。グルタミン酸(glu)作動性およびGABA作動性ニューロンがCRFニューロンに入力し、ノルアドレナリンは視床下部のglu作動性局所回路を媒介してCRFニューロンを活性化することが明らかにされた。CRF-VenusマウスゲノムからNeoカセットを除去することによりVenus発現強度と特異性が増強された。このマウスを用いVenus免疫組織化学によりマウス脳内CRFニューロンの分布が世界で初めて明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Hypothalamic local circuitry was examined using the CRF-Venus mouse in which CRF was labeled by modified yellow fluorescent protein. Hypothalamic CRF neurons receive direct glutamatergic and GABAergic inputs, and the glutamatergic EPSC frequency was increased by noradrenaline (NA). Thus, NA activates CRF neurons via glutamatergic interneurons in the hypothalamus. The Neo cassette was deleted from the genome of the CRF-Venus mouse, and CRF-VenusDeltaNeo mouse was generated. Venus fluorescent intensity, as well as its specificity for CRF neurons, was much improved. The distribution of CRF neurons in the whole brain of the mouse was disclosed for the first time using the CRF-VenusDeltaNeo.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：糖質コルチコイド 脳幹部 電気生理学 遺伝子ターゲティング レポーターマウス ドライバーマウス 免疫組織化学 in situ hybridization

1. 研究開始当初の背景

ストレス情報は、神経性および体液性の因子により視床下部室傍核 (PVN) のコルチコトロピン放出因子 (CRF) ニューロンに伝達される。これらの情報が CRF ニューロンで統合され、その出力が最終的に血中糖質コルチコイド (GC) レベルを決定する。したがって、CRF ニューロンはストレス応答系を統括する司令塔である。

CRF ニューロンを調節するメカニズムは、形態学、分子生物学、生化学、行動学など様々な手法を用いて研究されてきたが、細胞生理学的な研究は立ち遅れており、視床下部回路の基本的な動作原理は未だ明らかでない。たとえば、複数の脳内領域から視床下部に至る遠隔投射が直接 CRF ニューロンの活動を調節するのか、あるいは、PVN 内の局所回路 [グルタミン酸 (Glu) 作動性、または、GABA 作動性] を経て CRF ニューロンが調節されるのかは未だ明らかでない。

PVN には多彩な神経内分泌ニューロンが混在し、未染の生体標本でこれらを CRF ニューロンと区別することは難しい。この問題を克服するため、我々は CRF ニューロンの蛍光可視化マウスを作成した。

2. 研究の目的

本研究では、我々の作成した CRF ニューロン選択的蛍光可視化マウスを用い、視床下部に入力するノルアドレナリン (NA) を始めとする神経伝達物質がいかにして視床下部局所回路を調節するかを明らかにする。この目的を達成するため本研究では CRF ニューロン選択的蛍光可視化マウスゲノムを改変し改良型のマウスを作成した。

3. 研究の方法

CRF-Venus マウスを用い視床下部急性スライスを作成し whole cell clamp を行う。Venus で標識された CRF ニューロンにおいて次の実験を行う： Glu 作動性、GABA 作動性入力による CRF ニューロン調節機構を明らかにし、脳幹部から視床下部に投射する NA 作動性ニューロンおよびセロトニン (5-HT) 作動性ニューロンが PVN 内で Glu 作動性、あるいは GABA 作動性介在ニューロンを調節するメカニズムを明らかにする。

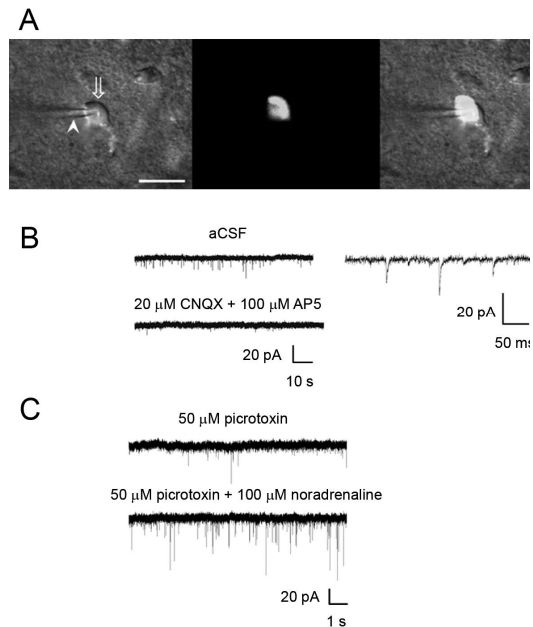
CRF ニューロン電気生理実験の効率を上げるため CRF-Venus マウスゲノムから Neo カセット除去 Venus 発現強度や特異性を高めた改良型のマウスを作成する。まず始めに frt-deleter mouse を作成し、次に CRF-Venus を deleter マウスと交配し Neo カセットが除去されたマウスラインをスクリーニングする。免疫組織化学を用い改良型マウス脳内 CRF ニューロンの分布を詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) CRF ニューロンへの glu 作動性および

GABA 作動性入力と NA, 5-HT による調節機構

Venus 発現ニューロンにガラス電極を近づけ whole cell clamp を行った (下図 A)。電位固定モードで EPSC および IPSC を計測し、CRF ニューロンで glu 作動性 EPSC (B) および GABA 作動性 IPSC (図示されていない) が直接入力することを明らかにした。次に、NA を細胞外液に加えたところ EPSC 頻度が有意に増加した (C)。

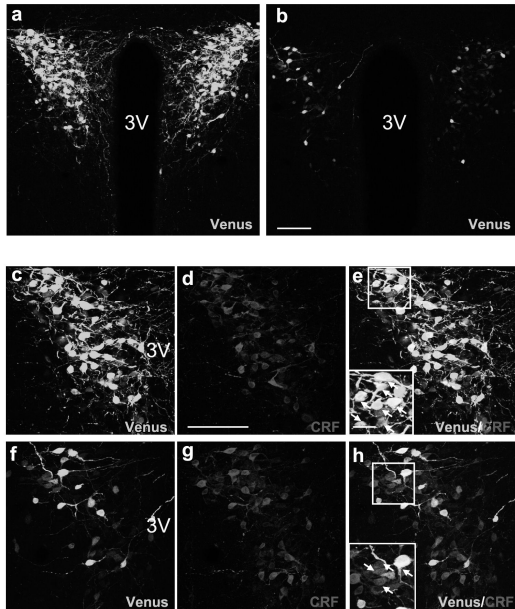


5-HT についても同様の検討を行った結果、NA 同様 glu 作動性 EPSC 頻度が増加することが明らかとなった。これらの実験結果から、脳幹部から視床下部に入力する NA や 5-HT は視床下部の glu 作動性局所回路を媒介して CRF ニューロンを活性化することが明らかにされた。

(2) CRF-Venus Δ Neo マウスの作成

CRF-Venus マウスゲノムから Neo カセットを除去し CRF-Venus Δ Neo マウスを作成した。このマウスでは (下図 a, c-e) Venus 発現強度と特異性が CRF-Venus マウス (b, f-h) と比較し格段に増加した。

CRF-Venus Δ Neo マウスの全ての脳領域で Venus 発現ニューロンの発現領域を検討し、マウス脳における CRF ニューロンの分布を世界で初めて明らかにした。CRF ニューロンは視床下部室傍核のほか嗅球、分界条床核、扁桃核、大脳皮質、梨状皮質、海馬、脚橋被蓋核、外背側被蓋核、バリントン核、外側結合腕傍核、下オリーブ核などに存在することが明らかとなった。大脳皮質や海馬では GABA 作動性介在ニューロンに、一方、梨状皮質や下オリーブ核では glu 作動性ニューロンに CRF が共存することが明らかにされた。



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9件)

(1) Kono J, Konno K, Talukder AH, Fuse T, Abe M, Uchida K, Horio S, Sakimura K, Watanabe M, Itoi K. Distribution of corticotropin-releasing factor neurons in the mouse brain: a study using corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein knock-in mouse. *Brain Struct Funct* 222, 1705-1732, 2017. DOI 10.1007/s00429-016-1303-0 査読有

(2) Kakizawa K, Watanabe M, Mutoh H, Okawa Y, Yamashita M, Yanagawa Y, Itoi K, Suda T, Oki Y, Fukuda A. A novel GABA-mediated corticotropin-releasing hormone secretory mechanism in the median eminence. *Science Advances* 2: e1501723, pp.1-15, 2016. 査読有

(3) Itoi K. Exploring the regulatory mechanism of stress responses in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: background and future perspectives of corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein-knock-in mouse. *Interdisciplinary Information Sciences* 21, 213-224, 2015. 査読有

(4) Iwasaki Y, Itoi K. Transcriptional regulation of vasopressin gene: update in 2015. *Interdisciplinary Information Sciences* 21, 267-271, 2015. 査読有

(5) 井樋慶一. 脳内ストレス反応の可視化に挑む (Challenging the visualization of stress responses in the brain). *自律神経* 52, 279-283, 2015. 査読なし

(6) 井樋慶一. ストレス防御に関与する神経内分泌系と自律神経系の構造と機能. *内分泌・糖尿病・代謝内科* 40, 412-420, 2015. 査読なし

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

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

(9) Itoi K, Talukder AF, Fuse T, Kaneko T, Ozawa R, Sato T, Sugaya T, Uchida K, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Sakimura K (2014) Visualization of corticotropin-releasing factor neurons by fluorescent proteins in the mouse brain and characterization of labeled neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*, 155, 4054-4060. 査読有

〔学会発表〕(計26件)

(1) Keiichi Itoi, Junko Kono, Kotaro Konno, Toshimitsu Fuse, Katsuya Uchida, Satoshi Yamagata, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe. Distribution of corticotropin-releasing factor neurons in the mouse brain: a study using corticotropin-releasing factor modified yellow fluorescent protein knock-in mouse. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA. 2016年11月16日.

(2) Keiichi Itoi. Development of mouse lines for studying corticotropin-releasing factor neurons in the brain. CURE Special Lecture, CURE LYON LIBRARY, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, USA. 2016年11月9日.

(3) 大塚寛子, 内田克哉, 布施俊光, 崎村建司, 井樋慶一. 分界条床核コルチコトロピン

放出因子 (CRF) 産生ニューロンの性差 CRF-Venus Neo マウスを用いた検討。第 43 回日本神経内分泌学会学術集会。浜松，2016 年 10 月 15 日。

(4) 山形 聡, Ashraf Hossain Talukder, 周麗, 夏目 里恵, 阿部学, 崎村建司, 井樋慶二。CRF ニューロン選択的 AVP 欠損マウスの作成と応用。第 43 回日本神経内分泌学会学術集会。浜松，2016 年 10 月 15 日。

(5) 井樋慶一, 河野順子, 今野幸太郎, Ashraf H. Talukder, 内田克哉, 布施俊光, 阿部学, 夏目里恵, 堀尾修平, 崎村建司, 渡辺雅彦。マウス脳内コルチコトロピン放出因子ニューロンの分布: 強化型黄色蛍光タンパク質ノックインマウスを用いた検討。第 39 回日本神経科学学会大会。2016 年 7 月 20 日。

(6) 井樋慶一。脳内コルチコトロピン放出因子産生ニューロンの構造と機能の解明 新たな実験動物を用いた検討。日本心身医学会総会ならびに学術講演会シンポジウム 5: ストレスと陰性情動の源流は何か。仙台, 2016 年 6 月 5 日。

(7) Keiichi Itoi, Junko Kono1, Kotaro Konno, Takayuki Sato, Takuma Sugaya, Toshimitsu Fuse, Katsuya Uchida, Atsuo Fukuda, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe. Labeling of corticotropin-releasing factor neurons with modified yellow fluorescent protein by genetic manipulation of the mouse: how the mouse lines can be utilized in morphological and functional studies? Neurobiology of Stress Workshop, Newport Beach, CA, USA. 2016 年 4 月 12-15 日。

(8) Keiichi Itoi. Exploring corticotropin-releasing factor (CRF) neuronal circuitry in the brain using CRF-Venus knock-in mouse lines. PEMG Research Conference on the main NIH Campus, Building 10 (Clinical Center), Bethesda, MD, USA. 2016 年 4 月 8 日。

(9) 菅谷琢磨, 佐藤隆幸, 福田敦夫, 杉本直哉, 布施俊光, 内田克哉, 阿部学, 山崎真弥, 崎村建司, 井樋慶一。視床下部コルチコトロピン放出因子 (CRF) ニューロンへのグルタミン酸作動性入力 - セロトニン (5-HT) による調節メカニズムの検討。第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 12 月 18 日。

(10) 佐藤隆幸, 菅谷琢磨, 福田敦夫, 杉本直哉, 布施俊光, 内田克哉, 阿部学, 山崎真弥, 崎村建司, 井樋慶一。視床下部コルチコトロピン放出因子 (CRF) ニューロンへの抑制性

入力とセロトニン (5-HT) による制御機序に関する研究。包括脳冬のシンポジウム, 一ツ橋大学, 東京, 2015 年 12 月 18 日。

(11) 井樋慶一。ストレス防御にはたらく神経内分泌系のメカニズム。宮城県保険医協会第 273 回研究会・特別講演, 宮城県保険医協会会議室, 仙台, 2015 年 11 月 30 日

(12) Takayuki Sato, Takuma Sugaya, Izumi Akiba, Toshimitsu Fuse, Katsuya Uchida, Junko Kono, Atsuo Fukuda, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi. Dual effects of serotonergic inputs to the local circuits regulating the corticotropin-releasing factor neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: an electrophysiological study using the CRF-Venus deltaNeo mouse. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago Convention Center, Chicago, IL, USA, 2015 年 10 月 19 日。

(13) 河野順子, 内田克哉, 今野幸太郎, 布施俊光, 阿部学, 山形聡, 伊藤貞嘉, 崎村建司, 渡辺雅彦, 井樋慶一。CRF-Venus Δ Neo マウスを用いた CRF 発現細胞のマウス脳内分布の検討。第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 9 月 19 日。

(14) 菅谷琢磨, 佐藤隆幸, 福田敦夫, 杉本直哉, 布施俊光, 内田克哉, 阿部学, 山崎真弥, 崎村建司, 井樋慶一。視床下部コルチコトロピン放出因子ニューロンへのグルタミン酸作動性入力 セロトニンによる調節メカニズムの検討。第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 9 月 18-19 日。

(15) 佐藤隆幸, 菅谷琢磨, 福田敦夫, 杉本直哉, 布施俊光, 内田克哉, 阿部学, 山崎真弥, 崎村建司, 井樋慶一。視床下部コルチコトロピン放出因子ニューロンへの抑制性入力とセロトニンによる制御機序に関する研究。第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 9 月 18-19 日。

(16) 大塚寛子, 内田克哉, 布施俊光, 崎村建司, 井樋慶一。CRF-Venus Δ Neo ノックインマウスを用いた CRF 含有ニューロンの個体発生とその脳内分布の神経解剖学的解析。第 42 回日本神経内分泌学会学術集会, 仙台, 2015 年 9 月 18-19 日。

(17) Keiichi Itoi. Characterization and future perspectives of the corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein-knock-in mouse. Parvo- and Magnocellular Symposium in Sendai, Gonryo-Kaikan, Sendai, Japan, 2015 年 9 月 17 日。

(18) 井樋慶一 . コルチコトロピン放出因子ニューロンの機能と構造解析のための蛍光可視化動物開発 . 日本神経科学学会 , 神戸国際会議場 , 神戸 , 2015 年 7 月 30 日

(19) 井樋慶一 . 視床下部研究の最近の進歩 . CRF ニューロン蛍光可視化マウスの開発と応用 . 第 88 回日本内分泌学会学術総会 , 第 88 回日本内分泌学会学術総会 , ホテルニューオータニ東京 , 2015 年 4 月 24 日

(20) Keiichi Itoi, Ashraf Hossain Talukder, Toshimitsu Fuse, Katsuya Uchida, Junko Kono, Kotaro Konno, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Masahiko Watanabe and Kenji Sakimura. Visualization of CRF Neurons in the Brain by Fluorescent Proteins: A Comparison Between CRF-Venus, CRF-Venus Delta Neo, and EGFP/CRF-Cre Mouse. Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, 2015 年 3 月 6 日 .

(21) 井樋慶一 , 布施俊光 , 内田克哉 , Ashraf Hossain Talukder , 小澤遼 , 佐藤隆幸 , 菅谷琢磨 , 杉本直哉 , 河野順子 , 今野幸太郎 , 阿部学 , 山崎真弥 , 夏目里恵 , 渡辺雅彦 , 崎村建司 . コルチコトロピン放出因子遺伝子ターゲットによるノックインマウスの開発と視床下部 CRF ニューロン機能解析への応用 . 包括脳冬のワークショップ , 東京医科歯科大学 , 東京 , 2014 年 12 月 12 日 .

(22) 井樋慶一 . ストレスの神経内分泌学 : 自律神経とのクロストーク . 第 41 回日本神経内分泌学会シンポジウム講演 , 都道府県会館 , 東京 , 2014 年 11 月 1 日 .

(23) Ashraf Hossain Talukder , 布施俊光 , 内田克哉 , 今野幸太郎 , 渡辺雅彦 , 阿部学 , 山崎真弥 , 崎村建司 , 井樋慶一 . コルチコトロピン放出因子ニューロン蛍光可視化マウスの組織学的性格づけ - CRF-Venus ノックインマウスと CRF-Venus Δ Neo マウスを用いた検討 . 第 41 回日本神経内分泌学会 , 都道府県会館 , 東京 , 2014 年 10 月 31 日

(24) 井樋慶一 . ストレス反応の可視化に挑む CRF-Venus ノックインマウスの作成と応用 . 日本自律神経学会シンポジウム講演 , ラフレ埼玉 , さいたま市 , 2014 年 10 月 30 日

(25) Itoi K. Neural and humoral mechanisms for the regulation of corticotropin-releasing factor neurons in the hypothalamus. NIH-Japan-JSPS Symposium, Bethesda, MD, USA, 2014 年

10 月 23 日 .

(26) Ashraf Hossain Talukder, Toshimitsu Fuse, Katsuya Uchida, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Rie Natsume, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi. The effect of glucocorticoid on Venus expression in the paraventricular nucleus of the CRF-Venus knockin mouse. 日本神経科学学会 , パシフィコ横浜 , 横浜 , 2014 年 9 月 12 日

〔図書〕(計 1 件)

(1) 泉井亮 , 井樋慶一 , 中澤潤 , 岡田元宏 監訳 . ヒト扁桃体研究ハンドブック (原著 : The Human Amygdala, ed. Whalen PJ and Phelps EA, The Guilford Press, New York & London, 2009) , 全 242 頁 , 西村書店 (2015) . ISBN: 978-4-89013-455-7

〔その他〕

ホームページ:

<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・大学院情報研究科・教授

研究者番号 : 60232427

(2) 研究分担者

内田 克哉 (UCHIDA, KATSUYA)

東北大学・大学院情報研究科・助教

研究者番号 : 40344709

(3) 研究分担者

布施 俊光 (FUSE, TOSHIMITSU)

東北大学・大学院情報研究科・助教

研究者番号 : 50401039

(4) 連携研究者

若森 実 (WAKAMORI, MINORU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号 : 50222401

(5) 連携研究者

崎村 建司 (SAKIMURA, KENJI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号 : 40162325