

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750240

研究課題名(和文) コルチコトロピン放出ホルモンが運動学習に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effects of corticotropin releasing hormone on motor learning.

## 研究代表者

竹内 絵理 (TAKEUCHI, Eri)

東海大学・創造科学技術研究機構・特定研究員

研究者番号：70712777

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)：本研究は、コルチコトロピン放出ホルモン(CRH)が運動学習に及ぼす影響について調査した。そのために、ラット生体小脳にCRHを投与して運動学習課題を行い、運動学習の獲得を評価した。その結果、CRHを投与したラットは運動学習が亢進することが明らかとなった。次に、ラット小脳にCRH受容体阻害薬を投与すると、運動学習の獲得が障害された。これらの結果から、小脳において外因性のCRHは運動学習を亢進し、内因性のCRHは運動学習の獲得に必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of corticotropin releasing hormone (CRH) on motor learning in vivo. We found that the acquisition of motor learning was enhanced in the rats injected CRH into the cerebellum. On the other hand, the acquisition of motor learning was impaired in the rats injected with CRH receptor antagonist. Our results suggest that exogenous CRH enhances the motor learning and endogenous CRH are needed for the motor learning in the cerebellum.

研究分野：総合領域

キーワード：コルチコトロピン放出ホルモン 運動学習

## 1. 研究開始当初の背景

コルチコトロピン放出ホルモン (Corticotropin releasing hormone : CRH, あるいはコルチコトロピン放出因子, Corticotropin releasing factor : CRF) は 41 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンである。ストレスを受けると視床下部の室傍核ニューロンにおける CRH 産生が高められ、産生された CRH は脳下垂体前葉を刺激し副腎皮質刺激ホルモンの放出を促す。副腎皮質刺激ホルモンは副腎皮質におけるグルココルチコイドの合成・分泌を促す。このように CRH は視床下部 - 下垂体 - 副腎軸を介したストレスの内分泌反応において中心的な役割を担っている。CRH ニューロンは視床下部の他にも扁桃体、大脳皮質、小脳など脳内に広く分布しており、近年ではストレスに対する内分泌系反応だけでなく CRH は神経伝達物質として働くということが報告されている。これまでに CRH に関する研究は数多くなされてきたが、その働きについては未だ不明な点が多い。

CRH の小脳における役割として、CRH の受容体阻害薬を小脳切片に作用させると長期抑圧が障害されることから、CRH は小脳の長期抑圧の発現に必要であるということが示された (Miyata et al., 1999)。小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は、平行線維と登上線維を介して興奮性のシナプス入力を受ける。この 2 つの興奮性入力がかつて一致し反復して起こると、平行線維 - プルキンエ細胞間シナプスの伝達効率が長期にわたって低下する。この現象は長期抑圧と呼ばれ、運動学習の細胞レベルでの基礎的メカニズムであると考えられている (Ito, 1989)。これまでにストレスや情動行動に対する CRH の関与については多くの報告がなされてきたが、個体レベルで小脳の運動学習に注目した研究は少ない。また、CRH が運動学習の獲得に及ぼす影響については明らかにされておらず、生体内における CRH の働きについて調べることが重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は CRH が運動学習に及ぼす影響について明らかにすることを目的とする。そのために本研究では、ラット生体小脳に CRH を投与し、in vivo における CRH の運動学習に対する役割について行動学的、薬理的、組織化学的手法を用いて検討した。

## 3. 研究の方法

実験動物として Wistar ラット (8 週齢・オス) を用いた。小脳に薬剤を局所投与するために、ラット小脳上部の頭蓋骨に薬剤局所投与用カニューレを取り付ける外科手術を施した。その後一週間を回復期間とした。薬剤の投与は、薬剤局所投与用カニューレにマイクロインジェクターを挿入し、ナノシリンジボ

ンプを用いて行った。運動学習の獲得を評価するための行動テストとしてロータロッドテストを用いた。回転するロッド上におけるラットの最大滞在時間は 120 秒に設定した。

本研究では、CRH の運動学習に対する役割について検討するために、次の項目について調査した。

(1) CRH を小脳に投与すると運動学習の獲得にどのような影響を及ぼすのか検討した。まず、ラット小脳に CRH を投与し、その後、ロータロッドテストを行い、運動学習の獲得を評価した。

(2) CRH 受容体の働きを阻害すると運動学習の獲得にどのような影響を及ぼすのか検討した。そのために、CRH 受容体阻害薬 (-helical CRF<sub>9-41</sub>) を小脳に投与し、ロータロッドテストを行い、運動学習の獲得を評価した。

(3) 薬剤を投与した位置および投与された薬剤の拡散の様子を調査した。すべての実験終了後にラットを灌流固定し、マイクロインジェクターの挿入位置を確認した。また、薬剤拡散の様子を確認するために、蛍光染料 (テキサスレッド) を投与し、灌流固定を行った。その後、小脳切片を作成し DAPI による対比染色を行い、蛍光顕微鏡にて薬剤拡散の様子を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) CRH 投与実験

CRH を小脳に投与し、ロータロッドテストを行った結果、CRH を投与したラットはコントロールとして PBS (リン酸緩衝生理食塩水) を投与したラットと比較し、回転するロッド上における滞在時間が長かった。そして、それは試行の前半から中盤にかけて顕著であった (図 1)。

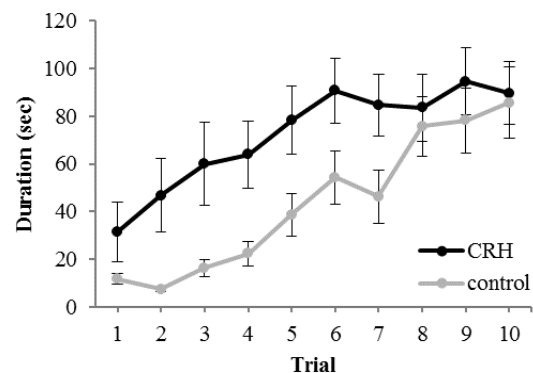


図 1 CRH の運動学習獲得に対する影響

ロータロッドテストの結果を表す。ラットが回転するロッド上に滞在した時間を計測した。

CRH: CRH 投与群のラットの成績

control: PBS 投与群のラットの成績

この結果から、外部から CRH を投与するとロータロッドテストの成績が向上することが明らかとなった。

### (2) CRH 受容体阻害薬投与実験

コントロールとして PBS を投与したラットは、試行が進むと回転するロッド上における滞在時間は増加するが、-helical CRF<sub>9-41</sub> を投与したラットは試行が進んでも回転するロッド上における滞在時間の増加が少なく、試行が進むほど両群の差は大きくなった(図2)。

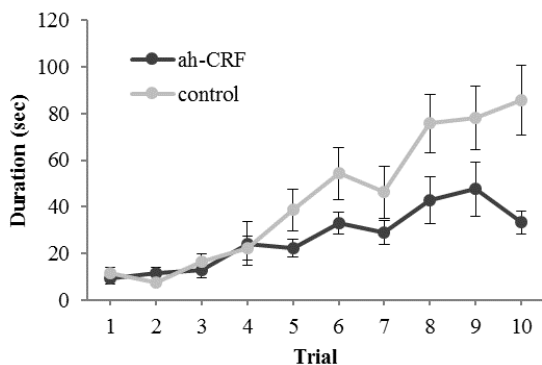


図2 CRH 受容体阻害薬の運動学習獲得に対する影響

ah-CRF: -helical CRF<sub>9-41</sub> 投与群のラットの成績

control: PBS 投与群のラットの成績

この結果から、ラット小脳に -helical CRF<sub>9-41</sub> を投与し CRH 受容体の働きを阻害すると、ロータロッドテストにおける運動学習の獲得が障害されることが明らかとなった。

### (3) 組織化学的解析

すべての実験が終了した後、灌流固定し、マイクロインジェクターの挿入位置を観察した。その結果、どの個体も狙った位置にマイクロインジェクターが挿入されていることを確認した。

薬剤拡散の様子を確認するために、ラットの脳にテキサスレッドを投与し、テキサスレッドの広がりを蛍光顕微鏡で観察したところ、小脳内広域に薬剤が広がることを確認した。

以上の結果から、CRH 受容体の働きを阻害すると運動学習が障害されたことから、内因性の CRH は運動学習の獲得に必要であることが示された。また、外因性の CRH により運動学習が亢進されたことから、CRH は運動学習獲得プロセスに対し正の向きに働くことが示唆された。

## 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 3 件)

Hatanaka T, Takeuchi E, Katoh A, Yamaki T, Uchida M, Natsume H. (2016)

Preparation of bioadhesive phosphorescent particles and their use as markers for video-oculography of mice. The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine, Vol. 41, No. 1, 46-53.

査読あり

Katoh A, Hatanaka T, Takeuchi E, Uchida M, Natsume H. (2015)

Calibration of infrared video-oculography by using bioadhesive phosphorescent particles for accurate measurement of vestibulo-ocular reflex in mice. Journal of Advanced Science, Vol. 27, No. 3&4, 11-16.

査読あり

Hatanaka T, Ogino E, Yamamura Y, Motosugi N, Takeuchi E, Sakabe K, Sugino M, Juni K, Kimura M. (2015)

Influence of NTE activity in skin on percutaneous absorption of sick house syndrome related substances. Japanese Journal of Clinical Ecology, Vol. 24, No. 2, 88-93. (Japanese)

査読あり

[学会発表] (計 4 件)

竹内絵理, 平石萌, 加藤明

コルチコトロピン放出ホルモンが運動学習に及ぼす影響 BMB2015 (第 38 回 日本分子生物学会年会, 第 88 回 日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 2015 年 12 月 1-4 日.

畑中朋美, 荻野瑛里奈, 山村勇貴, 本杉奈美, 竹内絵理, 坂部貢, 杉野雅浩, 従二和彦, 木村穰

シックハウス症候群における NTE の役割に関する研究 - フタル酸エステルの経皮吸収に及ぼす影響 I

BMB2015 (第 38 回 日本分子生物学会年会, 第 88 回 日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 2015 年 12 月 1-4 日.

Takeuchi E, Hiraishi M, Katoh A.  
Enhanced motor learning by injecting  
corticotrophin releasing factor to the  
cerebellum, Neuroscience 2015,  
Chicago, USA, October 17-21, 2015.

竹内絵理, 畑中朋美, 笹川恵梨奈, 岩里  
琢治, 糸原重美, 加藤明  
Rac-GAP<sup>-/-</sup>-chimaerin 欠損マウスはピロ  
カルピン低感受性を示す  
第37回日本神経科学大会, パシフィコ横  
浜(神奈川県横浜市), 2014年9月11-13  
日.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 絵理 (TAKEUCHI, Eri)  
東海大学・創造科学技術研究機構・  
特定研究員  
研究者番号: 70712777