

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460324

研究課題名(和文) ラット嗅球バゾプレッシン細胞における神経ペプチドの役割の解明

研究課題名(英文) Effects of neuropeptide on vasopressin neuron in rat olfactory bulb

研究代表者

橋本 弘史 (HASHIMOTO, Hirofumi)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10454935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多くの神経ペプチドが、抗利尿ホルモンであるバゾプレッシン(VP)分泌を引き起こす。嗅球においては、VP放出を介して社会行動の調節に関与しているとされている。グレリンやアドレノメデュリンファミリーなど様々な神経ペプチドを脳内に投与し、嗅球におけるVP細胞への効果を検討したが、いずれの神経ペプチド投与群もコントロール群と比較して変化は見られなかった。VP緑色蛍光蛋白遺伝子改変ラットにおいて、コルヒチンを用いて神経の軸索輸送を阻害し蛍光輝度を観察したが、変化は見られなかった。嗅球においては、VP産生細胞が少なく、受容体および神経終末が多く存在し、視床下部から投射されたVPが作用している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Many neuropeptides activate arginine vasopressin (VP) neurons in the hypothalamic supraoptic (SON) and the paraventricular nuclei (PVN) and release VP into the systemic circulation. In olfactory bulb (OB), VP is related to regulate with social behavior. In present study, I examined the effects of intracerebroventricular (icv) injection of some neuropeptides, including ghrelin and adrenomedulline family, by immunohistochemistry for Fos in OB. Fos-like immunoreactivity (Fos-LI) was observed in the SON, PVN and the nucleus of the tractus solitaries such as previous studies. However, few Fos-LI were observed in the OB. After icv injection of colchicine in VP-enhanced green fluorescent protein (eGFP) transgenic rats, fluorescence of eGFP did not change in the OB in comparison with control rats. I suggested that VP synthesis in the SON and PVN, not OB, project into OB, and have physiological effects in OB.

研究分野：神経内分泌

キーワード：バゾプレッシン 嗅球 コルヒチン 神経ペプチド Fos

1. 研究開始当初の背景

社会行動は通常、個々を認識することによって引き起こされ、また、ほとんどの動物は独自の嗅覚特性によって個々を認識する。個々の嗅覚における記憶は嗅球で処理されるが、その際にペプチドが作用する。例えば、雌ラットにおいて、分娩時に脳内で多量に分泌されるオキシトシン(OT)は、新生ラットの嗅覚特性を確立するのに非常に重要である。この対極にあるのが、攻撃性もしくは他者への拒絶であり、侵入者や競争相手と認識することである。これには OT に非常に関連するペプチドであるバゾプレシン(VP)が関係している。VPはV1受容体を介して作用するが、どこで、どのように作用するかは正確には明らかになっていない。しかし、機能的に副嗅球が欠如したマウスは、V1受容体の欠如したマウスと同じ行動様式が見られ、VPが嗅覚刺激の処理や調整に関係し、また、副嗅球が行動反応に関係があることを示唆している。視床下部視索上核および室傍核に局在する大細胞群のOTおよびVPのニューロンの細胞体は軸索を下垂体後葉に延ばし、終末から OT および VP を血中へ放出することはよく知られている。下垂体後葉ホルモンである VP は、浸透圧受容を介して下垂体後葉から血中へ分泌され、腎尿細管に発現する V2 受容体に作用し、水の再吸収を促す抗利尿ホルモンである。また、末梢圧受容器からの信号に応じて血中に分泌され、血管内皮に発現する V1a 受容体に作用し、血管を収縮させ、血圧および循環血液量の恒常維持する作用も知られている。さらに、下垂体前葉に発現している V1b 受容体に作用し、ACTH 分泌を促し、疼痛および拘束ストレスなど、様々なストレスに対するストレスホルモンとしての役割が明らかになった (Suzuki *et al.*, J. Neurosci. 2009)。この様に、VP は末梢の自律神経系のシグナル伝達の主なペプチドとしてのみならず、VP 受容体が末梢および中枢に広く分布していることから、中枢神経系における、VP の新たな生理作用が大変注目されている。

グレリンやアドレノメデュリン(AM)ファミリーなどの神経ペプチドによって、下垂体後葉から OT および VP 分泌がされることが報告されている。例えば、ラット脳室内に AM2 を脳室内投与すると、視床下部室傍核および視索上核の OT および VP 産生ニューロンが刺激され、血中 OT および VP は増加する (Hashimoto *et al.*, Am J Physiol., 2005; Hashimoto *et al.*, Peptides 2007)。神経ペプチドによって OT および VP 細胞が刺激され、血中に OT および VP が分泌されると考えられるが、その詳細な分子生物学的メカニズムは明らかになっていない。我々は、これまでに、視索上核への求心性経路の 1 つである嗅球に VP 含有細胞が局在し、嗅上皮粘膜から入力される嗅覚情報が脳内の VP 放出を介して高次脳機能に関与している可能性を示した (Tobin and Hashimoto *et al.*, Nature,

2010)。このことによって、VP が単なる自律神経調節ホルモンにとどまらず、情動や記憶などの社会行動の調節に関係する新たな高次脳機能調節ペプチドであることを示唆された。しかし、嗅球に局在する VP の、嗅覚受容と高次脳機能を互いに連関する分子メカニズムは明らかではない。我々は、VP 遺伝子に緑色蛍光蛋白遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて作成したトランスジェニックラット(VP-eGFP トランスジェニックラット)を用いることで、VP 含有細胞を緑色蛍光により生細胞の状態で同定することに成功した (Ueta *et al.*, Endocrinology 2005)。申請者はこれまで、*in situ* ハイブリダイゼーション法および組織化学的免疫染色法などを用いて、グレリンや AM ファミリーなどの神経ペプチドのラット脳内における役割を検討してきた。その結果、AM ファミリー (Hashimoto *et al.*, Am J Physiol., 2005; Hashimoto *et al.*, Peptides 2007; Otsubo *et al.*, J Endocrinol., 2009) が、視床下部室傍核および視索上核における Fos 蛋白および *c-fos* mRNA の発現を報告した。また、最近、嗅球における VP 細胞の局在を VP -eGFP トランスジェニックラットを用いて示し、また、嗅球の僧帽細胞における VP の抑制作用を電気生理学的手法によって示した (Tobin and Hashimoto *et al.*, Nature 2010)。したがって、これまでに同様の手法を用いて嗅球における神経ペプチドの作用を検討することにより、嗅球における VP 細胞の分子生理学的特性を解明することが可能と考えたのが本研究の発端である。

嗅球における VP 細胞の役割はいまだ未解明であり、また、嗅球における神経ペプチドと VP の作用およびメカニズムも不明である。ヒトにおいては、VP のシステム障害は、情動障害、強迫障害および自閉症などの精神障害と関連するとされている。嗅覚システムは、記憶や情動の情報処理の入り口であり、神経ペプチドの嗅球 VP への作用とその情報伝達機構の関連が明らかになれば、嗅覚システムを標的とした神経ペプチドの点鼻薬などによる新たな治療法の開発の一助となることが期待できる。

2. 研究の目的

我々は、AM、AM2 および AM5 をラット脳室内に投与し、視床下部視索上核および室傍核の OT および VP 産生細胞が興奮し、血中 OT および VP が増加することを明らかにした。本研究は、Wistar 系成熟雄ラットおよび VP eGFP トランスジェニックラットを用い、嗅球に局在する VP 含有細胞の生理学的特性および神経ペプチドの嗅球における役割を明らかとすることに焦点を当てる。具体的には、グレリンや AM ファミリーなどの神経ペプチドをラット脳内に投与し、1) 神経活動の指標として汎用されている Fos 蛋白を用いた免疫組織化学的染色法や *in situ* ハイブリダイ

ゼーション法によって嗅球内作用部位を同定し、嗅球 VP 細胞における変化を解析し、神経ペプチドに対する反応を明らかにする。

3. 研究の方法

Wistar 系成熟雄ラット、VP eGFP トランスジェニックラットおよび OT 赤色蛍光タンパク遺伝子(OT-mRFP1)トランスジェニックラットを用いて、神経ペプチドの脳室内投与による作用部位の同定を試みた。具体的には、ネンブータル麻酔下で脳室内カニューレを装着し、5~7日の回復期間後に覚醒下で神経ペプチド、もしくは生理食塩水を脳室内に投与する。投与90分後にソムノペンチル麻酔下で灌流固定後、嗅球も含めて脳を摘出し、後固定後、抗 Fos タンパク抗体を用いて、嗅球、視床下部、延髄および嗅球の Fos タンパクの発現部位(活性化部位)を免疫組織化学的染色法により探索し、比較および検討を行った。

4. 研究成果

セクレトニューリンおよび QRFP をラット脳室内に投与し、*in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学的染色法を用いて Fos タンパクおよび *c-fos* mRNA の脳内の発現を調べた。しかし、明らかな Fos タンパクおよび *c-fos* mRNA の明らかな発現部位は認められなかった。

次に、アドレノメデュリンファミリー(AM, AM2, AM5)をラット脳室内投与し、免疫組織化学的染色法を用いて Fos タンパクの脳内の発現を調べた。VP 産生部位である視床下部視索上核および室傍核に Fos タンパクの著明な発現が認められたが、嗅球には Fos タンパクの発現はほとんど認められなかった。

強力な摂食亢進ペプチドであるグレリンおよび摂食抑制ペプチドであるネスファチン1をラット脳室内投与し、免疫組織化学的染色法を用いて Fos タンパクの発現を調べた。既知の Fos タンパク発現部位である視床下部視索上核、室傍核、弓状核、延髄孤束核および最後野などには Fos タンパクの発現が認められたが、嗅球には Fos タンパクの発現はほとんど認められなかった(図1)。

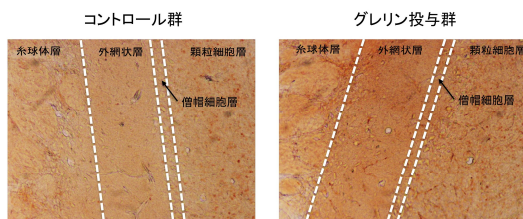


図1. グレリン(2nmol) 脳室内投与90分後のラット嗅球におけるFosタンパクの発現

VP eGFP トランスジェニックラットおよび OT-mRFP1 トランスジェニックラットの嗅球における eGFP 細胞および mRFP1 細胞の数は非常に少ない。コルヒチン(CH)をラット脳室内へ投与すると、神経の軸索輸送を阻害さ

れ、細胞体の神経伝達物質が濃縮され、産生量が極微量な神経伝達物質も観察可能となる。これまでも VP eGFP トランスジェニックラットを用いて、CH 脳室内投与後に、SON、室傍核(PVN)、青斑核において蛍光輝度が上昇したことを報告している(Todoroki et al., Stress 2010)。そこで、CH を VP eGFP トランスジェニックラットおよび OT-mRFP1 トランスジェニックラット脳室内に投与し、その変化を検討した。

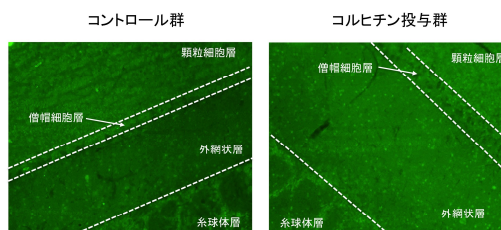


図2. コルヒチン脳室内投与2日後のラット嗅球におけるFosタンパクの発現

OT-mRFP1 トランスジェニックラットにおいて、CH 脳室内投与2日後の脳内の赤色蛍光タンパク発現は、コントロール群と比較し、CH 投与群では、下垂体後葉における赤色蛍光輝度は減少したが、SON、PVN、輪状核における赤色蛍光輝度は減少した。これは、神経終末では OT が分泌され、細胞体では OT が産生および蓄積されていることが示唆された。しかし、嗅球においては、コントロール群と CH 投与群において、mRFP1 の数および蛍光輝度に変化は見られなかった。VP-eGFP トランスジェニックラットにおいても、嗅球における eGFP の数および蛍光輝度に変化は見られなかった(図2)。さらに、VP eGFP トランスジェニックラットおよび OT-mRFP1 トランスジェニックラットの嗅球内に CH 投与を行い、その変化を比較した。VP-eGFP トランスジェニックラットおよび OT-mRFP1 トランスジェニックラットにおいて、嗅球における蛍光輝度の変化は認められなかった。

これまでに、嗅球における VP 細胞は少ないが、VP 受容体は多く存在することが報告されている(Tobin and Hashimoto et al., Nature, 2010)。したがって、嗅球においては、VP および OT 産生細胞が少なく、受容体および神経終末が多く存在していることが示唆される。

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 2件)

Interdisciplinary Information Sciences 21(3), 197-206, 2015

Vasopressin-Enhanced Green Fluorescent Protein and Oxytocin-Monomeric Red Fluorescent Protein 1 in Colchicine Treated Transgenic Rats

Hirofumi Hashimoto, Yoichi Ueta. (査読あり)

Front Neurosci. 2014 Jul 23;8:213. doi: 10.3389/fnins.2014.00213. eCollection 2014. Fluorescent visualization of oxytocin in the hypothalamo-neurohypophysial system. Hirofumi Hashimoto, Matsuura Takanori, Yoichi Ueta. (査読あり)

[学会発表](計 8件)

発表者名: 橋本弘史、吉村充弘、宗まり子、上田陽一
発表標題: シスプラチン末梢投与による脳内ネスファチン1への効果の検討
学会名: 第33回 産業医科大学学会
発表年月日: 2015.10.3
発表場所: 産業医科大学ラマツィーニホール (福岡県・北九州市)

発表者名: 橋本弘史、大坪広樹、竹井祥郎、上田陽一
発表標題: ラット脳室内に投与したアドレノメデュリン5の心血管系への影響
学会名: 第32回 産業医科大学学会
発表年月日: 2014.10.4
発表場所: 産業医科大学ラマツィーニホール (福岡県・北九州市)

発表者名: Hirofumi Hashimoto, Takanori Matsuura, Mitsuhiro Yoshimura, Yasuhito Motojima, Reiko Saito, Takashi Maruyama, Yoichi Ueta
発表標題: The oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene expression after central injection of colchicine in transgenic rat
学会名: The International Congress of Neuroendocrinology 2014 including the 18th Annual Meeting of the Society for Behavioural Neuroendocrinology
発表年月日: 2014.8.17-20
発表場所: Sydney, Australia

発表者名: Hirofumi Hashimoto, Takanori

Matsuura, Mitsuhiro Yoshimura, Jun-ichi Ohkubo, Akiko Katoh, Takashi Maruyama, Yoichi Ueta
発表標題: The oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene expression after central administration of colchicine in transgenic rat

学会名: 37th Naito Conference
発表年月日: 2014.7.15-18
発表場所: ヒルトンニセコビレッジ (北海道・ニセコ町)

発表者名: Hirofumi Hashimoto, Takanori Matsuura, Mitsuhiro Yoshimura, Junichi Ohkubo, Akiko Katoh, Takashi Maruyama, Yoichi Ueta
発表標題: Effects of intracerebroventricular administration of colchicine on oxytocin-mRFP1 expression in transgenic rats
学会名: 第91回日本生理学会大会
発表年月日: 2014.3.16-18
発表場所: 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市)

発表者名: 橋本弘史、松浦孝紀、吉村充弘、丸山崇、上田陽一
発表標題: オキシトシン-mRFP1 遺伝子改変ラットにおけるラット脳室内へのコルヒチン投与後の蛍光タンパクの変化
学会名: 第4回 Vivid Workshop-細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング-
発表年月日: 2014.2.20-22
発表場所: 山代温泉瑠璃光 (石川県・加賀市)

発表者名: Hirofumi Hashimoto, Hiroki Otsubo, Susumu Hyodo, Takashi Maruyama, Yoshio Takei, Yoichi Ueta
発表標題: Effects of central administration of adrenomedullin 5 on oxytocin-secreting neurons and the cardiovascular system in rat
学会名: 37th International Union of Physiological

Sciences

発表年月日：2013.7.21-26

発表場所：Birmingham, UK

発表者名：Hirofumi Hashimoto, Hiroki
Otsubo, Susumu Hyodo, Takashi Maruyama,
Jun-ichi Ohkubo, Mitsuhiro Yoshimura, Takanori
Matsuura, Yoshio Takei, Yoichi Ueta

発表標題：Effects of central administration of
adrenomedullin 5 on oxytocin-secreting neurons
and the cardiovascular system in rat brain

学会名：10th World Congress on
Neurohypophysial Hormones

発表年月日：2013.7.15-19

発表場所：Bristol, UK

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本弘史 (HASHIMOTO Hirofumi)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10454935

(2)研究分担者

上田陽一 (UETA Yoichi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232745