

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：31304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08499

研究課題名(和文) 視床下部室傍核CRFニューロン亜核群の機能の多様性：亜核ごとの構造と機能の解明

研究課題名(英文) Functional diversity of the subnuclei of PVH CRF neurons

研究代表者

井樋 慶一 (Itoi, Keiichi)

東北福祉大学・健康科学部・教授

研究者番号：60232427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は視床下部室傍核(PVH)の コルチコトロピン放出因子(CRF)産生ニューロンが正中隆起以外にも複数の脳内領域に直接投射し、しかも、CRFニューロンの細胞体はPVH内で亜核を形成していることを見出した。そこで、CRFニューロン選択的 Cre 発現マウス(CRF-iCreDeltaNeo)を用い、CRFニューロン一次投射野に逆行性ウイルスベクター HiRetを注入し、亜核選択的に蛍光タンパク質を発現させてそれぞれの亜核の細胞構築を明らかにすると共に、PVH内に光ファイバーを植え込み亜核選択的な活性化や抑制を行うことによりそれぞれの機能解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスは様々な疾病発症・増悪因子であり、特に、うつ病、摂食障害、高血圧などはストレスと関連が深い。PVH CRFニューロンはACTH分泌を介し副腎皮質での糖質コルチコイド合成・分泌を制御するが、我々はこれらが正中隆起以外の複数の脳内領域に投射し、PVH内亜核を形成することを見出した。本研究ではCRF-iCreDeltaNeoマウスを用い、亜核ごとのCRFニューロンの性格を形態と機能の両面から検討したものであり、極めて高い独創性を有するばかりでなく、ストレス関連疾患の病態解明、予防法や治療法の開発のためにも貢献する。

研究成果の概要(英文)：We discovered that corticotropin-releasing factor (CRF) neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH) project to multiple brain regions besides the median eminence, and that the cell bodies of the PVH CRF neurons comprises multiple subnuclei. We injected retrograde viral vector HiRet to the respective primary projection area, using the CRF-iCreDeltaNeo mouse, and elucidated the topographical characteristics of each subnucleus. Furthermore, functional roles of each subnucleus were uncovered by optogenetic or chemogenetic methods.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：マウス 糖質コルチコイド 遺伝子 光遺伝学 相同組換え

## 1. 研究開始当初の背景

視床下部室傍核 (PVH) のコルチコトロピン放出因子 (CRF) 産生ニューロン (以下, CRF ニューロン) は視床下部 下垂体 副腎 (HPA) 系の中枢であるが, CRF ニューロンは PVH 以外にも複数の脳内領域に存在し CRF 受容体も脳内に広範に発現している。また, CRF をラット脳室内に投与すると摂食量減少, 血圧・心拍数増加, うつ様行動や不安様行動の増加などが惹起される。これらの事実から, CRF は脳内で様々な生理機能調節に関与するものと考えられている。

HPA 系を介する CRF のはたらきと, 摂食, 自律神経, 情動など種々の生理機能を担う CRF の脳内作用は, ストレス防御と恒常性の維持によって生命を存続させるという重要な共通項を有する。しかしながら, 神経分泌をおこなう PVH の CRF ニューロンは内分泌系を統括する特殊なニューロンであるのか, あるいは, 種々の脳機能調節にも与るのかという疑問は未だ解決されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では, 我々の開発した CRF-iCre ノックインマウスを用い, Cre 依存的に神経トレーサーを発現する順行性ウイルスベクターによって PVH の CRF ニューロンの一次投射野を同定し, 逆行性ウイルスベクターによって, 一次投射野ごとに CRF ニューロン起始核を同定する。さらに, 化学遺伝学および光遺伝学の手法により, それぞれの CRF ニューロンの機能的意義を明らかにする。

糖尿病, 高血圧や関節リウマチ, 気管支喘息, 消化性潰瘍などの内科系疾患に加え気分障害や神経性食思不振症などの精神科疾患もストレスで増悪・発症することが知られている。本研究はこれらストレス関連疾患の病態を理解するために重要であり, 得られた成果は新たな治療法, 予防法の開発に寄与することができる。

## 3. 研究の方法

### (1) PVH 内 CRF ニューロン亜核の精密な同定

予備実験により PVH 内 CRF ニューロンが複数の亜核からなることが示唆されていたが, 本研究では, Cre 依存的に神経トレーサー GFP および WGA を発現させることのできるウイルスベクターを用い, PVH CRF ニューロンの一次投射野の全貌を明らかにする。脳定位固定装置をもちい, AAV ベクターを PVH に注入し, 4 週後に脳を灌流固定した後, 30  $\mu\text{m}$  の薄切切片を作製し, 抗 GFP 抗体および WGA 抗体を用いて一次投射野および二次投射神経を同定する。次にそれぞれの一次投射野に至る CRF ニューロンが, 起始核である PVH においてそれぞれ別の細胞集団 (亜核) を形成するか否かを, Cre 依存的 GFP 発現 HiRet ベクターを用いて検討する。PVH CRF ニューロンの一次投射野のそれぞれに HiRet ベクターを注入し, 4 週後に脳を灌流固定し, 抗 GFP 抗体を用いて PVH 内の細胞体の形態と分布を明らかにする。また, 脳内投射性 CRF ニューロンが正中隆起に投射するニューロンと同一のものであるか, あるいは, 別の細胞集団を形成するかを明らかにするため, HiRet ベクター注入マウスの腹腔内に逆行性神経トレーサー Fluorogold を

注入し、作製された脳切片を用いて GFP と Fluorogold の同時観察を行う。

#### (2) PVH CRF ニューロン亜核ごとの機能解明

我々は、PVH CRF ニューロンの一部が摂食抑制的にはたらくことを予備実験で明らかにした。そこで、摂食抑制にはたらく CRF ニューロンが脳内のどの領域に投射するものであるかを明らかにするため、一次投射野ごとに Tet on システムを利用してテタヌス毒素発現できる HiRet ウィルスベクターを注入する。

次に、同定された系がたしかに摂食抑制系であることを明らかにするため、Cre 依存性チャンネルロドプシン 2 または陰イオン性チャンネルロドプシン 2 発現 HiRet ベクターを一次投射野に注入し、予め PVH 内に留置した光ファイバーを介して青色光を照射し、摂食が抑制、または刺激されることを確かめる。

### 4. 研究成果

#### (1) PVH CRF ニューロンの一次投射野と PVH 内亜核の同定

PVH CRF ニューロンは脳内複数の領域に投射することが明らかになった。これらの詳細は現在投稿準備中であるので、出版された後に報告書に記載し公表する予定である。また、一次投射野ごとに PVH 内で亜核を形成することが明らかになったが、これらの形態学的特徴と分布に関しては現在投稿準備中であるので後に報告書に記載し公表する予定である。

#### (2) PVH CRF ニューロンの摂食調節における機能的な役割

PVH CRF ニューロンの一部が摂食抑制にはたらくことが明らかにされたが、これらが一次投射する脳内領域とその機能に詳細に関しては現在投稿準備中であるので後に報告書に記載し公表する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Itoi K, Motoike I, Liu Y, et al.	4. 巻 160
2. 論文標題 Genome-Wide Analysis of Glucocorticoid-Responsive Transcripts in the Hypothalamic Paraventricular Region of Male Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2556-2557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2018-00535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Katsuya Uchida, Hiroko Otsuka, Masahiro Morishita, Shinji Tsukahara, Tatsuya Sato, Kenji Sakimura and Keiichi Itoi	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Female-biased sexual dimorphism of corticotropin-releasing factor neurons in the bed nucleus of the stria terminalis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Sex Differences	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13293-019-0221-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mukai Y, Nagayama A, Itoi K, Yamanaka A	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Identification of substances which regulate activity of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70481-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawatani M, Itoi K, Talukder AH, Uchida K, Sakimura K, Kawatani M	4. 巻 124(2)
2. 論文標題 Cholinergic modulation of CRH and non-CRH neurons in Barrington's nucleus of the mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurophysiol	6. 最初と最後の頁 443-457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70481-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Itoi K., Talukder A.H., Uchida K., et al.
2. 発表標題 A comparison of the fluorescent protein expression between different mouse lines generated by corticotropin-releasing factor gene targetin
3. 学会等名 Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	佐藤 達也  (Soto Tatsuya)  (00568222)	東北大学・情報科学研究科・准教授   (11301)	
研究分担者	内田 克哉  (Uchida Katsuya)  (40344709)	東北大学・情報科学研究科・助教   (11301)	
研究分担者	山形 聡  (Yamagata Satoshi)  (50769940)	弘前大学・医学部附属病院・助教   (11101)	

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