

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780205

研究課題名（和文）視床下部下垂体系におけるエリスロポイエチンの内分泌制御機構の解明

研究課題名（英文）The role of erythropoietin in the hypothalamo-hypophyseal system

研究代表者

山田 美鈴 (YAMADA MISUZU)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：10414012

研究成果の概要（和文）：エリスロポイエチンは赤血球産生のみならず、低酸素障害回避性に作用するサイトカインとしても認識されている。本研究では、持続的低酸素刺激下におけるラット視床下部-下垂体系におけるエリスロポイエチン産生動態変化について明らかにした。EPO発現の時間経過は中枢神経系部位により異なっており、低酸素刺激に応じて発現が増強されるものと、低酸素刺激に応答が鈍く発現が維持されるものの二種類に分類することができた。視床下部-下垂体系においては両方の発現様式が確認され、部位特異的な発現制御機構が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Erythropoietin (EPO) is a crucial hematopoietic cytokine, and it is suggested that endogenous EPO has a neuroprotective function from hypoxic damage. In this study, the expression of EPO-mRNA was observed in hypothalamo-hypophyseal system under the hypoxic condition, as well as other parts of the central nervous system. The time-dependent expression of EPO-mRNA was divided into two patterns; hypoxia-responsive or constant. Both patterns shown in the hypothalamo-hypophyseal system imply the region-specific control of EPO gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：エリスロポイエチン、脳・神経、低酸素

1. 研究開始当初の背景

酸素は、地球上の生命体にとって必要不可欠なものである。特に動物は、酸素を利用して好氣的酸化を行い、細胞内においてATPを

絶え間なく作り出すことで生命活動のエネルギーを得ている。酸素は赤血球中のヘモグロビンと結合し、血流に乗って体内のあらゆる細胞に分配される。従って、出血や虚血な

どによる急性的・慢性的な赤血球数減少は、体内酸素濃度低下を引き起こし、細胞内代謝に障害を与え、生体の生命活動の維持を困難にする。

エリスロポイエチン (Erythropoietin; EPO) は、骨髄での赤血球産生において必須の造血サイトカインである。EPO は、赤血球減少など血中酸素分圧低下 (低酸素) に応じてその血中濃度が調節されるホルモンでもあり、腎臓から分泌されている。近年、EPO が主たる産生部位である腎臓以外にも、肝臓・脳・生殖器 (精巣・子宮) でも微量に発現していることが報告されている。中でも、呼吸・生殖等の基本自律機能を担い大量の酸素とエネルギー基質を必要とする脳での EPO の発現が注目されている。神経膠細胞株を用いた *in vitro* の実験系では、EPO が低酸素障害性神経細胞死を抑制すること (Masuda, S. *et al.* J. Biol. Chem., 269:19488-19493, 1994) が注目を集めており、骨髄での造血機能以外の機能を持つ低酸素障害回避性の生理活性物質であることが示唆され始めている。

しかし、生体内の脳内での EPO 産生細胞および作用部位については、定常酸素圧下では発現量が少ないため、EPO 産生およびその作用機序の解明を困難にしている。このように生体の中枢神経系における EPO 産生には未解明な部分が多く、また造血促進作用以外の他の生物学的機能が存在する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

骨髄での造血促進サイトカインである EPO が、低酸素条件下で主たる産生部位である腎臓以外にも肝臓・脳・生殖器で微量に発現していることが報告されている。また、神経培養細胞では EPO を添加すると低酸素障害性神経細胞死を抑制できることから、低酸素障害回避性の生理活性物質として神経細胞に作用すると考えられている。しかし、生体レベルにおいて、中枢神経系での EPO 産生および機能機序については発現動態を含め不明確なままである。本研究では、微量に発現すると報告されている中枢神経系における EPO 産生動態および作用部位を明らかにし、造血ホルモンである EPO の新たな生物学的機能を解明することを目的とする。

医療面では、組換え型 EPO は貧血の強力な治療薬として、慢性疾患起因性貧血に罹患しているヒトや家畜・伴侶動物の Quality of Life の維持に大きく貢献しているが、ヒトの臨床症例では、長期間投与の影響として生殖細胞の発育を制御する卵胞刺激ホルモンや黄体形成ホルモンといった下垂体前葉ホルモンの血中濃度異常が報告されている。これを受けて、中枢神経系の中でも視床下部-下垂体系での EPO 発現・作用動態に着目し、EPO による視床下部・下垂体ホルモンの内分泌調節機構について検証する。低酸素刺激により EPO の発現を誘導し、不明確であった *in vivo* での中枢神経内 EPO 産生細胞および作用部位を確定にすることで、EPO の新たな生理機能の解明を可能にし、中枢神経系での EPO 発現と内分泌制御の関連性の解明を目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、生体内の中枢神経系における EPO の発現動態の解明に重点を置く。定常酸素圧下では EPO はその産生が微量であるため検出が難しいと予想されるため、EPO の低酸素による発現増強特性を利用し、主たる EPO 産生場所である腎臓での発現を確認しながら中枢神経系における EPO 発現について解析を進める。また、mRNA レベル・タンパク質レベルの定性・定量解析においては、高感度の検出方法を用いる。

まず、EPO の低酸素による発現増強特性を利用し、生体用ガス環境自動制御チャンバーを用いて低酸素曝露によって EPO の産生を高める。その場合には血清中 EPO 濃度を EIA 法で測定し、また腎臓での EPO 発現動態についても同時にモニタリングを行い、低酸素に対する生体応答が起こっていることを確認する。そして、低酸素刺激下における EPO-mRNA 発現を中枢神経系の機能部位ごとに RT-PCR 法を用いて網羅的解析を行い、また低酸素曝露時間の違いによって発現変化が見られた部位について Real time RT-PCR 法を用いて EPO-mRNA の定量を試みる。

次に、中枢神経系における EPO の産生部位および発現細胞の同定を試みる。EPO を認識する抗体を用いた免疫染色法または *in situ* Hybridization 法を用いて産生細胞の検出を進める。微量の EPO 発現を捉えられるよう、免疫染色では ABC 法や蛍光法、*in situ*

Hybridization 法ではチラミドを用いた高感度法を用いる。また、細胞を同定するとともに、中枢神経系における EPO 受容体の局在を精査し、EPO 産生細胞局在と合わせて作用機序解明に結びつける。中枢神経系では特に、神経分泌細胞を含有する神経核が存在する視床下部に着目し、EPO 産生細胞とホルモン産生神経細胞の局在および発現動態に焦点をあてる。また、視床下部ホルモンが作用する腺性下垂体と神経分泌細胞の終末である神経性下垂体の2つで構成されている下垂体においても、EPO 産生細胞の同定を進める。

4. 研究成果

EPOは、骨髄での赤血球産生に必須の造血サイトカインであり、赤血球減少など血中酸素分圧低下（低酸素）に応じてその血中濃度が調節されている。生体レベルの脳でのEPO産生および機能機序については不明確なままであるため、中枢神経系において低酸素障害を軽減すると報告されているEPO産生動態および作用部位を検討した。

生体内EPO産生を誘起するために、ガス環境自動制御チャンバーを用いた持続的低酸素刺激（O₂ 10%+N₂ 90%、曝露0, 4, 24時間）を行い、ラット（Wistar、8週齢、雄）腎臓および中枢神経系部位（大脳・海馬・中脳・視床下部・下垂体・延髄・嗅球）を採取した。適切な低酸素応答が起こっているか確認するために、血清中EPO濃度をEIA法にて測定した。その結果、血清中EPO濃度は定常時には検出限界以下であったが、低酸素開始4時間後には急激に増加し、多いものでは定常時の約1000倍以上の増加に達した。低酸素24時間持続後も高い血清中EPO濃度を保持したことから、ガス環境自動制御チャンバーにより生体内での低酸素状態が保たれ、低酸素誘発性のEPO応答が生体内で起こっていることが確認された。

次に採取した組織からtotal RNAを抽出した後cDNAを合成し、EPO-mRNAに特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行った。中枢神経系の採取部位では延髄以外のすべての部位で、腎臓と同様に低酸素に応じてEPO-mRNAが強く発現した。このうち、大脳・海馬・嗅球では定常時にはほとんど発現しておらず、低酸素刺激によりはっきりとした発現が認められるようになった。下垂体では定常時から低

酸素刺激時と変わらない発現が見られた（第148回日本獣医学会学術集会発表）。

中枢神経系におけるEPO発現量と低酸素刺激時間との関連性を明らかにするため、低酸素刺激時間を4段階（曝露0, 6, 12, 24時間）に設定し、試料採取部位を低酸素刺激によるEPO-mRNA発現が強い大脳・海馬・中脳・視床下部・下垂体を選択し、RT-PCR法に加えて定量的RT-PCR法を用いてEPO-mRNAの発現量変化を解析した。低酸素刺激の確認のために血清中EPO濃度測定もを行い、EPO-mRNA発現のコントロールとして腎臓も併せて採取して同時に解析を行った。血清中EPO濃度は低酸素刺激6時間後には1000倍以上に急上昇し、刺激12時間後も高濃度が維持され、24時間後には低下し始めるものの、依然として定常時よりもかなり高い血清中濃度を維持した。

RT-PCR法によるEPO-mRNAの解析ではその発現様式は中枢神経系部位により大きく2種類に分類できた。すなわち、（1）定常酸素濃度ではほとんど発現せず、低酸素刺激により増強される。（腎臓・大脳・中脳・視床下部）（2）定常酸素濃度でも発現しており、低酸素刺激によって増強または維持される。（下垂体）という2種類に分類できることが明らかになった（36th International congress of physiological sciences）。

さらに、Real time RT-PCR法を用いて中枢神経系部位間でのEPO-mRNA発現量を比較したところ、腎臓および採取した中枢神経系では低酸素刺激の持続によりEPO-mRNAの発現量は有意に増加した。中枢神経系の大脳・海馬・視床下部では、腎臓に比べて発現量は少なく、刺激24時間まで漸次発現量が増加した。視床下部は大脳や海馬に比べて少ない発現量を示した。中脳でも低酸素刺激に応じて発現量が増加するが、その増加パターンは他の中枢神経系部位とは異なった。中脳では刺激6時間後に最も発現量が高く、その後時間経過とともに減少していく傾向が見られ、発現量は腎臓と比較すると格段に少ないものの、腎臓と同じ増減パターンを示した。下垂体では、定常状態から発現量が多く、低酸素刺激により有意な増加は見られず、一定の発現量を維持した。このうち神経性下垂体では定常状態でも他部位よりも強い発現が確認された（第150回日本獣医学会学術集会発表）。

中枢神経系におけるEPO産生細胞の同定をEPO抗体にてABC法にて試みたが、background

が強く染まってくる状態であったため、定常状態からEPO-mRNAが強く発現している神経性下垂体に検出対象を絞り、EPO産生細胞の同定をcRNA probe を用いた高感度 *in situ* Hybridizationにより試みた。その結果、神経性下垂体ではEPO産生細胞はニューロン以外の細胞である可能性が高いことがわかり、現在も検討を続けている。

次に、産生されたEPOの作用部位を検討するために、神経性下垂体におけるEPO受容体-mRNAの発現を調べた。神経性下垂体では、EPO受容体-mRNAが定常状態から一様に発現しており、低酸素によるRT-PCR検出バンドの増強傾向は見られなかった。抗体を用いて二重免疫染色法を行って、EPO受容体と抗利尿ホルモン分泌ニューロンとの分布について調べたところ、ニューロンとは局在が一致しない傾向があることが明らかになった。

また、視床下部を含む他の中枢神経系部位におけるEPO受容体-mRNAの発現もRT-PCR法にて確認したところ、定常時から広く発現しており、低酸素の持続的刺激による量的変動はあまりないものと考えられた。

このように、中枢神経系では多くの部位で、EPO 遺伝子発現量は持続的低酸素刺激により増加しており、腎臓とは異なる時間軸での増減と発現量を示した。また、中枢神経系にはEPO 受容体も広範囲に存在することから、中枢神経系内在性 EPO による局所的な制御機構があることが示唆された。特に視床下部-下垂体系においては、低酸素誘導によるEPO-mRNA 発現に違いが見られたことより、下垂体ホルモン産生部位と分泌部位における EPO の発現機序に領域特異性があることが示唆された。

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)

[学会発表] (計4件)

①山田美鈴、山本欣郎、摂水量変動がラット神経性下垂体でのエリスロポイエチン遺伝子発現に与える影響、第151回日本獣医学会学術集会、2011.3.31、東京農工大学(東京都)

②山田美鈴、若井淳、山本欣郎、ラット中枢神経系における低酸素刺激によるエリスロポイエチン-mRNA 発現亢進、第148回日本獣医学会学術集会、2009.9.25、とりぎん文化会館(鳥取県)

③Misuzu Yamada、Yoshio Yamamoto、Jun Wakai、Kouki Kato、Altered expression of erythropoietin mRNA in the central nervous system of hypoxic rats、36th International congress of physiological sciences、2009.8.1、国立京都国際会館(京都府)

④山田美鈴、若井淳、加藤弘毅、山本欣郎、低酸素刺激によるラット中枢神経系でのエリスロポイエチン-mRNA 発現変化、第146回日本獣医学会学術集会、2008.9.24、ワールドコンベンションセンター(宮崎県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 美鈴 (YAMADA MISUZU)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：10414012