

主論文の要旨

**Identification of substances which regulate activity
of corticotropin-releasing factor-producing neurons
in the paraventricular nucleus of the hypothalamus**

視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出因子産生神経の
活動を調節する物質の同定

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
器官系機能調節学講座 神経性調節学分野

(指導：山中 章弘 教授)

向井 康敬

【緒言】

ストレス応答は、様々な内的・外的刺激に適応するための生理機能である。視床下部の室傍核(以下 PVN)に存在する副腎皮質刺激ホルモン放出因子産生神経(以下 PVN-CRF 神経)は、視床下部-下垂体-副腎軸(以下 HPA 軸)の開始因子として、ストレス応答における重要な役割を担うことが知られている。しかし、PVN-CRF 神経の活動が他の神経や生理活性物質により、どのように調節されるかは、不明確な部分が多かった。そこで本研究では、PVN-CRF 神経の活動を調節する物質を明らかにする手法の確立と、その手法を用いた活動調節物質の同定を目的としている。

【対象および方法】

私は急性脳スライス標本を用いたカルシウムイメージングによる活動調節物質のスクリーニング法を確立した。そして PVN-CRF 神経の活動に対して、生理活性物質がどのように作用するかを明らかにした。以下の実験を行った。

(1) PVN-CRF 神経でカルシウム(Ca^{2+})指示タンパク質を発現するマウスの作出

PVN-CRF 神経で Ca^{2+} 指示タンパク質である Yellow cameleon-Nano50(以下 YC)を発現するマウスを作出した。CRF 神経特異的に Cre 組換え酵素(以下 Cre)を発現する遺伝子改変マウス(以下 *CRF-iCre* マウス)と、Cre 依存的に YC を発現するアデノ随伴ウイルスベクター(以下 *AAV9-CMV-FLEX-YC*)を用いた。まず、*CRF-iCre* マウスの PVN 領域に *AAV9-CMV-FLEX-YC* を微量注入して感染させ、PVN-CRF 神経に赤色蛍光タンパク質(以下 tdTomato)を発現するマウスを用いて、YC の発現率と特異性を調べた。

(2) 作出したマウスの Ca^{2+} シグナルの検証

YC によって PVN-CRF 神経の Ca^{2+} 濃度変化を測定できることを検証するために、PVN-CRF 神経に対して、ホールセルパッチクランプ記録とカルシウムイメージングの両方を同時に適用した。急性脳スライス標本を作製し、ホールセルパッチクランプ法を用いて PVN-CRF 神経を過分極状態にした後、パルス電流を注入して異なる周波数の発火を誘導し、生じる Ca^{2+} シグナルの大きさを比較した。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させる物質のスクリーニング

細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させる物質を同定するために、急性脳スライス標本を人工脳脊髄液(aCSF)で灌流し PVN-CRF 神経の Ca^{2+} シグナルを測定した。なお PVN-CRF 神経への他の神経性入力を阻害するために、電位依存性ナトリウムチャネル阻害薬であるテトロドトキシンを aCSF に加えた。aCSF 中に候補物質を溶解し、それぞれ 2 分間灌流投与した際の Ca^{2+} シグナルの変動を調べた。 Ca^{2+} シグナルの変動の大きかった物質を、PVN-CRF 神経の活動を調節する物質として同定した。

(4) Ca^{2+} 濃度を変化させる物質の受容体の同定

PVN-CRF 神経の細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させた物質のうち、アンジオテンシン II(以下 AngII)、ヒスタミン(以下 HA)、カルバコール(以下 CCh)は、背側と腹側の PVN-CRF 神経で応答性が異なった。関与する受容体を同定するために、候補受容体の選択的拮抗薬存在下で各物質を 2 分間灌流投与し、 Ca^{2+} シグナルの変動の大きさを拮抗薬

非存在下と比較した。

【結果】

(1) PVN-CRF 神経で YC を発現するマウスの作出

PVN-CRF 神経において YC の発現が観察され、第 3 脳室の背側端を通る水平面で腹側群と背側群に区別できた (Fig. 1a–c)。YC の発現の特異性を示す YC 発現細胞に占める tdTomato 発現細胞の割合は、腹側では $93.3 \pm 0.9\%$ 、背側では $72.7 \pm 4.1\%$ だった (Fig. 1d)。一方、YC の発現率を示す tdTomato 発現細胞に占める YC 発現細胞の割合は、腹側で $39.9 \pm 3.3\%$ 、背側で $54.3 \pm 3.9\%$ だった (Fig. 1e)。

(2) 作出したマウスの Ca^{2+} シグナルの検証

PVN-CRF 神経において、注入したパルス電流の周波数に依存した Ca^{2+} シグナルが観察された (Fig. 1i)。1、2、5、10 Hz のパルス電流によって、 Ca^{2+} シグナルは注入前と比較してそれぞれ $5.1 \pm 1.0\%$ 、 $9.5 \pm 1.4\%$ 、 $20.8 \pm 3.5\%$ 、 $31.7 \pm 4.3\%$ 上昇した (Fig. 1h)。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させる物質のスクリーニング

63 種類の候補物質を投与した結果、PVN-CRF 神経の Ca^{2+} 濃度は 12 物質 (HA、グルタミン酸、セロトニン、CCh、AngII、ノルアドレナリン、ドーパミン、コレシストキニン 8S (以下 CCK8S)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、ニューロメジン C、テトラコレシストキニン (以下 CCK4)、チラミン) により上昇し、3 物質 (GABA、ノシセプチン、グリシン) により低下した (Fig. 2f)。これらの物質のうち 3 物質 (CCK8S、CCK4、チラミン) は、過去に報告のない新規物質だった (Supplementary Fig. S1d, g, h)。また AngII (Fig. 3b) と HA (Fig. 4b) は主に腹側群の Ca^{2+} 濃度を上昇させた一方、CCh は主に背側群の Ca^{2+} 濃度を上昇させた (Fig. 5b)。

(4) Ca^{2+} 濃度を変化させる物質の受容体の同定

AngII、HA、CCh それぞれによる反応に関与する可能性の高い受容体を同定した。

まず AngII について調べた。AngII 1 型受容体 (以下 AT_1 受容体) の選択的拮抗薬であるロサルタン存在下では、 Ca^{2+} シグナルの変化がほとんど見られなかった (Fig. 3e, f)。このことから、AngII の作用には AT_1 受容体に関与していることが示唆された。

HA については、ヒスタミン H_1 受容体 (以下 H_1 受容体) の選択的拮抗薬であるピリラミン存在下では、 Ca^{2+} シグナルの変化がほとんど見られなかった (Fig. 4e, f)。このことから、HA の作用には H_1 受容体に関与していることが示唆された。

最後にニコチン性 (以下 nACh) およびムスカリン性 (以下 mACh) 双方のアセチルコリン受容体の作動薬である、CCh について調べた。nACh 受容体選択的拮抗薬であるヘキサメトニウムまたはメカミラミン存在下では、いずれも背側群における Ca^{2+} シグナルの上昇が有意に抑制された (Fig. 5e, f)。一方、mACh 受容体選択的拮抗薬であるアトロピン存在下でも、背側群における Ca^{2+} シグナルの上昇が有意に抑制された (Fig. 5f)。しかしいずれの拮抗薬も CCh による Ca^{2+} シグナル上昇を完全には抑制しなかった。このことから、CCh の作用には nACh 受容体と mACh 受容体の両方が関与していることが示唆された。

【考察】

本研究で確立したスクリーニング法によって、15種類の物質による PVN-CRF 神経細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を捉えることができた(Fig. 6)。これらの物質は、PVN-CRF 神経の活性化や抑制を介して、様々な生理機能に寄与している可能性が考えられた。PVN-CRF 神経の活動は、強制水泳などにより誘起される負の感情価(valence)によって活性化され、一方で食餌などにより誘起される正の感情価によって抑制される(Kim et al. 2019, Nat Neurosci)。本研究で同定された物質が、このような活動調節に関与する可能性が考えられた。

本研究では、3物質において PVN-CRF 神経の腹側群と背側群で異なる応答が観察された。腹側の PVN 神経の大部分は正中隆起に投射して HPA 軸を調節する一方、背側の PVN 神経は下位脳幹に投射して自律神経系出力を調節する可能性が報告されている(Biag et al. 2011, J Comp Neurol)。このことから、本研究で観察された PVN-CRF 神経の腹側群と背側群における Ca^{2+} シグナルの違いは、生理機能の差異を反映している可能性が考えられた。

【結論】

本研究では、PVN-CRF 神経の活動を調節する物質の影響を評価する、厳密で信頼性の高いスクリーニング法を確立した。そして本スクリーニング法によって、15物質が PVN-CRF 神経の活動を調節することを示した。本成果は、今後それぞれの物質の生理機能を解明する手がかりになることが期待される。そして将来、生体におけるストレス応答機構の解明、創薬や治療の糸口となることが期待される。

また今回開発したスクリーニング法は、活動を調節する「物質」のみでなく温度や浸透圧などの「因子」について、さらには PVN-CRF 神経のみでなく、あらゆる種類の神経細胞について、応用が可能である。本スクリーニング法を活用し、今後様々な種類の神経細胞の活動を調節する因子の解明の進むことが期待される。