

博士論文

成長ホルモンパルス形成機構における  
神経ペプチド Y の役割に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

獣医生理学研究室

平成 19 年度博士課程入学

藤澤 彩乃

第 1 章 序論 .....	1
第 2 章 ステロイドホルモンによる GH 分泌制御機構の解明	
第 1 節 糖質コルチコイドによる GH 分泌動態変化と NPY	
緒言 .....	9
図 .....	12
材料と方法 .....	15
結果 .....	18
考察 .....	19
図表 .....	21
第 2 節 性ステロイドによる GH 分泌動態変化と NPY	
緒言 .....	48
材料と方法 .....	51
結果 .....	53
考察 .....	54
図表 .....	57
第 3 章 光刺激による GH 分泌抑制機構の解明	
緒言 .....	61
材料と方法 .....	64
結果 .....	66
考察 .....	68
図表 .....	71
第 4 章 総括 .....	78
図 .....	83
参考文献 .....	85
謝辞 .....	105
要旨 .....	106

## 第1章 序論

## 序論

### 生物の偶発的進化と合目的的進化

ダーウィンは、その著書「種の起源」(1859)の中で語っている。「生物は自然選択によって、環境に適応するように変化し、種が分岐して多様な種が生じる」と。彼は進化を意味する“Evolution”の語を用いず、“Descent with Modification”と表現することで、この世代を超えた変異が偶発的であると強調している。ダーウィンの提唱するところの「自然選択説」は古代ギリシアのエンペドクレスが述べたものと近い概念であるが、中世キリスト教をはじめとする宗教権力により強固に否定されてきた「進化論」を「形質におけるエントロピー増大から環境抵抗による淘汰を経て種の多様性がもたらされる」という科学的な理論として説明したものとして意義が大きい。一方、ダーウィン以前に科学的に進化を論じたラマルクは用不用論を唱える中で「進化は目的論的である」と考えている。ラマルクの提唱する獲得形質の遺伝については今日では進化論の主流から外れてしまったが、単純なものから複雑なものへの定向的な進化の過程で、環境に応じて使用した器官が発達し、そうでない器官が退化するという結果はダーウィニズムと同様に現実に即したものである。つまり、どちらを取っても「生物は生存に適した方向へ種を進化させる」という結論に至るのである。そもそも、種とは、進化とは何なのであろうか。生物学的定義から言えば、種とは「生殖隔離が完了しておらず、互いに同様の形質を持つ個体群」である。一方の進化とは前述の通り、適応によって種に新しく生存に有利な形質がもたらされることである。進化の結果新たな種が誕生するとすれば、種という断続的なものと進化という継続的なものは相反する概念に思えてならない。遺伝学的解析方法が発達した昨今、種の同定や進化の系譜もゲノム計画において明らかにされて分類学に堅固な証拠を与えているが、一方で同種と定義されている中にもハプロタイプや SNP が存在することもますます明らかになり、このような変異のうちある程度以上のものを別種として認定するのは何か偏った定義のように感じられる。実際、頻繁な遺伝子の組み換えそのものを生存戦略とするウイルスでは分類までもが頻繁に組み換えられているし、真核生物においても単為生殖のみを行うものについては種としての定義・分類が難しいものがある。つくづく、種と進化、あるいは分類学と遺伝発生学とは相反する概念であると感じる。あえて定義するならば、現在という時点のみにおいて成立する分類が種であり、生殖を通じて連続していく生命の時間軸上の変遷をたどったものが進化であろう。その変化が偶発的であろうと合



目的적であろうと生物がより合理的な方向へと種を変化させてきたことは確からしい。

### 恒常性維持と視床下部—内分泌系

一方で、種概念に縛られなければ生物の進化とは神の存在を信じさせるかのような緻密な印象を与える。その最たるものは、生物が体内環境を一定に保とうとする性質、つまり恒常性（ホメオスタシス）である。この概念はキャノンによって提唱されたもので、言い換えれば「常態が乱されるときに、もとの常態に戻すようにはたらく各種の生理的仕組み」を指す。前述のように合理的な方向へと生物が進化してきた結果、脊椎動物では内分泌系・神経系・免疫系器官が分化し、恒常性維持の役割を担うようになった。3系は負のフィードバック機構を通じて恒常性維持を行っており、その主な制御中枢と考えられているのが視床下部である。

視床下部は間脳に含まれ、自律神経系の高次中枢および体温・睡眠・生殖・内分泌代謝などの神経中枢であると同時に下垂体と密接な連絡をもつことが知られている。下垂体は視床下部の基底に接している内分泌器官で、前葉・中葉・後葉に分かれる。下垂体前葉と視床下部の間には下垂体門脈と呼ばれる血管系による連絡があり、視床下部からの液性シグナルを受けて分泌される様々なホルモンは、全身の標的器官へ運ばれて多種の作用を発現するだけでなく、それ自身や誘導物質によって今度は視床下部の制御に影響を与え、内分泌系のフィードバック機構が完結する。しかも、内分泌系のフィードバックは独立系ではなく、視床下部を介して自律神経系・免疫系とも密な連絡を取り合っており、総合的な恒常性維持にも視床下部が必須であることに疑いの余地はない。その中でも成長ホルモン（Growth Hormone: GH）とその視床下部制御系は糖脂質代謝やタンパク質同化といったエネルギー状態に関与する体内環境維持作用を持ち、また広く標的器官が分布して全身性に作用が発現されることから恒常性維持に大きな役割を担うと考えられる。

### GHの基礎的所見

GHは分子量約22 kDaのペプチドホルモンで、2カ所のS-S結合を有する（Watahiki *et al.*, 1989）。下垂体前葉からの分泌はソマトトロフが担当するが、ソマトトロフはプロラクチンを分泌するラクトロフと発生的に近縁であること

が知られており (Mulchahey and Jaffe, 1988)、ペプチドの構造上でもプロラクチンと同じペプチドホルモンのファミリーに属す (Niall *et al.*, 1971)。種間での GH の構造上の相同性は高く、アミノ酸レベルで 60-90% が保存されている (Harvey *et al.*, 1994)。

GH の作用は GH 受容体への結合から直接発現するものと、GH 受容体—IGF-I 発現—IGF-I 受容体の経路をたどって間接的に発現するものとの 2 つに大別され、それぞれ全身の各臓器で発現している。GH 受容体はアミノ酸約 620 個からなる糖修飾タンパク質であり、膜貫通領域を 1 カ所、糖鎖結合部位を細胞外に 5 カ所、S-S 結合を細胞内に 3 カ所有する (Fuh *et al.*, 1990)。GH 受容体は肝臓に最も多く分布するが、同時に骨格筋、軟骨細胞、脂肪細胞など各臓器において発現が確認されており (Kelly *et al.*, 1991)、前述のように一部のシグナルは IGF-I の産生・分泌を促している。産生された IGF-I は循環血による運搬や近傍への拡散、分泌細胞内部での作用によって標的細胞の増殖を促進する (Harvey *et al.*, 1994; Le Roith *et al.*, 2001)。また、GH の直接作用としてはタンパク質合成、糖質代謝、脂質代謝などの直接的なエネルギー代謝調節が挙げられ、生存する上でのエネルギー代謝の重要性から考えても GH はホメオスタシス機構の根幹を成していると言える。

一方で、生物が進化の途上で獲得してきたホメオスタシス機構は、合理的であり、なおかつ進化が単純から複雑への方向性を持つならば、同時に多機能な機構であるはずであるから、ホメオスタシスのメインとなる GH の分泌制御や作用発現においてもエネルギー代謝以外での恒常性維持機構が内包されている可能性は十分にある。裏付けるものとして、GH 分泌動態が体内外の環境変化に応じて柔軟に変化する現象が挙げられる。

### GH の分泌動態

本研究では実験動物としてラットを用いた。ラットの GH 分泌動態は雌雄で異なり、雄では約 3 時間に 1 回の間歇的なパルス状分泌を、雌では持続的で不規則な分泌動態を示すとされる (Jansson *et al.*, 1985)。ラットで見られるこうした分泌動態の性差は大部分が性ステロイドの影響であると言われている。一方ヒトにおいては明確な性差は存在しないが、食事の前後と就寝時に大量に分泌される明確な日内変動が観察されており (Ho *et al.*, 1987)、ラットよりも体内エネルギー環境に影響されやすい分泌動態をもつと考えられる。また、GH の分泌動態を変化させる要因としてはストレスも大きな割合を占めると思われる。ストレ

ス時に副腎皮質より分泌される糖質コルチコイドは GH 分泌を抑制する作用を持つことが報告されている (Tsigos and Chrousos, 2002)。さらに、ヒトとラットに GH 分泌動態の種差が存在すると同様に多くの種はそれぞれに特徴的な分泌動態を示す。すなわち、ラットやアカシカの雄では明瞭なパルス状の分泌動態を示すが (Tannenbaum and Martin, 1976; Webster *et al.*, 1996)、ヒツジやウシでは雄でも不規則で小さいパルス状分泌が行われている (Cataldi *et al.*, 1994; Frohman *et al.*, 1990)。同種内でも亜種や品種において異なる GH 分泌動態を示す例も報告されており (Frohman *et al.*, 1990; Favier *et al.*, 2001; Gazal *et al.*, 2002)、緯度が高く気温の低い土地に生息する品種と低緯度地方が原産の品種とで GH 分泌動態と体格の特徴がそれぞれ一致する例が見受けられる。したがって、生物の生存地の環境に応じた体内環境の形成に GH 分泌が一役買っていると想像できる。

こうした GH 分泌動態の多様性は GH の生理作用発現を制御する上で重要である。ラットでは雌雄で肝臓のチトクロム P450 の発現量やサブタイプが異なるが、雌ラットにおいて雄の GH 分泌動態を模することで雄型の酵素発現が誘導できる (Mode *et al.*, 1992; Waxman and O'Connor, 2006; Thangavel and Sahpiro, 2007)。GH のシグナル伝達物質である STAT 5 の発現量についても同様の制御がなされていることがわかっている (Thangavel and Sahpiro, 2007)。また、一日あたりの投与量が同じでも、パルス状に GH 投与を受けたラットでは連続的に投与したラットに比べて骨成長や体重増加が促進される (Isgaard *et al.*, 1988; Jaffe *et al.*, 2002)。筆者らの研究室で作出されたヒト成長ホルモン遺伝子導入ラットのうち重度の肥満を呈す Low line TG については導入したヒト GH によってラット GH の分泌が抑制され、導入したヒト GH も慢性的に少量ずつ分泌されるが (Ikeda *et al.*, 1994)、GH をパルス状に補充することによって脂肪重量の減少、筋量の回復が起こることがわかっている (Ikeda *et al.*, 1996; 藤井, 2010 卒業論文)。翻ってこうした分泌動態によって誘導される作用が異なることで雌雄の体格差を形成しており、さらに体内環境に応じて繊細に GH 分泌動態を調節することで広義のホメオスタシスへの迅速で的確な寄与を可能としている。

#### 視床下部による GH の分泌制御

下垂体前葉ホルモンである GH は下垂体由来ホルモンの例に漏れず視床下部ペプチドによる分泌制御を受けている。従来、GH 分泌促進因子である GH 放出ホルモン (GH-releasing Hormone: GHRH) と、GH 分泌抑制因子であるソマトス

タチン (Somatotropin Release-inhibiting Factor: SRIF) との二因子制御系によってその分泌制御は説明されてきた (Tannenbaum and Ling, 1984)。そのうち GHRH は抗体中和によって GH パルスの欠如が見られることからパルス状分泌を司っているとされ、一方 SRIF の抗体中和では GH 基底値が上昇することから低い基底値を形成しているという仮説が提唱されていた (Plotsky and Vale, 1985)。

GHRH は 1982 年に同定されたペプチドホルモンで、アミノ酸約 40 個からなる (Guillemin *et al.*, 1982)。GHRH 産生ニューロンは主に視床下部の弓状核 (Arcuate Nucleus: ARC) に存在し、正中隆起に投射する軸索をもつ (Merchenthaler *et al.*, 1984; Sawchenko *et al.*, 1985)。GHRH 受容体は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体で、促進性 GTP 結合調節タンパク質を刺激し、アデニル酸シクラーゼを活性化することで細胞内の cAMP 濃度を増加させる。その下流では A キナーゼが活性化し、細胞内へのカルシウムイオン流入を介した分泌促進作用および合成促進作用が発現すると考えられている (Bilezikjian and Vale, 1983; Carter-Su *et al.*, 1996)。

一方の SRIF は 1972 年に同定された環状型ペプチドホルモンであり、構成アミノ酸は 14 個ないし 28 個である (Brazeau *et al.*, 1973)。SRIF ニューロンは皮質を含む脳内の広範囲に分布しているが (Finley *et al.*, 1981)、特に視床下部では複数の神経核に存在し (Pelletier *et al.*, 1975; Elde and Parsons, 1975)、正中隆起を経由して下垂体門脈へ分泌される SRIF は室周囲核 (Periventricular Nucleus: PeVN) の細胞体に由来するものが大部分であるとされている (Johansson *et al.*, 1984)。SRIF 受容体も 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であるが、共役 G タンパク質は抑制性 GTP 結合調節タンパク質である。したがって、作用も GHRH と反対向きとなり、cAMP 濃度の低下を誘導することで GHRH の作用を打ち消す。

このように、GHRH と SRIF は相反する作用を持ち、二者が協調的に GH パルスを形成していると考えられて来た。しかし、近年の研究で GH パルスの形成が GHRH、SRIF の二者だけでは説明できない報告が散見されるようになった。ヒツジ、サルを用いて下垂体門脈血、第三脳室中脳脊髄液の GHRH、SRIF 濃度と血中 GH との相関を調べた研究においては有意な相関が見られず、グレリン (Ghrelin) やガラニン、神経ペプチド Y (Neuropeptide Y: NPY) といった因子の強い関与を示唆することとなった (Frohman *et al.*, 1990; Giustina and Veldhuis, 1998; Watanobe and Habu, 2002)。

NPY は 36 アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、末梢から中枢までの広い範囲で伝達物質として作用している (Funabashi *et al.*, 2003) 。脳内においても広範に発現が認められ、視床下部においては ARC および室傍核 (Paraventricular Nucleus: PVN) などに多く分布する (Allen *et al.*, 1983; Chronwall *et al.*, 1985; Gehlert *et al.*, 1987) 。NPY 受容体も同様に 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であり、抑制性 GTP 結合調節タンパク質の作用で細胞内 cAMP 濃度の低下を引き起こす。ラットでは NPY および作動薬の脳室内投与によって GH 分泌の抑制がみられ (McDonald *et al.*, 1985; Suzuki *et al.*, 1996) 、抗体による中和では GH 分泌の促進がみられる (Rettori *et al.*, 1990) ことから、SRIF と同方向、すなわち GH 分泌抑制的な作用をもつと考えられている。NPY の GH 分泌抑制作用は GH のネガティブフィードバックに関係するという仮説を唱えるグループがある (Kamegai *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1996; Frago *et al.*, 2005) 一方で、ヤギ (シバヤギ) を用いた実験においては脳脊髄液中の NPY 動態が GH パルスと負の相関を持ち、また NPY 動態は GH 分泌動態に先んじて変化することから、中枢で分泌される NPY は積極的に GH 分泌動態を制御する可能性が示されている (Yonezawa *et al.*, 2010) 。解剖学的に、ARC の NPY ニューロンは PeVN の SRIF ニューロンへ投射していることが知られている (Lanneau *et al.*, 2000; Hisano *et al.*, 1990) 一方で、下垂体門脈への直接放出の可能性も示唆されている (Sutton *et al.*, 1988) ため、その作用は下垂体へ向かって直接のおよび間接的の双方が考えられる。したがって、NPY は GH パルス形成機構の一部を担う可能性を十分にもつ。

以上に挙げた視床下部において GH 分泌制御に関与するペプチド類は内分泌をはじめ睡眠・摂食・ストレス・生殖といった種々の恒常性維持にも影響を持つことが知られている。例えば GHRH の代表的な作用としては睡眠誘発作用が知られており (Obal and Krueger, 2002) 、SRIF は消化管ホルモンへの分泌抑制作用に加えて (Johnson *et al.*, 1975) プロラクチンや甲状腺刺激ホルモンの分泌も抑制する (Kaneda *et al.*, 1991) 。NPY もまた多くの調節機構への関与が知られており、強い摂食促進作用と覚醒抑制作用、生殖抑制作用などを有し、恒常性維持において総括的な役割を担っていることが期待される。

#### NPY の生体内作用

視床下部の NPY ニューロンは強い摂食促進作用を持つことが知られている (Clark *et al.*, 1985) 。ニューロペプチドの 1 つであるグレリンは GH 分泌に関

して NPY とは逆方向の促進的作用を示すが、一方で摂食に関しては同方向の促進作用を有し (Wren *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 2001; Tannenbaum *et al.*, 2003)、作用発現は NPY ニューロンを介する (Willesen *et al.*, 1999; Wren *et al.*, 2000)。また NPY ニューロンは摂食抑制作用を有するコルチコトロピン放出ホルモン (Corticotropin-releasing Hormone: CRH) を抑制することで摂食促進作用を増強している (Brady *et al.*, 1990)。NPY と CRH の負の制御関係はストレス反応時にも発現するが、この場合は NPY および CRH の双方がストレス負荷によって増加することが知られている。ストレス刺激は生殖機能や消化機能を抑制するが、その一部は NPY によるものであると考えられている (Thorsell, 2010)。さらに、摂食系と睡眠-覚醒系との間には共通因子が多く機能も相関するとされて来たが、NPY ニューロンも睡眠-覚醒調節へも作用を有することが期待される (Horvath *et al.*, 1999)。摂食やストレス、睡眠-覚醒などの調節機構は独立して研究されがちであるが、生体内においては互いの関連なくしては個体の維持に問題が生ずる。こうした複数の調節機構に単一の因子が関与することで調節機構同士を統括して多元的に調節する機構が存在する可能性がある。前述のように GH によるエネルギー代謝はホメオスタシスの根幹をなすため、GH 分泌調節機構においても NPY の関与が強いことが予想される。

## 本研究の目的

ここまで述べて来たように NPY は複数の調節機構に寄与し、それらを統括して生体全体でのホメオスタシス維持作用をもつ可能性が考えられる。他方で GH 分泌動態はエネルギー代謝を密に調節するがそのパルス状分泌制御機構は明らかとなっていない。したがって本研究では、GH 分泌制御系における NPY の寄与を証明することを目的とした。筆者の研究室での先行研究ではヤギ (シバヤギ) の脳脊髄液中 NPY と血中 GH パルスの相関が示されており (米澤、2004 学位論文)、神経内分泌的な手法による解析では NPY が GH パルスを制御する可能性が示唆されている。そこで筆者は、脳組織の解析が容易で詳細な脳地図が存在するラットを実験対象とし、GH パルスの動態と視床下部における NPY 発現動態の部位特異的な変化を比較する手法を用いて組織学的な解析を行った。

本論文は 4 章からなり、第 1 章は序論として本研究の背景と目的の詳細を述べた。GH と同様に広範な生体機能調節作用をもつステロイドホルモンは、その作用の少なくとも一部は GH のパルスパターンを変調させることにより発現すると考えられることから、第 2 章ではステロイドホルモンによる GH パルスの分泌調

節に対する NPY の関与について検討した。まず第 1 節では、筆者が過去の研究で明らかにした GH パルスと糖質コルチコイドレベルは相反的に変化するというモデルを用いて、視床下部 NPY の発現解析を行った。第 2 節では、上述した GH パルスの性差を形成する主要な因子であるエストロジェンと NPY 発現の関係について検討した。第 3 章では、GH パルス形成と NPY 発現動態の時間軸に沿った関係をより詳細に追究するため、光刺激による GH パルス抑制モデルを用いて検討を行った。第 4 章ではこれらの研究結果をもとに、GH パルス形成機構において視床下部 NPY が果たす役割について、他の因子との関連も含め総合的な考察を行った。

## 第2章 ステロイドホルモンによる GH 分泌制御機構の解明



## 第 1 節 糖質コルチコイドによる GH 分泌動態変化と NPY

### 緒言

#### ストレス反応と GH

ストレス反応はホメオスタシス維持機構の端緒となる部分である。動物の生存は外界や体内からのあらゆるストレスに対して体内環境を一定に保つための努力によって成り立っており、ストレス反応は視床下部を中心としたシステムである。そのシステムは 2 つに大別され、緊急反応として働く視床下部—交感神経—副腎髄質系 (Sympathetic-adrenamedullary System: SAM 系) と、それに続いて起こる内分泌反応としての視床下部—下垂体—副腎皮質軸 (Hypothalamus-pituitary-adrenal Axis: HPA 軸) とそれぞれ呼ばれている。特に HPA 軸の最終生理活性物質である糖質コルチコイドは末梢組織において多様な作用をもつが、血液脳関門を通過することで中枢への作用も有することが知られている。

さて、GH 分泌動態を変化させるものは見方を変えればすべてがストレスである。すなわち、GH の分泌動態変化はそのものがストレス反応であると考えられる。筆者は卒業論文の中で、ラットの主な糖質コルチコイドであるコルチコステロン (Corticosterone: CS) が高濃度に存在する状況下では GH パルスが形成されないことを示してきた (Figure 2-1-1., 2.; 今井、2007 卒業論文)。そもそも種によって、あるいは同種内でもストレス反応による GH 分泌動態変化は様々な報告があり、中には相反するものも存在する (Delitala *et al.*, 1987)。一般に、GH 分泌に対して HPA 軸は抑制的に働くと言われている (Senaris *et al.*, 1996)。低酸素、感染、低温、拘束といった各種のストレス刺激に対して HPA 軸は活性化し、GH 分泌は低下する (Xu *et al.*, 2004; Berczi, 1998; Fujikawa *et al.*, 2000; Rauhala *et al.*, 1995)。逆にストレスによって GH 分泌や濃度が上昇するという報告 (Priego *et al.*, 2003; Raza *et al.*, 1998) も得られているが、こうした報告間の相違は実験系の違い以上に GH 分泌動態の全容解明が未だなされていないこと、GH 分泌制御系での解析が不十分であることが原因であると考えられる。病態から糖質コルチコイドの影響を評価すると、糖質コルチコイドの過剰分泌を病態とするクッシング症候群では GH 分泌低下が見られ (van Aken

*et al.*, 2004)、これは GH 分泌刺激への反応性低下に起因すると考えられている (Correa-Silva *et al.*, 2006; Leal-Cerro *et al.*, 2003)。また、成長期における合成糖質コルチコイド製剤の投与では低身長が誘発されるという報告もあり (Shrivastava *et al.*, 2000)、総合すると GH 分泌に対して活性化された HPA 軸が抑制的な作用を持つことが予想される。

## 絶食

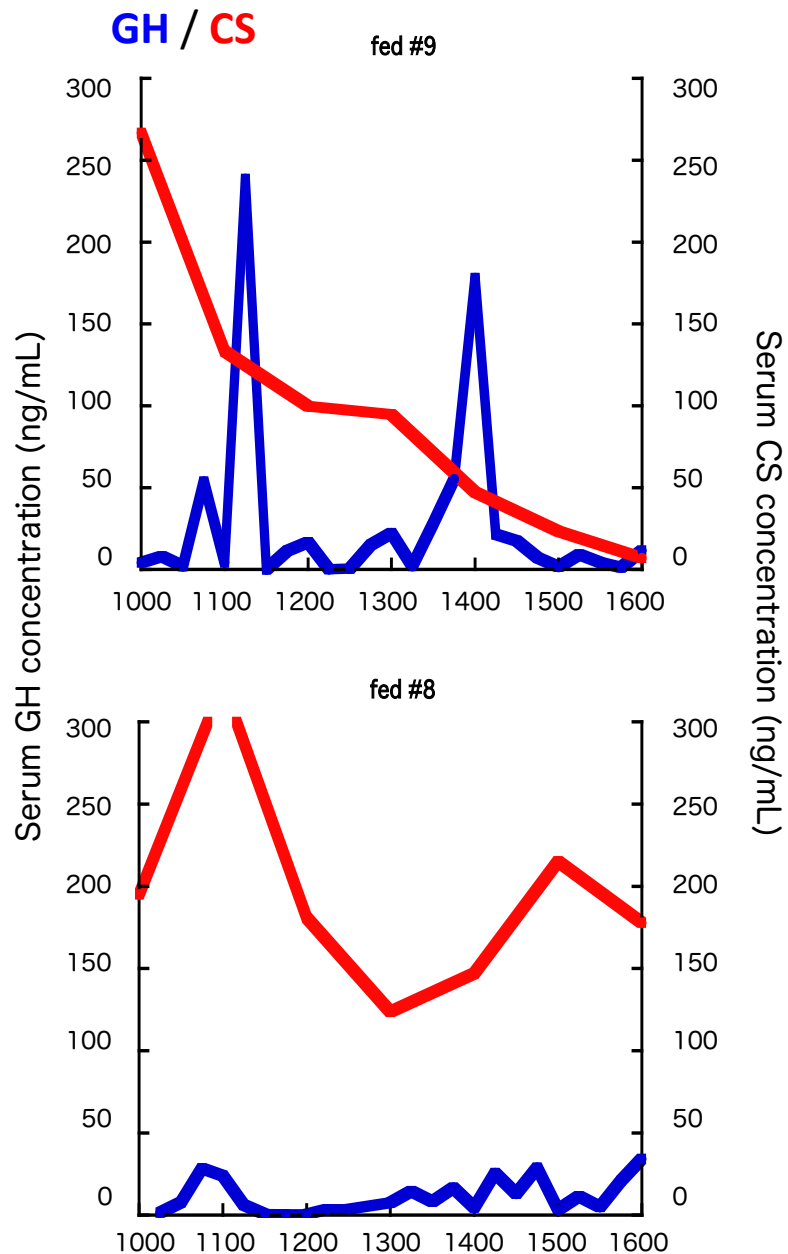
絶食負荷によって誘発される飢餓状態はストレス刺激であるが、エネルギー代謝そのものがストレスを受けるという点において GH 分泌との関係性を考える上では他のストレス刺激とは分けて考える必要がある。また、糖質コルチコイドそのものが末梢における糖新生作用も有するために両者の役割を分離して解析することは困難である。これまでの報告では、絶食ストレスによって糖質コルチコイド濃度は一様に上昇するが、マウスや霊長類では GH パルス振幅や基底値が上昇するとされるのに対し、ラットでは下垂体の GH 含量と血中 GH パルス振幅が低下するといった具合に報告が分かれている (Luque *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2005; Lindblom *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 1994; Lado-Abeal *et al.*, 2005; Espelund *et al.*, 2004)。一方で、筆者は絶食強度によって CS、GH がともに一方向性ではない変化を見せることを示して来た (Figure 2-1-3.)。すなわち、絶食開始後 48 h および 96 h では GH パルスが抑制されるが、72 h 絶食において GH パルスの形成が見られた。同様の変化はマウスの CS 動態においても観察されており (Luque *et al.*, 2006)、また摂食関連因子についても絶食期間の延長によって初期の飢餓状態とは発現パターンが異なることも示されていることから (Sucajtyś-Szulc *et al.*, 2010)これまでの報告についても絶食強度を考慮した上での検討が必要であると考え。見方を変えると、絶食モデルはストレス強度とエネルギー代謝環境の組み合わせで複数パターンの体内環境を作り出すことが可能となるものであり、GH と NPY の関係性を解析するにあたって多くの情報を与えてくれるという点が利点となる。

## NPY とストレス、摂食系との関与

本研究で注目する NPY は GH 分泌制御系の候補であると同時にストレス反応や摂食促進の作用も有する。ARC の NPY ニューロンの約半数は糖質コルチコイド受容体を持ち (Haerfstrand *et al.*, 1989)、PVN の CRH ニューロンに投射する (Fuezesi *et al.*, 2007)。NPY の CRH ニューロンに対する作用は促進的

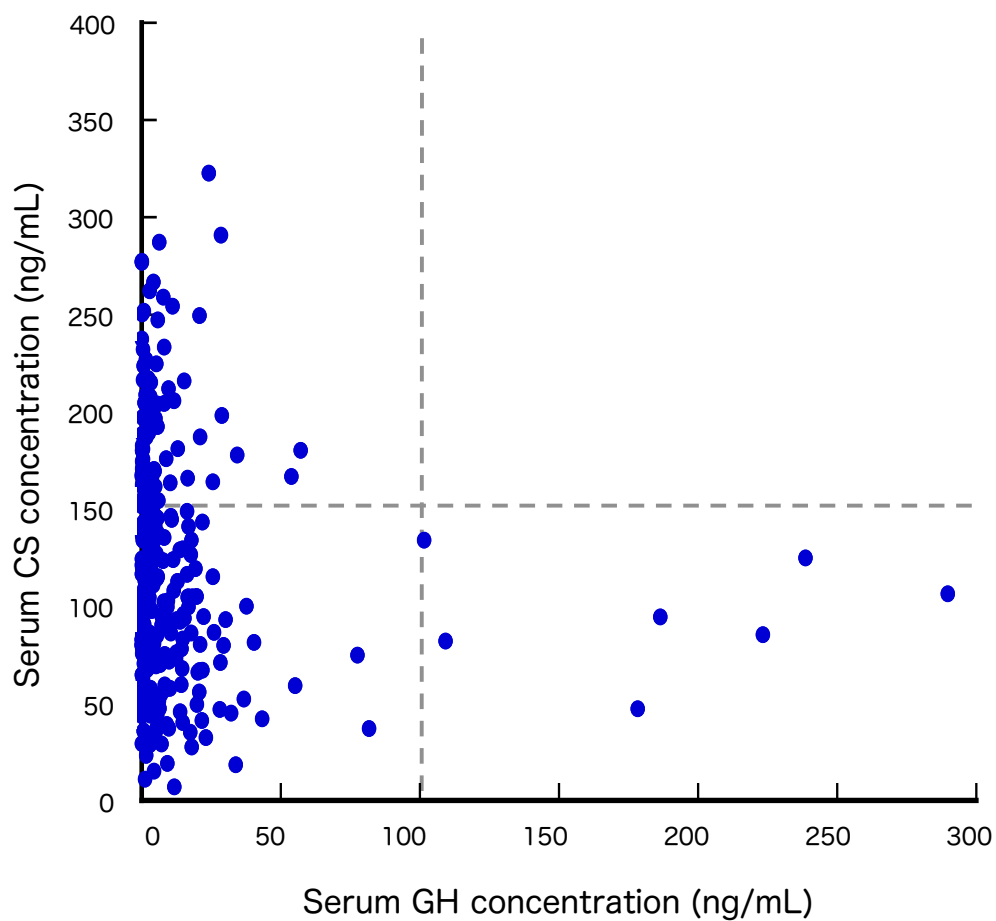
とされ (Thorsell, 2010) 、また ARC への CS 投与では HPA 軸が抑制されるという知見も得られている (Dallman *et al.*, 1995) 。しかし、CS と NPY に限定した場合には CS の投与によって ARC の NPY 発現は上昇するという報告も存在し (Krysiak *et al.*, 1999) 、ARC は NPY ニューロン以外にも、HPA 軸に影響を持つ神経を有する可能性がある。また、NPY は現在知られている神経ペプチドの中で最も強い摂食促進作用を持つが (Semjonous *et al.*, 2010) 、NPY のノックアウトマウスは通常飼育においては表現型を示さない (Bannon *et al.*, 2000) 。その上、受容体のノックアウトマウスでは摂食量、体重がともに増加する結果も報告されており (Feletou and Levens, 2005; Higuchi *et al.*, 2008) 、摂食促進作用の機序については不明な部分を多く残す。現在のところ、ARC の NPY ニューロンから外側野のメラニン凝集ホルモン (Melanin-concentrating Hormone: MCH) ニューロンへ投射があると考えられ、MCH を介して摂食促進作用が発現すると考えられている (Kawano *et al.*, 2002; Funahashi *et al.*, 2003; Griffond and Risold, 2010) 。CRH は摂食抑制作用を持つとされ (Connan *et al.*, 2006) 、ストレス反応と摂食促進においては NPY と CRH の作用方向は異なる。

筆者は卒業論文において、ストレス刺激による高 CS 濃度条件においては GH パルスが発生しないことを示して来た。また、前述したように絶食によるストレスの強度を変化させることで複数パターンの体内環境を作り出し、特徴的な CS-GH の分泌動態の観察に成功している。そこで本節では同じモデルを用いて、CS 単体による影響と絶食を含めたストレスの影響との両面から GH と NPY の関係性を調べ、NPY の GH 分泌制御作用およびその他の作用を明らかにすることを目的とした。



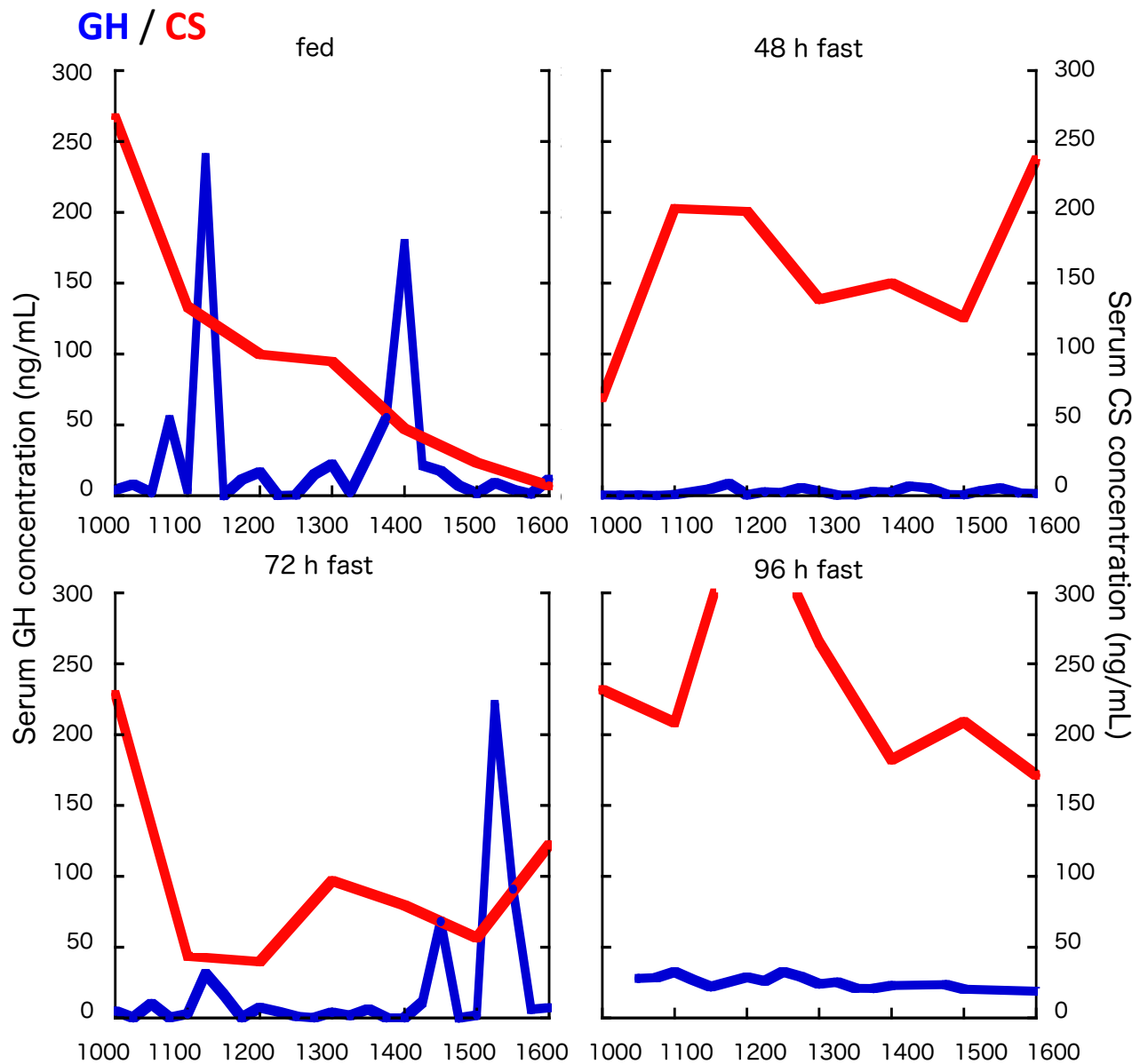
**Figure 2-1-1. CS 濃度と GH プロファイル**

青線、左軸はGH濃度を、赤線、右軸はCS濃度を表す。  
 上段はGHパルスが形成された個体、下段はGHパルス  
 が形成されなかった個体。(今井卒業論文より改変引  
 用)



**Figure 2-1-2. CS 濃度と GH 濃度の分布図**

縦軸はCS濃度、横軸はGH濃度。縦方向の破線より右側は高い振幅のGHパルスであり、横方向の破線より上側はストレス状態と同等の高CS濃度である。(今井卒業論文より改変引用)



**Figure 2-1-3. 絶食負荷時 GH プロファイル**

青線、左軸はGH、赤線、右軸はCSの血中濃度。各群それぞれ典型的な動態を示した。(今井卒業論文より改変引用)

## 材料と方法

これ以降の第2章、第3章の記述においては購入元企業名を略称にて表記したため、正式名称および所在地を Table 2-1-1. に示した。また、全ての実験において汎用した溶液についてはそれぞれの実験とは別途 Table 2-1-2. にまとめた。

### 動物

実験には Wistar Imamichi 系 (動物繁殖研究所) 11~12 週齢の雄ラットを用いた。1200 点灯 [12L:12D] の明暗、餌および水の自由摂取、温度湿度一定の条件下で飼育し、購入から 3 週間以上馴化飼育を行った後に実験に供した。全ての実験は東京大学の推奨する「東京大学動物実験実施マニュアル」に基づいて行った。

### CS ペレット留置

ペレットは、ステロイド粉末を熱融解したものを 110  $\mu$ l のペレット型に流し込んで再凝固させることで作製した。すなわち、高 CS 群に留置するためには CS (WAKO) 粉末を、対照群に留置するためにはコレステロール (Cholesterol: Chol, WAKO) 粉末をそれぞれ用いて作製した。脳を採材する 1 週間前に留置術を行った。エーテル麻酔下でラット後頸部の皮膚を切開し、体部方向に鈍性剥離した後各ペレットをそれぞれ 2 個ずつ留置してミュヘルクリップで閉鎖した。

### 絶食負荷

11 週齢ラットは群飼ケージ飼育のまま、それぞれサンプリングの 48, 72, 96 時間前より餌を与えずに飼育した。水は自由に摂取させた。絶食ラットは 24 時間ごとに観察し、変調を来していないことを目視にて確認した。

### 頸静脈カニューレ留置手術

カニューレは、シラスコン医療用チューブ (ID=0.5 mm, OD=1.0 mm; カネカメディックス) を適当な長さに切断し、縫合用絹糸 (ナツメ) に作った結び目に通した後に、結び目を締めない状態で先端より 3 cm の部位にてバスコーク (セ

メダイン) を用いて接着したものを用いた。手術はエーテル麻酔下で頸静脈を剖出して行った。カニューレ誘導には 22G と 18G の注射針を切り出した上で入れ子にして作製した針を使用し、頸静脈の頭側より心臓側へと血管内にカニューレを挿入した。用いた注射針はテルモより、手術器具はナツメより購入した。手術はヘパリン (ノボ・ヘパリン; 持田製薬) を 100 IU/ mL で生理食塩水に添加したものをを用いてカニューレ内での血液凝固を阻害しながら行った。

### 経時採血

カニューレ留置手術後 2 日半の回復期間の後、ラットを自動採血装置 (DR-2; エイコム) に接続した。採血に用いる溶液には前述のヘパリンを 1 IU/mL で添加した生理食塩水を用いた。断続的なフラッシュ運転を 11 時間以上続けた後、15 分毎に 120  $\mu$ l の採血を 明期開始 1 時間前から 4 時間 (1100-1500) 行った。採取した血液は 4°C で一晩凝固させ、血清を分離した後 -80°C においてホルモン濃度測定まで保存した。

### GH 濃度測定

血清中 GH 濃度は  $^{125}$ I を用いたラジオイムノアッセイ法 (Radioimmuno Assay: RIA 法) にて測定した。標識用ホルモン、標準曲線用ホルモン、および抗 GH 抗体はキットとして NIDDK より購入した。クロラミン T 法による標識手順および測定手順は Table 2-1-3., 4. に示した。用いた溶液の組成、試薬の購入元は Table 2-1-5. に示した。 $\gamma$ 線の測定には ARC-370 (Aloka) を使用した。アッセイはすべて 1 回で行い、アッセイ内 CV は 11.13% であった。

### CS 濃度測定

血清中 CS 濃度は、 $^3$ H で水素を置換した標識体を用いた RIA 法にて測定した。標識ホルモンは Perkin Elmer より購入した NN-NET 399 を用い、抗体は当研究室でウサギに免疫して作製したものを用いた。測定の詳しい手順および溶液組成は Table 2-1-6., 7. の通りである。液体シンチレーションカウンタは LSC-6100 (Aloka) を使用した。アッセイはすべて 1 回で行い、アッセイ内 CV は 6.62% であった。



### 組織学的解析 (*in situ* hybridization)

ラットに過剰量のペントバルビタール (ソムノペンチル麻酔用注射液®; 共立製薬) を腹腔内投与し、4% (w/v) PFA/PBS を用いて左心室からの直接還流を行った。固定した脳はブレインスライサーを用いて George Paxinos の脳地図において -1.80~-4.30 mm (from bregma) の部位を冠状に切り出し、その後 4%PFA/PBS 内で一晩の後固定を行い、さらに 30% Sucrose/PBS にて置換したものを O.C.T. compound を用いて凍結包埋した。Cryostat (HM 550; MICROM) を用いて 16  $\mu$ m に薄切した切片は Table 2-1-8., 9. のとおりに APS コートしたスライドガラスに貼付けて乾燥させ、以降の染色による検出に供するまで -80°C で保存した。*in situ* hybridization に用いたプローブの配列、プローブ作成までの手順および染色手順は Table 2-1-10.~15., 17. に示した。各反応に用いた溶液の組成、試薬の購入元は Table 2-1-16., 18. に示した。免疫組織化学部分では、1 次抗体として anti-DIG/Sheep 抗体 (Roche)、2 次抗体として anti-Sheep IgG/FITC conjugate/ Rabbit 抗体 (Southern Biotech) をそれぞれ用いた。染色像は正立蛍光顕微鏡 (OLYMPUS) を用いて観察し、DP controller (OLYMPUS) を用いてデータ化したものを Image J ソフト (NIH) にて解析した。解析に際して、ARC は脳内の吻尾軸に沿って広がっているため、Figure 2-1-4. に示すように機械的に吻側 (cranial part of ARC: cran-ARC)、中央 (middle part of ARC: mid-ARC)、尾側 (caudal part of ARC: caud-ARC) の 3 領域に分割して NPY の計測を行った。

### 統計

CS とコレステロールの 2 群比較には unpaired-*t* 検定を用いた。また、絶食群間の比較には one-way ANOVA 法を用い、post hoc test として Tukey HSD test を実施した。いずれも有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 結果

### CS 濃度依存的な NPY mRNA 発現の変化 (Figure 2-1-5., 6.)

ステロイドペレットの留置によって体内 CS 濃度を上昇させた群 (CS 群) について ARC の NPY mRNA 発現を *in situ* hybridization にて計測した。CS 群において caud-ARC の NPY mRNA 発現が高まっていた。一方、cran-ARC と mid-ARC においては両群間に差は見られなかった。したがって、高 CS 濃度によって caud-ARC に存在する NPY 産生細胞で mRNA 合成が亢進することが示唆された。

### CS 濃度の絶食負荷による変化と GH プロファイルの関連性 (Figure 2-1-7.)

絶食負荷の強度により GH および CS に生じる変化を明らかにするために血中ホルモン濃度を計測した。自由摂食群 (fed 群) と比較し、48 時間絶食 (48 h 群) と 96 時間絶食 (96 h 群) では CS 濃度が高かったが、72 時間絶食 (72 h 群) では fed 群と同程度に低い CS 濃度が見られた。この変化は Figure 2-1-3. に示した GH パルスの形成と連動している。以上の結果から、絶食に伴う体内環境変化は少なくとも GH と CS については一方向性ではなく、各段階で異なる可能性が示された。また、CS 濃度の高い状態では GH パルスの形成が起こらず、CS 濃度と GH パルスの間には対応関係が見られることが示された。以後の実験においては上記の 3 相をもたらす時間帯として、48 h、72 h、96 h の各絶食期間を用いることとした。

### 絶食負荷時の NPY mRNA 発現の変化 (Figure 2-1-8.)

絶食に伴う NPY mRNA 発現の変化を検出するために、ARC において *in situ* hybridization を行った。caud-ARC においては fed 群、72 h 群と比較して 48 h 群、96 h 群では NPY mRNA 発現が高まっていた。一方、mid-ARC では絶食時間が長くなるに伴って NPY mRNA 発現が高くなる傾向が見られた。cran-ARC では各群間で差はなかった。したがって、mid-ARC における NPY mRNA の発現は絶食強度に依存して変化しており、摂食に関与している可能性が示され、caud-ARC の NPY 産生細胞は CS 濃度、GH パルスと同調した変化が観察された。

## 考察

本節では、CS 濃度に連動して GH パルスの動態が変化する現象について、視床下部 ARC での NPY 発現との関連を調べた。その結果、GH パルスが抑制される高 CS 濃度条件においては caud-ARC の NPY mRNA 発現が上昇した。また、絶食負荷によっては CS 濃度の高い条件では caud-ARC の NPY mRNA 発現が上昇したが、その一方で絶食による体内エネルギー環境の悪化にともなって mid-ARC の NPY mRNA 発現が促進されていく傾向が見られた。

### ストレス反応としての GH 分泌制御における NPY の役割

筆者が卒業論文で示したように、GH パルスは絶食負荷の有無に関わらず高 CS 濃度条件下では抑制される。caud-ARC の NPY 産生細胞においては CS 濃度が高まることで NPY 発現が上昇することが明らかとなった。外因性、内因性のいずれの CS についても caud-ARC の NPY 発現は同様の傾向を示し、また ARC の NPY 産生細胞は CS に対する受容体を有する (Haerfstrand *et al.*, 1989) ことから、ストレス反応としての GH パルス抑制には血中 CS が伝達因子として強く関係し、NPY を介してその作用を発現していることが示唆された。

### NPY の栄養依存性発現の意義

GH パルスおよび CS の動態より、絶食強度による体内環境の変化は少なくとも 3 つ以上のステージに細分類できることを確認した。絶食強度が増加するに伴って mid-ARC では NPY 発現が 1 方向性に上昇した。緒言で述べたように NPY は強い摂食促進作用を有することが知られており (Semjonous *et al.*, 2010)、飢餓に応答して発現が上昇するという報告もある (Calza *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 2009) ため、mid-ARC では GH パルスへの影響は少ないものの摂食に強く関与する NPY 産生細胞群が存在する可能性を示した。ARC の NPY ニューロンには肥満信号の 1 つであるレプチン受容体の発現も確認されており (Baskin *et al.*, 1999)、また摂食促進系の MCH ニューロンへの入力も ARC の NPY ニューロンから発信されることが報告されている (Funahashi *et al.*, 2003; Griffond *et al.*, 2010) が、同ニューロンが ARC 内でさらに局在することを明らかにしたのは本研究が初めてである。したがって、mid-ARC の NPY ニューロンは低栄養状態を感知してエネルギー摂取を促す作用を持ち、体内の栄養状態改

善の意義を持つことが示唆された。

#### NPY の糖質コルチコイド依存性発現の意義

絶食負荷の有無を問わず caud-ARC の NPY 産生細胞は CS 濃度および GH パルスと同調した変化を見せた。したがって、この部位の NPY ニューロンは CS 依存的にその発現量を変化させ、GH パルスを抑制していると考えられる。GH パルスが欠損することで体内のエネルギー平衡は糖脂質代謝が弱まり、タンパク質合成作用も低下することが予想される (Laurson *et al.*, 2001)。これはエネルギー消費を抑える方向の変化であり、ストレスを回避するための作用とは反対の作用であるように思える。一方で CS は血糖値上昇に代表されるように活動するエネルギーを確保する方向への変化を誘導する。つまり、GH と CS が相反する作用を有することになり、エネルギー代謝に関するホメオスタシスの一環であると考えられる。同時に、NPY は HPA 軸のネガティブフィードバックにも関連しているため、GH 抑制などの作用が強くなりすぎないようにストレス反応自体に対しても同時に調節を加えている。

#### 小括

以上、本節では糖質コルチコイドがストレスによる GH パルス抑制において伝達因子としての役割をもち、caud-ARC の NPY を介して GH パルスを抑制することを示唆した。一方で mid-ARC の NPY は飢餓状態の進行に連動した変化を示し、GH 分泌調節よりもむしろ摂食促進因子としての作用を強く持っている可能性を示した。

Table 2-1-1. 試薬等購入元の略称と詳細情報

略称	正式社名	所在地 (都市・州)	(国名)
Aloka	アロカ株式会社	東京	
Ambion	(現在は Invitrogen と合併)		
BD	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ	USA
bms	Bio medical science Co. Ltd.	東京	
GE	GE Healthcare	Uppsala	Sweden
GENOMED	Genomed GmbH	Loehne	Germany
Invitrogen	Invitrogen corporation	Carisbad, CA	USA
MICROM	(現在は GMI, Inc. と合併)	Mound, MN	USA
MP Biomedicals	MP Biomedicals LLC.	Akron, OH	USA
Nacalai	ナカライテスク株式会社	京都	
NIDDK	National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases	Bethesda, MD	USA
NIH	National Institutes of Health	Washington D. C.	USA
Olympus	オリンパス株式会社	東京	
Perkin Elmer	Perkin Elmer, Inc.	Boston, MA	USA
Pharmacia	(現在は GE と合併)		
Promega	Promega corporation	Madison, WI	USA
Roche	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	Germany
Sigma	Sigma Aldrich Co.	St.Louis, MO	USA
Southern Biotech	Southern Biotech	Birmingham, AL	USA
Takara	タカラバイオ株式会社	大津	
Wako	和光純薬工業株式会社	大阪	
エイコム	エイコム株式会社	京都	
カネカメディックス	株式会社カネカメディックス	大阪	
共立製薬	共立製薬株式会社	東京	
信越シリコーン	信越化学工業株式会社	東京	
セメダイン	セメダイン株式会社	東京	
東京化成	東京化成工業株式会社	東京	
同仁堂	同仁化学研究所	熊本	
動物繁殖研究所	動物繁殖研究所	茨城	
ナツメ	株式会社夏目製作所	東京	
ニッポンジーン	株式会社ニッポンジーン	東京	
松浪ガラス	松浪ガラス工業株式会社	大阪	
持田製薬	持田製薬株式会社	東京	
雪印乳業	雪印乳業株式会社	札幌	

Table 2-1-2. 実験に汎用した溶液の組成および試薬の購入元

生理食塩水

NaCl	85 g	(Nacalai)
Total	10 L	
*オートクレーブをかける		

PBS (Phosphate Buffer Saline)

NaCl	80 g	(Nacalai)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	29 g	
KCl	2 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g	
Total	10 L	
*pH調整は特に行わない		

10 x PBS (Potassium free)

NaCl	255 g	(Nacalai)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	87 g	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	8.9 g	
Total	3 L	

4% PFA / PBS

Paraformaldehyde (PFA)	4 g	
H <sub>2</sub> O	85 mL	
*5 N NaOHを1滴加え加熱溶解する		
10 x PBS (Potassium free)	10 mL	
*室温へ冷却後PBS成分を加えて中和し、H <sub>2</sub> Oで100 mLに合わせる		

1 M Tris-HCl

Tris	1 M	
*HClを用いてpH調整を行う		

0.5 M EDTA

EDTA 2Na	0.5 M	(同仁堂)
NaOH	適量	
*溶解後、NaOHおよびHClを用いてpH調整を行う		

Table 2-1-2 (2) 実験に汎用した溶液組成および試薬の購入元 (続き)

50 x TAE

Tris	2 M
氷酢酸	2 M
EDTA (pH 8.0)	50 mM

1% Agarose ゲル

Agarose (Ultra pure)	1 g	(Invitrogen)
1 x TAE	100 mL	

\* 電子レンジにて加熱溶解後、再凝固する前に型に流す

DEPC-H<sub>2</sub>O

H <sub>2</sub> O	1 L	
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	1 mL	(Sigma)

\* 添加後よく振り混ぜ、37°Cにて1時間DEPCの揮発を促した後にオートクレーブにかける

DEPC-PBS

PBS	1 L
DEPC	1 mL

\* 添加後よく振り混ぜ、37°Cにて1時間DEPCの揮発を促した後にオートクレーブにかける

4% PFA / PBS

Paraformaldehyde (PFA)	4 g
H <sub>2</sub> O	85 mL

\* 5 N NaOHを1滴加え加熱溶解する

10 x PBS (Potassium free)	10 mL
---------------------------	-------

\* 室温へ冷却後PBS成分を加えて中和し、H<sub>2</sub>Oで100 mLに合わせる

100% エタノール

Ethanol

70% エタノール

Ethanol	35 mL
Total	50 mL

\* 表記のない試薬はすべてWakoより購入

Table 2-1-3. GH 標識の手順

準備	ガラスチューブに 1-16 まで番号を打ったものを 2 シリーズ用意 (A, B)
	<div>シリーズA      500 <math>\mu</math>L のアッセイバッファを分注</div> <div>シリーズB      空のまま</div>
	DP-10 column (GE) を以下の溶液で順に洗浄
	0.05 M PB      3 回
	1% BSA-PB      2 回
	0.05 M PB      2 回
	*最後に注いだ液体が膨潤した状態で密閉する
<sup>125</sup> I 標識	1.5 mL チューブ内で <sup>125</sup> I 溶液 4.7 $\mu$ L を 0.5 M PB 7.5 $\mu$ L と混合
	標識用 rat GH を 25 $\mu$ L 添加
	Chrolamin T を 1.0 mg/mL 0.5 M PB に調製
	Chrolamin T 溶液を 7.5 $\mu$ L 添加し、正確に 2 min 反応
	*1 min でピペティングにて攪拌する
	メタ重亜硫酸ナトリウム溶液を 25 $\mu$ L 添加して反応を停止
	0.05 M PB 200 $\mu$ L で反応液を希釈し、全量を column へ重層
	0.05 M PB 300 $\mu$ L で反応チューブを洗浄し、全量を column へ重層
	シリーズA へ column 濾過液を順番に滴下し、フラクション分離
	<div>*ガラスチューブ 1 本への滴下ごとに column 内全量を落としきる</div> <div>*2 本目のチューブ以降は column へ 0.05 M PB 800 <math>\mu</math>L を重層する</div>
標識 GH の分離	各チューブから 1 $\mu$ L を測り取り、チップごとシリーズB へ移動
	シリーズB を $\gamma$ -カウンタを用いて計測
	*二峰性にカウントのピークが見られることを確認する
	最初のピーク部分のフラクション 2-3 本分の滴下溶液を適量のアッセイバッファで希釈し、ストック溶液として 4°C で保存



Table 2-1-4. GH RIA の手順

準備	ガラスチューブに番号を打ち、サンプルと照合		
分注	スタンダード溶液を作製、100 $\mu$ L ずつ分注		
	Std. 0	stock 10 $\mu$ L/990 $\mu$ L アッセイバッファ	100 ng/mL
	Std. 1	Std. 0 250 $\mu$ L/750 $\mu$ L アッセイバッファ	25 ng/mL
	Std. 2	Std. 1 250 $\mu$ L/750 $\mu$ L アッセイバッファ	6.25 ng/mL
	↓		
	Std. 5	Std. 4 250 $\mu$ L/750 $\mu$ L アッセイバッファ	0.097 ng/mL
	アッセイバッファを分注		
	Total Count		500 $\mu$ L
	Nonspecific Bind		200 $\mu$ L
	Blank		175 $\mu$ L
	B <sub>0</sub>		100 $\mu$ L
	Stds		0 $\mu$ L
	Samples		75 $\mu$ L
	サンプル・プール血清を 25 $\mu$ L ずつ分注		
	* Blank チューブにはプール血清を分注する		
	標識GH を 10,000 cpm/ 100 $\mu$ L/ チューブにて分注		
一次抗体	一次抗体をアッセイバッファで 3000倍に希釈し、B <sub>0</sub> 、Stds、Samplesチューブに 100 $\mu$ L ずつ分注		
	十分に攪拌し、室温、O/N 静置		
二次抗体	二次抗体を 80倍に、正常家兔血清を 2000倍に 2nd バッファを用いて希釈し、Total Countチューブ以外に 200 $\mu$ L ずつ分注		
	十分に攪拌し、室温、O/N 静置		
カウント	30% PEG 溶液を Total Count チューブ以外に 100 $\mu$ L ずつ分注		
	4°C, 3,000 rpm, 30 min 遠心分離し、上清を吸引除去		
	ペレットを $\gamma$ -カウンタにて放射能計測		

Table 2-1-5. GH 標識・RIA に用いた溶液の組成および試薬の購入元

0.5 M PB		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	72.6 g	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7.4 g	
Total	500 mL	
1% BSA-PB		
BSA	1 %	(Sigma)
PB	0.05 M	
<sup>125</sup> I-Na		
	NEZ033A	(Perkin Elmer)
メタ重亜硫酸Na		
Chrolamin T		
		(東京化成)
アッセイバッファ		
PB	0.01 M	
NaCl	0.9 %	(Nacalai)
チメロザール	0.01 %	(Sigma)
BSA	2 %	(Sigma)
2 <sup>nd</sup> バッファ		
PB	0.01 M	
EDTA (pH 8.0)	0.05 M	
NaCl	0.9 %	(Nacalai)
チメロザール	0.01 %	(Sigma)
BSA	2 %	(Sigma)
30% PEG 溶液		
Polyethyleneglycol 6000	30 % (w/v)	
PB	0.01 M	

\*表記のない試薬はすべてWakoより購入

Table 2-1-6. CS RIA の手順

準備	ガラスチューブに番号を打ち、サンプルと照合		
抽出	血清サンプル 5 $\mu$ L を 1 mL のエタノールに溶解し、15 sec 以上強く vortex		
	2500 x g, 4°C, 15 min の遠心分離を行い、上清を 400 $\mu$ L ずつ 2 本のチューブへ分注		
分注	スタンダード溶液を分注		
	Std. 1	25 pg	2.5 $\mu$ L
	Std. 2	100 pg	10 $\mu$ L
	Std. 3	400 pg	40 $\mu$ L
	Std. 4	1600 pg	160 $\mu$ L
	エバポレータを用いて溶媒を揮発させ、チューブ内壁にステロイド類を固着		
	アッセイバッファを分注し、ステロイドを溶解		
	Total Count		800 $\mu$ L
	Nonspecific Bind		600 $\mu$ L
	B0, Stds, Samples		500 $\mu$ L
	標識 Corticosterone を 10,000 cpm/ 100 $\mu$ L/ チューブにて分注		
一次抗体	一次抗体をアッセイバッファで 3000倍に希釈し、B0、Stds、Samplesチューブに 100 $\mu$ L ずつ分注		
	十分に攪拌し、4°C、2 hr 静置		
チャコール吸着	氷上にてチャコール溶液 200 $\mu$ L を添加し、十分に攪拌して 4°C、正確に 10 min 静置		
シンチレーション	4°C, 3,000 rpm, 15 min 遠心分離し、上清を 3 mL シンチレータの入った測定チューブにデカント		
	十分に攪拌し、O/N 静置		
カウント	液体シンチレーションカウンタにて計測		

Table 2-1-7. CS RIA に用いた溶液の組成および試薬の購入元

アッセイバッファ

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	21.84 g	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.1 g	
NaCl	9 g	(Nacalai)
Gelatin	1 g	
$\text{NaN}_3$	1 g	
Total	1 L	

\* 加熱溶解を要する

スタンダード原液

Corticosterone	1 mg
Methanol	100 mL

標識 Corticosterone

(Perkin Elmer)

チャコール溶液

Charcoal	625 mg	
Dextran T 70	62.5 mg	(Pharmacia)
アッセイバッファ	100 mg	

液体シンチレータ

Omnifluor	12 g	(Perkin Elmer)
Toluene	3 L	

\* 表記のない試薬はすべてWakoより購入

Table 2-1-8. スライドガラスの APS コート手順

洗浄	Non-coatedスライドガラス (松浪ガラス) を超音波洗浄
	乾燥させた後、乾熱滅菌 (180°C, 5 hr) にてRnaseを非動化
	コート液に 10 min 浸漬
	アセトンにて 20 sec 震盪洗浄
	DEPC-H <sub>2</sub> Oにて 20 sec 震盪洗浄 (2回)
	100%エタノールにて 10 min 洗浄
	落下塵がかからないように乾燥 (65°C, 2 hr)

Table 2-1-9. APS コートに用いた溶液組成および試薬の購入元

コート液		
3-aminopropyltriethoxysilane	1 mL	(信越シリコーン)
Acetone	200 mL	

\* 表記のない試薬はすべてWakoより購入

Table 2-1-10. Total RNA 抽出の手順

ホモジナイズ	<p>1:10-20 (w/v) の TRIzol を試料に加え、丸底チューブ中で細断</p> <p>氷上で 10-20 min 静置し、試料を TRIzol に馴化</p> <p>シェイクマスター (bms) にて 11,000 rpm, 3 min 震盪破碎</p> <p>室温で 10 min 静置</p>
抽出	<p>1.0 mL ずつ分注、2:10 (v/v) のクロロホルムを添加</p> <p>vortex 後、室温で 5 min 静置</p> <p>15,000 x g, 室温, 10 min で遠心分離し、水層を新しいチューブへ分注</p>
雑物除去	<p>等量のクロロホルム/フェノール (1:1 v/v) を加え、vortex</p> <p>15,000 x g, 室温, 10 min で遠心分離し、水層を新しいチューブへ分注</p> <p>等量のクロロホルム/フェノール (1:1 v/v) を加え、vortex</p> <p>15,000 x g, 室温, 10 min で遠心分離し、水層を新しいチューブへ分注</p>
フェノール除去	<p>等量のクロロホルムを加え、vortex</p> <p>15,000 x g, 4°C-室温, 10 min で遠心分離し、水層を新しいチューブへ分注</p> <p>等量のクロロホルムを加え、vortex</p> <p>15,000 x g, 4°C-室温, 10 min で遠心分離し、水層を新しいチューブへ分注</p>
Total RNA 沈殿	<p>等量のイソプロパノールを加え、転倒混和</p> <p>15,000 x g, 4°C, 15-20 min で遠心分離し、上清を除去</p> <p>*途中で重力のかかる方向を逆にし、ペレットをチューブ底へ集める</p> <p>*ピペットなどを用いて慎重に上清を除く</p>
イソプロパノール 除去	<p>500 <math>\mu</math>L の 70-80%エタノールを添加し、浸透</p>

Table 2-1-10. (2) Total RNA 抽出の手順 (続き)

	15,000 x g, 4°C, 5 min で遠心分離し、上清を除去
精製	室温で 5-10 min 乾燥させ、ペレットをDEPC-H <sub>2</sub> Oで溶解
	1:2.5 (v/v) の100%エタノールを添加
	15,000 x g, 4°C, 15 min で遠心分離し、上清を除去
	室温で 5-10 min 乾燥させ、ペレットをDEPC-H <sub>2</sub> Oで溶解

Table 2-1-11. cDNA 作製の手順

加熱変性	混合溶液を作製 (Superscript 2 RT kit, Invitrogen)
	RNA sample 5 $\mu$ L (1-2 $\mu$ g)
	Oligo dT primer 1 $\mu$ L
	65°C, 10 min 変性
	終了後すぐ氷上に静置
逆転写反応	混合溶液を氷上にて調製、14 $\mu$ L ずつ添加
	5 x RT Buffer 4 $\mu$ L
	dNTP (2 mM) 5 $\mu$ L (RNase free)
	DTT 2 $\mu$ L
	Rnase inhibitor 2 $\mu$ L
	Superscript 2 1 $\mu$ L
	42°C, 60 min 加熱
	94°C, 5 min 加熱
	終了後すぐ氷上に静置

Table 2-1-12. PCR 反応の手順

PCR	混合溶液の作製 (Ex Taq polymerase system, Takara)	
	cDNA sample	< 1 $\mu$ g
	Primer (Forward)	1 $\mu$ L
	Primer (Reverse)	1 $\mu$ L
	10 x Buffer	5 $\mu$ L
	dNTP (25 mM)	4 $\mu$ L
	Ex Taq	0.25 $\mu$ L
	Total	50 $\mu$ L

\* primer の組み合わせは別表を参照

## 増幅反応

94°C	10 min	35 cycles
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	60 sec	
72°C	10 min	

終了後すぐに氷冷

Table 2-1-13. PCR 反応に用いた primer の配列およびアニーリング温度

NCBI Accession No.		Reverse	Tm	Size
NPY	NM_012614.1	Forward	caagctcattcctcgag	65.1°C
		Reverse	gaatgcatgatactttattt	50.8°C



Table 2-1-14. サブクローニングの手順

ライゲーション	混合溶液の作製 (pGEM-T vector system, Promega)									
	<table> <tr> <td>cDNA sample</td><td>&lt;3 <math>\mu\text{L}</math> (3-8 x M/ vector)</td></tr> <tr> <td>2 x Buffer</td><td>5 <math>\mu\text{L}</math></td></tr> <tr> <td>pGEM-T vector</td><td>1 <math>\mu\text{L}</math> (3 Kbp/ 50 ng/ <math>\mu\text{L}</math>)</td></tr> <tr> <td>T4 DNA Ligase</td><td>1 <math>\mu\text{L}</math></td></tr> <tr> <td>Total</td><td>10 <math>\mu\text{L}</math></td></tr> </table>	cDNA sample	<3 $\mu\text{L}$ (3-8 x M/ vector)	2 x Buffer	5 $\mu\text{L}$	pGEM-T vector	1 $\mu\text{L}$ (3 Kbp/ 50 ng/ $\mu\text{L}$ )	T4 DNA Ligase	1 $\mu\text{L}$	Total
cDNA sample	<3 $\mu\text{L}$ (3-8 x M/ vector)									
2 x Buffer	5 $\mu\text{L}$									
pGEM-T vector	1 $\mu\text{L}$ (3 Kbp/ 50 ng/ $\mu\text{L}$ )									
T4 DNA Ligase	1 $\mu\text{L}$									
Total	10 $\mu\text{L}$									
	4°C、O/N 反応									
形質転換	S.O.C. Medium、selection plates を 37°Cに保温 competent cell を氷上で融解									
	反応溶液の作製 <table> <tr> <td>Ligation 反応液</td><td>2 <math>\mu\text{L}</math></td></tr> <tr> <td>JM 109 competent cell</td><td>50 <math>\mu\text{L}</math></td></tr> </table>	Ligation 反応液	2 $\mu\text{L}$	JM 109 competent cell	50 $\mu\text{L}$					
Ligation 反応液	2 $\mu\text{L}$									
JM 109 competent cell	50 $\mu\text{L}$									
	氷上で 20 min 反応									
	42°C, 50 sec 加熱									
	終了後すぐに氷上に置き、2 min 静置									
	950 $\mu\text{L}$ の S.O.C. medium を添加し、37°C, 90 min 震盪培養									
	50-100 $\mu\text{L}$ ずつ selection plate に播種									
	37°C, O/N 培養									
インサート確認	青/白コロニーのうち白いコロニーをチップで拾い、2 mL の LB/Amp. に播種									
	37°C, 8 hr 震盪培養									
	1 mL の培養液を用いて Alkali-SDS prep を行い、プラスミド抽出 10,000 x g, 1 min 遠心分離を行い、菌体を回収する Sol 1 を 100 $\mu\text{L}$ , Lysozyme を 1 $\mu\text{L}$ 添加し、再けん濁して氷上で 15 min 静置する Sol 2 を 200 $\mu\text{L}$ 添加し、vortex の後室温で 5 min 静置する Sol 3 を 150 $\mu\text{L}$ 添加し、転倒混和の後氷上で 10 min 静置する									

Table 2-1-14. (2) サブクローニングの手順 (続き)

---

15,000 x g, 15 min 遠心分離を行い、上清 400  $\mu$ L を別チューブへ移す  
 PCI 溶液を 400  $\mu$ L 添加し、強く vortex する  
 15,000 x g, 15 min 遠心分離を行い、上清 400  $\mu$ L を別チューブへ移す  
 イソプロパノールを 400  $\mu$ L 添加する  
 15,000 x g, 30 min 遠心分離を行い、上清を取り除く  
 70% エタノールを 400  $\mu$ L 添加し、ペレットを洗浄する  
 上清を除去し、ペレットを乾燥させた後に H<sub>2</sub>O にて再けん濁する

制限酵素反応、配列決定によって挿入配列を確認

ストック作製      培養液に 15% になるよう Glycerol を加え、-80°Cで保存

Table 2-1-15. *in vitro* transcription の手順

大腸菌培養	10 mL の LB/Amp. にストックの大腸菌を 1 掻き添加し、37°C, 60 min 震盪培養												
	90 mL の LB/Amp. に培養液を加え、37°C, ON 震盪培養												
プラスミド抽出	プラスミド抽出 (JET STAR Midi kit, GENOMED)												
制限酵素消化	<p>反応溶液の作製 (制限酵素システム、Takara)</p> <table> <tr> <td>plasmid DNA</td><td>&lt;5 µg</td></tr> <tr> <td>10 x Buffer</td><td>10 µL</td></tr> <tr> <td>制限酵素</td><td>3 µL</td></tr> <tr> <td>Total</td><td>100 µL</td></tr> </table> <p>*制限酵素ならびに Buffer の組み合わせは probe によらず同一</p> <table> <tr> <td>T7 promoter (AS 鎖)</td><td>Spe I, Buffer M</td></tr> <tr> <td>SP6 promoter (S 鎖)</td><td>Apa I, Buffer L</td></tr> </table> <p>37°C, O/N で反応</p> <p>60°C, 10 min で加熱して反応を停止</p>	plasmid DNA	<5 µg	10 x Buffer	10 µL	制限酵素	3 µL	Total	100 µL	T7 promoter (AS 鎖)	Spe I, Buffer M	SP6 promoter (S 鎖)	Apa I, Buffer L
plasmid DNA	<5 µg												
10 x Buffer	10 µL												
制限酵素	3 µL												
Total	100 µL												
T7 promoter (AS 鎖)	Spe I, Buffer M												
SP6 promoter (S 鎖)	Apa I, Buffer L												
逆転写	<p>反応溶液の作製 (MAXI script kit, Ambion)</p> <table> <tr> <td>plasmid DNA</td><td>3 µg</td></tr> <tr> <td>10 x Buffer</td><td>20 µL</td></tr> <tr> <td>NTPs</td><td>各500 µM</td></tr> <tr> <td>Enzyme Mix</td><td>2 µL</td></tr> <tr> <td>Total</td><td>200 µL</td></tr> </table> <p>*Labeled UTP はRocheから購入、Label/Unlabel=2/1</p> <p>37°C, 2 hr 反応</p>	plasmid DNA	3 µg	10 x Buffer	20 µL	NTPs	各500 µM	Enzyme Mix	2 µL	Total	200 µL		
plasmid DNA	3 µg												
10 x Buffer	20 µL												
NTPs	各500 µM												
Enzyme Mix	2 µL												
Total	200 µL												
鋳型鎖分解	DNase を 2 µL 加え、37°C, 10 min 反応												
遊離NTP 除去	tRNA を 5 µL 添加												
精製	<p>5 M LiCl 20 µL と 100% エタノール 500 µL を加え、-20°C, 2 hr 沈殿形成</p> <p>15,000 x g, 4°C, 5 min 遠心分離</p>												

Table 2-1-15. (2) *in vitro* transcription の手順 (続き)

---

上清を除去し、70% エタノール 500  $\mu$ L を添加してペレットを洗浄

上清を除去し、風乾

DEPC-H<sub>2</sub>O で溶解し、-80°Cにて保存

Table 2-1-16. RNA probe 作製に用いた溶液の組成および試薬の購入元

TRIzol		(Invitrogen)
Chloroform		
Isopropanol		
Glucose stock		
Glucose	1 M	
* 溶解後フィルター滅菌し、凍結保存		
S.O.C. medium		
Bacto Tryptone	20 g	(BD)
Yeast Extract	5 g	(BD)
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
MgSO <sub>4</sub>	10 mM	
NaCl	0.5 g	(Nacalai)
Total	1 L	
* オートクレーブ後、室温に冷却		
Glucose stock	20 mL	
Ampicillin stock		
Ampicillin	1 mg	
Total	1 mL	
* 溶解後フィルター滅菌し、凍結保存		
Selection plate		
Bacto Tryptone	1 g	(BD)
Yeast Extract	0.5 g	(BD)
NaCl	1 g	(Nacalai)
Bactoagar	1.5 g	(BD)
Total	100 mL	
* オートクレーブ後、55°C以下に冷ます		
X-Gal (20 mg/mL)	200 $\mu$ L	
IPTG (20%)	200 $\mu$ L	
Ampicillin stock	100 $\mu$ L	
* 15 cm ディッシュに気泡が入らないよう注ぎ、室温で凝固させる		
* X-Gal; 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside		
* IPTG; isopropylthio- $\beta$ -D galactoside		

Table 2-1-16. (2) RNA probe 作製に用いた溶液の組成および試薬の購入元 (続き)

## LB/Amp.

Bacto Tryptone	1 g	(BD)
Yeast Extract	0.5 g	(BD)
NaCl	1 g	(Nacalai)
Total	100 mL	
* オートクレーブ後、55°C以下に冷ます		
Ampicilin stock	100 $\mu$ L	

## Lysozyme

Lysozyme	10 mg	
Total	1 mL	

## Alkali-SDS Sol 1

Glucose	9 g	
Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM	
EDTA (pH 8.0)	10 mM	
Total	1 L	
* オートクレーブにかける		

## Alkali-SDS Sol 2

NaOH	0.2 N	
Sodium Lauryl Sulfate (SDS)	1 %	(Nacalai)

## Alkali-SDS Sol 3

Potassium acetate	294.5 g	
acetic acid	120 mL	
milli Q	530 mL	
* オートクレーブにかける		

## PCI溶液

TE-saturated Phenol	25 mL	(ニッポンジーン)
Chloroform	24 mL	
Isoamyl alcohol	1 mL	

## tRNA溶液

tRNA	10 mg	(Roche)
Total	1 mL	

\* 表記のない試薬はすべてWakoより購入

Table 2-1-17. *in situ* hybridization の手順 (hybridization 部分)

---

馴化	DEPC-PBS に 5 min 浸漬 (2回)
細胞膜穿孔	0.75% Glycin/ DEPC-PBS に 5 min 浸漬する (2回)
	0.3% Tween/ DEPC-PBS に 15 min 浸漬する (2回)
	DEPC-PBS で 5 min 洗浄 (2回)
	5 mg/mL ProK/ PKバッファにて 37°C, 15 min 浸漬処理
後固定	4% PFA/ PBS に 5 min 浸漬
	DEPC-PBS で 5 min 洗浄 (2回)
アセチル化	0.25% (v/v) 無水酢酸/ アセチレーションバッファに 5 min 浸漬 (2回)
プレハイブリダイズ	ハイブリダイゼーションバッファストックに 37°C, 15 min 浸漬処理
ハイブリダイズ	0.5 mg/mL 変性サケDNA, <0.5 mg/mL RNA プローブを加えたハイブリダイゼーションバッファを 95°C, 5 min で変性 *変性後すぐに氷上で 5 min 静置し、37°Cで馴染ませる
	ハイブリダイゼーション溶液に浸漬し、パラフィルムをかけて 45°C, O/N 反応
	2 x SSC/ 50% Formamide を用い、52°C, 15 min にて洗浄 (2回)
	1 x SSC を用い、52°C, 15 min にて洗浄 (2回)
RNA プローブ分解	20 µg/mL Rnase A/ NTEバッファにて 37°C, 30 min 浸漬処理
	1 x SSC を用い、37°C, 30 min にて洗浄 (2回)
	PBS で 10 min 洗浄 (2回)

Table 2-1-17. (2) *in situ* hybridization の手順 (免疫組織化学部分)

---

ブロッキング	ブロッキング溶液に 1 hr 浸漬
一次抗体反応	一次抗体液中で 4°C、O/N反応 *一次抗体の希釈には PBST を用いる  PBS にて 10 min 洗浄 (3回)
二次抗体反応	二次抗体液中で 2 hr 反応 *二次抗体の希釈には PBST を用いる  PBS にて 10 min 洗浄 (3回)
封入・観察	Gel mount にて封入、蛍光顕微鏡で観察



Table 2-1-18. *in situ* hybridization に用いた溶液の組成および試薬の購入元

0.75% Glycine/ DEPC-PBS			
Glycine	750 mg		
DEPC-PBS	100 mL		
0.3% Tween/ DEPC-PBS			
Tween 20	300 $\mu$ L	(MP Biomedicals)	
DEPC-PBS	100 mL		
PKバッファ			
Tris-HCl (pH 8.0)	0.1 M		
EDTA (pH 8.0)	50 mM		
ProK stock			
Proteinase K	1 g		
Total	100 mL		
アセチレーションバッファ			
Triethanolamine	2.26 mL		
HCl	0.3 mL		
DEPC-H <sub>2</sub> O	167 mL		
100 x デンハルトバッファ			
Ficoll	2 %	(Sigma)	
polyvinylpyrrolidone	2 %	(Sigma)	
BSA	200 mg/mL	(Sigma)	
20 x SSC			
NaCl	1753 g	(Nacalai)	
Sodium Citrate Dihydrate	882 g		
Total	10 L		
変性サケDNA 溶液			
Salmon Sperm DNA powder	10 mg		
Total	1 mL		
* 激しく vortex し、1 min 以上超音波破碎			

Table 2-1-18. (2) *in situ* hybridization に用いた溶液の組成および試薬の購入元 (続き)

ハイブリダイゼーションバッファストック

SSC	5 x	
Formamide	50 %	
デンハルトバッファ	5 x	
Sodium Lauryl Sulfate (SDS)	0.1 %	(Nacalai)
N-Lauroyl Sulcosinate (NLS)	0.1 %	
Total	47.5 mL	

NTEバッファ

NaCl	500 mM	(Nacalai)
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM	
EDTA (pH 8.0)	1 mM	

RNase stock

RNase A	1 mg	(Roche)
Total	1 mL	

\* 80°C, 30 min の加熱で DNase free にする

\* 以下は免疫組織化学部分に用いた試薬の組成・購入元

ブロッカー原液

ブロッカー <sup>TM</sup> 粉末	4 g	(雪印乳業)
	10 mL	

ブロッキング溶液

ブロッカー原液	100 µL
PBS	900 µL

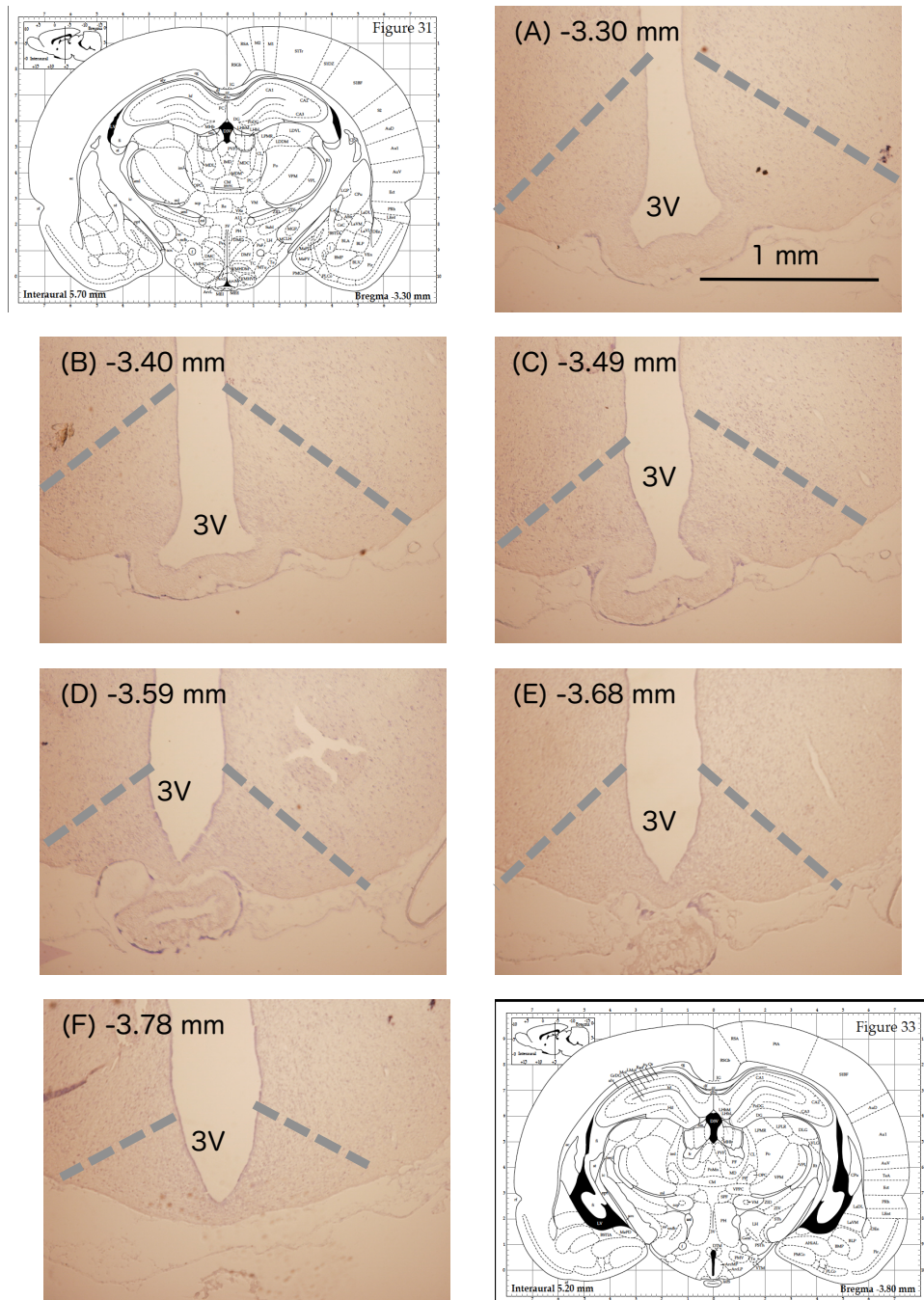
PBST

Triton X-100	30 µL	(Sigma)
PBS	100 mL	

マウント液

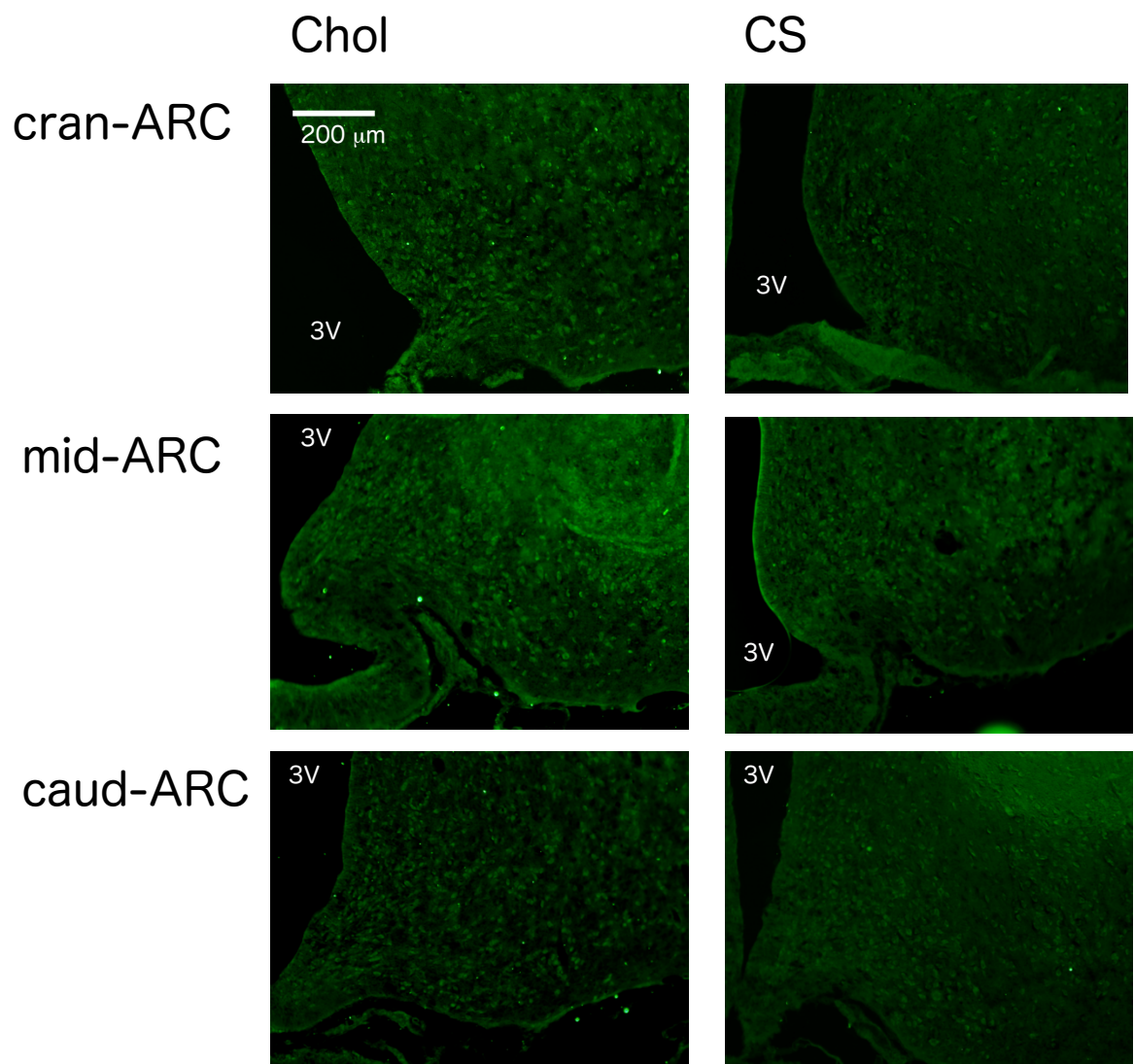
Gel mount	適量	(Biomed)
-----------	----	----------

\* 表記のない試薬はすべてWAKOより購入



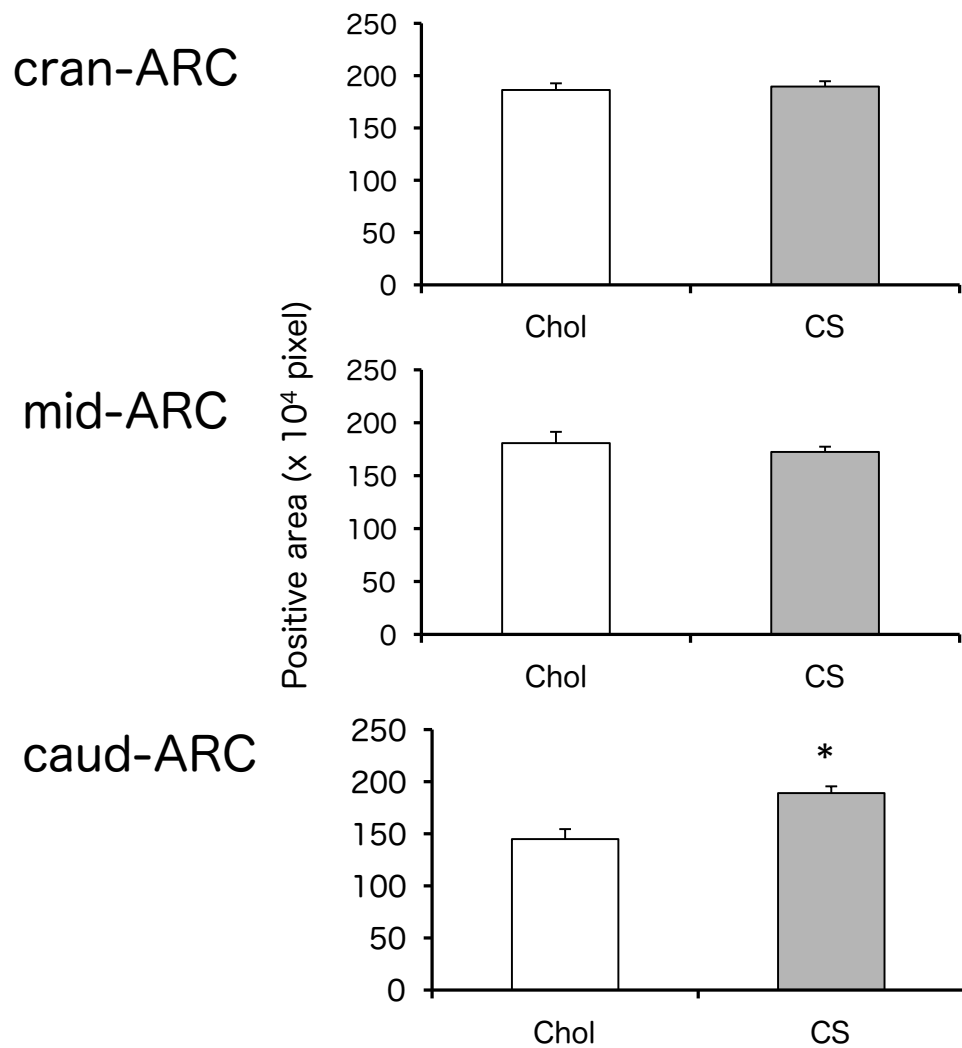
## Figure 2-1-4. ARC の領域分類

Nissl 染色による視床下部腹側部の組織像。左上数字はブレグマからの距離。3V は第三脳室を表し、点線よりも3V側がARCに相当する。切片の形態によって、Aを吻側、B、Cを中央、D、Eを尾側と分類した。



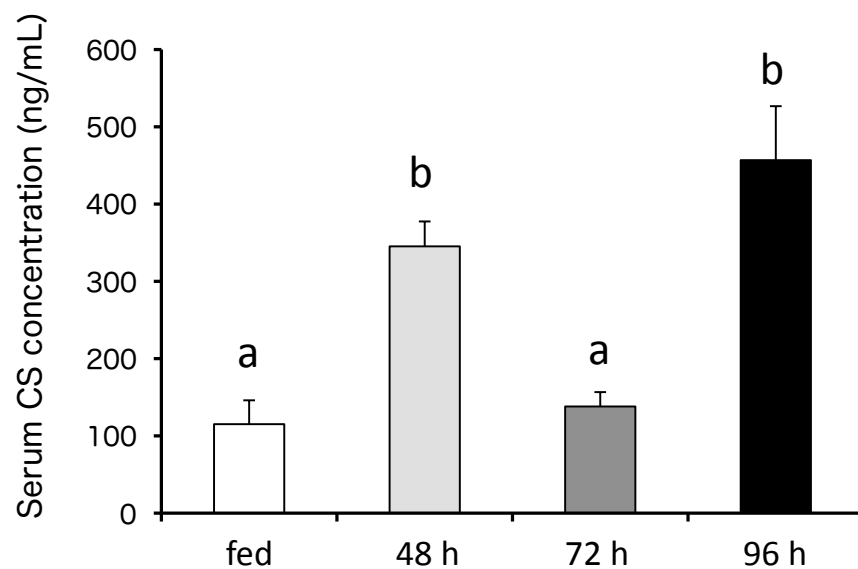
### Figure 2-1-5. CS 投与時のARCにおける NPY mRNA 発現

CS ペレット留置時の NPY に対する *in situ* hybridization 像。Chol 、CS はそれぞれ留置したペレットの組成。3V は第三脳室を表す。



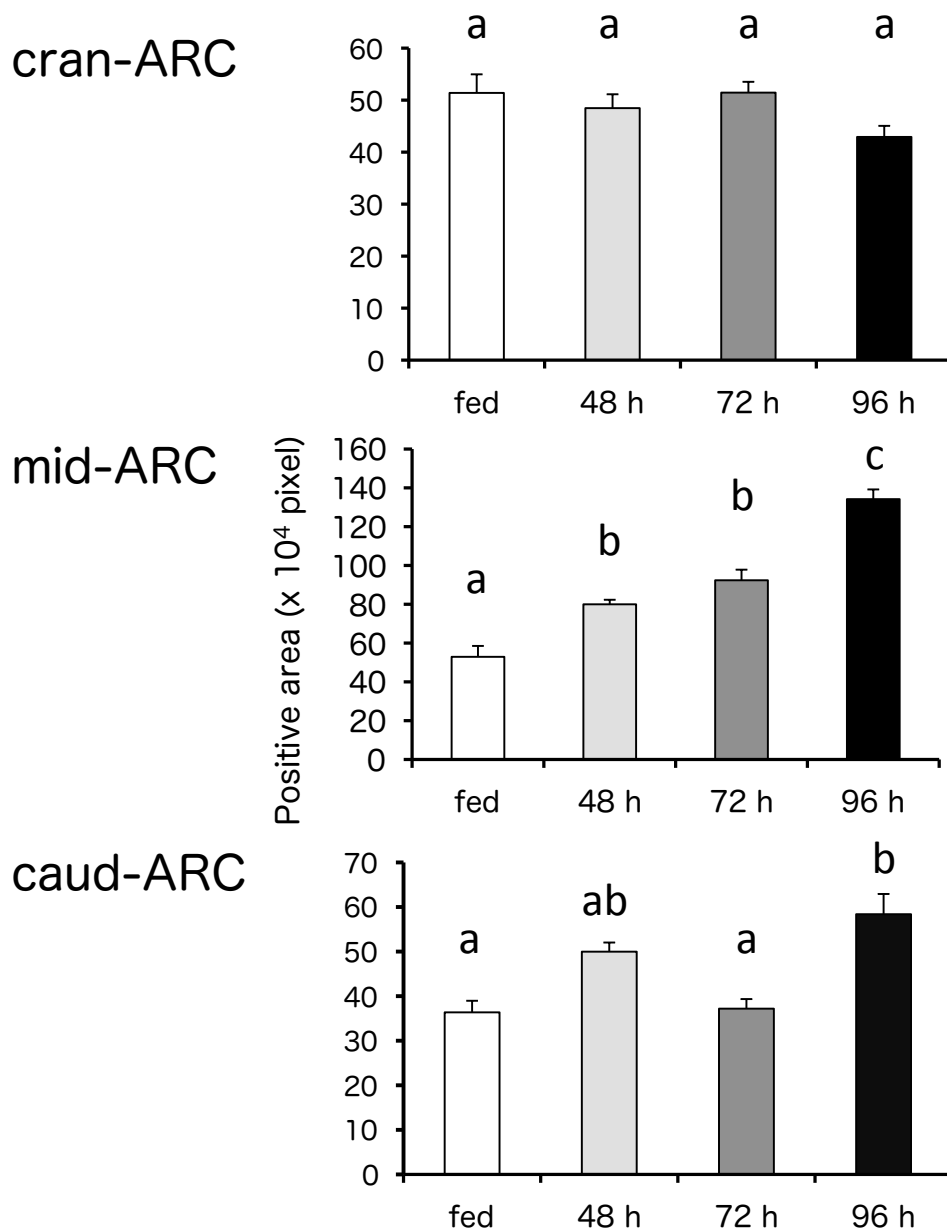
**Figure 2-1-6. CS 投与時のARCにおける NPY mRNA 陽性面積**

CS ペレット留置時の NPY mRNA 陽性面積を数値化したもの。平均値+標準誤差で表示し、縦軸は陽性面積である。n=3、 $P<0.005$  vs Chol、unpaired *t*-test。



**Figure 2-1-7. 絶食負荷時 CS 濃度**

縦軸は CS 濃度を示す。カラムはそれぞれ平均値+標準誤差で表した。fed は摂食群、他の数字は絶食負荷時間を示す。同一のアルファベット間に有意差はない。n=3、P<0.05。One-way ANOVA の後 Tukey HSD test を行った。



**Figure 2-1-8. 絶食負荷時の ARC における NPY mRNA 発現**

絶食負荷群についての *in situ* hybridization を Fig. 2-1-5 と同様に行い、陽性面積を計測した。グラフの縦軸は陽性面積であり、平均値+標準誤差で表した。同一のアルファベット間に有意差はない。n=3、P<0.05。なお、caud-ARC については fed vs 48 h ; P=0.0501, 48 h vs 72 h ; P=0.0660 。One-way ANOVA の後、Tukey HSD test を行った。

## 第 2 節 性ステロイドによる GH 分泌動態変化と NPY

### 緒言

第 1 節では体内環境を形成するステロイドとして糖質コルチコイドに焦点を当て、GH の分泌動態の変化と NPY 発現の変化を比較することで CS の GH パルス抑制の作用点として NPY が存在する可能性を示した。GH はストレス刺激により容易にその分泌動態を変化させるが、糖質コルチコイドだけではなく他のホルモン環境によってもその分泌動態に変化が生じることが報告されている。中でも、内分泌的な性差として最も注目すべきものは性ステロイドであり、アンドロジェン、エストロジェンについて GH 分泌動態の変化が知られていることから第 2 節では性ステロイドに焦点を当てた。

### GH 分泌の性差

GH の分泌動態は多くの種で性差があり、雄では鋭いパルスを、雌では高い基底値とより小さな振幅のパルスを示すものが多い。特にラットにおいては雄が約 3 時間に 1 回の間歇的なパルス状分泌ときわめて低い基底値を特徴とするのに対し、雌では高い基底値に頻回の小パルスを持つ分泌動態を示す (Jansson *et al.*, 1985)。こうした分泌動態の性差は雌雄の体格差や代謝能力差などを形成していると考えられる。一方で、こうした GH の性差を生み出す要因は周生期の性ステロイド暴露による脳の性差と、成熟後に性腺から分泌される性ステロイドとに大別される。GH パルスの性差の大部分は性成熟後の性ステロイドの暴露によって決定されていると考えられている (Jansson *et al.*, 1985)。つまり、性腺除去したラットは遺伝子上の性に関わらず雄と雌の中間的な分泌動態をとる (Painson *et al.*, 1992; 2000)。すなわち、性腺除去雄では GH パルス振幅が低下し、同雌では性腺除去雄と同様の低い基底値と明瞭なパルスを刻むが、その規則性は雄よりも低いとされる。つまり、雄型の規則正しいパルスを刻むためには脳の雄性化が、パルス振幅を高くするためにはテストステロンが必要であるが、エストロジェンのない状況では雌においてもパルスを形成しうるのである。



## 脳の性差と GH

哺乳類の脳は発生段階の途中までは雌雄差がないと言われているが、雄では性腺で合成されるアンドロジェンが脳へ作用することで雄型の脳が形成される (Korenbrot *et al.*, 1975; Ehrhardt and Meyer-Bahlburg, 1979)。この臨界期がいつであるのかは動物種の出生時発生段階によって変動する。げっ歯類の場合、生後 1-3 日目とされており、この時期に外因性にアンドロジェンを投与することで雌個体に雄型の脳を誘導することができる (Tarttelin *et al.*, 1976; Yamaji *et al.*, 1992)。雄型の脳を持つ雌個体は雌型性行動を取らず、また不安傾向などの精神系パラメータも雄型となる (de Jonge *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1992)。こうした違いは、脳の性分化の段階で特定の神経細胞の数や分布に性差が生じることに起因し、雌雄で形状や密度の異なる神経核を性的二型核と称している。GH 分泌制御に関わるとされる因子群も性的二型を示し、GHRH mRNA の転写は雄の方が雌よりも 2-3 倍多く (Maiter *et al.*, 1991)、細胞数自体も雄の方が多い (Chowen *et al.*, 1993)。この差は去勢、避妊を行っても消失しないことが示唆されている (De Gennaro Colonna *et al.*, 1989)。さらに、下垂体ソマトトロフにおいても雄では雌の 6 倍近い GHRH 受容体の mRNA が存在し (Miki *et al.*, 1996)、GHRH への反応性を高めている。SRIF については PeVN での細胞数に雌雄差があり (Van Vugt *et al.*, 2008)、臨界期アンドロジェンシャワーによって mRNA 転写が促進されるとの報告がなされており (Simonian *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 1999)、成熟後の性ステロイドによってさらに差が広がる方向への変化を受ける。

## 性ステロイドと GH

脳の性分化は不可逆的な変化であるが、一方の成熟後性ステロイド環境は可変的である。特に雌においては性周期に応じてエストロジェン濃度も変化するため、GH 分泌動態も性周期変動に伴って変化する。ヒトやヒツジでは GH の平均血中濃度が卵胞期に上昇することが報告されており (Faria *et al.*, 1992; Genazzani *et al.*, 1993)、またエストロジェンの投与はヒツジ、ウシなどで血中 GH 濃度を上昇させることがわかっている (Malven *et al.*, 1995; Silverman *et al.*, 1988)。この点に関してラットは特殊であり、平均濃度よりもパターンの変化が大きく見られる。すなわち、卵巣除去 (Ovariectomized: OVX) や精巣除去 (Cast) 処置を行ったラットにエストロジェンを投与すると、双方とも GH 分泌動態が持続型パターンとなる。このとき、GH 分泌制御因子にも変化が生じるはず

であり、なおかつこれは可逆的な変化であることが予想される。

第1節ではCSによってNPY mRNA発現に変化が誘導され、GH分泌動態の変化と対応させることができた。そこで本節では、脳の雄性化処置や成熟後のOVXによって性ステロイド環境を変化させたラットにおけるNPYの変化に着目し、GH分泌動態との対応を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 動物

新生仔ラットの処置には、動物繁殖研究所から購入した雌ラットを膣スメア観察による性周期判別の後に雄と同居させて妊娠、出産させたものを用いた。後述する雄性化処置時に雌雄判別を行い、母親 1 頭につき処置仔とコントロール仔を雌雄各 2 頭ずつ授乳させた。離乳は 3 週齢で行った。エストロジェン処置に用いた成熟雌ラットは動物繁殖研究所から 8 週齢で購入した。いずれのラットも飼育は第 1 節と同様の条件で行った。

### 新生仔ラットの雄性化処置

新生雌ラットは出生日を 0 日とした生後 1, 3 日において Testosterone propionate (Sigma) を 1 mg/50  $\mu$ L/head で皮下投与した。溶媒にはセサミオイルを用い、コントロール群には溶媒のみを投与した。個体識別を行い、体重測定を毎週行った。

### 成熟雌ラットのエストロジェン処置

8 週齢で購入した雌ラットはエーテル麻酔下で最後肋骨と臀端の中間点にあたる横腹部より卵巣を摘出した。1 週間の回復期間の後、後背部へステロイド粉末を充填した 1.5 cm 長のチューブ (シラスコン医療用チューブ; ID=1.57, OD=3.18; カネカメディックス) を埋め込み、サンプリングまでにはさらに 1 週間の回復およびステロイド馴化期間を設けた。発情前期のエストロジェン濃度を模した群 (High Estrogen: High E2 群) には  $\beta$ -エストラジオール (Estradiol: E2) : コレステロール (Chol) = 3 : 7 (w/w) の混合粉末を、発情休止期のエストロジェン濃度を模した群 (Low Estrogen: Low E2 群) には E2 : Chol = 1 : 9 (同) の混合粉末を充填に用いた。脳組織の採材は第 1 節と同様の方法を用いて行った。

### GH 経時採血と GH 濃度測定

第 1 節と同様の方法を用いて実験を行った。アッセイ内 CV はそれぞれ 11.13%、3.17% であり、アッセイ間 CV は 16.96% であった。

#### 組織学的解析 (*in situ* hybridization)

第 1 節と同様の方法を用いて解析を行った。

#### 統計

Unpaired-*t* 検定を用いて統計処理を行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### 性ステロイドおよび脳の雌雄差による GH パルスへの影響 (Figure 2-2-1., 2.)

低エストロジェン環境と雄型神経回路のいずれが雄型の GH パルスを形成するのかを確かめるため、OVX によってエストロジェンを除いた群 (OVX 群) と、周生期にテストステロン処置を施すことで脳の雄性化を誘起した群 (Testosterone propionate injected: TP 群) 成熟後のエストロジェンによる GH パルスへの影響を確認するため、OVX 群に高濃度エストロジェンチューブを留置した群において GH プロファイルと比較した。雌コントロール群においては高いピークのパルスは見られなかった。一方、OVX 群、TP 群のいずれにおいても低い基底値と高いパルスが認められ、雄型のプロファイルと類似していた。High E2 群では基底値が上昇し、パルスは不明瞭となった。また、TP 群は体成長曲線がコントロール群に比べて上方にシフトし、特に 10 週齢以降の傾きは雄型の成長曲線に近いものであった。卵巣重量は TP 群でコントロール群に比して低く、卵胞の発育は見られず萎縮した形態となっていた。したがって、TP 群、OVX 群で見られた雄型の GH プロファイルはエストロジェン濃度の低下によってもたらされたものであり、脳の雄性化の影響は成熟後のエストロジェンによるものよりも小さいことが明らかとなった。さらに、成熟後の高エストロジェン環境は GH 分泌動態において基底値の上昇を誘導することが示された。

### エストロジェンによる NPY mRNA 発現への影響 (Figure 2-2-3., 4.)

さらに、エストロジェン環境の変化が ARC の NPY 発現に及ぼす影響を *in situ* hybridization によって解析した。High E2 群と Low E2 群について ARC の NPY mRNA 陽性面積を計測したところ、caud-ARC では High E2 群で低下していた。一方で cran- および mid-ARC では陽性面積に変化は見られなかった。以上から、エストロジェンによって caud-ARC の NPY mRNA 発現が減弱することが示唆された。

## 考察

本節では、性ステロイドによる影響のもとで GH 分泌動態と NPY の関与を検討した。その結果、High E2 群では caud-ARC の NPY 発現が低下しており、また GH 分泌動態は基底値の上昇が認められた。

### 高濃度エストロジェン存在下での GH 分泌動態と NPY の関連性

下垂体ソマトトロフにおいてエストロジェン受容体は発現していない、ないし希少であるため (Zafer *et al.*, 1995)、エストロジェンによる GH 基底値上昇作用は下垂体に直接作用したものではないと考えられる。脳内ではエストロジェン受容体は広範囲に分布しており (Okamura *et al.*, 1994)、もちろん視床下部にも多く存在する。GHRH ニューロンはエストロジェン受容体を発現するが (Kamegai *et al.*, 2001)、PeVN の SRIF ニューロンにはこの発現が見られないことが報告されている (Murray *et al.*, 1999; Simonian *et al.*, 1998)。しかし、エストロジェン受容体を持たないはずの PeVN の SRIF ニューロンはエストロジェン反応性に放出能が上昇するとされており (Baldino *et al.*, 1988; Van Vugt *et al.*, 2008)、エストロジェンの SRIF ニューロンに対する効果は別の細胞を介するものであると考えられて来た。SRIF は GH 分泌動態において低い基底値を形成していると考えられてきたが (Plotsky and Vale, 1985)、SRIF 放出能上昇の報告と本実験における GH 分泌動態における変化とは合致しない。もちろん GH の分泌動態と SRIF の変化が全対応するとは限らず、それは GHRH と SRIF の二因子制御系の限界にもつながるのだが、他の影響因子としてまず考えられるのが NPY である。視床下部の NPY ニューロンはエストロジェンレセプターを発現することが知られており (Acosta-Martinez *et al.*, 2006)、前述のとおり GH 分泌制御への関与が疑われていることから、エストロジェンと SRIF を連絡する物質として最適である。本節で得られた結果は NPY と GH パルスの対応関係が SRIF のそれよりも直接的な関係であり、エストロジェンによる基底値の上昇は NPY mRNA 転写の低下によりもたらされると示唆するものである。

### 生殖と GH、NPY

エストロジェンによって GH パルスが抑制されて基底値が上昇することで、個体内のエネルギー代謝は蓄積の方向へと調節される。ラットにおいてエストロジ

エンの高い状態は排卵直前の発情期にあたり、この時期に特異的な行動変化として行動量の増加、摂食量や飲水量の低下が挙げられる (Tarttelin and Gorski, 1973)。摂食量、飲水量の低下は行動量の増加にともなう二次的な作用であると考えられている。雌ラットにとっては生殖時期を雄に知らしめてより多くの雄と交配することが、より優秀な遺伝子を持つ子孫を残すための変化となると考えられる。一方でラットは不完全性周期動物であり、完全性周期動物で存在する黄体期を欠く。妊娠の維持には通常のエネルギー消費を大幅に上回るエネルギーが必要とされるため、完全性周期動物では黄体期において蓄積型のエネルギー代謝が観察される。妊娠が成立しなくても黄体期が存在する動物では、発情期で消費したエネルギーをこの期間に補うことが可能であるが、ラットではこの期間が存在せずエネルギー補充が不可能であることから、発情期でも GH 分泌動態はエネルギー蓄積の方向へと変化し、行き過ぎた消費を阻止する役割を担っていると考えられる。完全性周期動物であるヤギ (シバヤギ) においては発情期に GH パルスが亢進することが報告されており (Yonezawa *et al.*, 2005)、今回観察されたラットでの結果と反することからもこの仮説の信憑性は高いと考えられる。

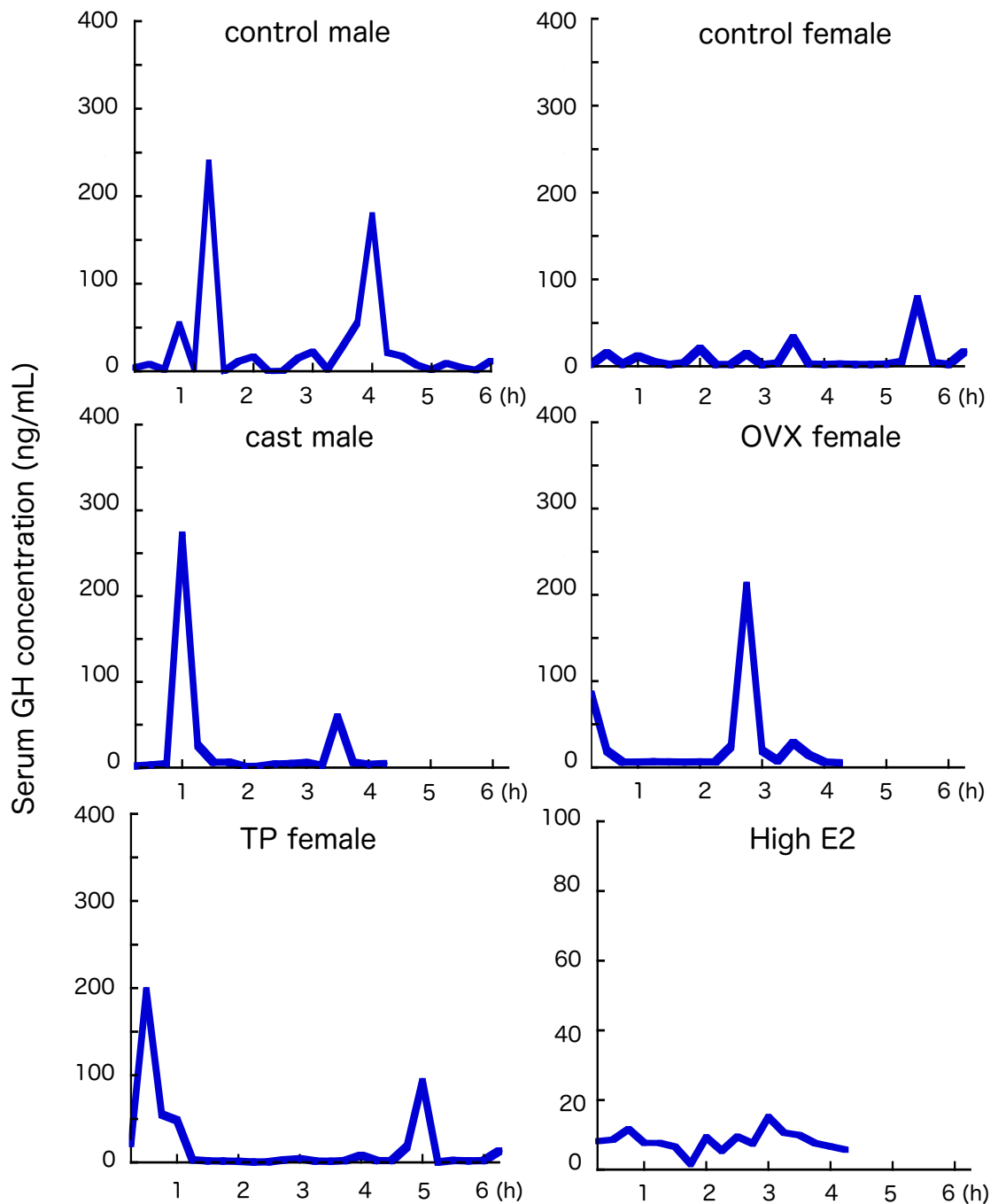
一方の NPY は、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin-releasing hormone: GnRH) を抑制する作用が知られている (Crown *et al.*, 2007; Klenke *et al.*, 2011)。発情期以外のエストロジェンは ARC のキスペプチンニューロンを通じて GnRH ニューロンへ負のフィードバックをかけることで性腺刺激ホルモンの分泌を調節しているが、発情期の高濃度エストロジェンは前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンを介して GnRH ニューロンを促進的に刺激して黄体形成ホルモンのサージを起こし、排卵誘起を可能にする (Smith *et al.*, 2006; Semaan and Kauffman, 2011)。エストロジェンは NPY 発現を低下させることで、GnRH ニューロンへの正のフィードバックの感度を自ら高くして排卵の精度を高めていると考えられる。

## 小括

以上、第2節では雌性ステロイドであるエストロジェンと NPY の関係を調べた。その結果、caud-ARC の NPY 産生細胞はエストロジェンによって発現が低下することがわかった。OVX ラットでは雄ラットと同様の GH パルスが生じる反面、エストロジェンを補充したラットでは基底値が上昇してパルスが不明瞭になっていたため、ラットにおける GH 分泌動態の性差はエストロジェンの影響で NPY 発現が低下し、GH の基底値を十分に低下させることができずにパルスが消

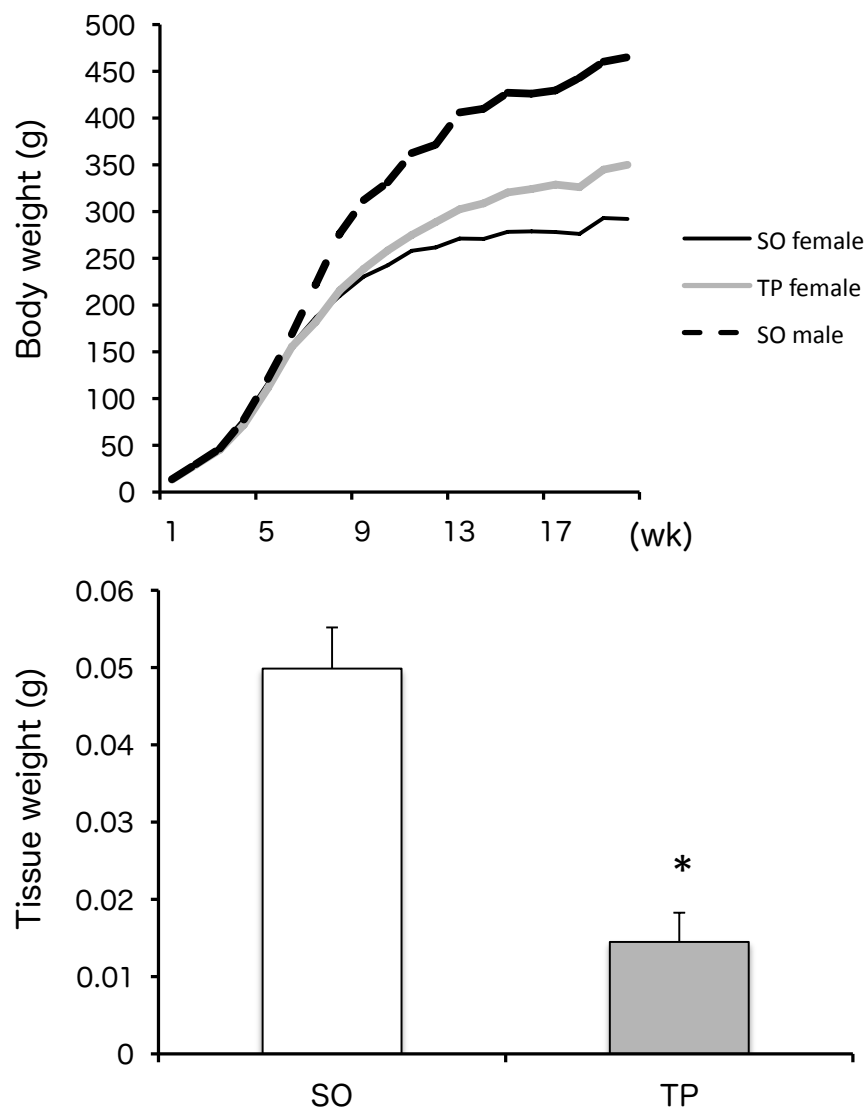
失するためであると考えられる。





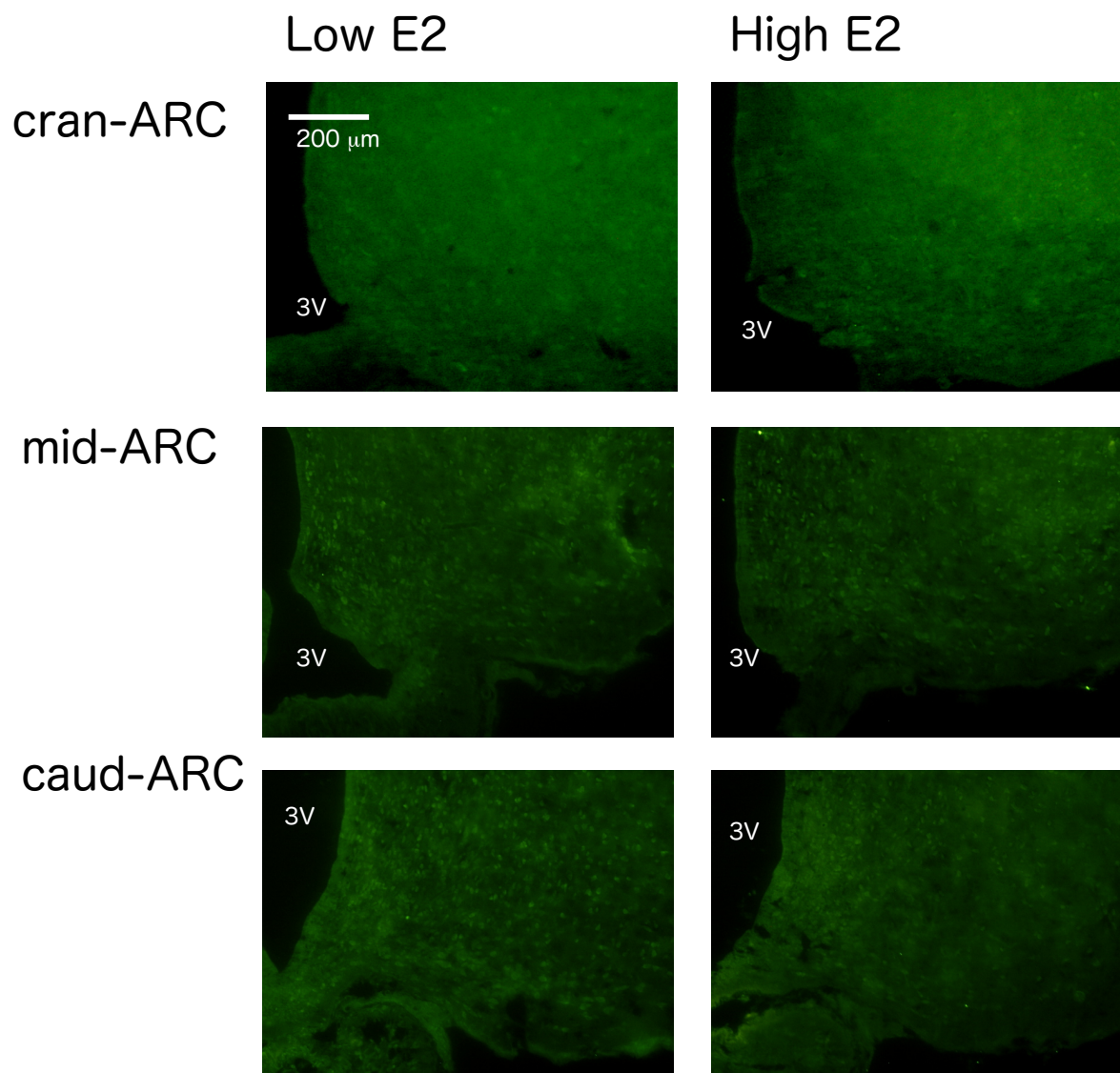
**Figure 2-2-1. 性ステロイド操作個体でのGH プロファイル**

各群の代表的な GH プロファイルを示す。縦軸は GH 濃度、横軸は時間を表す。High E2 群のみ縦軸の最高値を 100 ng/mL として示した。OVX: 卵巣除去、TP: 脳の雄性化。各群  $n > 4$ 、High E2 のみ  $n = 2$ 。



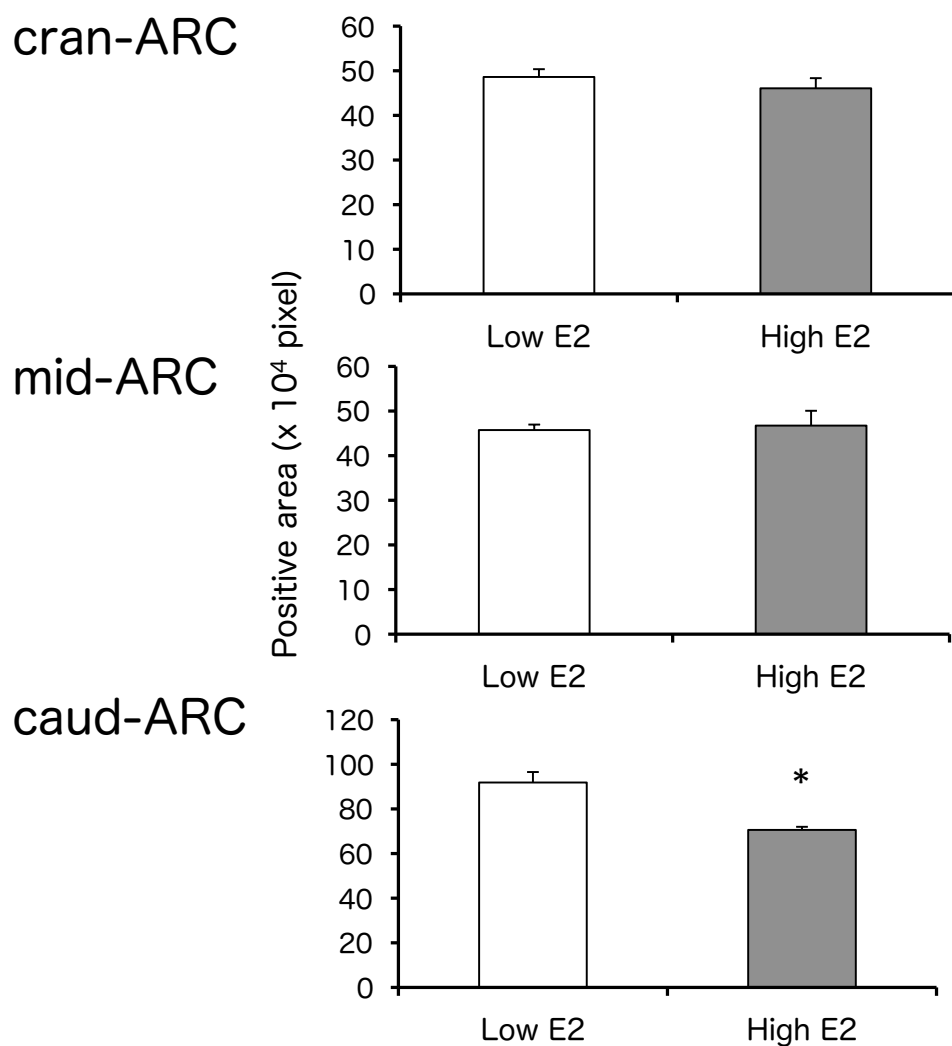
**Figure 2-2-2. 性ステロイド操作雌での体重および性腺重量**

上段は成長曲線、下段は卵巣重量。縦軸はともに重量 (g) であり、曲線は平均値、カラムグラフは平均値+標準誤差でそれぞれ示した。上段の横軸は生後週齢、下段の SO、TP はそれぞれ新生仔時のステロイド処置を表し、SOは対照群、TPは雄性化群。n=8、 $P<0.05$  vs SO、unpaired *t*-test。



### Figure 2-2-3. E2 投与時のARCにおける NPY mRNA 発現

E2 チューブ留置時の NPY に対する *in situ* hybridization 像。3Vは第三脳室を表す。Low E2 、 High E2 はそれぞれ留置したエストロゲンチューブ中のエストロゲン割合の高低を表す。



**Figure 2-2-4. E2 投与時のARCにおける NPY mRNA 陽性面積**

E2 チューブ留置時の NPY mRNA 陽性面積を数値化したもの。平均値+標準誤差で表示し、縦軸は陽性面積である。n=4、 $P<0.005$  vs Low E2、unpaired *t*-test。