

### 第3章 光刺激による GH 分泌抑制機構の解明

## 緒言

第2章では、ステロイドによる GH パルスの変動と NPY 発現の変化を対応させて比較することで、体内環境の変化をステロイド経由で NPY が受容し GH パルス動態を制御する可能性を示した。このときに作用をもつのは、caud-ARC の NPY ニューロン群に限定されることを示すことができたため、本章では光刺激による急性の GH パルス抑制モデルを用いて同細胞群の反応を明らかにすることを目的とした。

### 生物時計と光刺激

陸上で活動する生物にとって、光刺激は1日ずつの区切りを示す外界からの刺激である。生物の体内リズムは24時間に比べて若干のずれをもって回帰するため、光刺激によって1日ごとの体内時計の誤差を修正する機構が存在する (Cheung and McCormack, 1983; Hiroshige, 1984)。そもそも生物時計はフィードバックの結果生じる発振器であり、ここでの振動は正負それぞれの化学反応である。フィードバックは自らの分泌量を調節するという点において自触媒現象であり、単純な要素から複雑なパターンを生み出すことを可能とする反応系である。こうして生じた生物時計は概日リズムを刻み、生物の行動は概日時計に制御される。地球上に生きる生物にとって、光はもっともありふれたシグナルであり、生存を左右する因子である。したがって、刺激としての光は行動を制御する上で重要であり、進化経路の異なる多くの生物種で光刺激に対する反応性が観察できる (Ralph *et al.*, 1975; Weizenbaum, 1976; Page *et al.*, 1977; Woolum and Strumwasser, 1980)。哺乳類では視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) がマスタークロックであると考えられており (Ralph *et al.*, 1990)、網膜視床下部路を介して網膜の情報を受け取ることで概日リズムを外界のそれと同調させている (Mai and Junger, 1977; Sawaki, 1979; Sadun *et al.*, 1984)。哺乳類・鳥類・は虫類において SCN の破壊実験を行うと概日リズムそのものが消失する。一方で、目を完全に覆うことで光への同調性が失われ (Zweig *et al.*, 1966)、概日リズムはフリーランとなる (Johnson *et al.*, 1988)。SCN はマスタークロックとして全身臓器に内在する時計へ標準時刻を送信すると考えられているが、その際のシグナルは主に内分泌系である。様々な下垂体由来ホルモンがその役割を担うと予想されており、特に CS については知見も増えてきている (Atkinson *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006)。

## 光刺激による GH パルス抑制

GH パルスについてはラットで光刺激による中断が報告されており、このとき PeVN の SRIF 神経が興奮することが示唆されている (Davies *et al.*, 2004) 。また、GH パルスについての同様の現象はヤギ (シバヤギ) についても報告されており (米澤、2004 学位論文) 、さらにはアカシカなどの季節繁殖性動物において GH パルスに季節性変動が認められることも光刺激を受容、活用していることの証拠である (Webster *et al.*, 1996) 。しかし、それ以上の報告は現在のところ得られておらず、GH パルスにおける光中断のメカニズムや意義は不明なままである。また、光刺激は地上で生存する動物ならば毎日受けるものであり、ここで得られる GH パルス制御のメカニズムは通常時のパルス発生においても普遍的に働いている可能性が高い。したがって、本章で示す内容は第二章と同様に内因性の調節機構の一部を解明するものであると期待される。

## 神経興奮マーカー

古くから、中枢神経の研究において興奮神経の検出に用いられてきたマーカーとして c-Fos が挙げられる。c-Fos は fos ファミリーに属する癌原遺伝子であり、1987 年に疼痛応答性に脊髄後角に発現することが報告されて以来、転写制御因子であることが明らかにされ、今日まで利用されてきた。哺乳動物の細胞においては細胞外からの刺激によって fos およびその類似ファミリーである jun の一過性の誘導がもたらされる。Fos と Jun のヘテロダイマーは遺伝子の AP-1 領域に結合し、また、Fos のホモダイマーは TPA 応答配列に結合することで以降の転写制御を行っている。c-Fos の誘導には、血清や種々の成長因子による刺激ではプロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) 依存性に serum responsive element: SRE を介する系と PKC 非依存性に SRE を介する系、そしてアデニル酸シクラーゼ活性化を誘発する刺激では cAMP 応答性配列 (camp response element: CRE, TGACGTCA) を介する系とカルシウム濃度上昇による系が一般的に知られている。c-fos タンパク質の発現はニューロンの発火から約 30-60 分でピークに達するが、その後 2-3 時間は残存するため (Shiromani *et al.*, 1995; Herrera and Robertson, 1996; Herrera *et al.*, 1998) 、一般に行われる免疫組織化学での c-Fos 検出ではこれより短い間隔での興奮神経マーカーとしては用いることができない。

本研究では 2 時間以内の変化が予想されたため、興奮神経マーカーとして

Phosphorylated Camp Response Element Binding Protein: pCREB に着目した。CREB は SRIF 遺伝子に結合する 43 kDa のタンパク質として精製された転写調節タンパク質であり (Montminy *et al.*, 1986)、前出の c-Fos の誘導に関わる CRE に結合することから、c-Fos よりも 1 段階前の反応を検出することができる。cAMP 濃度の上昇にともなってプロテインキナーゼ A の触媒サブユニットが遊離して核内に移行し、CREB の第 133 番目のセリン残基がリン酸化される。リン酸化によって活性型となった CREB は CRE への結合能を獲得し、c-fos 以降の遺伝子発現を可能とする (Cell, 3<sup>rd</sup> edition)。その他、Extracellular Signal-regulated Kinase: ERK やカルシウムイオン濃度の上昇、Phosphoinositide 3-kinase: PI3K によって活性化される経路も報告されており、c-Fos と同様に広範な神経興奮刺激に対して検出が可能であると考えられる。リン酸化タンパク質の特性として、そのリン酸化と脱リン酸化はそれぞれ約 10 分以内の短いタイムコースで行われるため、短いタイムコースでの興奮神経マーカーとして近年の中枢神経科学研究で用いられるようになった。筆者の研究室での先行研究では、脳の電気刺激に応答する pCREB 陽性細胞数の計測を行ってその発現タイムコースを確認しており、電気刺激後 5-10 分でピークに達して以降は減少に転じ、40 分後ではほぼ完全に脱リン酸化することが示されている (倉本、2009 卒業論文)。ここでの電気刺激はニューロンの発火と見なすことができ、本実験で負荷する刺激からニューロン発火までのタイムラグを考えると、pCREB は刺激後 30 分程度の観察にも適しており、なおかつ 60 分後以降にその影響を残さないマーカーとして有用である。

本章では、速反応性興奮神経マーカーである pCREB と光刺激による急性の GH パルス抑制モデルを用いて caud-ARC における NPY 産生細胞の変化と GH 分泌動態を経時的に検討し、同ニューロンによる GH 分泌制御機構の詳細を時間的変化と空間的変化の両面から明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 動物

実験には Wistar Imamichi (動物繁殖研究所) 11~12 週齢の雄ラットを用いた。ラットの飼育については第 2 章と同様の条件下で行った。

### GH 経時採血と GH 濃度測定

第 2 章と同様の方法を用いて実験を行った。アッセイは全て 1 回で行い、アッセイ内 CV は 14.8%であった。

### 組織学的解析 (免疫組織化学・*in situ* hybridization)

*In situ* hybridization は第 2 章と同様の方法を用いて実験を行った。貼付け法による免疫組織化学では *in situ* hybridization に用いた切片の連続切片を用いて NPY および SRIF を検出した。浮遊法による pCREB 免疫組織化学では 30 $\mu$ m 厚で作製した切片を使用した。免疫組織化学の手順、溶液の組成、試薬の購入元は第 2 章で示したとおりであり (Table 2-1-17. (2), 18. (2))、抗体の条件は別に Table 3-1. に示した。画像解析についても第 2 章と同様の方法で行った。

### リアルタイム PCR 解析

ラットはエーテル導入後すぐに断頭し、脳組織を分離した。ブレインスライサーを用いて上述の脳地図において -2.80 ~ -3.80 mm (from bregma) の部位を冠状に切り出し、さらに濾紙上にて ARC 部分を分離したものを液体窒素中にて急速に凍結した。切り出し作業は全て氷上で行った。以降の Total RNA 抽出、逆転写反応については *in situ* hybridization で用いたプローブを作製する手順の一部と共通である (Table 2-1-10., 11., 16.)。リアルタイム PCR の手順およびプライマーについては Table 3-2., 3.に示した。ライトサイクラーおよび解析ソフトは Roche 社製のものを用了。

### 統計

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

### 明期開始による GH 分泌動態の変化 (Figure 3-1.)

光刺激による GH パルス中断を確認し、実験におけるサンプリングの時間帯を決定するため、飼育室の点灯前後の GH 分泌動態を計測した。明期開始後 90 分間程度 (1200-1330) GH パルスが形成されない時間帯が存在し、また 1330-1500 にかけては GH パルスが集中的に形成されていた。したがって、1100、1230、1400 の 3 点をそれぞれパルス形成期、パルス抑制期、パルス再現期として以下の実験のサンプリング時間とした。

### 光刺激応答性の pCREB 陽性細胞 (Figure 3-2.)

GH パルス抑制にともなう神経興奮を検出するため、興奮神経マーカーである pCREB の免疫組織化学を行った。pCREB は脳内の広範囲で見られたが、特に ARC の腹内側部後方において陽性細胞数に変化が見られたため、mid-ARC と caud-ARC の 2 領域について評価を行った。上方 3 段は染色像、最下段は陽性細胞数を計測したものである。mid-ARC では 3 点間で変化は見られなかったが、caud-ARC では 1230 において 1100、1400 に比べて陽性細胞が多く見られた。したがって、GH パルスが抑制される 1230 においては caud-ARC の細胞群が興奮し、GH 分泌抑制に関与していることが示唆された。

### 光刺激による SRIF ペプチドの部位特異的变化 (Figure 3-3.)

caud-ARC における SRIF 発現を比較するため、免疫組織化学を行った。ARC 全域について SRIF は線維状または顆粒状の染色像として確認され、その発現は光刺激に関わらず変化が見られなかった。ゆえに、caud-ARC の神経興奮と同部位の SRIF ニューロンの反応性においては関係性が薄いことが示唆された。

### 光刺激による NPY mRNA 発現の部位特異的变化 (Figure 3-4.)

caud-ARC における NPY 産生神経細胞を同定し、その変化を観察するために *in situ* hybridization を行った。左列は弱拡の組織像、中列は強拡の組織像であり、それぞれのサンプリング時間について陽性面積を数値化した。caud-ARC では 1230 において他の 2 点と比べて陽性面積が拡大しており、これは強拡像で

見られるように細胞内での mRNA 分布が増加したことに起因すると考えられる。以上より、1230 における caud-ARC の神経興奮は NPY 産生細胞で生じている可能性が高く、また NPY mRNA 合成が亢進されていることが示唆された。

#### 光刺激による NPY mRNA 発現の量的変化 (Figure 3-5.)

さらに、ARC における NPY mRNA の発現量を半定量するために ARC 組織抽出物についてリアルタイム PCR 解析を行った。ハウスキーピング遺伝子である HPRT 発現との比で評価したところ、NPY mRNA 発現量は組織解析の結果と同様に 1230 で増加していることが明らかになり、GH パルス抑制時に NPY mRNA 合成が亢進されるという前述の結果を支持するものとなった。

#### 光刺激による NPY 合成/分泌動態の変化 (Figure 3-6.)

NPY 神経分泌を確認するため、NPY ペプチドの免疫組織化学を行った。視床下部における NPY は線維状あるいは顆粒状を示す染色像として確認され、正中隆起 (Median Eminence: ME) と室周囲核 (Periventricular Nucleus: PeVN)、室傍核 (Paraventricular Nucleus: PVN) において観察された。陽性顆粒がバリコシーに観察された PeVN では 1230 で陽性面積が増加しており、同所に分布する SRIF 神経に沿って顆粒が存在するような像が得られた。



## 考察

本章では、光刺激による GH パルス中断モデルを用いて NPY による GH 分泌制御について検討を行った。光刺激による GH パルス中断において caud-ARC においては興奮神経数の増加が認められ、同時に NPY mRNA 発現が高まることが示された。したがって、caud-ARC の NPY ニューロンが光刺激により興奮したと考えられる。また、同時に PeVN における NPY タンパク質発現も上昇しており、PeVN への投射において NPY ニューロンからの輸送亢進が起こったことが示唆された。

### NPY ニューロンから SRIF ニューロンへの影響

ペプチド分泌性神経細胞においては、神経興奮とペプチド合成、ペプチド放出は必ずしも同意および同時ではないが、神経興奮に続いてペプチド放出が行われていると予測され、さらに放出刺激は二次的にペプチド合成を促進すると考えられている。したがって、PeVN の NPY 免疫組織化学像において染色面積が増加した結果は NPY 放出と合成の双方が亢進していることに起因すると考えられる。PeVN の SRIF 産生細胞には ARC の NPY 産生細胞からの投射が存在することが知られており (Hisano *et al.*, 1990)、NPY 受容体も存在する (Fetissov *et al.*, 2004) ことから、PeVN に放出された NPY は SRIF 産生細胞に作用していると考えられる。また、前述のとおり興奮したのは caud-ARC の NPY であることから、今回 PeVN に投射し、NPY の集積を見せた NPY ニューロンは caud-ARC に細胞体を有すると考えられる。前出の GH パルスの光中断の報告では、PeVN の SRIF ニューロンにおいて神経興奮が観察された (Davies *et al.*, 2004)。本章では同様に ARC の NPY ニューロンにおいて神経興奮が観察されたが、PeVN への NPY 集積から考え合わせると NPY の下流に SRIF が位置する可能性が高い。

### 光刺激への NPY の反応

前述のとおり、光刺激は網膜視床下部路を通して SCN へ入力され、ここで概日リズムは補正を受ける (Mai and Junger, 1977; Sawaki, 1979; Sadun *et al.*, 1984)。今回観察された NPY ニューロンは ARC に細胞体を持つが、光刺激の入力系で ARC へ直接入るものは報告がない。また、位置的にも視神経や視交叉からの距離が遠いため、SCN など光刺激の受容部位からの情報が間接的に ARC

へ伝達されたと考える方が自然である。SCN にはアルギノバソプレッシンや血管作動性腸管ペプチド産生神経の細胞体が存在し (van Leeuwen *et al.*, 1978; Vosko *et al.*, 2007)、また解剖学的に PVN へ投射を持つことが示されている (Hoorneman and Buijs, 1982)。SCN から PVN への投射は交感神経系を直接刺激するものであり、また糖質コルチコイドを介して全身臓器への時間補正を行う系への関与もあるとされている。SCN からの投射を受ける細胞は PVN のストレス反応性細胞であるという報告もあるため (Gomez *et al.*, 1997)、光刺激による CRH の放出を皮切りに HPA 軸が活性化する反応の開始は間違いないと考える。では HPA 軸の最終生理活性物質である CS によって NPY の mRNA 合成が亢進したかということ、点灯後 30 分のサンプリングで変化が見られるという時間帯からそれは考えにくい。

脳内の情報伝達であるならば、まず考えられるのは PVN の CRH ニューロンとの相互作用である。第 2 章で触れたように、NPY ニューロンは PVN の CRH ニューロンへ投射を持つが (Fuezesi *et al.*, 2007)、逆の投射は確認されていない。しかし、調節関係にある NPY と CRH の間に間接的な連絡がある可能性は否定できない。

次に期待するのはセロトニンあるいはヒスタミンの関与である。SCN のマスタークロックは外側膝状体からの GABA 作動性ニューロン、NPY ニューロン、そして縫線核からのセロトニンニューロンによって非光同調性に抑制がかかることが知られている (Yannielli and Harrington, 2004)。外側膝状体と縫線核にはそれぞれ網膜視神経路を介さない光刺激が入力される (Morin and Allen, 2005)。外側膝状体は視覚に関連する神経核であり、同部位の NPY ニューロンと ARC の NPY ニューロンの連絡は知られていない。一方、縫線核に存在する神経は大部分がセロトニン産生神経であり、また脳内のセロトニン含有神経細胞は縫線核に集中している。縫線核は脳内の広範囲に軸索を伸ばしているが (Moore *et al.*, 1978)、投射先の一つに結節乳頭核 (Tuberomammillary nucleus: TMN) が挙げられる。TMN にはヒスタミン産生神経が多く存在し、また網膜から TMN への連絡も知られており (Gastinger *et al.*, 2006)、光に反応して覚醒系の作用を発現する。TMN から ARC への直接投射が解剖学的に知られているが (Willoughby *et al.*, 1987)、この投射による生理機能は不明とされている。したがって、SCN を介さずにセロトニン・ヒスタミン経路を介して ARC の NPY に光刺激が伝達される系が関与していると考えられる。生理機能が不明であるとはいえ、他の神経核におけるヒスタミンは睡眠—覚醒調節や摂食調節に関与する因子であることを考えると同経路が関与する可能性もまた否定はできず、今後の研

究が期待される。

#### 光刺激による GH パルス中断の生理的意義

本実験でも観察されたような GH パルスの光中断はラットだけでなく、ヤギ (シバヤギ) においても観察されている (米澤、2004 学位論文)。動物の概日時計が光によって調節される機構は日長が季節によって変化する地域に生息する動物の夜行性および昼行性の行動パターンを環境の明暗に合致させる仕組みであり、捕食者、被食者のいずれにおいても栄養摂取のために必須である。また、生殖効率を上昇させるために同種個体間で活動時間や発情時期を一致させたり、被食者においては捕食の危険性を回避する意味合いも有すると考えられる。GH パルスの変化はこうした行動的な意味合いとは離れているように思えるが、体内エネルギー環境を GH 分泌動態によって調節していることを考えると、GH パルスの変化によって摂食のタイミングが変化する可能性に思い当たる。ラット、ヤギ (シバヤギ) はともに群れで生活する動物であるため、群内での行動に一貫性を生じさせることで群れ全体の生存確率を高めることができると考えられる。また、限られた食物によって生存する野生動物においては、同種個体同士で食物を分け合うよりも強い個体が優先的に栄養を摂取して子孫を残す方が種としての生存確率が高くなる。すなわち、個体ごとに摂食時間が異なるよりも同時に摂食欲求が起こる方が遺伝子の選抜を厳しくすることができ、なおかつ食物連鎖の下位に位置する動物の方が活動の中で摂食に費やす時間の割合が大きいためこうした淘汰による恩恵を受けやすいと考えられる。この点においてもラットとヤギ (シバヤギ) はそれぞれ小型雑食動物と草食動物であり、条件を満たしている。さらに、摂食行動や消化機能は睡眠—覚醒と相反する作用であることから、GH パルスを体外環境に合致させることは他の機能と拮抗を最小にするために必要不可欠であると言えるだろう。

#### 小括

以上、第3章では GH パルスの光中断のモデルを用いて NPY と GH パルスの関係性を調べた。第2章で示して来た結果と同様、caud-ARC の NPY 産生細胞は GH パルスの発生と同調した変化を見せた。このとき、同部位での神経興奮と PeVN での NPY 集積が観察されたことから、caud-ARC の NPY ニューロンは GH 分泌動態制御に強い関与を持ち、その作用の少なくとも一部は PeVN の SRIF ニューロンを介することが示唆された。

Table 3-1. 免疫組織化学に用いた抗体

一次抗体				
抗原	購入元	製品番号	由来動物種	希釈倍率
rat NPY	Santa cruz	sc-14728	Goat	1:100
rat SRIF	Santa cruz	sc-7819	Goat	1:1000
Ser133 pCREB	Millipore (Upstate)	06-519	Rabbit	1:5000 (float)
二次抗体				
抗原/標識	購入元	製品番号	由来動物種	希釈倍率
Goat IgG/Alexa 488	Invitrogen	A11055	Donkey	1:500
Rabbit IgG/Alexa 594	Invitrogen	A11012	Goat	1:500

Table 3-2. リアルタイム PCR の手順

リアルタイムPCR 混合溶液を作製 (Thunderbird SYBR qPCR Mix を使用)

cDNA sample	5 $\mu$ L
Forward primer	0.5 $\mu$ M
Reverse primer	0.5 $\mu$ M
SYBR Green Mix	10 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

\* cDNA sample は反応液を 1:100 に希釈したものを用いる。

\* 標準曲線の作製用には1:10, 1:100, 1:1000 の希釈列をcDNAサンプルで作製したものを用いる。

\* primer の組み合わせは別表を参照。

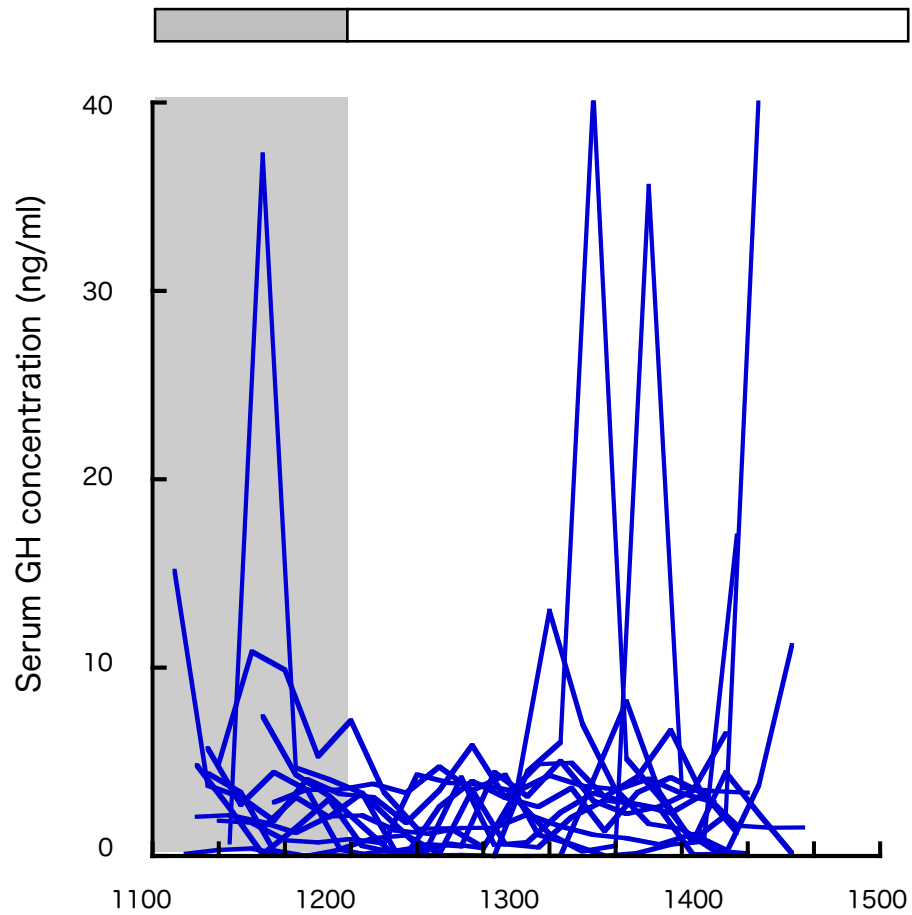
PCR反応

95°C	Melting	35 cycles
*°C	Annealing	
72°C	Extension	

\* Annealing 温度についてはNPY : 55°C, HPRT : 58°C。

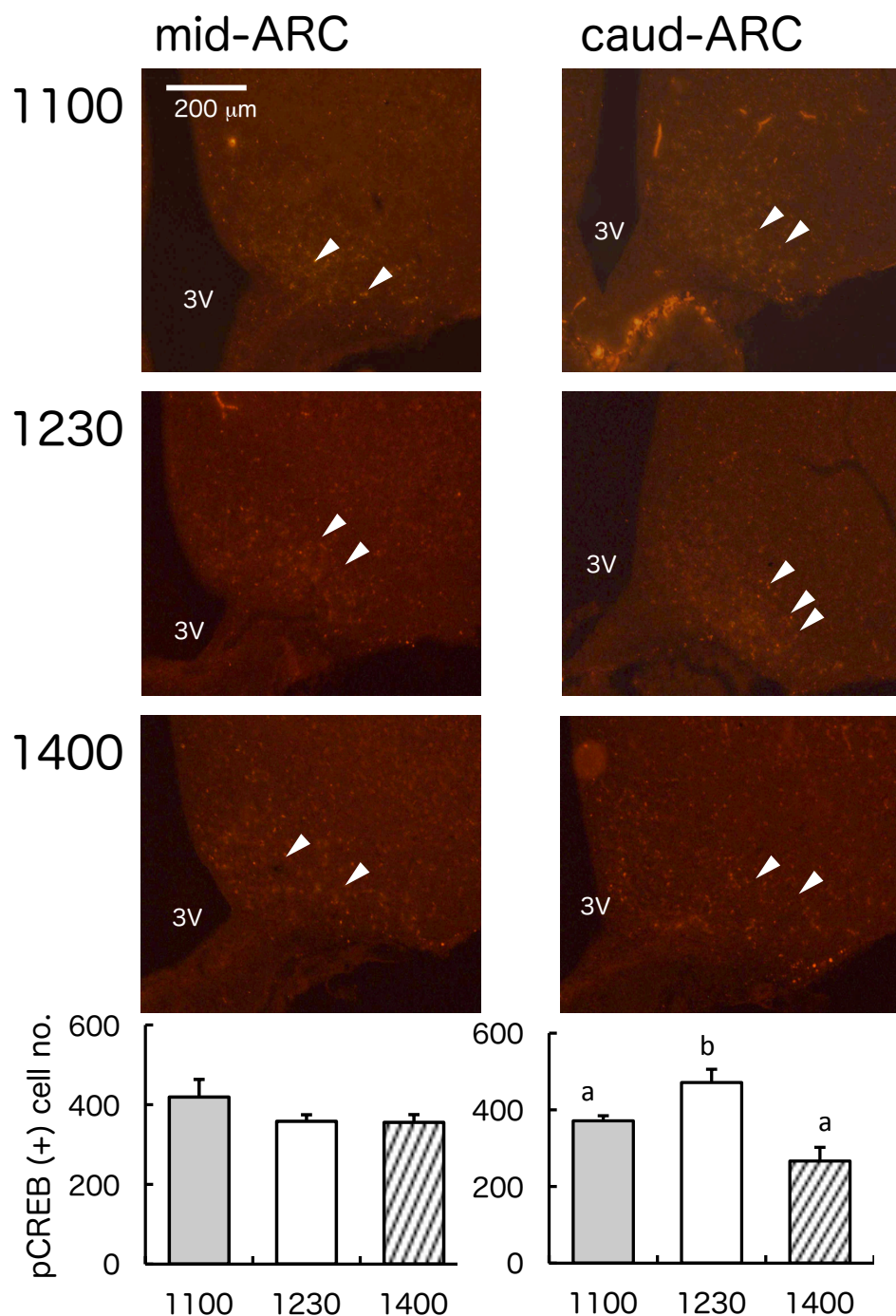
Table 3-3. リアルタイム PCR に用いた primer の配列および Tm 値

	NCBI Accession No.	Sequence	Tm
NPY	NM_012614.1	Forward	caagctcattcctcgcagag
		Reverse	gaatgcatgatactttattt
HPRT	NM_012583.2	Forward	gaccggttctgtcatgctg
		Reverse	acctggttcacatcactaatcac



**Figure 3-1. 明期開始時の GH プロファイル**

12個体のプロファイルを重ねて表現した。縦軸はGH濃度、横軸は時間経過を表す。上部のバーは明暗状態を示し、1200に飼育室の照明が点灯する。



**Figure 3-2. 明期開始時の ARC における pCREB 陽性細胞分布**

左列は中央領域の、右列は尾側領域の染色像。矢頭は陽性細胞を示す。最下段はそれぞれ同列の染色像を数値化したものであり、平均値+標準誤差で表した。縦軸は切片あたりの細胞数である。同一のアルファベット間に有意差はない。  
n=6、P<0.05、ANOVA 後に Tukey HSD test を行った。