

要旨

獣医学 専攻

平成 19 年度博士課程 入学

氏 名 藤澤 彩乃

指導教員名 西原 眞杉

論文題目 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

哺乳動物には体内環境の恒常性を維持するために、全身循環を介した情報伝達によって臓器間の協調をはかり、フィードバック機構を通じて揺らぎを最小限に抑える仕組みが備わっており、こうした全身性の情報伝達を主に担うのは多種のホルモンである。内分泌系がフィードバック機構を働かせるためには分泌制御機構が必須であるが、とりわけ視床下部の制御を受けて下垂体がホルモン分泌を行う系においては複雑な調節が行われている。視床下部は体内の自律的機能を制御する高次中枢であり、神経性および液性の多元的な情報を受容し、また下垂体からは複数のホルモンが分泌されて複合的かつ協調的に体内環境を調節することが可能となっている。

成長ホルモン (Growth hormone: GH) は下垂体前葉より分泌されるホルモンの一つであり、成長期の体成長促進作用に加えて成熟動物においては全身臓器に対する代謝調節作用を有する。GH の作用は多様であるが、個々の作用発現は GH の分泌量だけではなく分泌動態を含めて決定されと考えられている。例えば成

熟ラットの場合は、雄においては高いピークと低い基底値から成る特徴的なパルス状の分泌動態が観察されるのに対して、雌では比較的基底値が高く、高頻度のパルスを生じるパターンが知られており、肝臓の酵素発現や代謝効率における性差を形成していることがわかっている。さらに、GH は体内環境の変化にともなってその分泌動態を柔軟に変化させることも報告されており、視床下部の制御に従って量・時間の二次元からなる情報を発信するホルモンであるといえる。

一方で、視床下部の GH 分泌制御系については、従来、分泌促進系の GH 放出ホルモン (GH-releasing hormone: GHRH) と分泌抑制系のソマトスタチン (Somatotropin release-inhibiting factor: SRIF) による二因子制御系が唱えられていた。しかし、近年これら二因子のみでは説明できない現象が多数報告されており、グレリン、神経ペプチド Y (Neuropeptide Y: NPY) 等の因子を含めた新しい分泌制御モデルが求められている。グレリンと NPY は直接的なエネルギー摂取に関しては摂食促進という同方向への作用を持つにも関わらず、代謝調節を担う GH 分泌に関してはそれぞれ促進と抑制の相反する作用を有する。また、NPY は睡眠/覚醒や生殖といった他機能の調節系への影響も有するため、総合的に恒常性を維持する役割を持つことが期待できる。したがって、NPY は積極的に恒常性維持に寄与するために、広範な生物学的作用を有する GH のパルス形成機構の一部を成す可能性が考えられる。

そこで本研究では、脳組織の解析が容易であるラットを用いて、GH パルスの動態と視床下部における NPY 発現動態の変化を解析し、比較することで GH パルス形成機構への NPY の関与について組織学的に解明することを目的とした。本論文は 4 章からなり、第 1 章は緒言として本研究の背景と目的の詳細を述べた。やはり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果たしている視床下部 NPY の役割について、他の因子との関連も含め総合的な考察を行った。

第2章では NPY の作用点であるストレス系・生殖系の情報伝達物質であると同時に GH 分泌動態を変化させる内因性物質としてステロイドに焦点を当て、GH 分泌動態と視床下部 NPY 発現の比較解析を行った。第1節ではラットの糖質コルチコイドであるコルチコステロン (Corticosterone: CS) に着目した。筆者の過去の研究から、成熟雄ラットの経時採血では血中 CS 濃度が上昇すると GH パルスは発生しなくなることで、また、絶食負荷後 48 時間、96 時間においては血中 CS 濃度が上昇して GH パルスは消失するのに対し、同 72 時間においては自由摂食群と同等の低い CS 濃度と明瞭な GH パルスが見られることが示されている。そこで、まず CS を皮下投与した雄ラット (CS 群) とコレステロールを投与した対照群との視床下部 NPY 発現を *in situ* hybridization 法により比較したところ、視床下部弓状核 (Arcuate nucleus: ARC) 尾側領域の NPY mRNA 発現は CS 群においてより高まっていた。さらに、エネルギー代謝に関係するストレスとして雄ラットに絶食を負荷し、視床下部の組織学的解析を行った。その結果、視床下部 NPY 発現は ARC 尾側領域においては自由摂食群と 72 h 絶食群に比べて 48 h 絶食群と 96 h 絶食群とで高まっていた。ARC 吻側領域では各群間に差は見られなかったが、ARC 中央領域では絶食強度が高くなるに伴って NPY mRNA 発現が上昇した。以上のことから、ストレスによる GH パルス抑制は CS 濃度に依存し、ARC 尾側領域の NPY 産生細胞がその抑制を担っていることが示唆された。一方で ARC 中央領域の NPY 産生細胞は摂食促進に関与する可能性が考えられ、ARC 内でも NPY 産生細胞の位置によって異なる作用を発現していることが推察された。

第2節では雌の性ステロイドであるエストロジェンを用いた。卵巣除去によってエストロジェン濃度を低下させた雌ラットでは、雄に類似した低い基底値とピークの高いパルスをもつ GH 分泌動態が観察された。エストラジオール (Estradiol: E2) をそれぞれ発情前期、発情休止期を模した濃度(順に High E2、Low E2)で投与した雌ラットについて視床下部 NPY 発現を比較したところ、ARC 尾側領域において High E2 群では Low E2 群よりも NPY mRNA 発現が低下していた。高濃度 E2 の投与によって GH の基底値は上昇することを考え合わせると、E2 によって ARC 尾側領域の NPY 発現が低下することで GH 分泌抑制が弱まり、基底値を低く維持することができなくなるために明瞭なパルスが形成されなくなることが示唆された。

第3章では光刺激による GH パルス抑制モデルを用いて NPY の関与について検討を行った。すなわち、成熟雄ラットにおける明期開始時の光刺激による影響を血中 GH 濃度変化および視床下部組織の染色像より解析した。その結果、既報

の通り GH 分泌動態については明期開始後約 90 間 GH パルスが観察されない時間帯が存在した。このパルス抑制期ではその前後の時間帯と比較して、ARC 尾側領域で神経興奮マーカーであるリン酸化 CREB の陽性細胞数が増加し、同部位の NPY mRNA 発現が上昇していた。このとき、NPY と同じく GH 分泌抑制因子である SRIF の免疫染色像にはこのような変化は見られなかった。また、NPY タンパク質は SRIF 産生細胞が存在する室周囲核 (Periventricular nucleus: PeVN) において染色性が高まっていた。NPY 産生細胞は ARC のほぼ全域に分布していたが、神経興奮および NPY mRNA 合成において GH パルス抑制期とその前後で差が見られたのは尾側領域のみであり、吻側と中央の領域では違いが生じなかった。以上のことから、光刺激による GH パルス抑制には ARC 尾側領域の NPY 産生細胞が関与していること、また、この NPY 産生細胞は PeVN に投射しており、SRIF を介して GH 分泌を抑制していることが示唆された。

以上、本研究においてはステロイドホルモンによる比較的長期的な GH 分泌制御および光刺激による急性的な制御のいずれの場合においても、ARC 尾側領域の NPY 産生細胞の状態が GH 分泌動態と平行して変化することを示した。すなわち、同領域の NPY 産生細胞は普遍的に GH パルスの発生制御に強く寄与していることが示唆され、GH パルス形成機構のモデルとして従来の GHRH、SRIF の二因子に NPY を加えた三因子制御系の評価が必要となることが明らかとなった。また、ARC 吻側領域、中央領域の NPY 産生細胞は GH パルス制御への関係は薄い一方で、他の機能に関連する神経群として存在する可能性を示した。神経内分泌学ではこれまで神経核や神経細胞ごとに作用を表現してきたが、均一とされてきた神経群をさらに機能的に細分化できる可能性があり、組織学的アプローチと機能学的アプローチを組み合わせる必要性を示す結果となった。特に NPY のような多機能因子については、同一の入力系を持ちながら異なる出力系をもついくつかのサブグループが存在することで複数の機能系を協調的に調節することが可能となるため、生体の恒常性維持の観点から必須の機構であると考えられる。本研究で示したように NPY が GH パルス制御機構に含まれるということは、複数のフィードバック機構への同一因子の寄与が、単一のフィードバック機構よりもさらに包括的な恒常性維持機構として存在することを示すものである。