

# A novel GABA-mediated corticotropin-releasing hormone secretory mechanism in the median eminence

著者	柿沢 圭亮
発行年	2016-11-18
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/3135">http://hdl.handle.net/10271/3135</a>

doi: 10.1126/sciadv.1501723

博士(医学) 柿沢 圭亮

論文題目

A novel GABA-mediated corticotropin-releasing hormone secretory mechanism in the median eminence

(正中隆起における GABA を介した副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン分泌の新たなメカニズム)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ストレス時の内分泌応答調節において、視床下部室傍核小細胞領域に偏在する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) 分泌ニューロンは重要な役割を果たしている。非ストレス状態においては、CRH ニューロンは、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) ニューロンの入力によって抑制性の制御を受けている。GABA が抑制性に働くためには細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度が低いことが必要であり、室傍核の CRH ニューロンの細胞体においては、K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共輸送体 (KCC2: Cl<sup>-</sup>汲み出し機能) の発現によって細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度が低く保たれている。一方で、急性ストレス時には CRH ニューロン細胞体における KCC2 の細胞膜での発現が低下することによって細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度が上昇し、CRH ニューロンに対する GABA 作用が Cl<sup>-</sup>流入による抑制性から Cl<sup>-</sup>流出による興奮性に変化することが近年示された。しかし、CRH ニューロン神経終末で GABA が作用する可能性については検討した報告はない。本研究では、GABA の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 67 (GAD67) の遺伝子座に緑色蛍光タンパク質 (GFP) をノックインすることで、GABA 産生量を半減させた GAD67-GFP ノックインヘテロマウス (GAD マウス) を用い、CRH ニューロン制御における GABA の役割について、特に CRH ニューロン神経終末が収束している視床下部正中隆起に着目して検討した。

[材料ならびに方法]

成熟 GAD マウスおよびコントロール群として成熟野生型マウス (C57BL6) を用いた。GABA 合成量減少による視床下部-下垂体-副腎系への影響を調べるために、血漿コルチコステロン、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、アルギニンバソプレッシン (AVP) 値と視床下部 CRH 含有量をラジオイムノアッセイにより測定した。また、視床下部 CRH 合成量の変化は CRH mRNA 発現量のリアルタイム PCR 法で調べた。さらに、室傍核の CRH ニューロンの数ないし形態の変化や、CRH ニューロンへの GABA 作動性入力の有無を、免疫蛍光染色によって評価した。また、30 分間の拘束ストレスを与えたマウスにおいても、一部の項目について評価を行なった。さらに、CRH ニューロン選択的に細胞内 Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光蛋白 GCaMP3 を発現するマウスを作製して、GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬投与による細胞内 Ca<sup>2+</sup>反応を記録した。本研究は、本学の動物実験委員会 (承認番号: 2013040) と組換え DNA 実験安全委員会 (承認番号: 25-21, 26-21) の承認を得て行った。

## [結果]

血漿コルチコステロン、ACTH 値が、GAD マウスにおいて有意に低値であったが、CRH mRNA 発現量には差を認めなかった。室傍核 CRH を詳細に検討したところ、GAD マウスにおいて CRH 免疫染色陽性細胞数と細胞毎の染色強度が有意に増加し、CRH 含有量も有意に増加していた。この染色強度の差はコルヒチンによる軸索輸送の障害で消失したことから、GAD マウスでは GAD67 減少により、CRH 放出量が減少していることが示唆された。免疫染色では、小胞性 GABA トランスポーターと GFP で同定された GABA 作動性線維の正中隆起 CRH ニューロン神経終末への入力認められ、終末には GABA<sub>A</sub> 受容体と Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 共輸送体 (NKCC1: Cl<sup>-</sup> 取込機能) が CRH と共局在しており、対照的に室傍核の CRH ニューロン細胞体には GABA<sub>A</sub> 受容体と KCC2 が発現していた。このことから、GABA<sub>A</sub> 受容体作用が細胞体では抑制性、神経終末では興奮性であると考え、逆行性トレーサーであるフルオロゴールドの腹腔内投与により、弓状核から投射する GABA 作動性神経終末が正中隆起の CRH ニューロン神経終末にシナプス形成することを確認した。そこで、CRH ニューロン選択的に GCaMP3 を発現するマウスを作製し、GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬により細胞内 Ca<sup>2+</sup> 反応が、CRH ニューロン神経終末では増加、細胞体では減少することを確認した。この、CRH ニューロン神経終末での GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬による反応は、NKCC1 阻害薬により抑制され、神経終末では NKCC1 による Cl<sup>-</sup> 取込のため細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度が高く、GABA 作用が Cl<sup>-</sup> 流出による興奮性であると結論した。一方で、拘束ストレス後のコルチコステロン、ACTH、室傍核 CRH 免疫染色は、GAD マウスと野生型で差が無く、NKCC1 阻害薬の腹腔内投与による影響も認めなかったことより、今回発見した経路は拘束ストレス以外の状態において主に働くことが示唆された。

## [考察]

中枢神経系のいくつかの部位の神経終末において、GABA やグリシンが細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度が高いための脱分極により興奮性に作用することが示されている。今回、CRH ニューロン神経終末で同機序の存在を初めて示した本研究の意義は、それが神経内分泌における全く新しい経路の発見であることである。特に、今回見出した正中隆起への GABA 作動性線維の起源が弓状核であり拘束ストレスに反応しないことから以下が考えられる。弓状核に局在する GABA 作動性ニューロンはアグーチ関連タンパク質 / ニューロペプチド Y ニューロンとラットインスリンプロモーターニューロンであり、血中のインスリンやレプチン、グレリンなどを介して栄養状態をモニターしているので、摂食行動に伴う糖質コルチコイドの変化に、今回発見した機構が関与している可能性があり、今後さらに検討していく必要がある。

## [結論]

CRH ニューロン神経終末は NKCC1 発現により細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度が高く、視床下部弓状核由来の GABA が興奮性に作用して CRH 分泌を促進するという、新たな CRH 放出機構を発見した。今回の発見は、神経性食欲不振症や鬱病などの摂食行動変化を

呈する精神神経疾患に対する、新たな病因や病態論の展開に寄与するものと考え  
る。