

ストレス応答のかなめ CRH 遺伝子

井樋 慶一

要約：ストレスから自らを防御するためには糖質コルチコイド (GC) が不可欠であるが、中枢性に糖質コルチコイド合成・分泌を制御するのが視床下部のコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) ニューロンである。ヒトでもげっ歯類でも CRH は視床下部室傍核 (PVN) の小型神経細胞で産生される。CRH ニューロンにはバゾプレッシン (AVP) が共存し、両者が下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌を調節する。CRH ニューロンの活動性は GC などの液性因子および入力神経終末から放出される神経伝達物質によって調節されている。たとえば実験動物 PVN 内に代表的神経伝達物質の一つであるノルエピネフリン (NE) を注入すると CRH 遺伝子発現が増加することから脳内 NE 神経は CRH ニューロン刺激系と考えられる。CRH と AVP は共に小型神経細胞に存在するにもかかわらずストレス時これらの遺伝子発現は必ずしも平行しない。この現象を説明する細胞内メカニズムとして両遺伝子転写機構の違いがあげられるが、CRH と AVP による二重支配はストレス防御という視点からは生体応答の多様性の一つとして理解される。ストレスは様々な病態と深く関わっており、脳内ストレス情報処理機構の解明がストレス関連疾患の治療・予防に寄与するものと期待される。

1. はじめに

生体の恒常性を脅かすストレス情報は様々な脳内神経路を経たのち視床下部に伝達される。視床下部では室傍核 (PVN) のコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) ニューロンにおいて全てのストレス情報が統合され、末梢への出力レベルとして下垂体門脈血中へ

の CRH ペプチド放出量が規定される (1)。CRH は下垂体前葉 corticotroph [副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 産生細胞] を刺激し最終的に副腎皮質における糖質コルチコイド (GC) 分泌レベルが調節される。このようにストレス時の内分泌応答調節において CRH ニューロンは中心的な位置を占めるが、このニューロンに共存するもう一つのペプチド、バゾプレッシン (AVP) もまた CRH と並び重要なストレス応答ホルモンである (2) (後述参照)。GC は様々な生理作用を発揮しストレスから生体を防御するが、同時に corticotroph、PVN 内 CRH ニューロンなどへの負のフィードバック制御作用を有する (3)。

CRH は 1981 年 Vale らによってヒツジ視床下部から精製された 41 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドである (4)。ヒト CRH も 41 個のアミノ酸残基からなるが (5)、7 個のアミノ酸がヒツジと異なっている。ヒト、ラット (6)、マウス CRH (7) は遺伝子レベルでは塩基配列が幾分異なるがアミノ酸配列は同一である。CRH 遺伝子は 2 つのエクソンと 1 つのイントロンからなるが、CRH の前駆体 (prepro-CRH) は第 2 エクソンにコードされており、この前駆体から CRH ペプチドが生成される。

CRH 受容体には CRH-R1 と CRH-R2 があり、さらに CRH-R2 にはスプライス異形が存在する (8)。下垂体前葉における ACTH 分泌には CRH-R1 が関与するが、脳内では CRH-R1、CRH-R2 が異なった分布を示しており、それぞれの機能的意義を解明するため現在多くの研究がなされている。CRH および類縁ペプチドを含めた CRH ペプチドファミリーの中で、CRH は CRH-R1 への親和性が高く、ウロコルチンは CRH-R1、

キーワード：ストレス、バゾプレッシン、ACTH、遺伝子転写、視床下部

東北大学大学院情報科学研究科情報生物学、東北大学大学院医学系研究科神経内分泌学、東北大学学際科学国際高等研究センター (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3-09)

e-mail: itoik@mail.tains.tohoku.ac.jp

Title: The CRH gene as a key player in stress responses

Author: Keiichi Itoi



図1 ラットPVN内のCRH mRNA（グレー；破線で囲まれた領域）およびAVP mRNA（黒）発現ニューロンの分布
連続切片を用い in situ ハイブリダイゼーションによりそれぞれ CRH mRNA, AVP mRNA を検出し両者の画像を重ね合わせた。CRH は内側の小細胞領域に、AVP は主として外側の大細胞領域に発現する。（自検例）

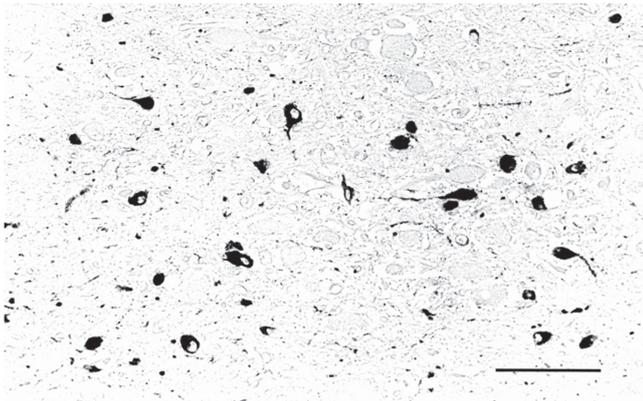


図2 ヒトPVN内のCRH発現ニューロンの分布（免疫組織化学）
CRH免疫染色性は小型の神経細胞に局限して認められる。Bar = 100 μ m.（自検例）

CRH-R2 両者に同程度の、ウロコルチン II, ウロコルチン III は CRH-R2 に強い親和性を有する(8)。

ストレス応答は健常な個体の生理的反応の一部であるが、ストレスはうつ病などの精神疾患の発症とも深く関わっている。実際、うつ病患者では視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系の異常亢進 (GC 分泌亢進や GC による負のフィードバック不全など) が知られており(9)、時にクッシング症候群との鑑別を要する場合もある。現在のところ、HPA 系異常がうつ病の成り立ちに関係するのか、うつ病の結果として出現するのかは明らかでないが、臨床症状の改善に伴い HPA 系も改善することが知られる(9)。この病態では末梢血中 ACTH, コルチゾール高値にもかかわらず脳脊髄

液中 CRH 抑制が認められないことから(10)、CRH ニューロンの活動性亢進 (あるいは負のフィードバック不全) が示唆される。中枢神経系において CRH は食欲抑制作用、睡眠抑制作用、血圧上昇作用などの薬理作用を有するが、病態との関連性は明らかでない。

2. PVNにおけるCRHニューロンの分布とCRHニューロン内AVP発現

ラットなどげっ歯類では PVN は大細胞領域 (magnocellular division) および小細胞領域 (parvocellular division) に分かれており、CRH は主として小細胞領域に存在する (図1)。

PVN の CRH ニューロンには AVP が共存し、正中隆起の神経終末において CRH と AVP が分泌顆粒内に共存することから(11)、ストレスの種類あるいは強さによっては CRH と AVP が同時に分泌されるものと考えられている。げっ歯類と異なりヒト PVN は大細胞、小細胞がコンパートメントに分かれず混在しているが CRH が小細胞に存在する点は同様である(12) (図2)。

CRH と AVP は共に下垂体前葉からの ACTH 分泌を刺激するが、両者の作用は相乗的であることが知られている(13)。したがって、強力な ACTH 分泌が必要な局面においては2つのペプチドが共に分泌されることは好都合なことと考えられるが、両ペプチド共存の生理的意義は未だ明確ではない。最近の研究から、AVP は慢性ストレス応答においてより重要な意義を有する可能性が示唆されている (後述参照)。CRH ニ

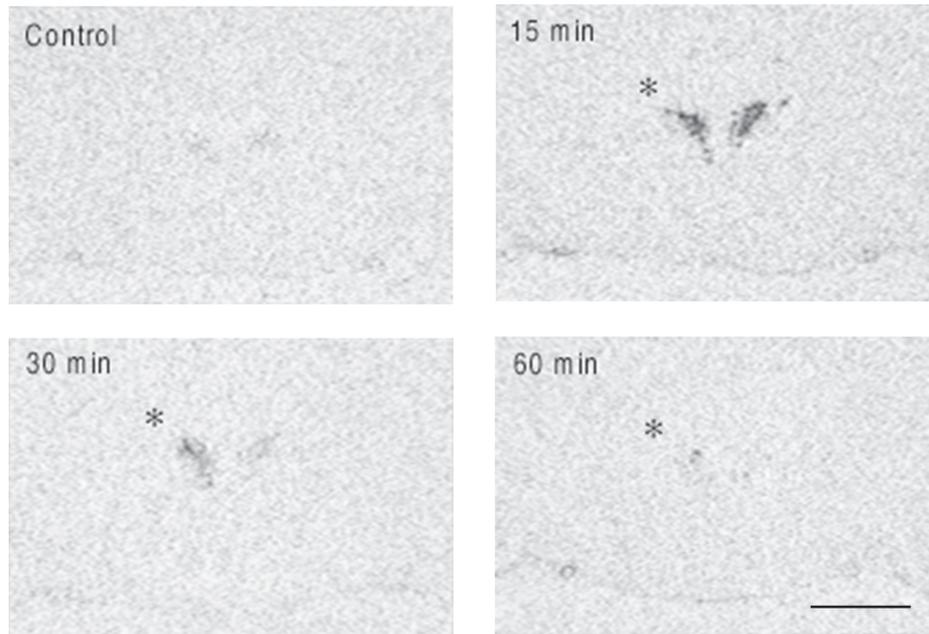


図3 無麻酔ラットPVN内にノルエピネフリン (NE) 注入後のCRH hnRNAの時間経過

片側性にNEを注入したところ15分後に対照(control)と比較しCRH hnRNAが著明な両側性増加を呈し、1時間以内に完全に消退した。
* : NE注入側, Bar = 100 μ m. (Itōi K, et al. J Neurosci. 1999;19:5464-5472より改変)

ニューロン内のAVP遺伝子は血中のGCにより強く抑制されており通常は発現量が少ないが、ラット両側副腎摘出による実験的副腎不全状態下では著しいAVP発現増加が認められる(3)。PVNにおける最大のAVP産生部位は大細胞ニューロンであり、ここで産生されたAVPは下垂体後葉から循環血中に分泌され体液量と浸透圧調節に関与している。生理的条件下では大細胞ニューロンにはGC受容体が発現しておらず(14)、GCによる負のフィードバック調節を受けない。

3. PVNへのストレス情報入力系

ストレス情報は、大脳皮質や辺縁系などが深く関与する情動性のもの、血圧、体液量、消化管などの情報が内臓神経求心路を介し延髄に入力されるもの、末梢における炎症反応がサイトカインなど体液性因子を介して中枢に伝達されるものなどに大別される。これらのストレス情報は脳内で様々な神経路を介してPVNに伝達される。ストレスの種類によってそれぞれ異なる神経路および神経伝達物質が関与していると考えられるが、その詳細は未だ明らかでない。

1) ノルエピネフリン神経路によるCRHニューロン調節機構

CRHニューロンへの求心路の中で我々の研究を含めこれまで最も良く研究されているのはノルエピネフリン(NE)含有神経路である(1,2)。脳幹部のA1(延

髄腹外側部)、A2(孤束核)、A6(青斑核)は視床下部へ投射する代表的なNE細胞群であるが、CRHニューロンへの直接投射は主としてA2からといわれる(15)。

NEがCRHニューロンを抑制するとする説もあるが、げっ歯類を用いた最近の研究では、NEはCRHニューロンを刺激する代表的な神経伝達物質の一つであると考えられている(1)。たとえば、NEを無麻酔ラットPVN内に直接投与するとCRH遺伝子発現が増加した(16)。遺伝子発現の変動は通常mRNA量によって検討されるが、①細胞質内に常時存在するmRNAプールが新たに産生されたmRNA増加をマスクしてしまい変動が検出できないことがある、②細胞質内mRNA量は転写によって新たに合成される量と代謝される量のバランスで決まるため必ずしも転写レベルを正確に反映しない、③最初期遺伝子を除く大部分の遺伝子では転写開始からmRNA合成まで長時間(1時間半以上)を要するなど不都合な点がある。そこで、イントロン配列に相補的なプローブを用い核内に存在する一次転写産物(ヘテロ核RNA, hnRNA)を検出することによりこれらの問題の解決を試みた。CRHイントロン配列を認識するプローブを用いて検討した結果、CRH一次転写産物(CRH hnRNA)は対照群ではほとんど検出できないがNE注入後速やかに著しい増加を認め、15分以内に頂値をとりほぼ1時間で基礎値に復した(17)(図3)。NEによるHPA系活性化作

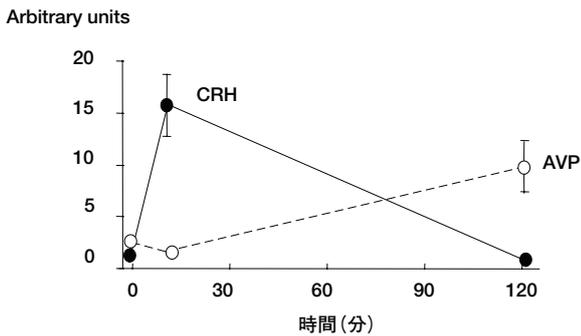


図4 温水中遊泳ストレス負荷後のラットPVN内CRH hnRNA (黒丸・実線) およびAVP hnRNA (白丸・破線)の時間経過
 CRH hnRNAは迅速に増加し2時間以内に消退したが、AVP hnRNAは2時間後にはじめて増加した。(Jiang Y-Q, et al. Neurosci Lett. 2004;358:201-204より改変)

用は主として視床下部内の α_1 受容体を介するものと考えられている (16)。

2) CRHとAVP遺伝子発現調節の違い

小細胞領域のCRHニューロンにAVPが共存し、共にACTH分泌にあずかっていることは上述したが、果たしてNEによりCRH遺伝子と平行してAVP遺伝子の転写もまた増加するであろうか。PVNに存在するAVPの大部分は大細胞領域に存在するためPVN全体を定量したのでは小細胞領域の変化は大細胞領域の大きなプールにマスクされてしまうであろう。そこで小細胞領域のみでAVP転写レベルを特異的に定量するために次のような方法を用いた。まずin situハイブリダイゼーション法によりAVP hnRNAを検出し、次に隣接切片を用いてCRH mRNAを検出した。CRH mRNA陽性領域の輪郭をトレースし、これをコンピュータ上でAVP hnRNAのデジタル画像上に重ね合わせるによりCRH mRNA発現領域(ほぼ小細胞領域に一致する)のみでAVP hnRNAの変化を定量した。この方法を用いた結果AVP hnRNAはCRH hnRNAと異なった動態を示すことが明らかとなった(17, 18)。すなわち、PVN内NE注入後CRH hnRNAは極めて迅速に著増したが、AVP hnRNAはこれと平行した増加が認められなかった。また、AVP hnRNAはNE注入2時間後にはじめて軽度増加が認められた。このような時間経過の不一致からCRHとAVPの遺伝子転写調節には異なる細胞内メカニズムが想定され、おそらく早い応答は転写因子タンパクのリン酸化を、遅い応答は新たな転写因子タンパク合成を介すると考えられている(後述参照)。

次に、種々のストレスに対してPVN小細胞領域のCRHとAVP遺伝子がどのように応答するかを検討し

た。温水中遊泳ストレス負荷後、CRH hnRNAは速やかな立ち上がりと消退を示したのに対し、AVP hnRNAはストレス負荷後2時間して増加が認められた(19)(図4)。ここで両遺伝子発現が上述のNE注入実験と類似の時間経過を示したことは、遊泳ストレス応答におけるNE系の関与を示唆するもので注目値する。また、脱血ショックストレスや、代表的なサイトカインの一つであるインターロイキン1(IL1)末梢投与後も小細胞領域のAVP遺伝子転写が増加し、しかもこの増加はCRH遺伝子転写より遅れて立ち上がる傾向が認められた。CRH遺伝子転写が消退した後もAVP遺伝子転写が持続するということは、ストレス応答における生体の多様性として理解されるが、緩慢な、あるいは持続的なAVP遺伝子の振舞いからAVPはHPA系の持続的な活性化に重要な役割を演ずるのかもしれない。実際、繰り返しストレスによりCRH遺伝子発現が抑制されると対照的にAVP遺伝子発現は増強されるという報告があり(20)、慢性ストレス時のAVPのはたらきに示唆を与えるものである。

4. CRHニューロンにおける細胞内情報伝達系

CRH遺伝子上流域にはcAMP反応性エレメント(CRE)が存在するが、このCREの機能がin vivoの実験系で明らかにされた。まず、8-Br-cAMPを直接無麻酔ラットPVNに注入した結果CRH mRNAが増加したことからcAMPの関与が示唆された(21)。次に、CRE結合タンパク(CREB) mRNAに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドをPVNに前投与することによりストレス時のCRH mRNA増加が抑制された(21)。したがって、cAMP依存性タンパクキナーゼA系を介したCREBのリン酸化がCRH遺伝子転写に関与することが示されたが、これらの結果はin vitro培養細胞系で報告された成果とよく一致する(22)。

CRH遺伝子5'上流域には複数のTPA response element (TRE)が存在するがCRH遺伝子発現への関与は未だ明らかでない。CRH合成、分泌能を有するヒト神経芽細胞腫BE(2)-M17細胞系においてTPAがCRH mRNA発現を増加させることからCRH遺伝子発現へのCカインース系の関与の可能性が示唆される(Itoi & Seasholtz 未発表)。最近、BE(2)-C培養細胞系を用いカルシウム/カルモジュリン・キナーゼが(おそらくCREBを介して)CRH遺伝子発現を刺激することが証明された(23)。

5. まとめ

ストレス応答を制御するCRHニューロンは数多く

の神経性、液性の因子による調節を受けており、ストレスの種類、強さ、持続時間などにより多様な応答を示すものと考えられる。様々なストレスに応じてこれらの神経路がどのように特異的あるいは協調的に働くかは今後検討すべき課題である。臨床的には、ストレスと病因論的な関連性が示唆される疾患としてうつ病があげられる。また、直接的な因果関係は明らかでないものの、いわゆる生活習慣病のほとんど全てがストレスと何らかの関連性を有することからストレスは現代医学・医療上の最重要課題の一つといえることができる。最近開発された神経内分泌ペプチドやそれら受容体ノックアウトマウスがHPA系やストレス応答異常の動物モデルとして実験に供されるようになり、今後はホルモンとしてばかりでなく脳内神経伝達物質としての神経内分泌ペプチドの役割が明確にされるものと考えられる。これらの研究成果がストレス関連疾患の治療および予防に貢献していくことが期待される。

文 献

- 1) Itoi K, et al. *Endocr J*. 1998;45:13-33.
- 2) Itoi K, et al. *J Neuroendocrinol*. 2004;16:348-355.
- 3) Itoi K, et al. *Neurosci Lett*. 1987;73:231-236.
- 4) Vale W, et al. *Science*. 1981;213:1394-1397.
- 5) Shibahara S, et al. *EMBO J*. 1983;2:775-779.
- 6) Thompson RC, et al. *Mol Endocrinol*. 1987;1:363-370.
- 7) Seasholtz AF, et al. *Mol Cell Neurosci*. 1991;2:266-273.
- 8) Reul JM, et al. *Curr Opin Pharmacol*. 2002;2:23-33.
- 9) Holsboer, et al. *Endocr Rev*. 1996;17:187-205.
- 10) Wong M-L, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:325-330.
- 11) Whitnall MH, et al. *Nature*. 1985;317:248-250.
- 12) Mouri T, et al. *Neuroendocrinology*. 1993;57:34-39.
- 13) Gillies GE, et al. *Nature*. 1982;299:355-357.
- 14) Berghorn KA, et al. *Endocrinology*. 1995;136:804-807.
- 15) Cunningham ET Jr, et al. *J Comp Neurol*. 1988;274:60-76.
- 16) Itoi K, et al. *Endocrinology*. 1994;135:2177-2182.
- 17) Itoi K, et al. *J Neurosci*. 1999;19:5464-5472.
- 18) Helmreich DL, et al. *Mol Brain Res*. 2001;88:62-73.
- 19) Jiang Y-Q, et al. *Neurosci Lett*. 2004;358:201-204.
- 20) Ma X-M, et al. *J Physiol*. 1998;510:605-614.
- 21) Itoi K, et al. *Endocrinology*. 1996;137:2389-2396.
- 22) Seasholtz AF, et al. *Mol Endocrinol*. 1988;2:1311-1319.
- 23) Yamamori E, et al. *J Mol Endocrinol*. 2004;33:639-649.

著者プロフィール

井樋 慶一 (いとい けいち)

東北大学大学院情報科学研究科情報生物学、東北大学大学院医学系研究科神経内分泌学、東北大学学際科学国際高等研究センター、医学博士。

◇1980年東北大学医学部卒。東大院医学系研究科で生理学を学んだのち臨床に転じ東北大第二内科入局。'87年ハイデルベルク大薬理学教室留学、翌年助手に採用される。'90年帰国後、東北大医学部附属病院助手、講師、同院医学系研究科助教授を経て、'01年東北大院情報科学研究科教授。この間、'96-'98年ミシガン大MHRI研究員。'01年東北大院医学系研究科教授（兼任）、'04年同学際科学国際高等研究センタープロジェクト・リーダー（兼任）。

◇研究テーマ：中枢神経系による生体機能調節メカニズム、特に視床下部のはたらき。

◇趣味：水泳、音楽鑑賞。



Dr. Furness と 著者