

# ストレスが変える視床下部の遺伝子

上田 陽一

**要約：**生体がストレスを受けると、脳を介して血圧・心拍の変化や気分・行動の変容など様々な生体反応が引き起こされる。生体のストレス反応のうち、自律神経系を介した生体反応や内分泌系の生体反応は、自律神経系と内分泌系の統合中枢である視床下部を介して引き起こされていることはよく知られている。視床下部ニューロンの神経活動の指標として前初期遺伝子群の発現が汎用されている。我々は、定量化の容易な浸透圧ストレスを用いて、ストレス研究への前初期遺伝子群の有用性について検討したところ、前初期遺伝子群の中でも *c-fos* 遺伝子の発現動態がよい指標となることを見出した。また、ストレスが食欲低下や過食を引き起こすことは経験的によく知られていることである。最近、視床下部の摂食関連ペプチドであるオレキシンとニューロメジンUのストレス反応との関与が注目されており、摂食に対してはオレキシンは促進作用、ニューロメジンUは抑制作用とまったく逆の作用を有する。ところが、脳内のオレキシン・ニューロメジンUは共にストレスに対する内分泌反応の中軸である視床下部 - 下垂体 - 副腎軸に対して賦活作用を有する。ストレス反応と視床下部に存在する神経ペプチドの生理作用との関連を調べることにより、ストレス反応の分子基盤の一端を解明できるかもしれない。

## 1. はじめに

生体にストレス（正確にはストレッサー）がかかると、様々な生体反応が生じる。ストレッサーが引き起こす生体反応を大別すると、1) 血圧・心拍数の増加、消化管運動の低下・亢進などの自律神経系を介した生体反応、2) 視床下部 - 下垂体 - 副腎 (HPA) 軸の賦活化による血中副腎皮質ホルモンの増加を代表とする

内分泌反応、3) 自律神経系や内分泌系の変化と相関する免疫系の変動、4) 不安感などの感情の変化や拒食・過食などの行動の変容となる。

ストレッサーが引き起こすこれらの生体反応は、脳内での神経回路網を介して引き起こされるが、その物質基盤となると脳内で変動する神経伝達物質・神経修飾物質およびその受容体を介していると言えよう。その代表的なものはノルアドレナリン、セロトニンなどの古典的神経伝達物質、および CRF を代表とするストレスホルモン（神経ペプチド）である。

視床下部は脳底部に位置する小さな部位であるが、生理機能の異なった多くの神経核が密集しており、ストレスによる様々な生体反応を引き起こす大変重要な部位である。その中でも、特に室傍核 (paraventricular nucleus: PVN) は、神経内分泌系と自律神経系の高次統合中枢として大切である。PVN は、解剖学的に見ると大細胞群と小細胞群から構成されており、大細胞群では、バゾプレッシン (arginine vasopressin: AVP) およびオキシトシン (oxytocin: OXT) を産生し、その軸索を下垂体後葉に投射し、血中にそれらを分泌する。一方、PVN の小細胞群では、CRF および AVP が産生されており、正中隆起に投射した軸索終末からそれらが分泌され、下垂体前葉からの ACTH 分泌を引き起こす(1)。また、PVN の小細胞群には、脊髄中間質外側核の交感神経節前ニューロンに軸索を投射している自律神経ニューロンが存在する。

ストレスと視床下部 - 下垂体系を主軸とする神経内分泌系について我々の最近の知見をもとに概説したい。

## 2. ストレスと前初期遺伝子群

中枢神経系において、前初期遺伝子群 (immediate

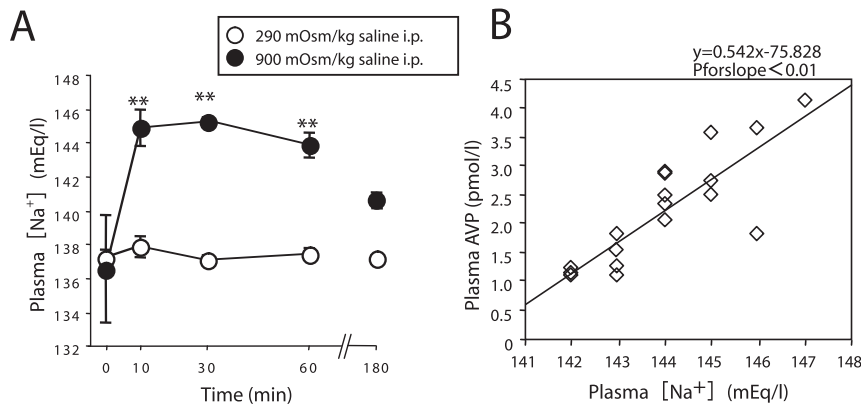


図1 ラットの浸透圧ストレスモデル

A: ラット腹腔内に高張食塩水を投与したときの血中ナトリウム濃度の推移, B: ラット血中ナトリウム濃度と血中バゾプレッシン (AVP) 濃度の相関. \*\* $P < 0.01$  vs 生理食塩水投与群 (文献15より一部抜粋)

early genes: IEGs) の発現が神経活動の指標として汎用されている。ストレス研究においても、種々のストレスラー (例えば拘束, 疼痛, 炎症, 高張食塩水負荷など) に対する脳内 IEGs の発現動態についての比較研究が行われてきた (2-9)。

IEGs を大別すると fos ファミリー遺伝子群 (c-fos, fos-B, fra-1, fra-2) (10), jun ファミリー遺伝子群 (c-jun, jun B, jun D) (11), zinc finger ファミリー遺伝子群 (NGFI-A (zif/268, egr-1, Krox-24), NGFI-C, Krox-20) (12) およびステロイドホルモン受容体と相同性が高い遺伝子群 (NGFI-B (nur/77)) (13) である。ストレスと神経内分泌系の研究では, c-fos 遺伝子発現を指標とした研究がもっとも多い。

視床下部室傍核に局在する AVP および CRF 産生ニューロンは種々のストレスラーに反応して下垂体前葉からの ACTH 分泌を引き起こす。一般にストレスラー (例えば拘束, 疼痛) が個々の生体にどれほど影響を与えたか客観的に定量化するのは困難である。そこで, 高張食塩水投与による急性浸透圧刺激により, 血中浸透圧もしくはナトリウム濃度を測定することで, 個々のストレス度を定量化することができることに着目した (図1)。抗利尿ホルモンである AVP の合成・分泌動態は浸透圧変化に敏感に反応することはよく知られている (14)。

実験では, 急性浸透圧刺激後の神経内分泌系における IEGs の発現動態について, 上記の IEGs (c-fos, jun B, NGFI-A, NGFI-B) を用いて比較検討した。動物は, ウイスター系成熟雄ラットを用いた。急性浸透圧刺激に, 高張食塩水 (450, 600, 900 mOsm/kg) を 2% 体重当たり腹腔内投与した。コントロー

ルには等張食塩水 (290 mOsm/kg) を投与した。それぞれの溶液を投与し, 10, 30, 60 および 180 分後に断頭した。脳を取り出し, 凍結脳切片を作成し, *in situ* ハイブリダイゼーション法により PVN における IEGs (c-fos, jun B, NGFI-A, NGFI-B) の mRNA 量を定量化した。さらに, AVP 遺伝子の転写活性の指標として AVP hnRNA の発現変化を調べ, 比較した。また, 体幹血を採取し, 血中浸透圧, ナトリウム濃度および AVP を測定した。その結果, PVN におけるすべての IEGs 発現は, 高張食塩水投与後 10 分で上昇し, 30 分でピークに達した。血漿ナトリウムと IEGs mRNA, AVP hnRNA および AVP 分泌は, 回帰分析においてすべて有意な正の相関を示した。また, IEGs のうち c-fos mRNA の上昇率が AVP hnRNA の上昇率と最も近似していた (図2)。したがって, 神経内分泌系において浸透圧ストレスに対する c-fos 遺伝子発現が最も AVP 遺伝子発現を反映していると思われる (15)。

### 3. ストレス反応と摂食関連ペプチド

ストレスが一過性の食欲低下・食欲亢進と慢性的な拒食・過食の原因もしくは誘因となることは経験的にもよく知られていることである。しかしながら, その脳内メカニズムの詳細は明らかではない。

これまで脂肪細胞が産生するレプチンを起点とする摂食抑制系と視床下部で産生されるニューロペプチド Y (NPY) を中心とする摂食促進系を軸とした研究が盛んに行われてきた。この摂食調節系に関与する生理活性物質として, 新規の摂食関連ペプチドが続々と登場してきた。例えば, オレキシン/ヒポクレチン, プ

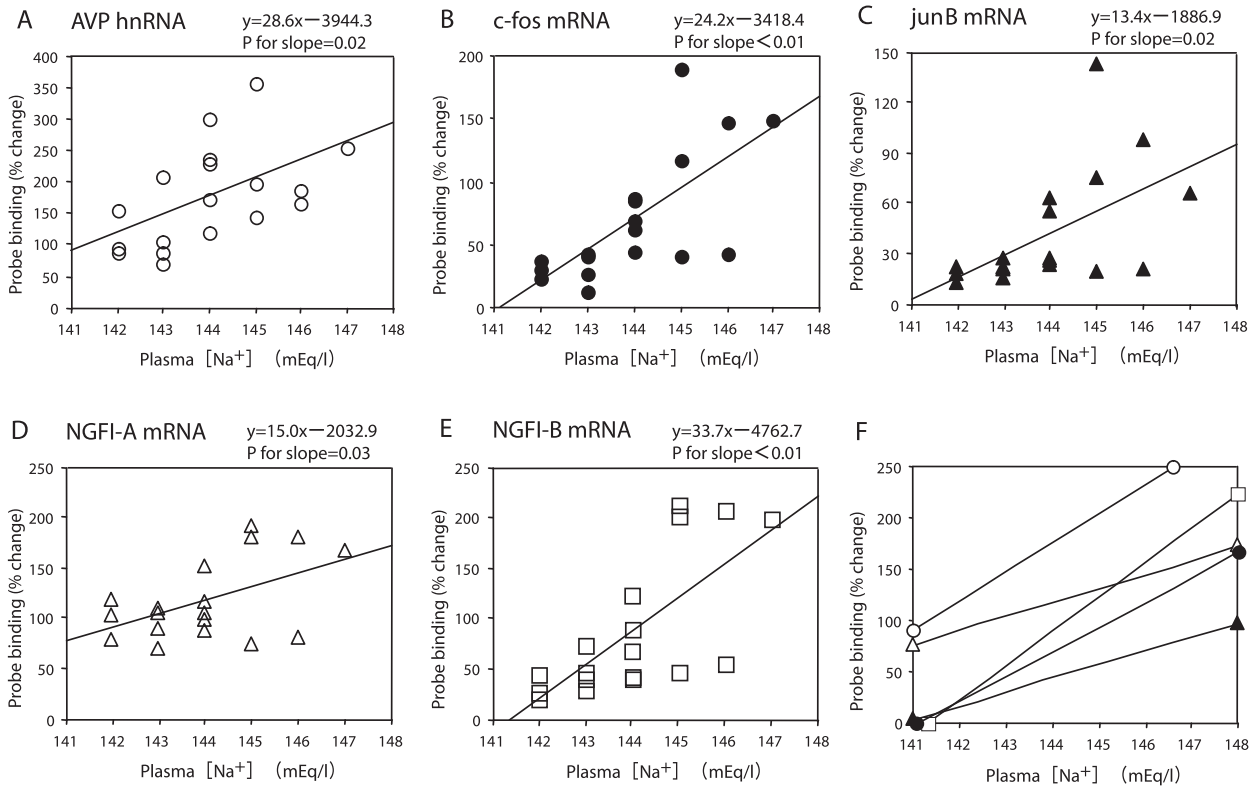


図2 ラット室傍核におけるバゾプレッシン合成と前初期遺伝子群の血中ナトリウム濃度との相関

A: ラット血中ナトリウム濃度とバゾプレッシン (AVP) heteronuclear (hn) RNA との相関. B~F: ラット血中ナトリウム濃度と IEGs mRNAs との相関. (文献 15 より一部抜粋)

ロラクチン放出ペプチド, グレリン, ニューロメジン U などである. これらのペプチドは G タンパク質共役型受容体のうち, リガンドの不明なオーファン受容体の内因性リガンドとして同定された. 最近, これらのペプチドが生体のストレス反応と深く関わっていることが明らかになりつつある (16,17).

### 1) ストレス反応とオレキシン

オレキシン-A, -B はオーファン受容体 (HFGAN72 (OX1R), OX2R) の内因性リガンドとして発見された (18). オレキシンの脳内分布を探索したところ, 摂食中枢として知られる視床下部外側野とその周辺部にオレキシン産生ニューロンが限局していることが明らかとなり, 摂食に関与することが考えられた. 実際にラットやマウスの脳室内にオレキシンを投与すると摂食を誘起することから, ギリシャ語の "orexis" (食欲の意) を語源として命名された. のちに, オレキシンもしくはオレキシン受容体異常がナルコレプシーの原因となることが明らかとなり, 睡眠・覚醒とも関わりのある神経ペプチドとしても注目されるに至った.

視床下部のオレキシン産生ニューロンの軸索は脳の広範な部位に投射しており, 特に PVN 小細胞群, 脳

内ノルアドレナリン系の起始核である青斑核や脳内セロトニン系の起始核である縫線核などに密な投射が見られる (19-21). また, これらの投射部位にはオレキシン受容体の豊富な発現が見られることも明らかとなっている (22, 23).

これまでに, 種々のストレスラーによりオレキシン産生ニューロンに Fos タンパクが発現すること, および prepro-orexin mRNA が増加することが報告されている (24-31). オレキシンを覚醒ラットの脳室内に投与すると PVN の小細胞群に c-fos 遺伝子および Fos タンパクが発現する. この Fos タンパクの発現はほとんどの CRF 産生ニューロンに見られる (30). また, 同時に血中 ACTH およびコルチコステロン濃度の増加が見られたり (32), 血圧の上昇 (33-35), 胃酸の分泌 (36, 37) などが引き起こされる. また, 行動上の変化としては, 顔洗い行動, 毛づくろい行動および探索行動が増加し, CRF 拮抗薬の前投与で有意に抑制される (29).

したがって, 種々のストレスラー→オレキシン産生ニューロンの活性化→オレキシン分泌による CRF ニューロンの活性化→CRF の分泌→生体のストレス反

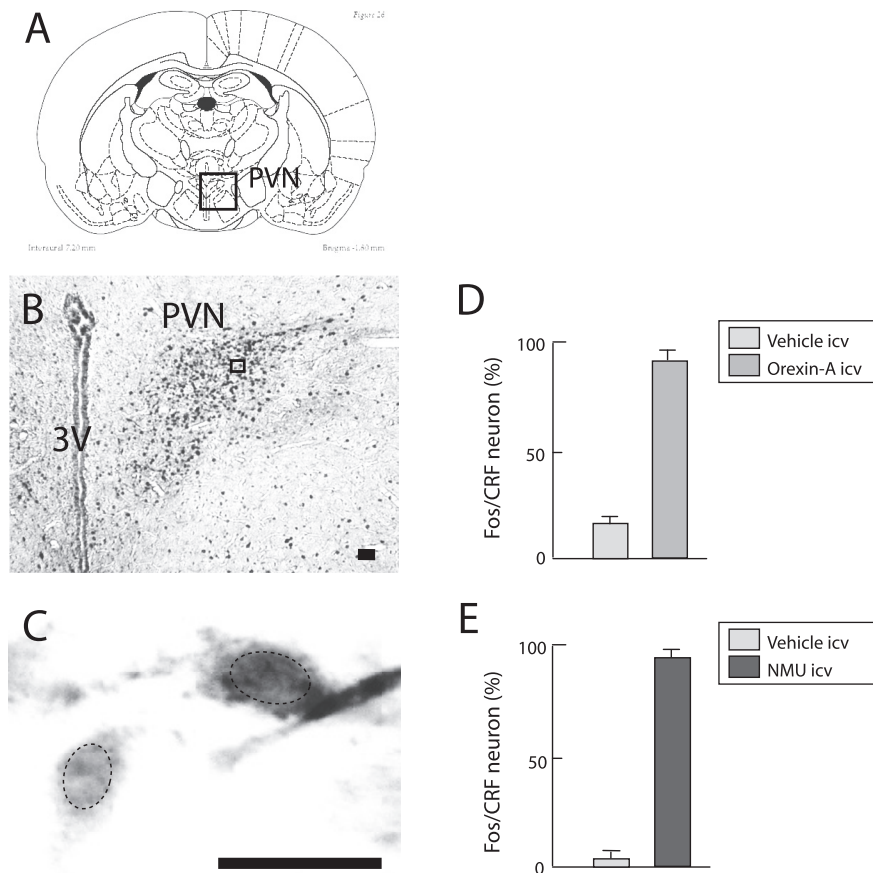


図3 ラット脳室内投与したオレキシン、ニューロメジンUのCRFニューロンへの作用

A: ラット脳における室傍核 (PVN) の位置. B: PVN の CRF 抗体と Fos 抗体を用いた免疫組織化学的二重染色. C: B の□の拡大, 細胞質の灰色は CRF 抗体による染色像, 点線内の黒色の核は Fos 抗体による染色像. D: オレキシン-A をラット脳室内投与したときの PVN における Fos/CRF ニューロンの比率. E: ニューロメジンU をラット脳室内投与したときの PVN における Fos/CRF ニューロンの比率.

応という神経回路が想定される。視床下部オレキシン系は脳内 CRF ニューロンの活性化を介して生体のストレス反応と深く関わっているようである。

一方、オレキシン産生ニューロンが CRF ニューロンによっても制御されていることが報告されている (38)。オレキシン産生ニューロンに CRF を含有する神経終末がシナプスしており、*in vitro* の実験でオレキシン産生ニューロンは CRF の投与により脱分極する。したがって、種々のストレス→CRF ニューロンの活性化→CRF の分泌→オレキシン産生ニューロンの活性化という神経回路の存在も明らかとなった。

また、ストレス反応として知られている“fight-or-flight” response (防御反応) にオレキシンが関与しているという興味深い報告もなされた (39)。オレキシンノックアウトマウスでは、防御反応が減弱していた。ストレス反応のメディエーターとしてのオレキシンの役割の重要性が今後さらに明らかになってくるものと思われる。

## 2) ストレス反応とニューロメジンU

ニューロメジンU (NMU) はブタ脊髄から平滑筋を収縮させるペプチドとして1985年に同定された (40)。その生理作用は十数年にわたり不明であったが、オーファン受容体 (FM3, 4) の内因性リガンドとして同定されるに至り、近年注目されている (41-45)。受容体は NMU1R および NMU2R と呼ばれている。NMU1R は末梢組織に、NMU2R は主に中枢神経系に存在する。脳内では NMU2R が視床下部 PVN や海馬 CA1 領域に多く分布している。NMU をラット脳室内に投与すると摂食抑制、胃酸分泌抑制、活動量増加、酸素消費量の増加、血圧・心拍数上昇、体温上昇、内分泌系のストレス反応である血中 ACTH とコルチコステロンが増加する。CRH ノックアウトマウスでは、NMU 投与による活動量の増加が見られないことから、CRH もしくは HPA 軸を介した行動の制御に関与していることが示唆された (46)。

我々は、オレキシンの場合と同様の実験により、覚醒ラット脳室内に NMU を投与すると PVN に c-fos

遺伝子の発現が見られること、ACTH 分泌と同時に AVP および OXT の分泌も促進することを見出した (47)。ただし、AVP の分泌反応に比べて OXT 分泌に対する効果の方が大きかった。さらに、NMU をラット脳室内に投与後、CRF と Fos タンパクに対する抗体を用いて免疫組織化学的二重染色を行ったところ、PVN 小細胞群に存在する CRF 陽性ニューロンのうち約 97% に Fos タンパクが見られ、コントロールでは約 1% であった (図 3)。以上より、ラット脳室内に投与した NMU は HPA 軸と下垂体後葉系を賦活化することを明らかにした (47, 48)。また、NMU ノックアウトマウスでは室傍核小細胞群において CRF 遺伝子の発現が減少していること、および NMU の脳室内投与により CRF mRNA が増加することも証明された (49)。

NMU は、主に視床下部に存在し、絶食により減少し、NMU 投与により摂食が抑制される“摂食抑制ペプチド”である。“摂食促進ペプチド”であるオレキシンと同様に“摂食抑制ペプチド”である NMU が HPA 軸を賦活化することは興味深い。

#### 4. おわりに

ストレスに対する生体反応が生じる背景に、視床下部の遺伝子群の発現変化が起こっている。これらの変化は、生体がストレスに対して適応するための巧妙な仕組みなのかもしれない。今後、益々ストレス研究はおもしろい領域となることが期待される。

### 文 献

- 1) Sawchenko PE, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1984;81:1883-1887.
- 2) Bullitt E. J Comp Neurol. 1990;296:517-530.
- 3) Chan RK, et al. J Neurosci. 1993;13:5126-5138.
- 4) Imaki T, et al. Endocr J. 1996;43:629-638.

- 5) Luckman SM, et al. Neuroscience. 1996;73:473-485.
- 6) Senba E, et al. Brain Res Bull. 1993;31:329-344.
- 7) Sharp FR, et al. J Neurosci. 1991;11:2321-2331.
- 8) Honkaniemi J, et al. Brain Res Mol Brain Res. 1994;25:234-241.
- 9) Larsen PJ, et al. J Neurosci. 1995;15:2609-2627.
- 10) Zerial M, et al. EMBO J. 1989;8:805-813.
- 11) Ryder K, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85:1487-1491.
- 12) Milbrandt J. Science. 1987;238:797-799.
- 13) Milbrandt J. Neuron. 1988;1:183-188.
- 14) Arima H, et al. J Neuroendocrinol. 1999;11:337-341.
- 15) Kawasaki M, et al. J Neuroendocrinol. 2005;17:227-237.
- 16) 上田陽一, 他. 脳の科学. 2002;24:239-246.
- 17) 藤原広明, 他. クリニカルニューロサイエンス. 2003;21:990-992.
- 18) Sakurai T, et al. Cell. 1998;92:573-585.
- 19) Date Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:748-753.
- 20) Peyron C, et al. J Neurosci. 1998;18:9996-10015.
- 21) Nambu T, et al. Brain Res. 1999;827:243-260.
- 22) Marcus JN, et al. J Comp Neurol. 2001;435:6-25.
- 23) Trivedi P, et al. FEBS Lett. 1998;438:71-75.
- 24) Moriguchi T, et al. Neurosci Lett. 1999;264:101-104.
- 25) Kurose T, et al. Regul Pept. 2002;104:145-151.
- 26) Briski KP, et al. Neuroreport. 2001;12:531-534.
- 27) Cai XJ, et al. Diabetes. 2001;50:105-112.
- 28) Zhu L, et al. Neuroreport. 2002;13:1351-1353.
- 29) Ida T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2000;270, 318-323.
- 30) Sakamoto F, et al. Regul Pept. 2004;118:183-191.
- 31) Estabrooke IV, et al. J Neurosci. 2001;21:1656-1662.
- 32) Kuru M, et al. Neuroreport. 2000;11:1977-1980.
- 33) Ferguson AV, et al. Front Neuroendocrinol. 2003;24:141-150.
- 34) Shirasaka T, et al. Am J Physiol. 1999;277:R1780-1785.
- 35) Samson WK, et al. Brain Res. 1999;831:248-253.
- 36) Takahashi N, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1999;254:623-627.
- 37) Okumura T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2001;280:976-981.
- 38) Winsky-Sommerer R, et al. J Neurosci. 2004;24:11439-11448.
- 39) Kayaba Y, et al. Am J Physiol. 2003;285:R581-593.
- 40) Minamino N, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1985;3:1078-1085.
- 41) Howard AD, et al. Nature. 2000;406:70-74.
- 42) Fujii R, et al. J Biol Chem. 2000;275:21068-21074.
- 43) Szekeres PG, et al. J Biol Chem. 2000;275:20247-20250.
- 44) Kojima M, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2000;276:435-438.
- 45) Raddatz R, et al. J Biol Chem. 2000;275:32452-32459.
- 46) Hanada T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2003;311:954-958.
- 47) Ozaki Y, et al. Endocrinology. 2002;143:4320-4329.
- 48) Yokota M, et al. Stress. 2004;7:109-112.
- 49) Hanada R, et al. Nat Med. 2004;10:1067-1073.

#### 著者プロフィール

上田 陽一 (うえた よういち)

産業医科大学医学部第 1 生理学教授, 医学博士。

◇ 1987 年 産業医科大学医学部卒業, '91 年 同大学大学院医学研究科博士課程修了, '92 年 同大学医学部第 1 生理学助手, '95 年 同大学医学部第 1 生理学講師, '00 年 同大学医学部第 1 生理学教授, 現在に至る。'91 年 英国 Babraham 研究所 (Cambridge) 研究員, '93-'95 年 英国 Bristol 大学医学部内科学教室 研究員。

◇ 専門分野: 神経生理学, 神経内分泌学

◇ 趣味: 映画

