

# ストレス応答のかなめ CRH 遺伝子

東北大学大学院情報科学研究科情報生物学

同医学系研究科分子内分泌学 井樋慶一

## 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) ニューロンはストレス情報を統合し、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を媒介として最終的に糖質コルチコイド分泌レベルを規定する。糖質コルチコイドは様々な生理作用を發揮しストレスから生体を防御する。このように CRH ニューロンはストレス時の内分泌応答における中心的な役割を担っている。

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。ヒト CRH も 41 個のアミノ酸残基からなるが、7 個のアミノ酸がヒツジと異なっている。ヒト、ラット、マウス CRH 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、この前駆体が酵素的に切断され CRH ペプチドが生成される。

## 2. PVN における CRH ニューロンの分布

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) に分れており、CRH は主として小細胞領域内側部に存在する (図 1)。

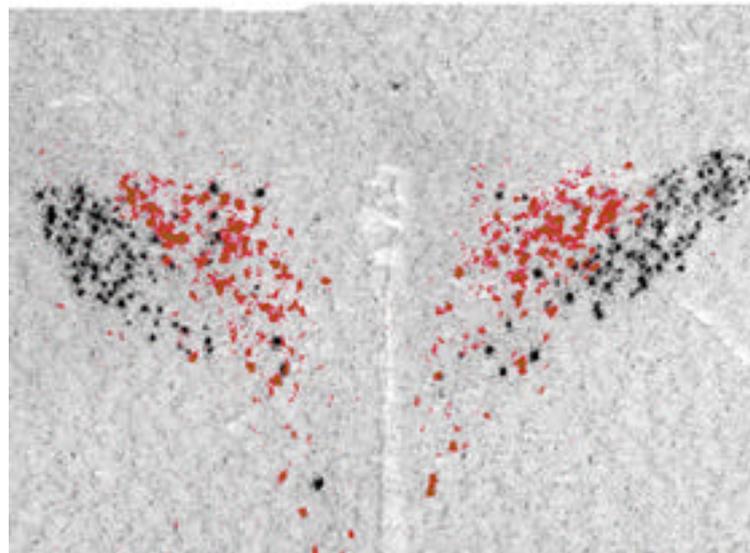


図 1. ラット PVN における CRH (赤) および AVP (黒) 産生細胞の分布.

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、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(図2)。

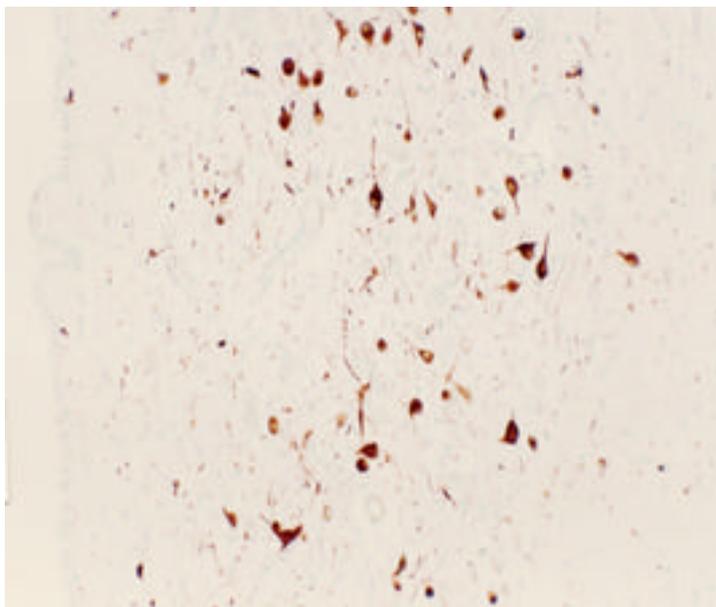


図2.ヒトPVN内CRHニューロン分布.

CRHとAVPは共に下垂体前葉からのACTH分泌を刺激し、同時に作用すると相乗的に働くことが知られている。強力なACTH分泌が必要な局面においては両者が共に分泌されることは好都合なことと考えられるが、生理的に両者の分泌がいかなる調節をうけているかは明らかでない。通常はCRHニューロンに共存するAVPは量的には少なく、PVN中大部分のAVPは大細胞領域に存在し、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。

### 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。

#### 3.1 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。脳幹部の A1 (延髄腹内側部) 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。

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 (文献 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 (文献 2)。遺伝子転写の速い変化を検出するために、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 (図 3、文献 3)。この NE 作用はプラゾシン脳室内前投与によって完全に抑制されたことから主として  $\alpha_1$  受容体を介するものと考えられる。

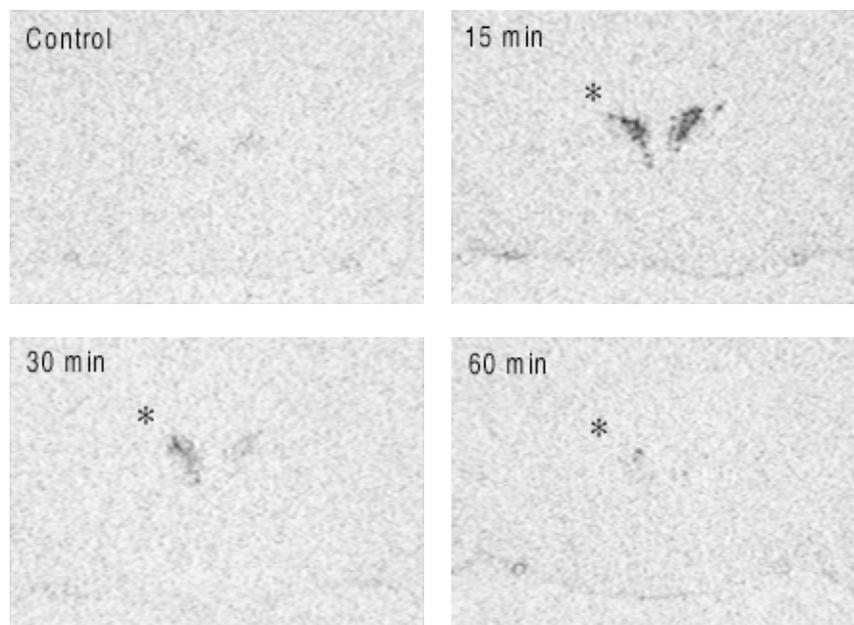


図 3 .PVN 内 NE 投与後 CRH hnRNA の変動 (\* NE 注入側)

### 3 . 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 遺伝子増加と平行して AVP 遺伝子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 AVP 転写レベルを特異的に定量するために 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ー上で AVP hnRNA のデジタル画像上に重ね合わせることで 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(文献3)。すなわち、CRH hnRNA が著増した早い時間では AVP hnRNA は変化が認められず、2 時間後に軽度増加が認められた。したがって 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た。

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(図4、文献4)。また、脱血ショックストレスや、IL1 末梢投与後は AVP 遺伝子転写が持続する傾向が認められた。AVP 遺伝子転写のスタートが CRH 遺伝子転写より遅い、あるいは持続的であるということは、ストレス応答の多様性として理解されるが、もしかすると慢性ストレス時に AVP が重要な役割を演ずるのかもしれない。

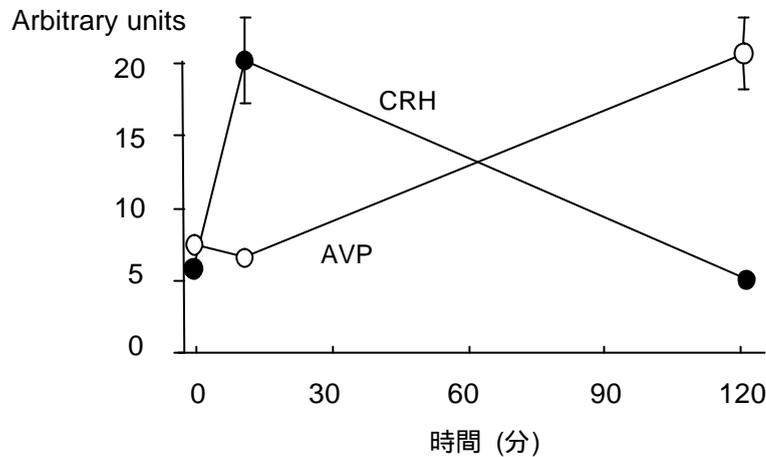


図4 .遊泳後 PVN 小細胞領域における CRH と AVP hnRNA の時間経過.

#### 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 の実験系で明らかとされた。8-Br-cAMP を直接無麻酔ラット PVN に注入した結果 CRH mRNA が増加する。さらに、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(文献5)。したがって、cAMP 依存性タンパクキナーゼ A 系を介しリン酸化 CREB が CRH 遺伝子転写に関与していることが明らかとなった。

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 カイネーシス系の関与の可能性が示唆される。最近、カルモジュリン・キナーゼ系を介する CRH 遺伝子調節系が明らかにされた(文献6)。

## 5 . まとめ

今回は脳内ストレス伝達系の中から代表的なものとして NE 系を取り上げたが、CRH ニューロンにはこのほかにも非常に多くの入力神経路が存在し、ストレスの種類に応じて信号が伝達されるものと考えられる。それぞれのストレスに対応し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。ストレス関連疾患の病態解明には慢性的に脳内神経路を活性化あるいは不活化した動物モデルが有用であり、CRH をはじめ神経内分泌ペプチドやそれら受容体の遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究が現在精力的になされている。これらの研究の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, Jiang Y-Q, Iwasaki Y, Watson SJ (2004) Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. **J Neuroendocrinol** 16, 348-355.
- 2) Itoi K, Suda T, Tozawa F, Dobashi I, Ohmori N, Sakai Y, Abe K, Demura H (1994) Microinjection of norepinephrine into the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in conscious rats. **Endocrinology** 135, 2177-2182.
- 3) Itoi K, Helmreich DL, Lopez-Figueroa MO, Watson SJ (1999) Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene transcription in the hypothalamus by norepinephrine. **J Neurosci** 19, 5464-5472.
- 4) Jiang Y-Q, Kawashima H, Iwasaki Y, Uchida K, Sugimoto K, Itoi K (2004) Differential effects of forced swim-stress on the corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene transcription in the parvocellular division of the paraventricular nucleus of rat hypothalamus. **Neurosci Lett** 358, 201-204.
- 5) Itoi K, Horiba N, Tozawa F, Sakai Y, Sakai K, Abe K, Demura H, Suda T (1996) Major role of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase A pathway in corticotropin-releasing factor gene expression in the rat hypothalamus in vivo. **Endocrinology** 137, 2389-2396.
- 6) Yamamori E, Asai M, Yoshida M, Takano K, Itoi K, Oiso Y, Iwasaki Y (2004) Calcium/calmodulin kinase IV pathway is involved in the transcriptional regulation of the corticotropin-releasing hormone gene promoter in neural cells. **J Mol Endocrinol** (in press).