



Regional distribution of growth hormone-releasing hormone(GHRH) receptor mRNA in the rat brain

高橋, 哲也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1811

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001811>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 高橋 哲也

(兵庫県)

博士の専攻
分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第75号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成10年3月31日

学位論文題目 Regional distribution of growth hormone-releasing
hormone(GHRH) receptor mRNA in the rat brain
(成長ホルモン分泌刺激ホルモン受容体 mRNAのラット脳内分布)審査委員 主査 教授 千原和夫
教授 馬場久光 教授 横野浩一

論文内容の要旨

I. はじめに

成長ホルモン分泌刺激ホルモン (growth hormone-releasing hormone, GHRH) は、成長ホルモンの合成、分泌に促進的に作用する視床下部ホルモンとして知られている。このGHRHは主に弓状核に存在するGHRHニューロンで合成される。これらニューロンは軸索を正中隆起へ延ばし、そこに運ばれたGHRHは下垂体門脈系を介して、下垂体前葉のソマトトロフに作用する。また、GHRHニューロンは弓状核以外、例えば、腹内側核、背内側核および前視床下部領域にも存在していることが知られている。これらの部位でのGHRHの役割は明らかではないが、下垂体以外でのいくつかの作用が知られている。ラットを用いて、GHRHの脳室内投与は食行動を亢進させる、また徐波睡眠を増すことが実験的に示されている。つまり、GHRHは下垂体前葉だけでなく、脳内においても神経伝達物質として働いていることが示唆されてきた。しかしながら、これまでその作用部位は不明であった。最近、ラット、ヒトおよびマウスでGHRH受容体のcDNAがクローニングされ、受容体発現の検討が可能となった。本研究において、我々はRNase protection assayを用いてラットGHRH受容体の脳内分布の検討を行い、さらにRT-PCRを応用することで、視床下部神経核でのGHRH受容体の発現を解析した。

II 方法

i) RNase protection assay : SD系ラットの脳内の各領域、つまり嗅球、尾状核、大脳皮質、海馬、視床下部、視床、小脳、脳幹、および下垂体前葉の各組織片からそれぞれ15 μ gのtotal RNA プローブを作製し、RNase protection assayにより、脳内の各領域の粗抽出したtotalRNA中のGHRH受容体mRNAの発現量を解析した。

ii) 視床下部神経核の単離 : Palkovitsの方法に準じて、-10°Cに設定したクライオスタッフで300 μ Mラットの脳の薄切片を作り、ステンレス針で神経核を打抜き、個々の視床下部神経核を含む微量

組織片を採取した。

iii) RT-PCR およびサザンプロット解析：ii) で採取した室周囲核, 室傍核, 弓状核, 腹内側核, および前視床下部領域の御陵組織片をグアニジン法で処理を行い, RNAを粗抽出した。これをテンプレートとして, ラットGHRH受容体cDNAの739-757nt, 1285-1302ntに相当する合成オリゴヌクレオチドを用いて, RT-PCRを行った。このPCR産物はアガロースゲル電気泳動で展開, エチジウムプロミド染色で解析した。さらにGHRH受容体cDNA断片をプローブとしてサザンプロット法でも解析した。

III 結果および考察

RNase protection assayにより, すでに報告されているように下垂体前葉でのGHRH受容体の発現を確認した。これまで脳内でのGHRH受容体の発現は明らかにされておらず, 今回, 我々のRNase protection assayによる検討では, 視床下部にのみ発現がみとめられ, 嗅球, 尾状核, 大脳皮質, 海馬, 視床, 小脳, および脳幹には認められなかった。

次に, *in situ*ハイブリダイゼーション法によりGHRH受容体の視床下部内での発現部位の検討を試みたが, GHRH受容体 mRNA陽性細胞の同定は困難であった。この理由として, GHRH受容体 mRNAの発現量は, *in situ*ハイブリダイゼーション法で検出できるほど多くないことが考えられた。

これを克服するため, Palkovitsが報告した視床下部神経核の単離法とRT-PCRを組み合わせ, 少なくとも, 定性的にGHRH受容体の視床下部内での発現部位を明らかにすることを試みた。その結果, 期待されるサイズのPCR産物は室傍核ではみられなかつたが, 室周囲核, 弓状核, 腹内側核, 前視床下部領域で増幅され, GHRH受容体mRNAの発現がみられた。これらの神経核領域はGHRHの作用部位であると考えられる。腹内側核は食行動と関係することが知られている。実際に, GHRHの脳室内投与により, 食餌摂取が増加することがラットで示されている。また, 室周囲核ではGHRH含有ニューロンとSRIF含有ニューロンとのシナプス結合が組織学的に証明されている。弓状核内ではGHRH含有ニューロン同士のシナプス結合が示されている。我々の得た結果は, 少なくとも, これらの事実と矛盾しない。

また, これらのPCR産物をナイロン膜に転写し, サザンプロットを行うと, エチジウムプロミド染色で解析した時と同様, 室傍核では陽性シグナルは得られなかつたが, 大脳皮質では認められた。意義は不明であるが, この結果は, 大脳皮質にもGHRH受容体mRNAが少量存在することを示している。さらに, 微量ではあるが, 脳内に広く分布している可能性も推測される。

このRT-PCRによる解析で, もうひとつの興味深い結果は前視床下部と弓状核において明らかにサイズの小さなバンドが見られたことである。Mayoらによると123塩基対の介在するGHRH受容体のvariant formの存在が報告されている。ここで検出されたバンドは明らかにサイズが小さく, このvariant formとは異なる。またGHRH受容体cDNAプローブを用いたサザンプロット解析からは, 非特異的な増幅産物ではなく, あきらかにGHRH受容体遺伝子の一部に相当するものであると考えられる。また, 前視床下部と弓状核においてのみ検出される点も興味深く, short formのGHRH受容体のサブタイプの存在する可能性を示唆する。

論文内容の要旨

成長ホルモン (GH) 分泌は視床下部より分泌されるGH放出ホルモン (GHRH) とソマトスタチンにより中枢性に調節されている。GHRHは視床下部弓状核に存在するGHRHニューロンで合成され、その軸索を運ばれ神経末端より下垂体門脈血中へ放出され下垂体前葉へ到達しGH分泌を促進し、逆にソマトスタチンは脳室周囲核に細胞体をもつソマトスタチンニューロンで合成され同様に下垂体に運ばれGH分泌を抑制する。また、GHRHニューロンは弓状核以外、たとえば腹内側核、背内側核および前視床下部領域にも存在しているが、その生理的役割は明らかでない。一方、ラットにおいてGHRHの脳室内投与は食行動を亢進させ、徐波睡眠を増加させることが知られており、GHRHは下垂体前葉でGH分泌を刺激するにとどまらず、中枢神経系において神経情報伝達物質あるいはその修飾物質として働く可能性が示唆されてきた。しかしその作用部位すなわち受容体分布は不明であった。そこで申請者は、RNase protection assayを用いてラットGHRH受容体mRNAの脳内分布をまず調べた。SD系ラットの脳内の各部位組織片からtotal RNAを調節し、ラットGHRH受容体cDNAのアンチセンスRNAプローブを用いてGHRH受容体mRNA量をRNase protection assayで測定したところ、下垂体前葉のほかに視床下部に有意に高いmRNA量を検出した。嗅球、尾状核、大脳皮質、海馬、視床、小脳および脳幹にはGHRH受容体mRNAは検出されなかった。視床下部内の局在をより詳細に調べるため、当初 *in situ* hybridization法を試みたがGHRH受容体mRNAの発現量が少ないと認められ、そこで、Palkovets法に準じてラット視床下部神経核を採取しRT-PCRと組み合わせてGHRH受容体mRNA発現を調べたところ室周囲核、弓状核、腹内側核、前視床下部領域に明らかなmRNAの発現を認めた。腹内側核は食行動と関係することが知られているのでGHRH脳室内投与後の食行動亢進は腹内側核GHRH受容体を介する可能性が考えられる。また室周囲核ではGHRHニューロンとソマトスタチンニューロンとのシナプス結合が、そして弓状核内ではGHRHニューロン同士のシナプス結合が組織学的に証明されており、これらのシナプスではGHRHニューロン受容体を介して神経情報伝達が行われると考えられる。今回の研究で得られたもう一つの興味深い成績は前視床下部と弓状核において明らかにサイズの小さなバンドが見られたことである。Mayoらによると123塩基対の介在するGHRH受容体のvariant formの存在が報告されているが、ここで検出されたバンドはサイズが明らかに小さくMayoらの報告したvariant formとは異なる。GHRH受容体cDNAプローブを用いたサザンブロット解析から、このバンドは非特異的な増幅産物ではなく、GHRH受容体遺伝子産物の一部に相当するものであると考えられる。このshortformのGHRH受容体が前視床下部と弓状核においてのみ検出される点が興味深いがその生理的意義については今後検討されねばならない。以上、本研究はGHRHの中枢神経系への作用機構を明らかにするため、GHRH受容体の発現部位を研究したものであるが、従来知られていなかったGHRH受容体mRNAの視床下部内の局在について重要な地検を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学にを得る資格があると認める。