

博士(医学) 余 語 宏 介

論文題目

Neuropeptide W stimulates adrenocorticotrophic hormone release *via* corticotrophin-releasing factor but not *via* arginine vasopressin

(Neuropeptide W はバゾプレッシンではなく corticotrophin-releasing factor を介して ACTH 分泌を刺激する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

主に脳内に存在するとされたリガンド不明の G 蛋白質共役受容体 GPR7(以後、NPBWR1 に統一)に対するリガンドとして neuropeptide W (NPW)が分離された。既に、NPBWR1 の発現が室房核で報告されており、今回、我々は NPW が corticotropine-releasing factor (CRF)や arginine vasopressin (AVP)を介して視床下部—下垂体—副腎(HPA)軸の活性に関与するか否か検討した。

[材料ならびに方法]

1. ラット下垂体・副腎単層培養細胞への NPW 添加

雄 SD ラット(6 週齢)の下垂体前葉細胞・副腎皮質細胞を採取し、 1×10^5 細胞/0.5 mL を各 well に散布してそれぞれ 4 日間・3 日間培養した。vehicle もしくは NPW $10^{-12} \sim 10^{-8}$ M を添加、また vehicle もしくは NPW $10^{-12} \sim 10^{-8}$ M に下垂体前葉細胞には CRF 1 nM を、副腎皮質細胞には ACTH 40 pM を加えた溶液も添加した。それぞれ ACTH・corticosterone を測定した。

2. ラットへの NPW 静脈内投与 (i.v.)の効果

頸静脈カニューラ留置後の非拘束下ラットを用いて、60 分間の安静後に生理食塩水(NSS) 200 μ L、NPW 2.5 nmole/200 μ L もしくは NPW 25 nmole/200 μ L を静脈内投与し、ACTH を測定した。

3. ラットへの NPW 側脳室内投与 (intracerebroventricular; i.c.v.)の効果

側脳室カニューラと頸静脈カニューラ留置後の非拘束下ラットを用いて、60 分間の安静後に NSS 10 μ L、NPW 2.5 nmole/10 μ L もしくは NPW 5.0 nmole/10 μ L を側脳室内投与し、ACTH を測定した。

4. ラットへの CRF 受容体拮抗薬・バゾプレッシン受容体拮抗薬による前処置後の NPW i.c.v.の効果

側脳室カニューラと頸静脈カニューラ留置後の非拘束下ラットを用いて、60 分間の安静後に前処置として NSS 200 μ L、CRF 受容体拮抗薬(Astressin) 100 μ g/kg/200 μ L もしくはバゾプレッシン受容体拮抗薬(V1/3 antagonist) 25 μ g/kg/200 μ L を静脈内投与した。15 分後に NPW 2.5 nmole/10 μ L を側脳室内投与し、ACTH を測定した。また対照として、NSS 200 μ L i.v.で前処置した 15 分後に NSS 10 μ L を側脳室投与した。

[結果]

1. ラット下垂体・副腎単層培養細胞への NPW 添加

$10^{-12} \sim 10^{-8}$ M の NPW は下垂体・副腎単層培養細胞において、それぞれの ACTH・corticosterone 分泌に影響を与えず、また下垂体細胞において CRF の ACTH 分泌促進作用や副腎細胞での ACTH の corticosterone 分泌促進作用にも影響を与えなかった。

2. ラットへの NPW i.v.の効果

NPW の末梢静脈内投与は血中 ACTH 濃度に影響を与えなかった。

3. ラットへの NPW i.c.v.の効果

NSS の側脳室投与は血中 ACTH 濃度を有意に上昇させなかったが、NPW の側脳室投与は 2.5 および 5.0 nmole の両用量で投与後 15 および 30 分共に有意に血中 ACTH 濃度を上昇させた。また、NSS、NPW 2.5 nmole および NPW 5.0 nmole の 3 群間で多変量解析を行うと NPW 2.5 nmole および NPW 5.0 nmole 群ともに 15～60 分に NSS 群と比較して有意な血中 ACTH 濃度の増加を認めた。

4. ラットへの CRF 受容体拮抗薬・バゾプレッシン受容体拮抗薬による前処置後の NPW i.c.v.の効果

NSS の前処置で NPW 側脳室投与後に ACTH の上昇を認めたのに対し、CRF 受容体拮抗薬の前処置では NPW 側脳室投与 15 および 30 分後の血中 ACTH 濃度増加が抑制された。バゾプレッシン受容体拮抗薬での前処置では、NPW 側脳室投与による血中 ACTH 濃度増加に影響しなかった。また、各時間毎に 15 分値で NSS 群と CRF 受容体拮抗薬群の間に有意な血中 ACTH 濃度の差を認めた。

[考案]

下垂体前葉培養細胞および副腎皮質培養細胞において、NPW がそれぞれ ACTH および corticosterone 分泌に影響を与えなかったこと、さらに、NPW の静脈内投与が血中 ACTH 濃度に影響を与えなかったことは、NPW による HPA 系活性化が NPBWR1 mRNA の発現が確認されている下垂体や副腎への直接作用ではないことを示唆した。下垂体前葉からの ACTH 分泌は CRF や AVP のような視床下部因子によって調節されており、NPW の側脳室内投与により血中 ACTH 濃度が上昇したことは、NPW の HPA 系活性化に CRF や AVP が関与している可能性を示唆した。今回の検討で、CRF 受容体拮抗薬が NPW の ACTH 分泌増加作用を阻害したのに対し、バゾプレッシン受容体拮抗薬は NPW の ACTH 分泌増加作用を阻害できないことを示した。以上から、NPW は視床下部 CRF を介して HPA 系を活性化していると考えられた。NPBWR1 は室傍核に発現が確認されており、NPW が室傍核の CRF ニューロンに作用し、正中隆起に CRF を放出していることが示唆された。NPW の脳室内投与後 15 分という早い時相に ACTH 濃度が最高点に達したことは室傍核が脳室近傍に位置することに合致すると考えられた。

[結論]

NPW の HPA 系活性化作用は下垂体・副腎への直接作用ではなく、視床下部を介して発揮されるものであることを示した。また、NPW 中枢投与による HPA 系活性化は AVP ではなく CRF を介していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

G 蛋白質共役受容体 NPBWR1 のリガンドとして neuropeptide W (NPW) が分離された。NPBWR1 の発現が室房核で報告されていることから、申請者は NPW が corticotropine-releasing factor (CRF) や arginine vasopressin (AVP) を介して視床下部—下垂体—副腎 (HPA) 軸の活性に関与するか否か検討した。

1. 雄SDラット(6週齢)の下垂体前葉細胞・副腎皮質細胞を培養し、NPW 10^{-12} – 10^{-8} Mを添加し、それぞれ ACTH/corticosterone を測定した。2. 頸静脈カニューラ留置後の非拘束下ラットを用いて、NPW 2.5–25 nmole/200 μ L を静脈内投与し、ACTH を測定した。3. 側脳室カニューラと頸静脈カニューラ留置後の非拘束下ラットを用いて、NPW 2.5–5.0 nmole/10 μ L を側脳室内投与し、ACTH を測定した。さらに、CRF 受容体拮抗薬(Astressin) 100 μ g/kg/200 μ L ないしバゾプレッシン受容体拮抗薬(V1/3 antagonist) 25 μ g/kg/200 μ L を静脈内投与した後に NPW を側脳室内投与し、ACTH を測定した。

NPWは下垂体・副腎単層培養細胞のACTH/corticosterone分泌および、CRF/ACTH作用を介した分泌への修飾に影響を与えなかった。また、末梢静脈内投与でも血中ACTH濃度に影響を与えなかった。しかし、側脳室投与では量依存的に有意に血中ACTH濃度を上昇させた。この上昇はCRF受容体拮抗薬の前処置で抑制されたが、バゾプレッシン受容体拮抗薬での前処置は影響しなかった。以上から、NPWは室傍核のCRFニューロンに作用し、CRF放出を促していることが示唆された。

NPWのHPA系活性化作用は下垂体・副腎への直接作用ではなく視床下部への作用を介しており、AVPではなくCRFが関与していると考えられた。

審査委員会では、NPWの副腎に対する作用が、視床下部のCRFを介したACTH分泌によるHPA軸の活性化によるものであることを、申請者が初めて証明した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 福田 敦夫
副査 緒方 勤 副査 佐藤 康二