

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07072

研究課題名（和文）アストロサイトを中心とした脳内バソプレシンネットワーク機能の検討

研究課題名（英文）The examination of role of astrocyte in brain vasopressin network

研究代表者

中村 和昭（Nakamura, Kazuaki）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・室長

研究者番号：80392356

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、バソプレシン（AVP）がアストロサイトに作用することにより、アストロサイト機能を制御し、直接・間接的に高次脳機能や神経細胞保護を制御しているとの仮説を立て、AVPによるアストロサイト機能制御機構について検討を行うことを目的とした。神経障害に対するAVPの神経保護作用の検討、社会性行動に対するAVPの作用の検討、AVPによる脳内グルタミン酸濃度へのAVP受容体欠損マウスを用いて行い、脳虚血モデルにおけるAVPの神経保護作用、AVPの社会性行動に対する影響、AVPによる脳脊髄液中のグルタミン酸濃度の変動を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AVPの中樞神経系における作用は不明な点が多いが、本研究でその一端が明らかとなった。AVPは虚血性脳疾患に対する神経保護作用を有している可能性が示され、脳障害の治療薬として利用できる可能性がある。また、AVPが性行動の制御に関与している可能性が示され、社会行動制御機構の解明につながる成果となると期待される。さらに、AVPが神経伝達物質であるグルタミン酸の脳内での濃度の制御に関与している可能性が示され、神経上場伝達機構の理解に資する成果となると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was hypothesized that vasopressin (AVP) acts on astrocytes to control astrocyte function, and directly or indirectly controls higher brain functions and neuronal cell protection. The purpose of this study was to investigate the mechanism of astrocyte function control by AVP. Examination of the neuroprotective effect of AVP against neuropathy, examination of the effect of AVP on social behavior, and the effect of AVP on brain glutamate concentration were carried out using AVP receptor-deficient mice. We clarified the neuroprotective effect of AVP in the cerebral ischemia model, the effect of AVP on social behavior, and the variation of glutamate concentration in cerebrospinal fluid by AVP.

研究分野：実験薬理学、神経内分泌学

キーワード：バソプレシン 受容体 神経細胞 アストロサイト 神経保護 社会性行動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルギニンバソプレッシン(AVP)は、9個のアミノ酸からなるペプチドであり、受容体としてV1及びV2受容体が知られている。このうちV1受容体は、更にV1a受容体とV1b受容体の2つに分類されている。AVPは下垂体後葉ホルモンとして知られているが、その受容体は末梢標的器官に加え、脳内にも分布している。特にV1a受容体は中隔、大脳皮質、海馬および視床下部に広く分布しており、V1b受容体もまた大脳皮質、海馬、視床下部に分布している。近年、このように脳内に広く分布するAVP受容体と様々な発達障害・精神疾患との関連を示唆する知見が多数報告されている。例えば、自閉症とV1a受容体の遺伝的多型が関係していることが報告されている。また、V1b受容体の一塩基多型がうつ病の感受性に関与することが報告されている。あるいは、V1a受容体遺伝子のプロモーター領域に存在するマイクロサテライト多型と摂食行動との関連も報告されている^{1,2)}。一夫多妻制をとる雄ハタネズミの脳にV1a受容体を発現させると、その雄ハタネズミは特定の雌と一緒にいる時間が長くなり子育てをするようになったことから³⁾、AVPは「家庭を大切にせず、浮気をしてしまうような困った夫を理想的な夫に変貌させる物質」としても注目を集めた。一方、これまでにグルタミン酸誘導性海馬神経細胞死に対してAVPが神経細胞保護作用を示すことが報告されている⁴⁾。このようにAVPは高次脳機能や神経細胞保護に広く関与していると考えられ、多機能な神経機能調節因子と捉えることができる。しかし、AVPの脳内における機能及びその作用機序については未だ不明な点が多い。例えば、V1a受容体とV1b受容体はその機能面において相互作用するのか、あるいは機能の相補性があるのか、それぞれの受容体の細胞レベルでの局在はどのようになっているのか等の詳細は明らかではない。同時に両受容体とも脳内グリア細胞であるアストロサイトでの発現が報告されているが、アストロサイトにおける両受容体の機能、アストロサイトの発生や機能制御におけるAVP作用及び発達障害・精神疾患との関連など、アストロサイトに着目したAVP/AVP受容体の脳内AVP機能発現における位置づけ、役割分担、機能的相補性等の解析は不十分である。したがって、発達障害、精神疾患、行動、記憶のような高次脳機能制御や神経細胞保護におけるAVP機能の全容解明には、これまでの神経細胞に着目した研究に加え、アストロサイトにも着目したAVP研究が必須である。

2. 研究の目的

本研究では、AVPがアストロサイトに作用することにより、アストロサイト機能を制御し、直接・間接的に高次脳機能や神経細胞保護を制御しているとの仮説を立て、AVPによるアストロサイト機能制御機構について検討を行うことを目的とした。そのため、AVPの脳内作用の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) アストロサイトに対するバソプレッシン作用のin vitro評価系の検討

In vitro系においてアストロサイトに対するAVP作用の検討を行うため、V1a受容体およびV1b受容体遺伝子を発現するアストロサイト細胞株の探索を行った。マウスアストロサイト株KT-5細胞、ヒトアストロサイトマ細胞株1321N1細胞を用いて、V1a受容体およびV1b受容体遺伝子発現の検出をRT-PCRにて行った。

(2) 神経障害に対するバソプレッシンの神経保護作用の検討

神経障害のin vitroモデルとして、低酸素低グルコース負荷(Oxygen Glucose Deprivation: OGD)モデルにおける初代培養海馬神経細胞障害におけるAVPの神経保護作用を検討した。マウス胎生18日より海馬を単離・分散し、B27含有培地で初代培養を10日間行った後、95% N₂/5% CO₂、グルコース不含培地(OGD条件)で培養した。OGD条件下で24時間培養し、細胞生存率を測定した。OGD条件下での培養液にAVPを添加し、AVPによる神経保護作用を検討した。

(3) 社会性行動に対するバソプレッシンの作用の検討

野生型(WT)、V1a受容体/V1b受容体ダブルノックアウト(dKO)雄マウスを用いて、発情雌臭に対する嗅覚選好性テスト、性行動テスト、オープンフィールド(OF)テスト、高架式十字迷路(EPM)テストを行い、性行動の評価と不安行動の評価を行った。

(4) AVPによる脳内グルタミン酸レベルの測定

野生型(WT)、V1a受容体ノックアウトマウス、V1b受容体ノックアウトマウス、V1a受容体/V1b受容体ダブルノックアウト雄マウスより、脳脊髄液を採取しグルタミン酸濃度を測定した。また生理食塩水あるいはカイニン酸投与後に脳脊髄液を採取し、グルタミン酸濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) アストロサイトに対するバソプレッシン作用のin vitro評価系の検討

アストロサイト初代培養系では、V1a受容体およびV1b受容体遺伝子発現が確認される。アストロサイトにおけるバソプレッシン機能の関与を検討するために、アストロサイト細胞株にお

いて V1a 受容体および V1b 受容体遺伝子を発現する細胞株の探索を行い、in vitro 系での評価を試みたが、V1a 受容体および V1b 受容体遺伝子を発現するアストロサイト株を見出すに至らなかった。脳内の生理学的条件あるいは初代培養細胞ではアストロサイトに V1a 受容体および V1b 受容体遺伝子が発現していると考えられるが、株化細胞においては、V1a 受容体および V1b 受容体遺伝子発現が消失していると考えられた。今後は初代培養のアストロサイトと神経細胞の共培養系やアストロサイト特異的バソプレシン受容体遺伝子欠損マウスを用いて、バソプレシンのアストロサイトを介した中枢神経系におけるバソプレシン機能を検討していく。

(2) 神経障害に対するバソプレシンの神経保護作用

脳虚血の培養系モデルである低酸素低グルコース負荷 (Oxygen Glucose Deprivation: OGD) モデルにおける初代培養海馬神経細胞障害をバソプレシンが抑制することを見出した。またバソプレシン受容体を発現させた培養細胞において、バソプレシン刺激により、ERK および AKT のリン酸化が惹起されることを見出し、バソプレシンにおける神経保護作用が ERK-MAP キナーゼ系 (細胞増殖シグナル) 及び phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt 系 (生存シグナル) を介して発揮されていることを示唆した。この結果は海馬神経細胞の虚血性神経細胞死においてバソプレシンが直接的に神経保護作用を有することを示している。一方で脳内においては多数のアストロサイトが存在し、アストロサイトにバソプレシン受容体が発現していると考えられると、バソプレシンによるアストロサイトの機能制御が、神経細胞保護に何らかの形で関与している可能性が考えられる。

(3) 社会性行動に対するバソプレシンの作用

AVP の脳内における v1a 受容体、v1b 受容体 をダブルノックアウト (dKO) した雄マウスと野生型 (WT) 雄マウスの行動を比較し、AVP の社会行動における役割を検討した。週 1 回、計 4 回行った発情雌臭に対する嗅覚選好性テストでは、dKO 雄と WT 雄の行動に差は見られなかったが、各選好性テストの直後に行った性行動テストは、大型の観察ケージにさまざまなオブジェクトをおき、豊かな環境下で行ったところ、dKO 雄は WT 雄に比べ有意に追従回数が多く、マウント回数も多くなった。また、dKO 雄は WT 雄よりチューブに入る時間が有意に短かった。これらのテストの間隔 (別日) にオープンフィールド (OF) テストと高架式十字迷路 (EPM) テストを行ったところ、dKO 雄の不安様行動は WT に比べて低いことが分かった。OF の中央に円柱形のケージに入れた発情雌または非発情雌を置いて行動観察したところ、dKO 雄は WT 雄よりも発情雌近傍で有意に長い時間費やしたが、非発情雌では WT 雄と差が見られなかった。OF に非生物である置物を置いて観察した場合にも、dKO 雄と WT 雄には差が見られなかった。以上の結果から、複雑な環境下では dKO 雄は WT 雄よりも発情雌を追いかけ、交尾を試みるということが分かった。これは、EPM や OF テストでみられた低い不安傾向を反映しているとも考えられるが、dKO 雄は OF において発情雌対してのみ積極的な接近を示したことから、不安傾向以外の要因も関与していることが示唆された。

(4) バソプレシンによる脳内グルタミン酸レベルの制御

上記現象の脳内機構を明らかにするために、野生型マウス、V1a 受容体遺伝子欠損マウス、V1b 受容体遺伝子欠損マウスおよび V1a 受容体および V1b 受容体遺伝子の二重欠損マウスの脳脊髄液中のグルタミン酸濃度の測定を行い、野生型マウスと比べ V1a 受容体/V1b 受容体遺伝子の二重欠損マウスにおいて脳脊髄液中のグルタミン酸濃度が有意に低下していることを見出した。さらにグルタミン酸のアナログであるカイニン酸を投与した場合、V1b 受容体遺伝子欠損マウスにおいて、生理食塩水投与と比べて脳脊髄液中のグルタミン酸濃度が有意に上昇することを見出した。神経伝達物質であるグルタミン酸は、神経細胞から分泌されアストロサイトにより取り込まれることが知られている。avpr1b 遺伝子欠損マウスにおいて、カイニン酸投与後の脳脊髄液中グルタミン酸が顕著に上昇したことから、アストロサイトにおけるグルタミン酸取り込みが、V1b 受容体を介してバソプレシンにより調節されていることが示唆される。今後は、V1b 受容体を介したバソプレシンによるアストロサイトでのグルタミン酸取り込み調節機構を検討するとともに、海馬初代神経細胞/アストロサイトの共培養系を用いて、グルタミン酸毒性に対するアストロサイトの神経保護作用を検討していく。

< 引用文献 >

Taka-aki Koshimizu, Kazuaki Nakamura, Nobuaki Egashira, Masami Hiroshima, Hiroshi Nonoguchi, Akito Tanoue. Vasopressin V1a and V1b Receptors: From Molecules to Physiological Systems, *Physiol Rev.* 92, 2012, 1813-1864.

Nobuaki Egashira 1, Kenichi Mishima, Katsunori Iwasaki, Ryoza Oishi, Michihiro Fujiwara. New Topics in Vasopressin Receptors and Approach to Novel Drugs: Role of the Vasopressin Receptor in Psychological and Cognitive Functions. *J Pharmacol Sci.* 109, 2009, 44-49.

Miranda M Lim 1, Zuoxin Wang, Daniel E Olazábal, Xianghui Ren, Ernest F Terwilliger, Larry J Young. Enhanced Partner Preference in a Promiscuous Species by Manipulating the Expression of a Single Gene. *Nature.* 429, 2004, 754-757.

J Chen 1, G Aguilera. Vasopressin Protects Hippocampal Neurones in Culture Against Nutrient Deprivation or Glutamate-Induced Apoptosis. *J Neuroendocrinol.* 10, 2010, 1072-1081.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimizu Kie, Nakamura Kazuaki, Yokosuka Makoto, Kondo Yasuhiko	4. 巻 197
2. 論文標題 Modulation of male mouse sociosexual and anxiety-like behaviors by vasopressin receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 37 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2018.09.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takizawa Mai, Harada Kazuki, Nakamura Kazuaki, Tsuboi Takashi	4. 巻 501
2. 論文標題 Transient receptor potential ankyrin 1 channels are involved in spontaneous peptide hormone release from astrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 988 ~ 995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura K., Velho G., Bouby N.	4. 巻 282
2. 論文標題 Vasopressin and metabolic disorders: translation from experimental models to clinical use	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 298 ~ 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joim.12649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shimizu K, Nakamura k, Yokosuka M, Kondo Y.
2. 発表標題 Enhancement of Sexual Behavior in v1a-v1b double KO Male Mice.
3. 学会等名 9th International Congress of Neuroendocrinology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maekawa F, Sano K, Kimura E, Nakamura K.
2. 発表標題 Behavioral profile of mice genetically deficient in vasopressin 1a and/or 1b receptors in the IntelliCage.
3. 学会等名 The 11th FENS Forum of Neuroscience. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水稀恵、中村和昭、近藤保彦
2. 発表標題 バソプレシン受容体V1a, V1b欠失マウスによるマウスの社会行動
3. 学会等名 第45回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水稀恵、岩倉未幸、佐藤咲希、中村和昭、山田一夫、近藤保彦
2. 発表標題 仔マウスにおける母親選好性の発達
3. 学会等名 第29回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村和昭
2. 発表標題 バソプレシンV1受容体欠損マウスによるバソプレシン作用へのアプローチ
3. 学会等名 日本解剖学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村和昭
2. 発表標題 パソプレシンV1受容体欠損マウスからのパソプレシン作用へのアプローチ
3. 学会等名 日本下垂体研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----