

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日 現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590252

研究課題名（和文）前脳のアミノ酸受容体を介する ADH 分泌調節機序における
神経ステロイドの役割の解明研究課題名（英文）Evaluation of the role played by neurosteroids in the ADH-releasing mechanism
mediated by forebrain receptors for amino-acid transmitters

研究代表者

山口 賢一（YAMAGUCHI KEN'ICHI）

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：50108023

研究成果の概要（和文）：血漿浸透圧の上昇や血液量の減少は主な ADH 分泌促進因子である。両刺激は、前脳(AV3V)に分布する GABA(A)受容体(-R)の活性を下げることにより、視床下部の ADH 分泌細胞を興奮させる。この受容体には、そのサブユニット構成により、強いステロイド感受性を持つタイプがある。しかし、神経ステロイド(NS)やその産生阻害薬を AV3V に与えても、基礎状態や GABA(A)-R の阻害、更に血漿浸透圧上昇や血液量減少によってもたらされる ADH 分泌はどれも変わらない。従って、ADH 分泌に働く AV3V の GABA(A)-R は、少なくとも急性的には NS による活性調節を受けないこと、換言すればステロイド感受性のサブユニットを含むものではない、と考えられる。

研究成果の概要（英文）：An increase in plasma osmolality and a decrease in blood volume are primary factors to facilitate ADH secretion. Both stimulus excites hypothalamic ADH-releasing cells by causing inactivation of the GABA(A) receptor in a forebrain region called the anteroventral third ventricle (AV3V). It is well known that the GABA(A) receptor includes a lot of subtypes, among which there exists a subtype whose binding affinity to GABA is highly affected by steroids generated in the brain tissue (neurosteroids, NS). However, topical infusions in the AV3V with NS or an inhibitor for the synthesis of NS affected neither basal ADH release nor stimulated ADH secretion by pharmacological blockade of the GABA(A) receptor, plasma hyperosmolality or blood hypovolemia. These results suggest that AV3V GABA(A) receptors involved in ADH secretion may not be regulated acutely at least by NS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：第三脳室前腹側部 (AV3V), GABA (-アミノ酪酸), グルタミン酸 (Glu), 神経ステロイド, 抗利尿ホルモン (ADH), 浸透圧上昇, 低容量減少, 心血管系

1. 研究開始当初の背景

血漿浸透圧の上昇と血液量の減少は視床下部にある抗利尿ホルモン(ADH)分泌神経を興奮させる二大因子である。浸透圧上昇は血液-脳関門の弱い第三脳室腹側前部(AV3V)で感受され、その情報は神経連絡を介して視床下部に送られ、ADH神経を刺激する。私は、このADH神経興奮のしくみは、基礎状態で活発に働いている抑制性GABA神経の活動が、浸透圧上昇により抑制されるためである、と報告した [Brain Res Bull 77 (2008) 61-69]。他方、血液量の減少によって生じた末梢の圧/容量情報が脳幹に到達後、どのような神経回路を通りADH神経を興奮させるのか、という問題は良く分かっていない。私は過去の研究から、圧/容量情報もAV3Vの神経機構を通じてADH神経を興奮させることを示す結果を得ていることから [Brain Res Bull 71(2006) 183-192]、今回、低容量(脱血)刺激したADH分泌におけるAV3VのGABA受容体(Rs)の役割を詳しく調べた。

続いて、AV3Vで産生される神経伝達物質(NS)が、ADH分泌その他の自律機能を調節するAV3Vの神経機構に対し、どんな影響を与えるのかという問題を追及した。上記のように、AV3Vでは、普段GABA神経が向イオン性の(A)-Rsを介して強く働き、ADH分泌、心血管機能、血糖値等を低く抑えている。この(A)-Rsは、5つの異なるサブユニットから構成されるので、その組合せにより、多くのサブタイプがある。そのうち、サブユニットをもつGABA(A)-Rsは、海馬、視床、小脳等で持続的、かつ緊張的な抑制作用を媒介し、その活性は、神経伝達物質によって強く修飾されることが知られている。AV3VにはNS-RsやそのmRNAが存在し [Prog Brain Res 91(1992)271-277]、サブユニット処理はAV3V神経の興奮性を左右する [Neurosci Lett 202 (1996) 153-156] と言われ、サブユニット-Rsをもつ神経の一部は、ADH細胞のある視索上核に軸索を伸ばしている [Neuroscience 78 (1997) 215-228]、と報告されている。さらに、NSの神経作用は、慢性的同様、急性的にも発現し、視床下部のNS含有量は、ストレス負荷後数分で激増する [Biochemical Basis Neuropharmacology, 8th ed (2003), Oxford]、とも言われる。こうした理由から、NSはAV3VにおいてGABA(A)-Rsの機能と関連し、或いは独立的に、ADH分泌その他の事象の調節に係わる可能性がある。しかし、基礎状態や高浸透圧或いは低容量刺激負荷時のADH分泌その他の事象が、AV3VのNSによってどんな影響を受けるのか、という問題を追及した報告は未だ存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先ず、(1)AV3Vの

GABA(A)-Rが、血液量や血圧の下降する状況で、ADH分泌、血糖、心血管系などの自律機能調節に与えることを示す証拠を得ることだった。続いて、(2)ADH分泌を調節するAV3VのGABA(A)-Rsの機能が、当該領域で産生されるNSによってどんな修飾を受けるのか、という問題を追究することだった。

3. 研究の方法

(1)実験の凡そ一週間前、雄ラットのAV3Vその他の脳領域に、薬物注入用のガイド・チューブを、さらに二日前、頸静脈や大腿動・静脈に、血圧/心拍数の測定及び採血・輸血の為、ポリエチレンチューブを植え込んだ。

(2)実験はラットを不透明な小箱に入れ、覚醒・無拘束状態で行った。

の群では、脳内に一度、或いは二度(15分間隔)、薬物や溶媒を局所注入し(0.5 or 1 μ l/min)、適当な時間間隔で血液サンプルを採取した。

の群では、脳内に薬物や溶媒を局所注入後、高張NaCl(2.5 mol/l)または等張NaCl(0.15 mol/l)を大腿静脈内に30分間持続的に注入し(0.1 ml/kg体重/minの速度)、その0分前、15分後、30分後に血液サンプルを採取した。

の群では、脳内に薬物や溶媒を注入後、体重の1%に相当する血液量を大腿動脈から10分間隔で二度吸引除去するか(約40秒で)、或いは偽脱血操作を行った。そして、脱血、偽脱血操作の適当な時間に血液サンプルを採取した。

(3)実験中は全時間にわたって動脈圧(SAP)及び心拍数(HR)を記録し、それらの変動を解析した。採取した血液サンプルは、血漿ADH(PAVP)、angiotensin II、血漿浸透圧(POsm)、電解質濃度(Na⁺, K⁺, Cl⁻)、グルコース濃度(PGlc)等の測定に用いた。

(4)実験終了後、致死量のトリパンブルーを静注してラットを殺し、脳内の薬物注入部位に色素(Trypan blue)を微量注入してから、脳を取り出した。これをホルマリンにて固定後、凍結連続切片を作り、クルシ紫で染色した。切片を顕微鏡観察し、薬物の注入部位を確定した。

(5)本研究で脳内に注入した薬物の種類はは次の通りである。

GABA-Rs 活性薬=muscimol (Mus: A-Rs 選択的); baclofen(Bac: B-Rs 選択的)、GABA-Rs 阻害薬=bicuculline (Bic: A-Rs 選択的); phaclofen(Phac: B-選択的)、

NS 関連薬=pregnenolone sulfate [PREGS: GABA(A)-Rs を非ステロイド阻害]; allopregnanolone acetate [ALLO: GABA(A)-Rs を非ステロイドに活性化); DL-aminoglutethimide [AMGT: NS 産生(トコ A P450scc)阻害薬

4. 研究成果

(1) AV3V に GABA(A)-Rs の活性薬 Mus を局所注入しても顕著な変化は生じないが、阻害薬 Bic(0.4nmol)を注入すると、血漿 ADH(PAVP)、浸透圧(Posm)、グルコース(PGlc)、血圧(SAP)、心拍数(HR)が数分内に顕著に増大した。Bic の効果は、全て、Mus(10nmol)の前投与で抑制された(Fig. 1)。GABA(B)-Rs 阻害薬 Phac (33nmol)の AV3V 注入は全因子に影響せず、活性薬 Bac(12nmol)の注入では SAP と HR のみ が変化(増加)した。以上の結果から、AV3V の GABA(A)-Rs は基礎状態で緊張的に活性化しており、即ち GABA 神経は興奮しており、それによって ADH 分泌、心血管因子、血糖値等 が低く維持されている、と考えられる。

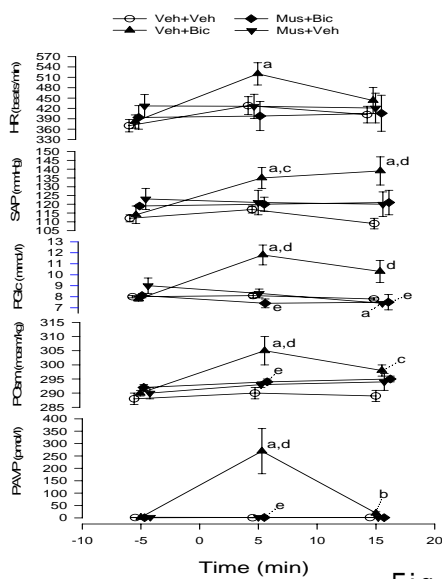


Fig.1

(2) 上述のように、AV3V の GABA(A)-R は、基礎状態で緊張的に働いている。この(A)-Rs は、 $\text{AVT}5$ 量体の糖蛋白質であり、その中に $\text{AVT}5$ 感受性サブユニットを持つ場合がある。しかし、海馬でこのサブユニット活性を抑え、GABA(A)-R アンタゴニストとして働く PREGS を AV3V に局所注入しても、PAVP、Posm、電解質($\text{Na}\cdot\text{K}\cdot\text{Cl}$)、SAP、HR に、有意な変化は見られなかった(Fig. 2)。このことから、基礎状態で認めた AV3V の高い GABA(A)-Rs 活性が、内因性に生じた NS によってもたらされている、とは考え難い。

(3) プログステロンの代謝物である Allo は、内因性に生じる NS の中でも、GABA(A)-R に対するアンタゴニスト活性が最も強いものとして知られている。この NS、或いはその溶媒(DMSO)を AV3V に前投与した後、GABA(A)-R アンタゴニストの Bic を注入した。Fig. 3 に示すように、Bic 注入でもたらされる PAVP、SAP、HR の上昇は、Posm や PGlc の増加と同様、 Allo の前投与によって有意な影響を受けなかった。この結果は、ADH 分泌や心

血管因子、血糖値等の調節に働く AV3V の GABA(A)-R は、NS による機能的修飾を受け難いサブユニットから構成されていることを示唆している。

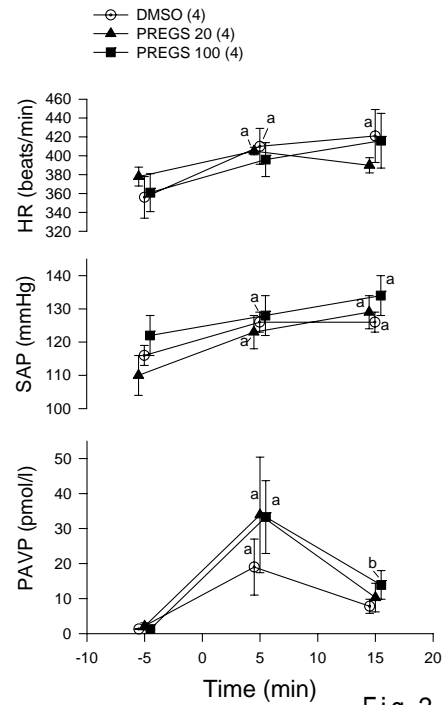


Fig.2

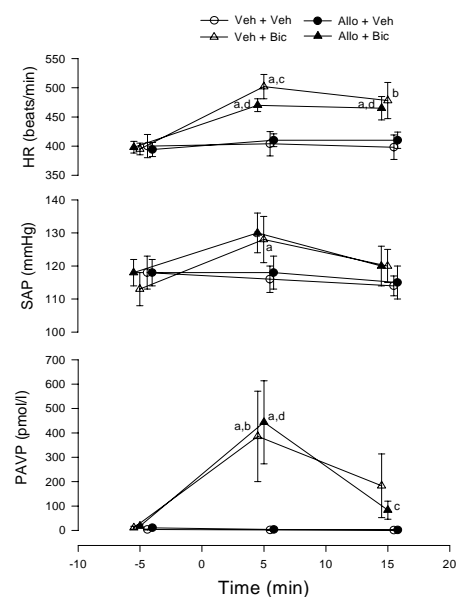


Fig.3

(4) 大腿静脈から、0.15 mol/l の等張 NaCl または 2.5 mol/l の高張 NaCl を 1 分間につき 0.1 ml/kg の速度で持続的に注入し、注入開始 0 分、15 分、30 分後に大腿動脈から採血し、PAVP その他の因子を測定した。高張 NaCl の注入に伴い、Posm、Pna、PCI が増加し、PAVP が高進した。SAP にも上昇を認めた。静注開始 10 分前に、10.3 nmol (2 μg) の Mus を AV3V に局所注入すると、PAVP

の上昇は、SAPと同様、完全に抑制された(Fig.4)。しかし、AV3VにNS産生(P450scc)阻害薬のAMGを注入しても、高張NaCl静注に対するPAVPその他因子の反応は有意に変化しなかった(Fig.5)。

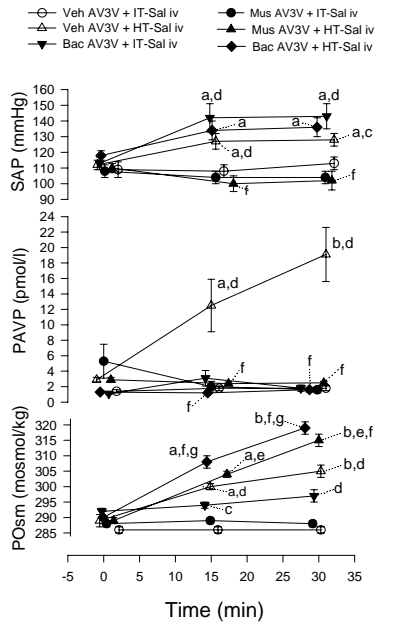


Fig.4

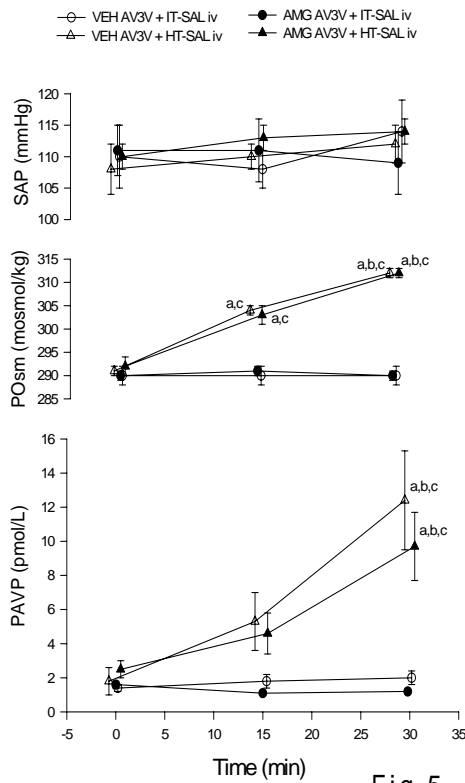


Fig.5

(5)大腿動脈から、体重あたり1%重量の血液を吸引除去し、非降圧性の容量減少を惹起した。その10分後、再度同量の血液を除去し、

降圧性の容量減少を惹起した。Figs. 5、6横軸にあるB1、B2は、BLD群では、各々、非降圧性、降圧性脱血の10分後に採取した血液サンプルを表す。Cは非降圧性脱血5分前のサンプルである。ShamBLD群では、脱血せずに、偽操作のみを加えた。脱血に伴い、SAP

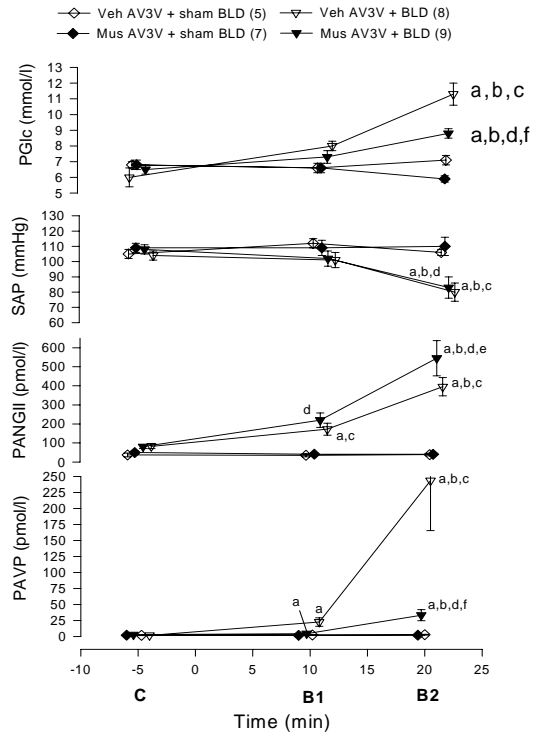


Fig.6

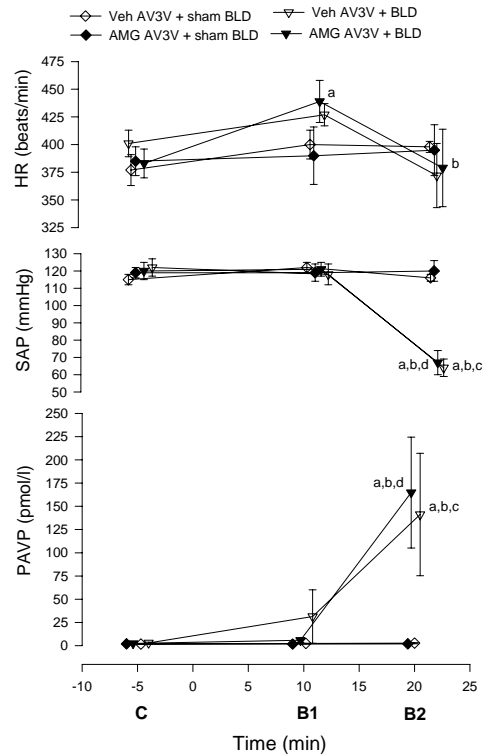


Fig.7

は下降し、PAVP は、PANGII、PGIc、POsm とともに増大した。非降圧性脱血の 15 分前(-15 min)に、10.3 nmol の Mus を AV3V に局所注入すると、PAVP の上昇が、PGIc のそれと同様、著しく減弱した(Fig.6)。それと対称的に、AV3V に NS 産生阻害薬 AMG を注入した場合には、脱血に対する PAVP、PGIc、その他の因子の反応は有意に変化しなかった(Fig.7)。

以上のように、Posm の上昇に対する PAVP や SAP の反応、容量減少に伴う PAVP や PGIc の反応が AV3V への Mus 注入で抑制されるとの事実は、AV3V の GABA(A)-Rs が、高浸透圧や低容量環境下において、ADH 分泌、心血管因子、血糖などの自律機能調節に重要な役割を営むことを示唆する。しかし、このような状態で AV3V における NS 産生を AMG によって抑えても、ADH 分泌その他の事象は有意に変動しない。このことから、AV3V で働く GABA(A)-R の活性は、NS による急性的な機能修飾を受け難いと考えられる。換言すれば、この GABA(A) Rs は高 NS 感受性を特徴とする非サブス局在性(サブユニットを持つ)のものでなく、サブユニットを備えたサブス局在性のものであることが推察される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)

1. Yamaguchi K. and Hama H., Changes in vasopressin release and autonomic function induced by manipulating forebrain GABAergic signaling under euvolesmia and hypovolemia in conscious rats, *Endocrine Journal* 58 (2011) 559-573. [査読有]
2. Yamaguchi K., Effects on vasopressin secretion and autonomic function of manipulating forebrain GABAergic activity under hypovolemic conditions with or without an osmotic load, *Neuroscience Research* 715 (2011) e61. [査読有]
3. Yamaguchi K. and Yamada T., The regulation of heart rate mediated by beta adrenoceptors in the brain, *Journal of Physiological Sciences*. 61 Suppl. 1 (2011) s147. [査読有]
4. Sukumaran V., Veeraveedu P.T., Gurusamy N., Yamaguchi K., Lakshmanan A.P., 他 4 名; Cardioprotective effects of Telmisartan against Heart Failure in Rats Induced By Experimental Autoimmune Myocarditis through the Modulation of Angiotensin-Converting Enzyme-2/Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis. *International Journal of Biological*

Sciences 7 (2011) 1077-1092. [査読有]

5. Sukumaran V., Watanabe K., Veeraveedu P.T., Gurusamy N., Ma M., Yamaguchi K., 他 3名; Olmesartan, an AT1 antagonist, attenuates oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and cardiac inflammatory mediators in rats with heart failure induced by experimental autoimmune myocarditis, *International Journal of Biological Sciences* 7(2011) 154-167. [査読有]

6. Sukumaran V., Watanabe K., Veeraveedu P.T., Ma M., Gurusamy N., Rajavel V., Suzuki K., Yamaguchi K., 他 2 名; Telmisartan ameliorates experimental autoimmune myocarditis associated with inhibition of inflammation and oxidative stress, *European J. Pharmacology* 652 (2011) 126-135. [査読有]

7. Yamaguchi K., Yamada T., Hama H. and Yamaya K., Forebrain mechanisms activated by amino acid receptors to control vasopressin release in response to a hyperosmotic or a hypovolemic stimulus, *Endocrine Journal* 57 Suppl.2 (2010) s532. [査読有]

8. Yamaguchi K. and Yamada T., Roles for preoptic GABA receptors in hemorrhagic vasopressin secretion in conscious rats, *Journal of Physiological Sciences* 60 Suppl.1 (2010) s97. [査読有]

9. 山口賢一、山田貴穂、濱齊、山谷金光; 出血性 vasopressin 分泌を巡る前脳 GABA-Glu 神経の機能連関, *日本内分泌学会雑誌* 86 (2010) 351. [査読有]

10. Veeraveedu P.T., Palaniyandi S.S., Yamaguchi K., 他 4 名; Arginine vasopressin receptor antagonists (vaptans): pharmacological tools and potential therapeutic agents, *Drug Discovery Today* 15 (2010) 826-841. [査読有]

11. Sukumaran V., Watanabe K., Veeraveedu P.T., Thandavarayan R.A., Gurusamy N., Ma M., Yamaguchi K., 他 3 名; Beneficial effects of olmesartan, an angiotensin II receptor type 1 antagonist, in rats with dilated cardiomyopathy, *Experimental Biology and Medicine* 235(2010) 1338-1346. [査読有]

12. Sukumaran V., Watanabe K., Veeraveedu P.T., Thandavarayan R.A., Gurusamy N., Ma M., Yamaguchi K., 他 3 名; Telmisartan, an angiotensin-II receptor blocker ameliorates cardiac remodeling in rats with dilated cardiomyopathy, *Hypertension Research* 33 (2010) 695-702. [査読有]

13. 山口賢一、山田貴穂、長谷川功; 前脳 GABA(A) 受容体とバゾプレッシン分泌, 生体の

科学 60(5): 378 - 379, 2009. [査読有]

14. Yamaguchi K. and Yamada T., Roles of forebrain amino acid receptors in regulating ADH secretion under basal and hyperosmotic condition, Journal of Physiological Sciences 59 Suppl.1: 271, 2009. [査読有]

15. Yamaguchi K., Hama H., Yamaya K., Watanabe K. and Veeraveedu P.T., Roles for forebrain GABA receptors in the hypovolemia-induced vasopressin secretion in conscious rats, Abstracts of the 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones: 69-70, 2009. [査読有]

16. Veeraveedu P.T., Watanabe K., Yamaguchi K., Thandavarayan R.A., Komai Y., Ma M., Kodama M. and Aizawa Y., Effectiveness of nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist tolvaptan in rats with heart failure, Abstracts of the 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones: 75-76, 2009. [査読有]

[学会発表](計 14 件)

1. 山口賢一: 脳内ノルアドレナリン 受容体を介する頻脈反応発現機構の追究. 第 89 回日本生理学会大会、松本市、2012・3・31.

2. 山口賢一: バゾプレッシン分泌不適合症候群 (SIADH) をめぐって. 第2回新潟心不全と Vasopressin 研究会、新潟市、2011・11・25.

3. Nishimura H., Ikezumi Y., Yaoita E., Nameta M., Yamaguchi K., 他 2名; Are insufficient nutrition during development and low birth weight risk factors for focal segmental glomerulosclerosis? High Blood Pressure Research 2011 Scientific Sessions, Orlando, Florida, 2011・9・22.

4. 山口賢一: 血液量減少時のバゾプレッシン分泌と自律性反応に及ぼす前脳 GABA 活性の変化. 第 34 回日本神経科学大会、横浜市、2011・9・15.

5. 山口賢一: 前脳の GABA 機構による体液・循環系のホメオスタシス反応. 第51回新潟高血圧談話会、新潟市、2011・7・8.

6. 山口賢一、新島旭: 脳内ノルアドレナリン受容体による心血管機能の制御. 第38回自律神経研究会、東京、2010・12・4.

7. 山口賢一、山田貴穂、濱齊、山谷金光: 出血性 vasopressin (VP) 分泌を巡る前脳 GABA・Glu 神経の機能連関. 第37回日本神経内分泌学会、京都市、2010・10・23.

8. 山口賢一、相馬規子、中島尚、中村美保子、久保田直樹、他5名: 脳内ノルアドレナリン受容体による頻脈反応をもたらす神経路. 第49回新潟高血圧談話会、新潟市、2010・7・9.

9. 山口賢一、山田貴穂: 出血性 ADH 分泌における視索前 GABA 受容体の役割. 第87回日本生理

学会大会、盛岡市、2010・5・20

10. Yamaguchi K., Yamada T., Hama H. and Yamaya K., Forebrain mechanisms activated by amino acid receptors to control vasopressin release in response to a hyperosmotic or a hypovolemic stimulus. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, 2010・3・30.

11. Veeraveedu P.T., Yamaguchi K., Watanabe K. and Komai Y., Beneficial effects of nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist tolvaptan in rats with heart failure. 第20回バゾプレッシン研究会、東京、2010・1・9.

12. Yamaguchi K., Hama H., Yamaya K., Watanabe K. and Veeraveedu P.T., Roles for forebrain GABA receptors in the hypovolemia-induced vasopressin secretion in conscious rats, VIIIth World Congress on Neurohypophysial Hormones, Kitakyuusu-City, 2009・9・7.

13. Yamaguchi K. and Yamada T., Roles of forebrain amino acid receptors in regulating ADH secretion under basal and hyperosmotic condition. XXXVIth International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, 2009・7・29.

14. 山口賢一、山田貴穂、濱齊、渡辺賢一、長谷川功: 前脳の GABA 受容体による自律機能の調節. 第47回新潟高血圧談話会、新潟市、2009・7・10.

[その他]

ホームページ

<http://researchers.adm.niigata-u.ac.jp/r/staff/?userId=408&lang=>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 賢一 (YAMAGUCHI KEN'ICHI)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号: 50108023

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし