

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870035

研究課題名(和文)下垂体ホルモンの産生・分泌制御におけるエリスロポイエチンの役割

研究課題名(英文)The role of erythropoietin in the production and secretion of neurohypophyseal hormone

研究代表者

山田 美鈴(山口美鈴)(YAMADA, Misuzu)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：10414012

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):高地など低酸素圧環境下では、血中酸素分圧低下に加えて体液ホメオスタシスにも影響が及び、時に重篤な障害を引き起こす。本研究では、持続的低酸素刺激が尿量の変化を伴わない摂水量と摂食量の減少を引き起こし、視床下部-下垂体軸を中心とした体液ホメオスタシス調節に関与するホルモンの分泌や制御に何らかの異常が生じていることを示した。また、低酸素応答性の造血サイトカインであるエリスロポイエチン(EPO)が神経性下垂体においてmRNAレベルで常時発現しており、EPOの作用部位であるEPO受容体も神経内分泌細胞軸索終末や下垂体細胞が存在する洞様毛細血管間の線維性構造部位に発現していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):This study revealed that continuous hypoxic stimulation suppressed the water intake and food intake without a decrease in urinary volume. This result indicates that hypoxia disorders the homeostasis of body fluid balance and the regulation of neurohypophyseal hormone. In addition to the constant mRNA expression of erythropoietin (EPO), known as a hypoxia-responsive hematopoietic cytokine, in the neurohypophysis, immunohistochemical analyses detected the expression of EPO receptor in the areas around the inferior hypophyseal artery, where are rich in axon terminals and pituicytes.

研究分野：動物生理化学

キーワード：エリスロポイエチン 低酸素 下垂体ホルモン

1. 研究開始当初の背景

生体が高地へ移動した場合、急激な気圧低下による血中酸素分圧低下(低酸素)に加えて体液ホメオスタシスにも影響が及び、脳浮腫や高浸透圧血症など時に重篤な障害を引き起こすことがある。健全な状態では、視床下部や副腎で産生されるホルモンの分泌制御を介して利尿を促すが、低酸素時には何らかの原因でこれらの体液ホメオスタシス調節ホルモンの分泌異常が起こるメカニズムが考えられる。

エリスロポイエチン(Erythropoietin; EPO)は低酸素応答性の造血サイトカインである。貧血など低酸素時には、主たる産生部位である腎臓でのEPO産生が急激に上昇し、骨髄に作用して造血を増進して全身の低酸素状態を改善する。そのため、医学・獣医学の臨床分野では、組換え型EPOが貧血の根本的な治療薬として重宝されている。近年では、腎臓のみならず、肝臓や生殖器・脳においてもEPOの微量な発現が報告されており、特に中枢神経系では脳虚血や低酸素障害などにおける神経保護への関与が考えられている。培養細胞を使用した実験では、EPOを添加すると低酸素負荷による神経細胞死を抑制できることから、低酸素障害回避性の生理活性物質(Masuda, S. *et al.* J. Biol. Chem., 269:19488-19493, 1994)としても注目されている。

しかし、生体内中枢神経系でのEPO産生機序やその作用部位については、定常時での発現量の少なさから、未解明な部分が多く残されている。本研究課題では、低酸素時における体液ホメオスタシス異常の現象との関連性に着目し、低酸素応答によりEPO産生が増進する中枢神経系の中でも、体液ホメオスタシス維持に関与する神経内分泌を担う視床下部-下垂体系におけるEPOの、造血作用以外の新規生理機能を着想した。

2. 研究の目的

本研究代表者はこれまで、低酸素応答性の造血サイトカインであるEPOの発現動態に着目して研究を行ってきた。遺伝性腎疾患モデル動物を用いて腎臓のEPO産生細胞を同定し、慢性的な腎性貧血の原因が、腎

臓での低酸素受容・応答機構に異常を伴うEPO産生能低下にあることを明らかにした(Yamaguchi-Yamada, M. *et al.* J. Vet. Med. Sci., 67: 891-899, 2005)。

EPOは低酸素応答性の造血サイトカインであり、神経系培養細胞では造血のみならず低酸素障害回避のための神経保護機能も有することが報告されている。そこで、低酸素刺激下での中枢神経系におけるEPO発現についても調べたところ、興味深いことにラット中枢神経系の低酸素応答性EPO-mRNA発現には部位特異性があり、体液ホメオスタシス調節に関わるホルモンを産生する視床下部では低酸素に応じて発現が増強するのに対して、ホルモン分泌部の下垂体では定常状態から強い発現が維持されており、低酸素以外にも発現制御因子の存在が示唆された(第150回日本獣医学会学術集会発表)。

また、神経系培養細胞を用いた*in vitro*系の実験では、EPOが細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、細胞膜の脱分極を誘導し、神経伝達物質の分泌を促すこと(K. Koshimura *et al.* J. Neurochem. 72:2565-2572, 1999)や、水チャネルを介して直接的にグリア細胞の水透過性を調節すること(E. Gunnarson *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 106: 1602-1607, 2009)が報告されている。

視床下部の神経核(室傍核・視索上核)には、体液ホメオスタシスに関わる抗利尿ホルモン(Antidiuretic hormone; ADH)を産生する神経内分泌ニューロン細胞体が存在し、分泌顆粒は長い神経軸索を運ばれ、軸索終末部である下垂体から循環血液中に分泌する。視床下部と下垂体は毛細血管に富む神経領域であり、神経内分泌ニューロンやアストロサイトの他にも脳室に接する特殊なグリア細胞を持つ。本研究課題では、定常下・低酸素条件下および体内水分量変化時における視床下部-下垂体系でのEPOの産生部位および作用部位を明らかにし、EPOを介して神経内分泌機能制御を行う新規生理機能の可能性について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、視床下部 - 下垂体系神経内分泌制御において、低酸素応答性ホルモンである EPO が神経内分泌ニューロンおよびグリア細胞に与える機能の解明を試みる。特に、ADH など低酸素時に影響を受ける体液ホメオスタシスに關与するホルモンの分泌促進・抑制機構との関連性に着目する。

まず、マウスを代謝ケージ内で数日間継続飼育し、体液ホメオスタシス変動を促す条件下（摂水制限、水分過負荷）での体重・摂食量・摂水量・尿量変化を測定する。また、生体用ガス環境自動制御チャンバー内に代謝ケージを設置して、24 時間までの低酸素曝露（10%O₂, 90%N₂）を行い、EPO 産生を増進する低酸素刺激下での摂食量・摂水量および尿量を測定し、比較を行う。

次に、低酸素刺激下または体液ホメオスタシス変動刺激下における視床下部 - 下垂体系での EPO の産生部位および EPO 受容体発現動態の解明を試みる。特に定常下から EPO-mRNA が比較的多く産生する神経性下垂体を重点的に精査する。一般的に、定常下では EPO の産生は非常に微量であり、EPO 産生細胞を同定することは難しいことが予想されるため、免疫染色では ABC 法や蛍光法、*in situ* Hybridization 法では高感度法を用いる。

また、EPO の作用部位を示すことが予想される EPO 受容体の局在については、免疫組織学的手法を用い、神経内分泌ニューロンを特異的に染色する ADH など視床下部-下垂体系ホルモン抗体や、グリア細胞を特異的に染色する Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 等の抗体を用いて、EPO 受容体を認識する抗体との二重免疫染色法を施し、明らかにすることを試みる。EPO 受容体は膜タンパク質であるため、その局在部位の判別が難しい場合には、*in situ* Hybridization 法を用いて発現細胞を同定する。

4. 研究成果

高地など低酸素圧環境下では、血中酸素分圧低下に加えて、脳浮腫や高浸透圧血症など、体液ホメオスタシスに重篤な障害を引き起こすことがある。EPO は低酸素応答性の造血サイトカインであり、造血のみな

らず低酸素障害回避のための神経保護機能も有する。本研究課題では、体液ホメオスタシス維持に關与する神経内分泌を担う視床下部 - 下垂体系に着目して、EPO が神経内分泌ニューロンやグリア細胞に及ぼす新規細胞生理学的機能について明らかにするために実験を行い、下記の結果が得られた。

まず、摂取水分量調節や低酸素刺激が及ぼす体内水分量変動について、代謝ケージを用いて検討を行った。マウス（ICR 系、8 ~ 11 週齢、雄）を代謝ケージ内にて数日間継続的に飼育後、摂取水分量調節（摂水制限または水分過負荷 18 時間）および低酸素曝露（10%O₂, 90%N₂; 刺激 18 時間）を行い、摂取水分量調節前後および低酸素曝露前後の体重、摂食量、摂水量と尿量を測定し、実験対照群と合わせて 4 つの実験群間（各群 5 ~ 8 匹）で比較を行った。水分過負荷は、Nielsen らの方法 (Nielsen, S. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90: 11663-11667, 1993) に倣って、0.6M sucrose 水を非制限摂水させることで行い、同じく低酸素曝露群でも非制限摂水とした。

その結果、健常動物では体液ホメオスタシス機構が機能するため、生体内水分量の増減を維持し続けることは難しいものの、摂水量の制御により、短期的に体内水分量変動を促すことができ、尿量測定を介してその変動を間接的に検討できることがわかった。摂水制限群では、実験対照群と比較して体重と尿量が減少し、摂食量も有意に減少した。水分過負荷群では摂水量の増加とともに尿量も有意に増加し、摂食量は有意に減少したが、体重に大きな変化はみられなかった（日本畜産学会第121回大会発表）。低酸素曝露群では、体重および摂水量・摂食量は有意に減少したが、興味深いことに尿量は実験対照群と比較して変化が認められなかった。

これらのことより、低酸素曝露下では摂水量減少にもかかわらず尿量が維持されることから、生体が脱水状態に陥りやすい状態になっていることが示唆された。低酸素が脳での体内水分量感知機構を鈍化させて、ADH などの体液ホメオスタシスを調節するホルモンの分泌に影響を与えている可能性や、腎臓の尿排泄・尿濃縮機構に障害を及ぼしている可能性が考えられた（第159回日本獣医学会学術集会発表予定）。

次に、視床下部 - 下垂体系での EPO の産生部位および EPO 受容体発現動態の解明を試みた。特に、これまでの研究により定常状態から EPO-mRNA が多く発現することが明らかになった神経性下垂体を重点的に調べた。ICR 系マウス(雄)から下垂体を採取後、総 RNA を抽出し、RT-PCR 法により EPO および EPO 受容体-mRNA の発現確認を行ったところ、神経性下垂体での EPO および EPO 受容体-mRNA 発現が確認された。同時に採取した腎臓や海馬・視床下部でも両方の mRNA 発現が確認された。

また、10%中性緩衝ホルマリン液にて組織固定を行い、免疫組織化学法を用いて神経性下垂体における EPO 受容体の局在を調べた。免疫組織化学染色により、洞様毛細血管内腔壁の一部が EPO 受容体陽性反応を示していた。その他にも、視床下部ニューロンの軸索が走行する線維性構造部位や毛細血管外周部位にも、微細点状を呈する陽性反応が分布していた(第 158 回日本獣医学会学会発表)。神経性下垂体における EPO 受容体の局在部位をより明確にするために、*in situ* Hybridization 法を試みたところ、低酸素刺激下では下垂体細胞に EPO 受容体-mRNA に対する陽性反応が認められた。

神経性下垂体の一部の切片は、神経内血管内皮細胞のマーカーである VE-cadherin 抗体、グリア細胞のマーカーである GFAP 抗体を用いた二重蛍光抗体法で解析した。その結果、洞様毛細血管内腔壁の一部に観察された EPO 受容体の陽性反応は、VE-cadherin 抗体による陽性反応と重ならなかった。線維性構造部位や毛細血管外周部位に微細点状に分布していた陽性反応は、GFAP 抗体による陽性反応とも完全には重ならず、*in situ* Hybridization 法による mRNA 発現細胞同定結果と合わせると、GFAP 抗体では識別が難しい下垂体細胞の高度に分岐した細胞突起に EPO 受容体が発現している可能性が考えられる。

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)

[学会発表](計 2 件)

山田美鈴、代謝ケージを用いたマウスの水

分摂取量調節に関する検討について、日本畜産学会第 121 回大会、2016.3.29、日本獣医生命科学大学キャンパス(東京都・武蔵野市)

山田美鈴、マウス神経性下垂体におけるエリスロポイエチン受容体発現、第 158 回日本獣医学会学会発表、2015.9.7、北里大学獣医学部(青森県・十和田市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 美鈴 (YAMADA MISUZU)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：10414012