

機関番号：37116

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18077006

研究課題名（和文）中枢性浸透圧調節系におけるホルモンセンサーと浸透圧センサーの機能連関の解明

研究課題名（英文）Functional interactions between hormone-sensor and osmo-sensor in the central regulation of body fluid osmolality

研究代表者

上田 陽一 (UETA YOICHI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232745

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、外部環境の変化の一つとして浸透圧変化に着目して、浸透圧変化が惹起するホルモン分泌とそれを感知するホルモンセンサーと浸透圧変化そのものを感知する浸透圧センサーとの機能連関の解明を目的とした。具体的には、中枢性浸透圧調節系における液性因子の主役であるバゾプレッシン（AVP）系および飲水行動調節について検討した。その結果、（1）脳スライス標本を用いて、ラットおよびマウス視索上核の AVP を産生する大細胞性神経分泌ニューロンへの興奮性および抑制性シナプス入力への種々の生理活性物質の生理作用について明らかにした。（2）ホールセルパッチクランプ法を用いて単離した AVP-eGFP ニューロンの電気生理学的特性を明らかにした。また、生体リズムの中核である視交叉上核 AVP-eGFP ニューロンでの種々の遺伝子発現の日内変動と電気生理学的性質について明らかにした。（3）ラット飲水行動を指標にアンジオテンシン II 等の中枢性作用を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the study was to examine the relationship between sensing the hormones (hormone-sensor) secreted by changes of osmolality and sensing the osmolality (osmo-sensor). In particular, we examined arginine vasopressin (AVP) system and drinking behavior. We obtained significant results as follow. (1) In *in vitro* brain slice preparation including the supraoptic nucleus (SON) that contain AVP neurons whole-cell patch-clamp recordings revealed effects of physiologically active substances on the excitatory and inhibitory synaptic currents in the SON. (2) Whole-cell patch-clamp recordings from an isolated single AVP-eGFP neuron revealed the electrophysiological properties. The diurnal changes of the expression of the several genes and electrophysiological properties were determined in the AVP-eGFP neurons in the suprachiasmatic nucleus that is known to be a circadian center. (3) Central effects of angiotensin II etc on drinking behavior were examined in rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,900,000	0	12,900,000
2007年度	12,900,000	0	12,900,000
2008年度	12,900,000	0	12,900,000
2009年度	12,500,000	0	12,500,000
2010年度	12,600,000	0	12,600,000
総計	63,800,000	0	63,800,000

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：セルセンサー、浸透圧、バゾプレッシン

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

中枢性浸透圧調節系の主軸はバゾプレッシン分泌を介した液性調節および飲水行動による能動的調節である。バゾプレッシンを産生する神経分泌ニューロンの細胞体は視床下部室傍核大細胞群領域および視索上核に局在し、その軸索を下垂体後葉に投射している。この軸索終末からの血中へのバゾプレッシン分泌は、通常バゾプレッシン産生ニューロンの神経活動の増減によって調節されている。バゾプレッシン産生ニューロンの神経活動は、種々の神経性入力（興奮性および抑制性シナプス入力）・液性入力（アンジオテンシン II 等のホルモンや浸透圧変化そのもの）によって調節されている。本研究課題の開始当時、バゾプレッシン産生ニューロンの浸透圧感受性には細胞容積を感知する非選択的陽イオンチャネルが関与していること、そのイオンチャネル候補分子として TRPV1（のバリエーション）が着目されていたが、詳細は不明であった。また、イオンチャネル、細胞から飲水行動レベルに至るまでホルモンセンサーと浸透圧センサーの機能連関に関する研究報告はほとんどなかった。

当時、我々はバゾプレッシン産生ニューロンに改変緑色蛍光タンパク（eGFP）を発現するトランスジェニックラットの開発に成功した。本トランスジェニックラットを用いることにより、蛍光顕微鏡下で eGFP 蛍光を指標に生細胞のままバゾプレッシン産生ニューロンを容易に同定することが可能となった。我々は長年にわたり視床下部下垂体後葉系についての電気生理学的研究を展開しており、本研究課題に着手する準備が十分に整っていた。

2. 研究の目的

細胞は、外部環境の変化（細胞外情報）に生体が適応・生存するためにその感知機構（セルセンサー）を発達させてきた。本研究課題では、外部環境の変化の一つとして浸透圧変化に着目し、浸透圧変化（物理情報）が引き起こすホルモン分泌（化学物質情報）を感知するホルモンセンサーと浸透圧変化そのものを細胞が感知する浸透圧センサーとの機能連関を *in vitro* および *in vivo* の系を用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

対象としては、*in vitro* の系として（1）ラットおよびマウス脳スライス標本もしくは下垂体後葉標本、および（2）バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットの視床下部からの急性単離ニューロン、*in vivo*

の系として（3）覚醒ラットでの飲水行動を評価した。

（1）頸椎脱臼後、ラットおよびマウスの脳もしくは下垂体を素早く取り出し、視索上核を含む脳スライス標本もしくは下垂体後葉標本を作成した。ホールセルパッチクランプ法を用いて、視索上核に局在するバゾプレッシン産生ニューロンの興奮性および抑制性シナプス入力の指標である興奮性および抑制性後シナプス電流を記録した。また、TRPV1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスでも同様の電流記録を行った。下垂体後葉標本では、インキュベーション液中のバゾプレッシンおよびオキシトシン濃度を測定した。（2）バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットの視索上核から大細胞性神経分泌ニューロンを酵素処理により急性単離した。蛍光顕微鏡下で eGFP 蛍光を指標にバゾプレッシン産生ニューロンを同定し、ホールセルパッチクランプ法を用いてホールセル電流を記録した。細胞外灌流液中に種々の生理活性物質を投与することにより、バゾプレッシン-eGFP ニューロンの電気生理学的特性を検討した。また、生体リズムの中核である視交叉上核に局在するバゾプレッシン-eGFP ニューロンでの種々の遺伝子発現の日内変動と電気生理学的性質について検討した。（3）ラット飲水行動を指標に、アンジオテンシン II、グレリン、リラキシン、TRPV4 アゴニストの中枢性作用についてこれらの物質を脳室内に投与することにより検討した。

4. 研究成果

（1）視索上核を含むラット脳スライス標本からホールセルパッチクランプ法を用いてバゾプレッシン産生ニューロンから興奮性および抑制性シナプス後電流を記録した。興奮性シナプス後電流が高浸透圧、アンジオテンシン II、グレリン、TRPV1 および TRPA1 アゴニストによって増加反応を示すこと、TRP チャネルアンタゴニストであるルテニウムレッドによりこれらの反応がブロックされることが明らかとなった。さらに、TRPV1 ノックアウトマウスでは、高浸透圧刺激、アンジオテンシン II およびグレリンに対する興奮性シナプス後電流の反応性が野生型と比較して有意に減弱していることを明らかにした。一方、抑制性シナプス後電流は、高および低浸透圧刺激に影響されないが、高浸透圧状態から低浸透圧状態に変化すると増加反応が起こることを見出した。さらに、この反応に BDNF を介した GABAA 受容体のインターナリゼーションが関与している可能性を見出した。下垂体後葉標本では、新規ペプチドであるサリューションβやガラ

ニン様ペプチド (GALP) がバ下垂体後葉に直接作用してバゾプレッシン分泌を引き起こすことを見出した。

(2) 蛍光顕微鏡下で eGFP 蛍光を指標に、急性単離したバゾプレッシン産生ニューロンを同定し、ホールセルパッチクランプ法を用いてホールセル電流を記録した。細胞外灌流液中に種々の生理活性物質を投与することにより、バゾプレッシン-eGFP ニューロンの電気生理学的特性 (GABA 応答、pH (特に酸性を感知する ASICs 電流)、K 電流 (BK および SK)、ATP およびパネキシン-1 が機能的に関与する電流) を明らかにした。特に、酸性を感知するイオンチャネルである ASICs によって惹起される内向き電流はアミロライド感受性であること、生体内では乳酸によって活性化している可能性を見出した。また、生体リズムの中核である視交叉上核に局在するバゾプレッシン-eGFP ニューロンでの種々の遺伝子発現 (バゾプレッシン hnRNA、eGFP mRNA、時計遺伝子等) の日内変動と電気生理学的性質について明らかにした。

(3) ラット飲水行動を指標にアンジオテンシン II、グレリン、TRPV4 アゴニスト (4 α PDD) およびリラキシンの中枢性作用について明らかにした。グレリンおよび 4 α PDD の中枢投与は、脱水およびアンジオテンシン II が惹起する飲水行動を有意に抑制することを明らかにした。一方、ポリエチレングリコール末梢投与後の容量減少によって惹起される飲水行動は、グレリンの前投与により抑制されたが、4 α PDD の前投与では抑制されなかった。リラキシシン-3 をラット脳室内に投与すると浸透圧感受性部位である脳室周囲器官等が活性化され、濃度依存的に飲水行動を惹起することを明らかにした。

さらに、in vivo の系としてバゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットを用いて、急性および慢性疼痛・炎症、種々のストレス刺激についての視床下部 eGFP 遺伝子発現の変化を検討した。その結果、疼痛や炎症および種々のストレス刺激に対して視床下部 eGFP 遺伝子発現および eGFP 蛍光が非常に敏感に変化することが明らかとなった。

以上のように、イオンチャネル、シナプス入力についての単一細胞レベルから飲水行動に至るまで、ホルモンセンサーおよび浸透圧センサーの機能連関について多くの知見を得た。従来考えられていたバゾプレッシンや種々のホルモンの生理機能に加えて、予想もしていなかった生理機能の発見や TRP チャネルファミリーが浸透圧およびホルモン感受性に関与していること等の生理機能のモデルシフトを明らかにすることができた。

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 32 件)

1. Ohbuchi, T. Yokoyama, T. Saito, T. Ohkubo, J. Suzuki, H. Ishikura, T. Katoh, A. Fujihara, H. Hashimoto, H. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2011) Possible contribution of pannexin channel to ATP-induced currents in vitro in vasopressin neurons isolated from the rat supraoptic nucleus. Brain Research (in press) (査読有)
2. Sato, K. Numata, T. Saito, T. Ueta, Y. & Okada, Y. (2011) V₂ receptor-mediated autocrine role of somatodendritic release of AVP in rat vasopressin neurons under hypo-osmotic conditions. Science Signaling 4(157): ra5 (Cover article of the issue) (査読有)
3. Yokoyama, T. Ohbuchi, T. Saito, T. Fujihara, H. Minami, K. Nagatomo, T. Uezono, Y. & Ueta, Y. (2011) Allyl isothiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats. European Journal of Pharmacology 655(1-3): 31-37 (査読有)
4. Ueta, Y. Dayanithi, G. Fujihara, H. (2011) Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli: Visualization in transgenic animal models. Hormones and Behavior 59(2): 221-226 (査読有)
5. Maruyama, T. Ohbuchi, T. Fujihara, H. Shibata, M. Mori, K. Murphy, D. Dayanithi, G. & Ueta, Y. (2010) Diurnal changes of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion transgene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. Peptides 31(11): 2089-2093 (査読有)
6. Ohbuchi, T. Yokoyama, T. Saito, T. Suzuki, H. Fujihara, H. Katoh, A. Otsubo, H. Ishikura, T. & Ueta, Y. (2010) Modulators of BK and SK channels alter electrical activity in vitro in single vasopressin neurons isolated from the rat supraoptic nucleus. Neuroscience Letters 484(1): 26-29 (査読有)
7. Ohbuchi, T. Sato, K. Suzuki, H. Okada, Y. Dayanithi, G. Murphy, D. & Ueta, Y. (2010) Acid-sensing ion channels in rat hypothalamic vasopressin neurons of the supraoptic nucleus. Journal of Physiology (London) 588(12): 2147-2162

- (査読有)
8. Todoroki, M. Ueta, Y. Fujihara, H. Otsubo, H. Shibata, M. Hashimoto, H. Kobayashi, M. Sakamoto, H. Kawata, M. Dayanithi, G. Murphy, D. Hiro, H. Takahashi, K. & Nagata, S. (2010) Induction of the arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion transgene in the rat locus coeruleus. *Stress* 13(4): 281-291 (査読有)
 9. Otsubo, H. Onaka, T. Suzuki, H. Katoh, A. Ohbuchi, T. Todoroki, M. Kobayashi, M. Fujihara, H. Yokoyama, T. Matsumoto, T. & Ueta, Y. (2010) Centrally administered relaxin-3 induces Fos expression in the osmosensitive areas in rat brain and facilitates water intake. *Peptides* 31(6):1124-1130 (査読有)
 10. Ohbuchi, T. Yokoyama, T. Fujihara, H. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2010) Electrophysiological identification of the functional presynaptic nerve terminal on an isolated single vasopressin neuron of the rat supraoptic nucleus. *Journal of Neuroendocrinology* 22(5): 413-419 (査読有)
 11. Yokoyama, T. Saito, T. Ohbuchi, T. Hashimoto, H. Suzuki, H. Otsubo, H. Fujihara, H. Nagatomo, T. & Ueta, Y. (2010) TRPV1 gene deficiency attenuates miniature EPSCs potentiation induced by mannitol and angiotensin II in supraoptic magnocellular neurons. *Journal of Neuroscience* 30(3): 876-884 (査読有)
 12. Hashimoto, H. Otsubo, H. Fujihara, H. Suzuki, H. Ohbuchi, T. Yokoyama, T. Takei, Y. & Ueta, Y. (2010) Centrally administered ghrelin potently inhibits water intake induced by angiotensin II and hypovolemia in rats. *The Journal of Physiological Sciences* 60(1): 19-25 (査読有)
 13. Fujihara, H. Ueta, Y. Suzuki, H. Katoh, A. Ohbuchi, T. Otsubo, H. Dayanithi, G. & Murphy, D. (2009) Robust up-regulation of nuclear red fluorescent-tagged Fos marks neuronal activation in green fluorescent vasopressin neurons after osmotic stimulation in a double transgenic rat. *Endocrinology* 150(12): 5633-5638 (査読有)
 14. Yokoyama, T. Saito, T. Ohbuchi, T. Suzuki, H. Otsubo, H. Okamoto, T. Fujihara, H. Nagatomo, T. & Ueta, Y. (2009) Ghrelin potentiates miniature excitatory postsynaptic currents in rat supraoptic magnocellular neurons. *Journal of Neuroendocrinology* 21(11): 183-190 (Cover article of the issue) (査読有)
 15. Suzuki, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Otsubo, H. Ohbuchi, T. Katoh, A. Hashimoto, H. Yokoyama, T. Fujihara, H. Dayanithi, G. Murphy, D. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2009) Exaggerated response of a vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgene to nociceptive stimulation in the rat. *Journal of Neuroscience* 29(42): 13182-13189 (査読有)
 16. Suzuki, H. Onaka, T. Kasai, M. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Otsubo, H. Saito, T. Hashimoto, H. Yokoyama, T. Fujihara, H. Dayanithi, G. Murphy, D. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2009) Response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene in the hypothalamus of adjuvant-induced arthritic rats. *Journal of Neuroendocrinology* 21(3): 183-190 (査読有)
 17. Ohbuchi, T. Yokoyama, T. Saito, T. Hashimoto, H. Suzuki, H. Otsubo, H. Fujihara, H. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2009) Brain-derived neurotrophic factor inhibits spontaneous inhibitory postsynaptic currents in the rat supraoptic nucleus. *Brain Research* 1258(3): 34-42 (査読有)
 18. Saito, T. Dayanithi, G. Saito, J. Onaka, T. Urabe, T. Watanabe, T. Hashimoto, H. Yokoyama, T. Fujihara, H. Yokota, A. Nishizawa, S. Hirata, Y. & Ueta, Y. (2008) Chronic osmotic stimuli increase salusin- β -like immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system: possible involvement of salusin- β on $[Ca^{2+}]_i$ increase and neurohypophyseal hormone release from the axon terminals. *Journal of Neuroendocrinology* 20(2): 207-219 (査読有)
 19. Kawasaki, M. Saito, J. Hashimoto, H. Suzuki, H. Otsubo, H. Fujihara, H. Ohnishi, H. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2007) Induction of the galanin-like peptide gene expression in the posterior pituitary gland after acute osmotic stimulus in rats. *Neuroscience Letters* 419(2): 125-130 (査読有)

20. Hashimoto, H. Fujihara, H. Kawasaki, M. Saito, T. Shibata, M. Otsubo, H. Takei, Y. & Ueta, Y. (2007) Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. *Endocrinology* 148(4): 1638-1647 (査読有)
21. Shibata, M. Fujihara, H. Suzuki, H. Ozawa, H. Kawata, M. Dayanithi, G. Murphy, D. & Ueta, Y. (2007) Physiological studies of stress responses in the hypothalamus of vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgenic rat. *Journal of Neuroendocrinology* 19(4): 285-292 (査読有)
22. Fujio, T. Fujihara, H. Shibata, M. Yamada, S. Onaka, T. Tanaka, K. Morita, H. Dayanithi, G. Kawata, M. Murphy, D. & Ueta, Y. (2006) Exaggerated response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene to salt loading without disturbance of body fluid homeostasis in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 18(10): 776-785 (Cover article of the issue) (査読有)

[学会発表] (計 160 件)

1. 上田 陽一 (2010 年 12 月 23 日) 浸透圧センシングとバゾプレッシン分泌、特定領域研究公開シンポジウム「細胞感覚：セルセンサーのモーダルシフト」、東京
2. Ueta, Y. (2010 年 7 月 11-15 日) Regulation of stress responses by peptides: New transgenic animal models. The 7th International Congress of Neuroendocrinology symposium, Rouen, France
3. Ueta Y. Fujihara, H. & Murphy, D. (2010 年 3 月 26-30 日) The expression of the vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene in the hypothalamo-pituitary system in rats: a new aspect of vasopressin dynamics. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan
4. 上田 陽一、横山 徹 (2009 年 11 月 18-20 日) TRP チャンネルから見た神経分泌ニューロンの物理・化学感受性、第 39 回日本臨床神経生理学学会学術大会シンポジウム、北九州
5. 藤原 広明、鈴木 仁士、加藤 明子、大坪 広樹、上田 陽一 (2009 年 9 月 26-27 日) 多色蛍光タンパクを発現するトランスジェニックラットの作出と浸透圧刺激に対する反応、第 50 回日本組織細胞化学会、滋賀
6. 横山 徹、大淵 豊明、藤原 広明、長友 敏寿、上田 陽一 (2009 年 9 月 16-18 日) 視索上核大細胞性神経分泌細胞の浸透圧感受性における TRPV1 の関与、第 32 回日本神経科学大会、名古屋
7. 上田 陽一 (2008 年 12 月 5 日) ラットにおける中枢性体液調節：ストレス・ペプチド・浸透圧感受性、第 33 回日本比較内分泌学会大会シンポジウム、広島
8. 上田 陽一 (2008 年 11 月 6-7 日) 中枢性浸透圧調節と TRP チャンネル、第 61 回日本自律神経学会総会シンポジウム、横浜
9. 横山 徹、大淵 豊明、藤原 広明、長友 敏寿、上田 陽一 (2008 年 8 月 28-30 日) ラット視索上核大細胞性神経分泌ニューロンへのシナプス入力における TRPA1 の役割：電気生理学的検討、第 35 回日本神経内分泌学会、東京
10. 上田 陽一 (2008 年 7 月 11-12 日) 浸透圧センサーとバゾプレッシン分泌、第 26 回内分泌代謝学サマーセミナー、名古屋
11. 上田 陽一、横山 徹 (2008 年 7 月 9-11 日) 神経分泌細胞における浸透圧およびペプチドセンシングメカニズム、第 31 回日本神経科学大会、東京
12. 上田 陽一 (2008 年 5 月 16-18 日) TRP チャンネルと中枢性浸透圧調節、第 81 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム、青森
13. 横山 徹、齋藤 健、大淵 豊明、橋本 弘史、鈴木 仁士、大坪 広樹、藤原 広明、長友 敏寿、上田 陽一 (2008 年 3 月 25-27 日) ラット視索上核大細胞性神経分泌ニューロンへの興奮性シナプス入力に対するグレリンの効果、第 85 回日本生理学会大会、東京
14. 上田 陽一 (2008 年 3 月 25-27 日) 遺伝子改変動物による下垂体後葉ホルモン研究の新展開、第 85 回日本生理学会大会シンポジウム、東京
15. 上田 陽一、鈴木 仁士 (2008 年 1 月 26-27 日) ストレスにおけるラット視床下部-下垂体後葉系のバゾプレッシン eGFP 融合遺伝子発現と病態生理学的意義、第 17 回日本病態生理学会大会シンポジウム、神戸
16. 上田 陽一 (2007 年 10 月 19-22 日) バゾプレッシンとオキシトシン；ストレスと生殖の視点から、第 100 回日本繁殖生物学会大会、第 12 回日本生殖内分泌学会学術集会合同大会ジョイントシンポジウム、東京
17. Ueta, Y. Matsui, A. Fujihara, H. Sakamoto, F. Kawata, M. Dayanithi, G. & Murphy, D. (2007 年 9 月 18-22 日) The expression of the arginine vasopressin-enhanced green fluorescent

protein fusion gene in the transgenic rat brain. VIIth World Congress on Neurohypophysial Hormones, Regensburg, Germany

18. 上田 陽一 (2006年12月16日) バゾプレッシンニューロン研究の今：遺伝子改変動物を用いた研究、第16回神経科学の基礎と臨床、大阪
19. 上田 陽一 (2006年7月19-21日) 新規循環関連ペプチドと下垂体後葉系、第29回日本神経科学大会シンポジウム、京都

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://www.nips.ac.jp/cellsensor/NL16.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 陽一 (UETA YOICHI)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：10232745

(2)研究分担者

長友 敏寿 (NAGATOMO TOSHIHISA)
産業医科大学・大学病院・准教授
研究者番号：50258604

藤原 広明 (FUJIHARA HIROAKI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス部・助教
研究者番号：10369051

横山 徹 (YOKOYAMA TORU)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：80425321

(3)連携研究者

なし