

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293055

研究課題名(和文)新規浸透圧・メカノセンサー分子の探索と生理機能解明

研究課題名(英文)Discovery of novel osmo-/mechano-sensing molecules and physiological function

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規浸透圧・メカノセンサー分子群および下垂体後葉系を含む脳内浸透圧受容機構について遺伝子改変動物を用いて検討した。その結果、c-fos-eGFPトランスジェニックラットを用いて急性浸透圧刺激後の脳内浸透圧感受性部位を可視化することができた。さらに、バゾプレッシン-eGFPトランスジェニックラット、TRPV1ノックアウトマウスおよびTRPV4ノックアウトマウスを用いて新たな浸透圧・メカノセンサー候補を見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to investigate novel osmo-/mechano-sensing molecules and osmosensitive mechanisms in the central nervous system, including the hypothalamo-neurohypophysial system. We visualized the central osmosensitive areas after acute osmotic challenge, using c-fos-eGFP transgenic rats that express c-fos and eGFP fusion gene after adequate physiological stimuli. We found that osmotic and non-osmotic stimuli such as mechanical and hypovolemic stimuli caused activation of vasopressin-eGFP magnocellular neurosecretory cells in vasopressin-eGFP transgenic rats. We also found that TRPV1 and TRPV4 knockout mice showed different drinking behaviors in comparison with wild type.

研究分野：医歯薬学

キーワード：浸透圧 メカノセンサー バゾプレッシン 蛍光タンパク 遺伝子改変動物

## 1. 研究開始当初の背景

生体の約 60% は水分である。生体は水分を失うと喉の渇きと飲水行動を惹起して水分を能動的に摂取する。生体内では、喉の渇きが生じる前に血漿浸透圧の僅かな上昇に敏感に反応して抗利尿ホルモン (バゾプレッシン) が下垂体後葉から血中に分泌され、腎臓に作用して水の再吸収を促進する。

バゾプレッシンは視床下部室傍核および視索上核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から活動電位依存的に分泌される。

血漿浸透圧の変化は、脳内浸透圧感受性部位として知られる血液脳関門の欠如した脳室周囲器官 (脳弓下器官、終板器官など) で感知されてバゾプレッシンニューロンへ神経性情報として伝達され、主な神経伝達物質としてグルタミン酸やアンジオテンシン II (Ang II) が考えられている。バゾプレッシンニューロン自身も浸透圧感受性を持ち、浸透圧情報を活動電位に変換する。

一般に、血漿浸透圧の変化により細胞は低浸透圧環境下では膨張し、高浸透圧環境下では収縮することから、浸透圧センサーはメカノセンサー機能を有していると考えられる。バゾプレッシンニューロンは、細胞体の収縮により活性化する非選択性陽イオンチャネルが電気生理学的にメカノセンサーとして同定され、その候補分子として TRPV1 遺伝子産物で N 末端の欠損した TRPV1 バリエントが着目されている。

しかしながら、いまだバゾプレッシンニューロンを含む脳内浸透圧調節機構は未だ詳細が明らかでなく、浸透圧センサーの候補として TRPV1 や TRPV4 が挙げられているもののその分子実体は同定されていない。

## 2. 研究の目的

(1) 私たちは、浸透圧刺激に対して活性化するニューロン群を生細胞のまま同定するために *c-fos*-mRFP1 トランスジェニックラットを作出し、慢性 (脱水および再飲水) 浸透圧負荷後の脳内浸透圧感受性部位を *in vivo* で可視化することができた (Yoshimura et al., J Neuroendocrinol 2013)。さらに、*c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを用いて、急性浸透圧刺激 (高張食塩水腹腔内投与) 後の脳内浸透圧感受性部位を *in vivo* で可視化することを試みた。

(2) バゾプレッシンニューロンを eGFP 蛍光で同定することができるバゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットを用いて、視床下部視索上核からバゾプレッシン-eGFP ニューロンを単離し、*in vitro* で酸および機械刺激に関連するイオンチャネルの同定を試みた。

(3) TRPV1 ノックアウトマウス、4 ノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いて Ang II が惹起する飲水行動および浸透圧感受性に関連する脳内部位の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを用いて、急性浸透圧刺激のために 9% 食塩水 (20 ml/kg) を腹腔内投与し、無処置 (コントロール) および 0.9% 生理食塩水投与と比較した。90 分後に深麻酔下で開胸し、経心的に 4% パラホルムアルデヒド固定液で灌流後、脳を取り出した。後固定の後、シュクロース化してマイクロトームを用いて脳切片を作成し、蛍光顕微鏡下で Fos タンパクの発現を示す eGFP 緑色蛍光を観察した。

(2) バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットを用いて、頸椎脱臼後に素早く脳を取り出し、マイクロスライサーを使用して視索上核を含む脳ブロック標本作製した。酵素処理後に機械的にニューロン

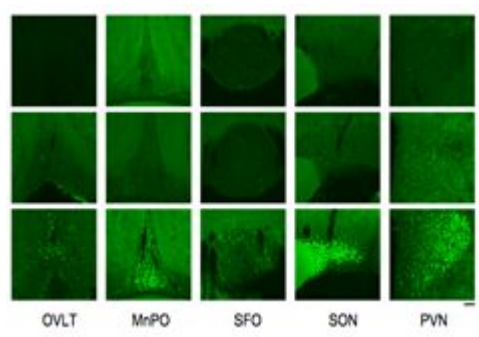
を単離し、蛍光顕微鏡下で eGFP 緑色蛍光を指標にしてバゾプレッシン-eGFP 陽性ニューロンを同定した。ホールセルパッチクランプ法を用いて膜電位固定下で電流を記録しながら、細胞外 pH を変化させた場合および機械刺激した場合について検討した。さらに、バゾプレッシン-eGFP × オキシトシン-mRFP1 ダブルトランスジェニックラットをそれぞれの交配によって作出し、このダブルトランスジェニックラットの視索上核から同時にバゾプレッシン-eGFP 陽性ニューロンとオキシトシン-mRFP1 陽性ニューロンを単離し、酸性条件下での電流を記録した。

(3) TRPV1 ノックアウトマウス、TRPV4 ノックアウトマウスおよびコントロールに野生型マウスを用いて、脳室内に AII を微量投与して飲水量を観察した。生理食塩水の脳室内投与をコントロールとした。さらに、AII 脳室内投与 90 分後に深麻酔下で開胸し、経心的に 4%パラフォルムアルデヒド固定液で灌流後、脳を取り出した。後固定の後、シュクロース化してマイクロトームを用いて脳切片を作成し、抗 Fos タンパク抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットにおいて、9%高張食塩水の腹腔内投与 90 分後、脳室周囲器官(終板器官(OVLT)、正中視索前野(MnPO)、脳弓下器官(SFO))、視床下部室傍核(PVN)および視索上核(SON)および脳幹部(最後野(AP)、孤束核(NTS)、延髄吻側腹外側野(RVLM))に eGFP 陽性ニューロンが有意に増加した(図 1)。*c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを用いて浸透圧感受性部位および関連するニューロン群を可視化することができた。今後、生細胞のままこれらのニューロンを eGFP 蛍光を指標に生

理的快晴や分子生物学的解析を行うことにより浸透圧感受性の実体を明らかにしたい。

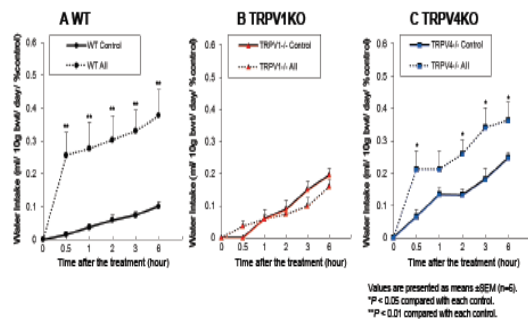


**図 1 諸核における *c-fos*-eGFP の発現**  
 上段: コントロール(無処置) 中段: 0.9% 生理食塩水投与、下段: 9% 食塩水投与、  
 スケールバー = 100  $\mu$ m

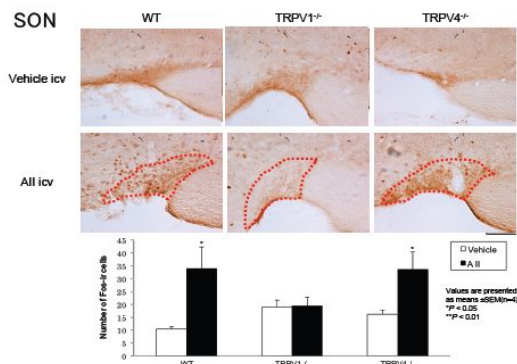
(2) ホールセルパッチクランプ法を用いて膜電位固定下で電流を記録しながら、細胞外 pH を変化させ、酸性 (pH=5.5) 条件で一過性の内向き電流が記録できた。この内向き電流はアミロライド灌流下で有意に抑制された。オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットの視索上核から同様にして単離したオキシトシン-mRFP1 陽性ニューロンは、酸性条件下で内向き電流はほとんど記録できなかった。予備実験ではあるが、ニューロンを細胞外から機械的に刺激したところ、一過性の内向き電流が記録できた。

さらに、バゾプレッシン-eGFP × オキシトシン-mRFP1 ダブルトランスジェニックラットをそれぞれの交配によって作出した。このダブルトランスジェニックラットの視索上核から同時にバゾプレッシン-eGFP 陽性ニューロンとオキシトシン-mRFP1 陽性ニューロンを単離し、酸性条件下での電流を記録したところ、やはり eGFP 陽性ニューロンには大きな内向き電流が記録でき、mRFP1 陽性ニューロンでは小さな内向き電流しか記録できなかった。

(3) TRPV4 ノックアウトマウスおよび野生型マウスでは、AII の脳室内投与により有意な飲水増加が見られたが、TRPV1 ノックアウトマウスでは飲水の増加が見られなかった(図2)。AII の脳室投与後の脳内 Fos タンパクの発現を免疫組織化学的染色により検討した結果、視床下部視索上核(SON)には野生型および TRPV4 ノックアウトマウスで Fos タンパクの有意な増加が見られたが、TRPV1 ノックアウトマウスでは TRPV4 ノックアウトマウスおよび野生型マウスと比較して有意に少なく、コントロールと同程度であった(図3)。AII によって飲水およびバゾプレッシン分泌が惹起されることはよく知られているが、その作用に TRPV1 を介していることが示唆された。



**図2 野生型、TRPV1 ノックアウトおよび TRPV4 ノックアウトマウスの AII 脳室内投与後の飲水量の変化**



**図3 野生型、TRPV1 ノックアウトおよび TRPV4 ノックアウトマウスの AII 脳室内投与後の視索上核 (SON) における Fos タンパクの発現**

以上より、*c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを用いて脳内浸透圧感受性部位の蛍光タンパクによる可視化することができたことから生細胞を用いた浸透圧感受性ニューロンへの新たなアプローチが可能となった。さらに、バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットを用いてバゾプレッシンニューロンの浸透圧感受性およびメカノセンシングに関連するイオンチャネル電流を記録することができた。今後、これらの分子実体について明らかにしたい。また、浸透圧およびメカノセンサー分子の候補の一つとして TRPV1 遺伝子産物の関与が示唆された。

## 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10件)

1. Matsuura, T. Kawasaki, M. Hashimoto, H. Yoshimura, M. Motojima, Y. Saito, R. Ueno, H. Maruyama, T. Ishikura, T. Sabanai, K. Mori, T. Ohnishi, H. Onaka, T. Sakai, A. & Ueta, Y. (2016) Possible involvement of the rat hypothalamo-neurohypophysial/-spinal oxytocinergic pathways in acute nociceptive responses. *Journal of Neuroendocrinology* (in press) (査読有) DOI: 10.1111/jne.12396.
2. Matsuura, T. Kawasaki, M. Hashimoto, H. Yoshimura, M. Motojima, Y. Saito, R. Ueno, H. Maruyama, T. Sabanai, K. Mori, T. Ohnishi, H. Sakai, A. & Ueta, Y. (2016) Effects of central administration of oxytocin-saporin cytotoxin on chronic inflammation and feeding/drinking behaviors in adjuvant arthritic rats. *Neuroscience Letters* 621: 104-110 (査読有) DOI: 10.1016/j.neulet.2016.04.010.
3. Ishikura, T. Suzuki, H. Shoguchi, K. Koreeda, Y. Aritomi, T. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, JI. Maruyama, T. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Sakai, A. Mizuki, M. & Ueta, Y. (2015) Possible involvement of TRPV1 and TRPV4 in nociceptive stimulation-induced nocifensive behavior and neuroendocrine response in mice. *Brain Research Bulletin* 118:7-16 (査読有り) DOI: 10.1016/j.brainresbull.2015.08.004.

4. Satoh, K. Oti, T. Katoh, A. Ueta, Y. Morris, JF. Sakamoto, T. & Sakamoto, H. (2015) In vivo processing and release into the circulation of GFP fusion protein in arginine vasopressin enhanced GFP transgenic rat: response to osmotic stimulation. *The FEBS Journal* 282(13): 2488-2499 ( 査読有り )  
DOI: 10.1111/febs.13291.
  5. Matsuura, T. Kawasaki, M. Hashimoto, H. Ishikura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, JI. Maruyama, T. Motojima, Y. Sabanai, K. Mori, T. Ohnishi, H. Sakai, A. & Ueta, Y. (2015) Fluorescent visualisation of oxytocin in the hypothalamo-neurohypophysial/-spinal pathways after chronic inflammation in oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rats. *Journal of Neuroendocrinology* 27(7):636-646 ( 査読有り )  
DOI: 10.1111/jne.12290.
  6. Yoshimura, M. Ohkubo, JI. Hashimoto, H. Matsuura, T. Maruyama, T. Onaka, T. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2015) Effects of a subconvulsive dose of kainic acid on the gene expression of the arginine vasopressin, oxytocin and neuronal nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *Neuroscience Research* 99: 62-68 ( 査読有り )  
DOI: 10.1016/j.neures.2015.05.002.
  7. Ohkubo, J. Ohbuchi, T. Yoshimura, M. Maruyama, T. Ishikura, T. Matsuura, T. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2014) Electrophysiological effects of kainic acid on vasopressin-eGFP and oxytocin-mRFPI neurones isolated from the supraoptic nucleus in transgenic rats. *Journal of Neuroendocrinology* 26(1):43-51 ( 査読有り )  
DOI: 10.1111/jne.12128.
  8. Ohkubo, JI. Ohbuchi, T. Yoshimura, M. Maruyama, T. Hashimoto, H. Matsuura, T. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2014) Differences in acid-induced currents between oxytocin-mRFPI and vasopressin-eGFP neurons isolated from the supraoptic and paraventricular nuclei of transgenic rats. *Neuroscience Letters* 583(7): 1-5 ( 査読有り )  
DOI: 10.1016/j.neulet.2014.09.004.
  9. Yoshimura, M. Matsuura, T. Ohkubo, J. Maruyama, T. Ishikura, T. Hashimoto, H. Kakuma, T. Mori, M. & Ueta, Y. (2014) A role of nesfatin-1/NucB2 in dehydration-induced anorexia. *American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 307(2): R225-R236 ( 査読有り )  
DOI: 10.1152/ajpregu.00488.2013.
  10. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Katoh, A. Ohno, M. Ishikura, T. Kakuma, T. Yoshimatsu, H. Murphy, D. & Ueta, Y. (2013) A *c-fos*-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgene is differentially expressed in rat forebrain and brainstem after chronic dehydration and rehydration. *Journal of Neuroendocrinology* 25(5): 478-487 ( 査読有り )  
DOI: 10.1111/jne.12022.
- [学会発表](計17件)
1. 上田 陽一 (2016年3月28日) 味覚と健康: 栄養素センサー研究の現状と未来: 消化管栄養素受容による摂食調節: 日本薬学会第136年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
  2. 上田 陽一、松浦 孝紀、元嶋 尉士、吉村 充弘、將口 加奈子、丸山 崇、橋本 弘史、石倉 透、川崎 展、大西 英生、酒井 昭典 (2016年3月24日) 浸透圧および非浸透圧刺激によるマウス飲水行動への効果: TRPV1ならびにTRPV4の関与の可能性: 第93回日本生理学会大会、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
  3. 上田 陽一 (2015年3月18-20日) 栄養と飲水・摂食行動調節: 第88回日本薬理学会年会シンポジウム、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
  4. Ueta, Y. (2015年12月13-14日) Electrophysiological study combined with fluorescent visualization in rat vasopressin / oxytocin neuron: Neuropeptides and Neurotransmitters: Role in Physiology and Pathophysiology & Second Meeting of Indian Sub-continental Branch of the International Neuropeptide Society, Bhubaneswar, India
  5. Ueta, Y. (2015年11月22-25日) Optogenetic approach to control neuronal activity in rat vasopressin neuron in vitro preparation: The 8<sup>th</sup> Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, Bangkok, Thailand
  6. Ueta, Y. Matsuura, T. Motojima, Y. Yoshimura, M. Shoguchi, K. Maruyama, T. Hashimoto, H. Ishikura, T. Kawasaki, M. Ohnishi, H. & Sakai, A. (2015年11月3-4日) Possible involvements of TRPV1 and TRPV4 in neuroendocrine response and

- drinking behavior : The 13<sup>th</sup> International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, Fukuoka, Japan
7. Ueta, Y. (2015年9月17日) Optogenetic approach to regulate neuronal activity in rat vasopressin neuron: Parvo- and Magnocellular Symposium in Sendai, Sendai, Japan
  8. Ueta, Y. (2015年8月29-9月1日) Electrophysiological study combined with fluorescent imaging and optogenetic approaches in rat vasopressin neuron: 11<sup>th</sup> World Congress on Neurohypophysial Hormones, Queenstown, New Zealand
  9. Ueta, Y., Matsuura, T. Motojima, Y. Yoshimura, M. Shoguchi, K. Maruyama, T., Hashimoto, H., Kawasaki, M. Ohnishi, H. & Sakai, A. (2015年6月2-7日) Effects of osmotic and non-osmotic stimuli on drinking behavior in TRPV1 and TRPV4 knockout mice : International Behavioral Neuroscience Society 2015, Victoria, Canada
  10. 上田 陽一、有富 貴史、將口 加奈子、吉村 充弘、石倉 透、丸山 崇、橋本 弘史 (2014年7月4-5日) 急性浸透圧刺激に対する脳内浸透圧感受性部位の可視化～遺伝子改変動物を用いた検討～ : 第35回日本循環制御医学会総会、九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)
  11. 上田 陽一 (2014年6月28日) 生理学から見た飲水と摂食のメカニズム : NADAC 研修会、九州女子大学(福岡県北九州市)
  12. 上田 陽一 (2014年3月16-18日) 脳内浸透圧感受性部位およびバゾプレッシン分泌顆粒の蛍光タンパクによる可視化の試み : 第91回日本生理学会大会シンポジウム、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)
  13. Ueta, Y., Aritomi, T. Shoguchi, K. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ishikura, T. Maruyama, T., Hashimoto, H. (2014年11月15-19日) Fluorescent visualization of central osmosensitive areas activated by acute osmotic stimulation in c-fos-eGFP transgenic rats. Neuroscience 2014. Washington DC, USA.
  14. 上田 陽一、吉村 充弘、森 昌朋 (2013年8月24日) 脱水誘発性摂食抑制反応に関する分子機構 : 第18回アイポサイエンス・シンポジウム、大阪千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
  15. 上田 陽一、大野 素子、吉村 充弘、松浦 孝紀、大久保 淳一、丸山 崇、石倉 透 (2013年4月25-27日) ラット視床下部および青斑核におけるバゾプレッシン-eGFP 融合遺伝子発現～等張性脱水における検討～ : 第86回日本内分泌学会学術総会、仙台国際センター(宮城県仙台市)
  16. Ueta, Y., Ohno, M. Ishikura, T. Maruyama, T., Hashimoto, H., Matsuura, T. Ohkubo, J. Yoshimura, M. & Yamashita, H. (2013年7月21-26日) Arginine vasopressin (AVP)-eGFP expression in the hypothalamus after hypovolemia in AVP-eGFP transgenic rats. IUPS2013, Birmingham, UK
  17. Ueta, Y., Ishikura, T. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Maruyama, T. & Ohnishi, H. (2013年6月25-30日) Nocifensive behavior and neuroendocrine response after nociceptive stimulation in TRPV1 and TRPV4 knockout mice. International Behavioral Neuroscience Society, Malahide, County Dublin, Ireland
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  
橋本 弘史 (HASHIMOTO Hirofumi)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 10454935  
丸山 崇 (MARUYAMA Takashi)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 20533194  
(平成25年4月1日 平成26年3月31日)
  - (3) 連携研究者  
水村 和枝 (MIZUMURA Kazue)  
中部大学・生命健康科学部・教授  
研究者番号 : 00109349