

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08076

研究課題名(和文) 体液調節におけるムスカリン受容体の包括的な役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of systemic roles of muscarinic receptor in body fluid regulation.

研究代表者

海野 年弘 (Unno, Toshihiro)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90252121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：体液量の調節は生命の維持に必須であり、体への流入水分量と体外への排出水分量は、神経やホルモンの働きにより調節されている。本研究では、神経伝達物質の一つであるアセチルコリン(ACh)が作用するM2ムスカリン受容体に着目し、同受容体が体液調節に重要な役割を果たすホルモンであるバソプレシン(AVP)の合成や分泌調節にどのような役割を果たしているか明らかにしようとした。その結果、M2ムスカリン受容体の刺激は視床下部視索上核におけるAVPの合成および分泌を促進するように調節しており、同受容体の新たな役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AVPは体液量の恒常性を調節する主要なホルモンの一つであり、その分泌不全は尿崩症や夜間頻尿の原因となっている。また、ホルモンとして腎臓に作用するだけでなく、分泌されたAVPが近くの神経細胞に作用して、神経細胞の破壊を防ぐ働きをすることも明らかになっている。さらに、AVPは社会認知能力の獲得やストレスに対する反応性にも関与しており、うつ病などの精神疾患の発症に関わっていると考えられている。したがって、AVPの分泌調節機構について検討した本研究結果は、上述した疾患における新たな治療薬の開発につながる基礎情報を提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regulation and maintenance of body fluid is crucial for the vital homeostasis, and the water influx to and outflow from body are exactly regulated by various neurotransmitters and hormones. In the present study, we have focused on M2 subtype of muscarinic receptors, of which the neurotransmitter acetylcholine acts on them, and aimed to elucidate if M2 subtype regulates synthesis and secretion of arginine-vasopressin (AVP) in mice hypothalamus, which plays an important role in body fluid regulation. The results suggest that M2 subtype promotes AVP synthesis in the supraoptic nuclei and play an important role in the regulation and maintenance of body fluid.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：バソプレシン ムスカリン受容体 M2サブタイプ ノックアウトマウス 体液調節 視床下部視索上核 視床下部室傍核 GABA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

生体では、体液量が減少したり、血漿浸透圧が上昇すると、抗利尿ホルモンとして知られるバソプレシン (AVP) の合成および分泌が促進される。AVP は、視床下部の視索上核および室傍核に存在する巨細胞性神経分泌細胞 (MNCs) の細胞体で合成され、軸索輸送により下垂体後葉の神経終末に到達した後、血中へと分泌される。分泌された AVP は、腎臓における集合管の V2 受容体に作用して水の再吸収を促すことで尿の濃縮を行い、体液量を保持する役割を果たしている。MNCs における浸透圧センサーを介した AVP の分泌調節については、これまでに詳細な検討がなされている。しかし、神経伝達物質やホルモンによる AVP の分泌調節については、断片的な報告に限られており、脳室内へ投与したムスカリン受容体作動薬が AVP の分泌を促進することは報告されているものの、その作用を仲介する受容体サブタイプや詳細なメカニズムおよび生理学的意義は不明であった。

ムスカリン受容体は、コリン作動性神経の伝達物質であるアセチルコリン (ACh) の作用を仲介する受容体であり、中枢および抹消を問わず様々な組織・器官に広く分布している。同受容体には M1 ~ M5 まで 5 種類のサブタイプが存在しており、同一の組織・器官には複数のサブタイプが発現している。体液の自律性調節に重要な役割を果たす視床下部には、M2 サブタイプが比較的多く発現していることが報告されている (Okii et al., Brain. Res., 2005) もの、同サブタイプがどのような役割を果たしているのかはこれまで明らかにされていない。我々はこれまで、ムスカリン受容体サブタイプの欠損マウスを用いて、消化管や膀胱における内臓平滑筋の収縮発現に関わる M2 と M3 サブタイプの役割を追求してきた (Unno et al., Br. J. Pharmacol., 2006; Tanahashi et al., Neurogastroenterol. Motil., 2013)。その課程において、M2 サブタイプの欠損マウス (M2-KO マウス) では、排尿量と飲水量が野生型と比較して有意に増加していることを見出した。さらに、血中の AVP 濃度を測定したところ、M2-KO マウスでは有意に低下していることも明らかとなった。すなわち、これらの結果は、M2 サブタイプが AVP の合成・分泌を促進的に調節していることを示唆しており、同サブタイプが欠損すると AVP 分泌が低下して多飲・多尿となることを示している。このような背景から我々は、体液調節における同サブタイプの包括的な役割を解明するために本研究を行った。

2. 研究の目的

体液量の調節は生命の維持に必須であり、流入水分量と排出水分量は、神経性・体液性因子の調節により厳密に制御されている。我々は、体液調節に重要な役割を果たす AVP の分泌調節に、ACh の作用を仲介する M2 ムスカリン受容体サブタイプが関与することを初めて見出している。本研究では、体液調節における M2 ムスカリン受容体の新たな制御機構を解明する目的で、サブタイプ欠損マウスを用いて AVP 分泌調節機構の詳細を明らかにするとともに、別の体液調節因子であるアルドステロンの分泌調節、および体液の保持に直接影響を及ぼす腎機能の調節にムスカリン受容体サブタイプがどのような役割を果たすのか解明するため、以下の点について検討した。

- (1) M2 サブタイプを介した AVP の促進性調節がどのようなメカニズムで発現するのか (同物質の合成促進に基づくのか、放出促進に基づくのか)。
- (2) AVP の促進性調節をもたらすコリン作動性神経はどのような神経回路を形成しているのか (視索上核および室傍核に存在する MNCs に直接シナプス接続しているのか、他の神経を介して間接的に MNCs を制御しているのか)。
- (3) アルドステロンの分泌調節にも M2 サブタイプが関与しているのか。
- (4) 腎機能の維持・調節に M2 サブタイプが関与しているのか。
- (5) M2 以外のサブタイプを介した体液の調節機構が存在するのかどうか。

これらの点を明らかにするために、ムスカリン受容体サブタイプ欠損マウスを用い、AVP の合成・分泌能、コリン作動性神経と MNCs との間の神経回路網、アルドステロンの分泌能、腎機能、排尿機能を検討し、野生型のものと比較・解析した。

3. 研究の方法

(1) AVP 含有神経細胞の数的および質的变化: M2-KO マウスで見られた血漿中 AVP 濃度の減少が、MNCs における AVP 合成の減少に基づくのか、MNCs からの AVP 放出の減少に基づくのかを明らかにするため、M2-KO マウスの脳切片において抗 AVP 抗体を用いた免疫染色を行い、視索上核および室傍核における陽性細胞の形態を観察するとともに、陽性細胞数を計測し、野生型と比較した。さらに ELISA 法により両者の脳標本中の AVP 含有量も比較した。

(2) 腎機能および排尿機能の評価: M2-KO マウスにおける排尿量、排尿回数および飲水量を測定し野生型の場合と比較した。排尿量および排尿回数は、代謝ケージにマウスを移し、18 時間の排尿量および排尿回数について電子天秤を用いた連続測定により求めた。また、M2-KO マウス

の腎臓における V2 受容体の発現量を ELISA 法により測定し、同受容体の反応性を確認するため、AVP の類似体である デスモプレシンの投与試験による排尿機能の変化を評価した。さらに、腎機能マーカーである BUN、クレアチニン値を測定した。排尿機能を評価するため、膀胱平滑筋のコリン作動性収縮反応性を評価した。

(3) AVP およびアルドステロンの血中濃度の測定：体液を保持するホルモンとして AVP および副腎皮質から分泌されるアルドステロンが知られており、これらの分泌調節に M2 サブタイプが関与しているか明らかにするため、M2-KO マウスにおける血漿 AVP およびアルドステロン濃度を測定し、野生型と比較した。AVP およびアルドステロン濃度の測定にはラジオイムノアッセイ法を用いた。

(4) c-Fos の免疫組織化学：AVP の分泌が促進する情報伝達経路上にコリン作動性神経が関与するかどうか検討するため、コリン作動薬の投与を行い、神経活動により増加する c-Fos の発現量を M2-KO と野生型マウス間の視床下部で比較した。

(5) GABA の自発性放出に伴う抑制性微小シナプス後電流の記録：マウスの視床下部スライス標本を作製し、AVP を分泌する巨細胞性神経分泌細胞 (MNCs) から、GABA の自発性放出に伴う抑制性微小シナプス後電流 (mIPSC) をパッチクランプ法により記録した。mIPSC の振幅および発射頻度に対してムスカリン受容体作動薬が及ぼす影響およびその効果に対する M2 サブタイプに比較的选择性を持った拮抗薬の作用を解析した。

(6) AVP 合成細胞におけるコリン作動性神経および GABA 作動性神経の神経支配様式の探索：AVP 抗体と M2 受容体抗体による二重染色、あるいは GABA 抗体と M2 受容体抗体による二重染色により、AVP 合成細胞および GABA 作動性神経における M2 受容体の局在の有無を確認し、AVP 合成および分泌調節における GABA 作動性神経細胞およびコリン作動性神経による神経支配様式を検討した。

(7) 視床下部の視索上核および室傍核からは AVP とともにオキシトシンも分泌されることが知られている。そこで、オキシトシンについても M2 サブタイプを介した合成・分泌調節が存在するかどうか検討するため、M2-KO マウスの脳切片において抗オキシトシン抗体を用いた免疫染色を行い、視床下部視索上核および室傍核における陽性細胞数を計測し、野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) M2-KO マウスの脳切片において抗 AVP 抗体を用いた免疫染色を行い、視床下部視索上核および室傍核における陽性細胞数を計測し、野生型と比較した。その結果、室傍核における AVP 陽性細胞の数は両者で差が認められなかったものの、視索上核では M2-KO マウスで有意に減少していた (図 1 および 2)。

(2) ELISA 法により脳標本中の AVP 含有量を比較したところ、M2-KO および野生型マウスの間で差は認められなかったが、血漿中 AVP 濃度は M2-KO マウスで有意に減少していた (図 3C)。これらの結果から、M2 ムスカリン受容体サブタイプが視索上核に

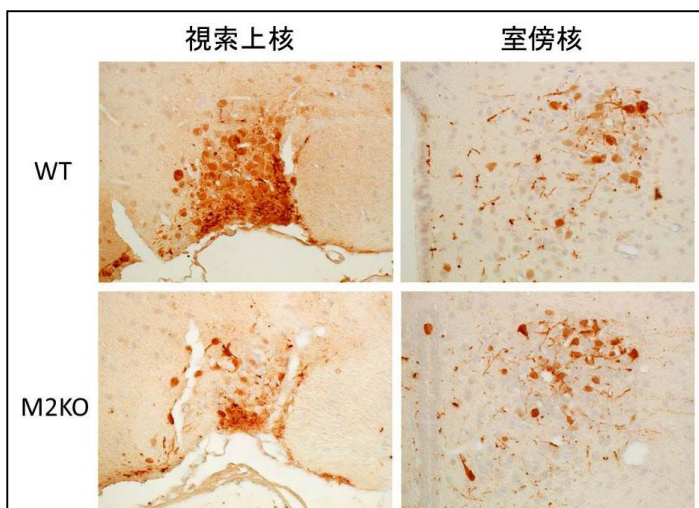


図 1. 野生型 (WT) および M2 欠損型 (M2KO) マウスの視床下部における AVP 陽性細胞

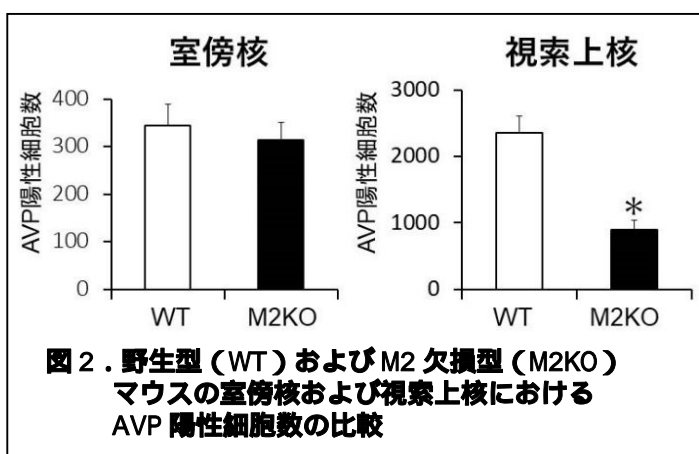
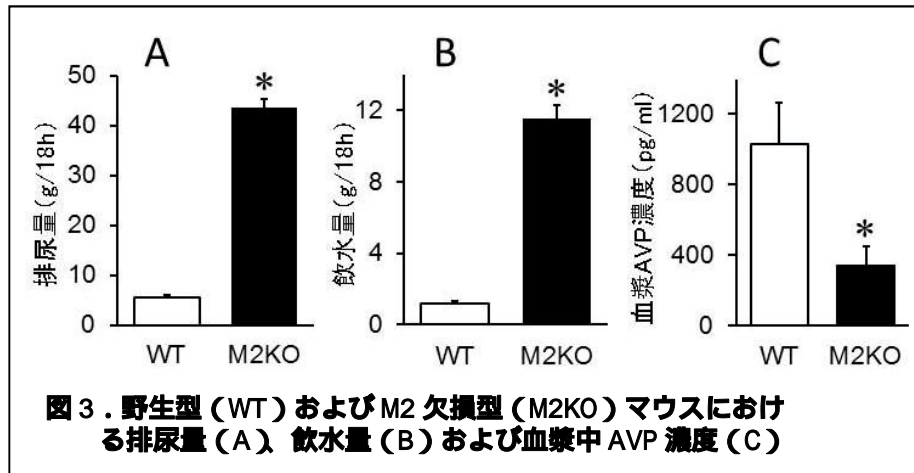


図 2. 野生型 (WT) および M2 欠損型 (M2KO) マウスの室傍核および視索上核における AVP 陽性細胞数の比較

における AVP の合成・分泌を促進性に制御していることが示唆された。



(3) 排尿量、排尿回数および飲水量を計測した結果、M2-KO マウスではいずれも野生型に比べ有意に増加しており、多飲・多尿の状態になっていた(図 3A および B)。このような影響は M3 サブタイプを欠損したマウスでは認められなかった。多飲・多尿の原因として、AVP の減少だけでなく腎機能の異常 (V2 受容体の減少や反応性の低下) も関与しているのかを明らかにするため、M2-KO マウスの腎臓における V2 受容体の発現量および反応性を ELISA 法およびデスマプレシン投与試験により検討した結果、いずれも野生型と差は認められなかった。また、M2-KO マウスにおける排尿量、排尿回数の増加が、膀胱の収縮機能の異常ではないことも確認した。

(4) コリン作動薬のピロカルピンをマウスに投与し、視床下部室傍核および視索上核における c-Fos の発現を検討したところ、野生型マウスでは視索上核における発現が有意に増加した。一方、M2-KO マウスでは、ピロカルピンによる視索上核における c-Fos 発現が抑制され、野生型と比較して有意に低下していた。この結果は、視床下部視索上核において M2 サブタイプの刺激を介した神経回路の存在を示唆している。

(5) M2 ムスカリン受容体サブタイプが視索上核における AVP の合成・分泌を促進性に制御するメカニズムを明らかにするため、AVP を分泌する巨細胞性神経分泌細胞 (MNCs) から、GABA の自発性放出に伴う抑制性微小シナプス後電流 (mIPSC) をパッチクランプ法により記録し、ムスカリン受容体作動薬および拮抗薬の効果を検討した。その結果、mIPSC の発射頻度が M2 サブタイプを介して減少することが明らかとなった。これらの結果から、M2 サブタイプが GABA の放出を抑制的に制御することにより、視索上核における AVP の合成・分泌を促進性に調節していることが示唆された。

(6) 視床下部における AVP および M2 サブタイプに対する免疫組織化学実験を行ったところ、コリン作動性神経が直接 AVP 分泌細胞とシナプスを形成するのではなく、別の神経、おそらく GABA 作動性神経を介して間接的に AVP 分泌細胞の機能を調整する可能性が示唆された。さらに、AVP 抗体と M2 受容体抗体による二重染色、あるいは GABA 抗体と M2 受容体抗体による二重染色を実施した結果、GABA 作動性神経とコリン作動性神経が直接シナプスを形成して AVP の合成および分泌を調節しているのではなく、介在神経を介して間接的な神経支配により AVP の合成・分泌調節に関わっていることが示唆された。

(7) M2-KO マウスにおける血漿アルドステロン濃度を測定し、野生型と比較した結果、欠損型と野生型でアルドステロンを分泌する副腎皮質について形態・機能的な差異は認められなかったものの、欠損型ではアルドステロン濃度が有意に低下しており、アルドステロンの分泌調節にも M2 サブタイプが関与していることが示唆された。

(8) AVP と同様に、視床下部の視索上核および室傍核の MNCs 細胞で合成されるオキシトシンについても M2 サブタイプによる合成の調節が存在するのか検討するため、M2-KO マウスの脳切片において抗オキシトシン抗体を用いた免疫染色を行い、視床下部視索上核および室傍核における陽性細胞を計測し、野生型と比較した。その結果、室傍核におけるオキシトシン陽性細胞の数は両方で差が認められなかったものの、視索上核では M2-KO マウスで有意に減少していた。この結果は、M2 サブタイプが視床下部室傍核において AVP とオキシトシンの両者について合成・分泌を促進性に調節していることを示唆している。

<引用文献>

Oki T., Takagi Y., Inagaki S., Taketo M., Manabe T., Matsui M., Yamada S., Quantitative analysis of binding parameters of [3H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 133:6-11, 2005.

Unno T, Matsuyama H, Izumi Y, Yamada M, Wess J, Komori S. Roles of M2 and M3 muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse ileum studied with receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.*, 149:1022-1030, 2006.

Tanahashi Y, Waki N, Unno T, Matsuyama H, Iino S, Kitazawa T, Yamada M, Komori S. Roles of M2 and M3 muscarinic receptors in the generation of rhythmic motor activity in mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil.*, 25:e687-697, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Alom, F., Miyakawa, M., Matsuyama, M., Nagano, H., Tanahashi, Y., Unno, T.	4. 巻 80
2. 論文標題 Possible antagonistic effects of the TRPC4 channel blocker ML204 on M2 and M3 muscarinic receptors in mouse ileal and detrusor smooth muscles and atrial myocardium.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1407-1415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0197	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 Alom F., Matsuyama H., Nagano H., Fujikawa S., Tanahashi Y., Unno T.	4. 巻 81
2. 論文標題 Involvement of transient receptor potential melastatin 4 channels in the resting membrane potential setting and cholinergic contractile responses in mouse detrusor and ileal smooth muscles.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 217-228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0631	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 Nagano, H., Sobue, Y., Matsuyama, M., Saito, S., Sakai, H., Alom, F., Tanahashi, Y., Ishii, T. and Unno, T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Muscarinic M2 receptor promotes vasopressin synthesis in mice supraoptic nuclei.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JOE-17-0630	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 Kinoshita, K., Muroi Y., Unno T., Ishii, T.	4. 巻 134
2. 論文標題 Rolipram improves facilitation of contextual fear extinction in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 55-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2017.04.002.	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 Tanahashi, Y., Katsurada, T., Inasaki, M., Uchiyama, M., Sakamoto, S., Yamamoto, M., Matsuyama, T., Komori, S., Unno, T.	4. 巻 318
2. 論文標題 Further characterization of the synergistic activation mechanism of cationic channels by M2 and M3 muscarinic receptors in mouse intestinal smooth muscle cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C514-C523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00277.2019.	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Nagano H., Tasker J., Matsuyama M., Sobue Y., Saito S., Sakai H., Ishii T., Tanahashi Y., Unno T.
2. 発表標題 M2 muscarinic receptor mediates arginine-vasopressin synthesis possibly through decreasing presynaptic GABA release in the supraoptic nuclei.
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Alom F., Matsuyama H., Nagano H., Tanahashi Y., Unno T.
2. 発表標題 Possible involvement of TRPM4 channels in the cholinergic contractile responses in mouse detrusor and ileal smooth muscles.
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永野宏、Tasker Jeffrey、松山勇人、棚橋靖行、石井利明、海野年弘
2. 発表標題 M2ムスカリン受容体はシナプス前性GABA放出を抑制し視索上核バゾプレシンニューロンの興奮を促進する
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本隆、永野宏、海野年弘、飯野哲
2. 発表標題 成体ラット脳におけるムスカリン受容体M2の局在解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inaba N., Nagano H., Alom F., Matsuyama H., Tanahashi Y., Unno T.
2. 発表標題 Functional roles of M2 subtype of muscarinic receptors in the regulation of motor activity in mouse colon.
3. 学会等名 The 92nd Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Unno T., Inaba N., Nagano H., Hashimoto T., Iino S., Matsuyama H., Saito S., Tanahashi Y.
2. 発表標題 M2 muscarinic receptors possibly facilitate oxytocin synthesis in the mouse supraoptic nuclei.
3. 学会等名 The 93rd Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
4. 発表年 2020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
研究 分担者	齋藤 正一郎 (Saito Shouichiro) (60325371)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	松山 勇人 (Matsuyama Hayato) (80345800)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	
研究 協力者	棚橋 靖行 (Tanahashi Yasuyuki)		
研究 協力者	橋本 隆 (Hashimoto Takashi)		
研究 協力者	タスカ - ジェフリー (Tasker Jeffrey)		
研究 協力者	酒井 洋樹 (Sakai Hiroki)		
研究 協力者	永野 宏 (Nagano Hiroshi)		
連携 研究者	石井 利明 (Ishii Toshiaki) (50264809)	帯広畜産大学・畜産学部・教授 (10105)	
連携 研究者	飯野 哲 (Iino Satoshi) (40242854)	福井大学・医学部・教授 (13401)	