

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06403

研究課題名(和文) 脳弓下器官のアンジオテンシンII誘発性持続性活性は生理的調節機構か病態の発端か

研究課題名(英文) Is the angiotensin II-induced persistent activity in the subfornical neurons physiological or pathological?

研究代表者

澁谷 泉 (SHIBUYA, Izumi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50162649

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)：脳弓下器官(SFO)は血液脳関門を欠くため、末梢血中のアンジオテンシンII(AII)などを受容することから体液量、体液浸透圧調節中枢と見なされている。本研究では、SFOニューロンを急性単離することにより、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)画像解析とパッチクランプ法により、SFO細胞の特性を解析した。SFOニューロンは1 nM以上のAIIに対してのみ、持続性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を引き起こした。この持続性応答はSFOの生理的抑制因子であるGABA、Galanin、ANPにより可逆的に抑制されたことから、病理的な反応ではなく、SFOニューロンの生理的調節メカニズムの一部であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人の体重の60%以上は水であるが、その大量の液体の量と、その浸透圧はわずか数%の範囲で調節されている。血圧・体液量・体液浸透圧は神経性、および液性に調節される。液性調節の中で主要なホルモンであるアンジオテンシンIIは、血液脳関門を欠く脳弓下器官(SFO)のニューロンによって直接感知される。今回の研究では、アンジオテンシンIIがSFOニューロンの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を持続的に上昇させること、およびこの現象が飲水行動や抗利尿反応の発現に重要な生理的反応であると示唆する結果を得た。この成果は今後、体液量・浸透圧に関する疾患の予防・治療に役立つと思われる。

研究成果の概要(英文)：The subfornical organ (SFO) senses circulating angiotensin II (AII) because of its lack of the blood-brain barrier (BBB), and therefore, regarded as the major site of the central nervous system controlling the volume and osmolality of the body fluid. In the present study, we measured the cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and the membrane current in acutely isolated SFO neurons. We found that only AII given at nanomolar concentrations induced persistent increases of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and that the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase was reversibly suppressed by the physiological inhibitory ligands in the SFO, GABA, galanin and ANP. These results suggest that the AII-induced persistent [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase is the physiological regulatory mechanism for SFO neurons, and does not reflect pathological reactions.

研究分野：神経生理学

キーワード：脳弓下器官 アンジオテンシンII GABA Galanin ANP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳弓下器官(subfornical organ: 以下、SFO)は脳室周囲器官の一部であり、血液脳関門を欠く特性により、中枢神経系にありながら、循環血液中のホルモンなど末梢からの情報を感知する。SFOは心機能・血圧・体液量・体液浸透圧・摂食量など多くの重要な生理機能の調節に関して重要な役割を果たしていることが知られている。特に、循環機能・体液調節機能に関連して、末梢血中のホルモン、アンジオテンシン II(以下、Ang II)濃度の上昇に関しては、SFO 破壊動物では Ang II 誘発性の飲水行動が生じないことから、Ang II の受容・指令統合において SFO が複数ある脳室周囲器官の中でも中心的な役割を果たすことは明白である。

SFO を介した飲水行動の調節に関しては促進的に作用する Ang II だけでなく、Ang II に拮抗的に抑制的に作用する ANP の作用についても複数の先行研究があり、この両者がどのようなメカニズムで拮抗作用を生じるのかについては不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

申請者は最近「単離 SFO ニューロンが 1-100 nM の Ang II でわずか 30 秒間刺激すると、持続的活性化を示す」ことを見いだした。本研究では、この発見を端緒に、Ang II による SFO の長期的機能調節の分子・細胞機構を解明し、その調節が SFO に固有の調節メカニズムなのか、あるいは他の脳室周囲器官あるいは関連の自律神経中枢にも共通の現象なのかを明らかとする計画である。さらに、Ang II による持続性促進反応に対して、SFO の機能を抑制することが知られる ANP や GABA,あるいは Galanin などの生理的因子がどのような作用を発現するのかについても詳細に解明する。

### 3. 研究の方法

Ang II による長期的 SFO ニューロン活性化メカニズムを解析するために、細胞レベルで細胞生理学的な解析を行う。急性単離ニューロンにおいて蛍光色素を用いた細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) イメージングを行い、Ang II ならびに、その他の SFO ニューロンに興奮性の作用を有する伝達物質、ホルモンを適用し、その効果を詳細に解析する。加えてそれらの因子により、持続性  $Ca^{2+}$  濃度上昇がどのような条件下で生じるのかについて解析を行う。さらに、持続性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の細胞内機構を解析する。

### 4. 研究成果

【令和元年度】Ang II 以外の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を引き起こす刺激として、50mM  $K^+$ 、グルタミン酸、カルバコール、アルギニンバソプレシン、ATP、エンドセリンを用いた。最大反応を生じる濃度領域において Ang II 以外の刺激では持続性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は生じなかった。次に、Ang II 100nM の刺激持続時間を 30 秒、1 分、3 分、9 分と変化させて  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を観察したところ、わずか 30 秒の刺激で持続性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が生じることが判明した。この  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は 60 分観察しても持続していた。また、グリア細胞の一部で Ang II に反応する細胞がみられたが、グリア細胞では持続性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は生じなかった。Ang II の濃度を 1p, 10p, 100p, 1n, 10n, 100nM と変化させて反応を観察したところ、1nM 以上では持続性が観察され、それ未満では一過性の上昇、あるいは周期的な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇と下降の繰り返し反応、いわゆる  $Ca^{2+}$  オシレーションの反応がみられた。これらの結果から、一部の SFO ニューロンにおいて観察される Ang II 誘発性の持続性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は、Ang II 受容体に限局した反応であり、さらにニューロンのみが存在する機構であることが判明した。さらに、生理的な血漿 Ang II 濃度は 1- 100pM の範囲であると推定されることから、生体内において生理的濃度範囲を超えた Ang II が SFO ニューロンの持続性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を生じることが示唆された。

【令和2年度】1nM 以上の Ang II によって生じる持続性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇反応は GABA, 100nM~100  $\mu$ M で可逆的に、かつ濃度依存性に抑制された。10  $\mu$ M 以上では Ang II による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が完全に抑制された。GABA<sub>A</sub> 受容体および GABA<sub>B</sub> 受容体の選択的アゴニストであるムシモールとバクロフェンの両者が GABA と同様の抑制効果を示した。また、GABA による抑制効果は GABA<sub>A</sub> 受容体と GABA<sub>B</sub> 受容体の選択的アンタゴニストであるピククリンと CGP55845 の一方の投与では解除されなかったが、両者を同時に加えると解除された。SFO ニューロンをパッチクランプ法で膜電位固定して観察される膜電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネル電流 (ICa) はバクロフェン, 1~100  $\mu$ M により抑制され、その抑制は CGP55845 によって解除された。SFO ニューロンの Ang II 誘発性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は 100 nM Galanin によっても可逆的に抑制された。その抑制の大きさは GABA とほぼ同程度であったが、抑制が観察されるニューロンは約 60%程度であった。ANP は約 30%程度のニューロンで Ang II 誘発性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を可逆的に抑制したが、抑制の大きさは GABA と Galanin に比較して小さかった。SFO ニューロン、グリア共に ATP に対して  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を示した。ATP による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇はニューロンでは細胞外  $Ca^{2+}$  除去で消失したが、グリアでは影響を受けなかったことから、異なるメカニズムが関与することが示唆された。

【令和3年度】過去2年間に渡って、飲水行動・体液量/循環調節において中心的役割を果たす脳弓下器官(SFO)の急性単離ニューロンにおいて、アンジオテンシン II(AII)により持続性の $[Ca^{2+}]_i$ の持続性増加が引き起こされる現象とそのメカニズムについて解析してきた。最終年度はこの持続性の $[Ca^{2+}]_i$ 増加現象が細胞傷害などによる病理的な変化ではなく、SFOニューロンの生理的な機能調節メカニズムの一端であることの証明として、AII誘発性持続性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の抑制メカニズムの詳細な解析を試みた。これまでの実験成績より、AII誘発性持続性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加はSFOニューロンの生理的抑制因子であるGABA、Galanin、ANPによって可逆的に抑制されることが判明していたため、本年度の実験計画は、それら3者による抑制の分子・細胞メカニズムを解析することとした。そのため、急性単離SFOニューロンに $Ca^{2+}$ 感受性蛍光色素であるFura-2あるいはFluo-4による $[Ca^{2+}]_i$ 画像解析法、ならびにパッチクランプ法を適用した。また、SFOにおけるANP受容体のサブタイプをリアルタイムRT-PCR法を用いて解析した。その結果、GABAによる抑制反応は、イオン向性のGABA<sub>A</sub>受容体と代謝向性のGABA<sub>B</sub>受容体の両者によって生じること、Gi蛋白共役型受容体であることが判明しているGABA<sub>B</sub>受容体とGalanin受容体による抑制メカニズムには膜電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルが関与していることが明らかとなった。加えて、SFOに発現する主要なANP受容体はGC-AおよびGC-Bであること、ならびにこの受容体を介した抑制メカニズムはグアニル酸シクラーゼ(GC)、cGMP依存性プロテインキナーゼ(PKG)を介した抑制機構であり、膜電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルへの直接抑制作用は持たないことが判明した。

以上の結果から、SFOニューロンにおいてナノモル以上のAIIにだけ特異的に発生する持続性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は、SFOの機能調節に重要な役割を果たす3種の生理的抑制因子(GABA、ANP、Galanin)の全てで可逆的に抑制され、その抑制の解除後には、抑制反応発現前とほぼ同一の持続性に復帰することが明らかとなった。この成績は、AII誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応が、細胞膜の傷害などによる病理的な反応ではなく、おそらくはSFOニューロンの機能発現に必要な生理的あるいは病態生理的応答に関与するものと推察される。

さらに、ヒトならび複数の哺乳類で報告されているAIIの生理的血漿濃度は数10ピコモル程度であり、AII血漿濃度がナノモルレンジに至る状況は、高血圧などの循環系の疾患と推察されることから、今回我々が見いだした持続性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は、なんらかの病態におけるSFO機能発現に関与している可能性が示唆された。一方、ピコモル濃度の範囲では、AIIは $Ca^{2+}$ オシレーションを引き起こすことが観察されたことから、生理的な条件下ではSFOニューロンは $[Ca^{2+}]_i$ が周期的に上昇・下降を繰り返す性質を有する可能性が示唆された。このような $[Ca^{2+}]_i$ の周期的変動は長期的に $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を維持する他の細胞でも見られている現象であり、SFOを起点とする飲水や浸透圧・循環調節の発現に重要に関与している可能性も考えられた。

AIIによる持続性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を最も強力に抑制したのはGABAであったが、その作用はこれまでSFOニューロンの調節を媒介する中心的な受容体であるGABA<sub>A</sub>受容体のみならず、GABA<sub>B</sub>受容体も重要に抑制機構に関与することが初めて明らかとなった。イオン向性と代謝向性の異なる分子機構を有する2種の受容体を介した冗長とも思われる2重の抑制機構の存在の生理的意義については現時点では不明であるが、一方の抑制が効果を発揮しにくくなるような病態などでは確実にAIIなど興奮性因子の作用に拮抗する必要があるのかもしれない。さらに、AIIによる強力な飲水行動の発現を完全に拮抗するANPは細胞レベルではAIIの応答を部分的にししか解除しなかった。この理由については、さらなる解析が必要であるが、我々が観察したのはあくまでもAIIに応答するSFOニューロンでの現象であり、AIIに応答しないニューロンでANPが優的な抑制作用を生じる可能性は十分に考えられる。

SFOから単離されたニューロンとグリアでは、複数の共通のアゴニストで $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応が生じることが判明したが、反応の特性として、ニューロンでの応答はほぼ完全に細胞外からの $Ca^{2+}$ 流入によって維持されていたのに対して、グリアでは細胞内 $Ca^{2+}$ ストアからの $Ca^{2+}$ 放出に依存していた。加えて、グリアでの $Ca^{2+}$ 放出機構には、IP<sub>3</sub>依存性放出(IICR)とカフェイン・リアノジン依存性放出(CICR)の両者が存在することが明らかとなり、SFO内でのニューロン-グリア相互連関が機能調節に重要である可能性も考えられる。この可能性について、特にグリアで著明な反応を生じたATPに関しては、ニューロン-グリア間の情報伝達物質である可能性について今後の研究が待たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yu Izumisawa, Kenji Ito, Keisuke Sugita, Tazuyo Arai, Hina Kokudo, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya	4. 巻 1763
2. 論文標題 Mechanisms of GABA-mediated inhibition of the angiotensin II-induced cytosolic Ca <sup>2+</sup> increase in rat subfornical organ neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	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） 10.1016/j.brainres.2021.147451.	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 Yu Izumisawa, Keiko Tanaka-Yamamoto, John Ciriello, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya	4. 巻 1718
2. 論文標題 Persistent Cytosolic Ca <sup>2+</sup> Increase Induced by Angiotensin II at Nanomolar Concentrations in Acutely Dissociated Subfornical Organ (SF0) Neurons of Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 137-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2019.05.014.	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 泉澤有, 伊藤健司, 杉田圭輔, 新井鶴与, 國土姫菜, 北村直樹, 澁谷泉
2. 発表標題 脳弓下器官ニューロンにおけるアンジオテンシンIIによる持続的[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> 濃度上昇に対する抑制機構
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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	保坂 善真 (HOSAKA Yoshinao) (00337023)	鳥取大学・農学部・教授  (15101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	樋口 雅司  (HIGUCHI Masashi)  (70614791)	鳥取大学・農学部・准教授    (15101)	
研究分担者	北村 直樹  (KITAMURA Naoki)  (80301951)	鳥取大学・農学部・准教授    (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関