

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700384

研究課題名（和文）神経細胞生存制御機構におけるバソプレッシン受容体機能の解明と神経保護療法への応用

研究課題名（英文）Investigation of Vasopressin receptors function in neural cell survival system and development of neural-protection therapy

研究代表者

中村 和昭（NAKAMURA KAZUAKI）

独立行政法人国立成育医療研究センター・研究所薬剤治療研究部・室長

研究者番号：80392356

研究成果の概要（和文）：本研究では、バソプレッシン（AVP）の神経細胞死への関与を検討した。この過程で、脳内における AVP および AVP 受容体発現を検討し、グリア細胞におけるバソプレッシン V1a 受容体並びに AVP 発現を明らかにした。また、AVP が海馬神経培養系におけるカイニン酸誘導性神経細胞死を抑制することを明らかにした。カイニン酸誘導性の海馬変性モデルによる検討では、V1a 受容体欠損マウスおよび V1b 受容体欠損マウスにおいて、野生型マウスと比べカイニン酸によるてんかん発作症状の増悪が認められた。また、V1a 受容体欠損マウスおよび V1b 受容体欠損マウス間では V1b 受容体欠損マウスにおいてカイニン酸によるてんかん症状がより増悪した。この結果は AVP が海馬神経培養系におけるカイニン酸誘導性神経細胞死を抑制することと一致し、AVP が V1a 受容体および V1b 受容体を介して神経細胞保護作用を持つことを示している。また、AVP は直接的に神経細胞を保護する効果とともに、グリア細胞を介して神経細胞生存に寄与している可能性が考えられた。一方で、病理学的解析からカイニン酸による海馬神経細胞の脱落は V1b 受容体欠損マウスに比べ V1a 受容体欠損マウスにおいて顕著であることが示された。これらの結果から、神経細胞保護における V1a 受容体と V1b 受容体の作用が異なることが示唆された。以上より、AVP を介したグリア細胞機能を明らかにすることにより、神経細胞並びにグリア細胞双方を標的とした AVP およびそのアゴニスト等による神経細胞保護の可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：In this study, the roles of vasopressin (AVP) for neural cell death were examined. The gene expression analysis and immunohistochemical analysis revealed that V1a receptor and V1b receptor were expressed in hippocampal neuron and astrocyte, and that AVP was expressed in hippocampal astrocyte. AVP could reduce the kainic-acid induced hippocampal neural death in vitro. Kainic-acid induced hippocampus degeneration model showed that seizure severity of V1a receptor and V1b receptor knock out mice were reduced compare to wild type mice, respectively. These results suggest that AVP could protect hippocampal neuron via V1a and/or V1b receptor, and that AVP could protect hippocampal neuron via astrocyte indirectly as well as to neuron directly. On the other hand, immunohistochemical analysis for neural degeneration in kainic-acid induced hippocampus degeneration model showed that kainic-induced neural degeneration was more severe in V1a receptor knock out mice than in V1b receptor knock out mice. This result suggests that there are difference of neural protective function between V1a receptor and V1b receptor. Thus, it is suggest that investigation of AVP function for glial function as well as neural function lead to novel therapy strategy for neural degeneration disease using AVP and/or AVP agonist/antagonist.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：バソプレッシン、神経細胞保護、海馬、バソプレッシン受容体、グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

AVP は血圧調節ホルモンとしての心血管系への作用及び腎での水再吸収促進作用に基づく抗利尿作用を主たる生理機能として持つ下垂体後葉ホルモンで、体液の恒常性を維持している。その受容体として V1 及び V2 受容体が知られている。このうち V1 受容体は更に、V1a 受容体と V1b 受容体の 2 つに分類されている。V1a 受容体は肝臓、血小板、血管平滑筋、腎メサンギウム細胞などに発現しており、糖代謝、凝集、血圧調節に関与すると考えられている。一方、V1b 受容体は脳下垂体前葉に発現しており、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) や β -エンドルフィン分泌制御などに関与していると考えられている。さらに、V1a 受容体は中隔、大脳皮質、海馬及び視床下部を含む中枢神経系に広く分布しており、V1b 受容体もまた大脳皮質、海馬、視床下部を含む中枢神経系に広範囲に分布している。近年、このように脳内に広く分布する AVP 受容体と様々な精神疾患との関連を示唆する知見が多数報告されている。一方、最近 AVP が培養神経細胞株において、血清除去誘導性の細胞死に対して保護作用を示すことが報告された。このような AVP は古くて新しい神経機能調節因子と捉えることができ、中枢神経系において神経機能調節から神経細胞生存制御に至る広範な作用を有していると推測される。しかし、AVP の脳内における機能については不明な点も多く、特に神経変性疾患と AVP との関係はこれまで検討されていない。

2. 研究の目的

一般的に、中枢神経系の神経細胞は障害や変性疾患により失われると、その再生・機能回復は極めて困難である。多くの障害や神経変性疾患で見られるように、神経変性疾患の病態は最終的には神経細胞機能不全と細胞死

による神経細胞の脱落による。したがって、神経細胞の機能維持及び細胞保護は神経障害あるいは神経変性疾患における極めて有効な予防・治療法である。このため、神経機能制御及び神経細胞生存制御にかかわる内在性因子とその作用機序を解明し、得られた知見から神経機能・神経細胞を保護する有効な手法を見出すことが重要である。このような観点から本研究では脳内において広範な機能を有していると推測される AVP に着目し、特にこれまで注目されてこなかった神経変性疾患におけるバソプレッシン受容体の役割を解明し、神経変性疾患に対するバソプレッシン作用に基づいた予防・治療法の開発に繋がる成果を上げることが目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳内 AVP 受容体の分布を検討するため、海馬組織より、神経細胞およびアストロサイトを単離し、AVP 受容体遺伝子発現を検討した。また、同時に免疫組織化学により海馬における AVP 発現を検討した。

(2) マウス初代海馬神経細胞培養系を用いて、カイニン酸誘導性の細胞死に対する AVP の神経保護作用を検討した。

(3) 野生型マウス、V1a 受容体欠損マウス、V1b 受容体欠損マウスを用いてカイニン酸誘導性海馬細胞死モデルを作成し、その病態を検討することにより、AVP の神経細胞死への関与を検討した。カイニン酸投与後、30、60、90 分後のてんかん症状を観察し、既報に従い以下の基準をもとに点数化した；0、正常；1、動作の停止；2、けいれんを伴う頭部・頸部のミオクローヌス；3、片側性のけいれん；4、両側性のけいれん；5、体位の喪失、死亡。また、カイニン酸投与後 5 日目の海馬切片を作成し、抗 NueN 抗体による免疫組織化学を行い、神経細胞の脱落を観察した。

4. 研究成果

(1) 単離海馬神経細胞およびアストロサイトにおけるAVP受容体発現を検討した結果、神経細胞ならびにアストロサイトにおいてV1a受容体遺伝子発現が観察された(図1および図2)。

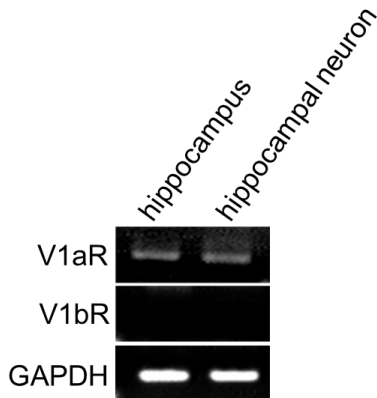


図1. 海馬神経細胞におけるAVP受容体発現の解析。

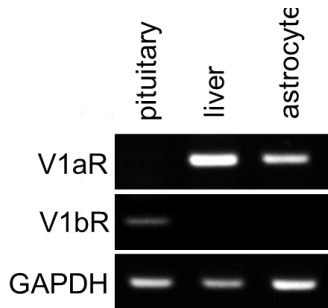


図 2. 海馬アストロサイトにおける AVP 受容体発現の解析

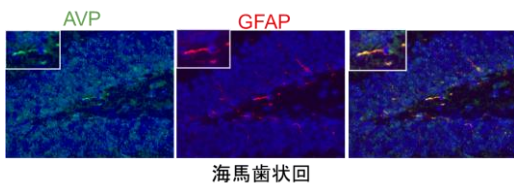


図 3.海馬アストロサイトにおける AVP 発現

これらの結果から、海馬においてはV1a受容体が主に発現しており、また神経細胞並びにアストロサイトにおいてV1a受容体が発現していると考えられた。また、免疫組織化学的検討からアストロサイトにおいてAVPの発現を認めた(図3)。これらの結果から、アストロサイトに由来するAVPが傍分泌的に周囲の神経細胞やアストロサイトに作用すると考えられ

た。

(2) マウス初代海馬神経細胞培養系による検討から、AVP (10^{-7} M) 添加によりカイニン酸誘導性の神経細胞死が抑制されることが明らかとなった(図4)。

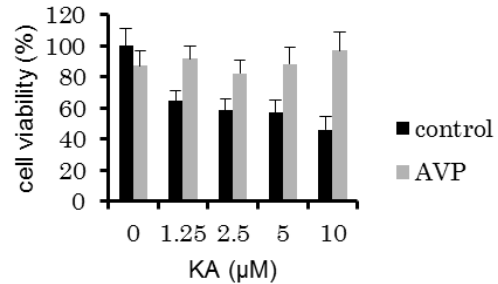


図4. カイニン酸誘導性神経細胞死に対するAVPの効果

(3) カイニン酸誘導性の海馬変性モデルによる検討では、V1a受容体欠損マウスおよびV1b受容体欠損マウスにおいて、野生型マウスと比べカイニン酸によるてんかん発作症状の増悪が認められた。また、V1a受容体欠損マウスおよびV1b受容体欠損マウス間ではV1b受容体欠損マウスにおいてカイニン酸によるてんかん症状がより増悪した(図5)。この結果はこれまでに観察したAVPが海馬神経培養系におけるカイニン酸誘導性神経細胞死を抑制することと一致し、AVPがV1a受容体およびV1b受容体を介して神経細胞保護作用を持つこと

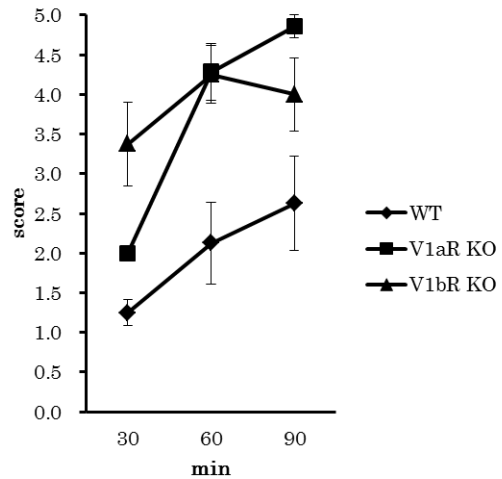


図 3. カイニン酸によるてんかん発作の誘導に対する AVP 受容体欠損の効果

を示している。

一方で、病理学的解析からカイニン酸による海馬神経細胞の脱落はV1b受容体欠損マウスに比べV1a受容体欠損マウスにおいて顕著であることが示された(図6)。これらの結果

から、神経細胞保護におけるV1a受容体とV1b受容体の作用が異なることが示唆された。

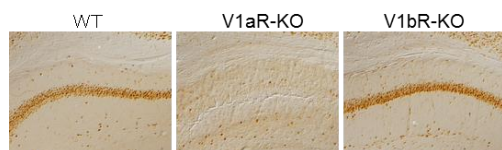


図 6. カイニン酸投与による海馬神経細胞の脱落

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 2 件)

- ① Nakamura K, Yamashita T, Fujiki H, Aoyagi T, Yamauchi J, Mori T, Tanoue A. Enhanced glucose tolerance in the Brattleboro rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読有、2011 405, 64-67. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.126>
- ② Mizutani R, Nakamura K*, Kato N, Aizawa K, Miyamoto Y, Torii T, Yamauchi J, Tanoue A. *; corresponding author. Expression of sorting nexin 12 is regulated in developing cerebral cortical neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 査読有、2012 90, 721-731. DOI: 10.1002/jnr.22795

[学会発表] (計 2 件)

- ① 中村和昭、田上昭人、アルギニンバソプレッシン (AVP) によるバソプレッシン V1 受容体を介した血糖制御、日本動物学会第 82 回旭川大会 (2011、旭川)
- ② 中村和昭、田上昭人、哺乳類バソプレッシンの神経系における役割、シンポジウム「哺乳動物の脳神経系およびホルモン研究に関する最近の話題」日本動物学会第 81 回大会 (2010、東京)

[図書] (計 2 件)

- ① 中村和昭、青柳利紀、田上昭人、AVP 受容体の生理作用—ノックアウトマウスの解析結果を中心に—、*Fluid Management Renaissance* 2011, 1, 2, 64-69
- ② 中村和昭、田上昭人、バソプレッシン受容体による ACTH 分泌と血糖の制御、医学のあゆみ「最新 G 蛋白質共役受容体研究

疾患解明とシグナル制御の新時代」2010, 233, 9, 802-806.

[その他]

ホームページ等

<http://111.89.135.117/TOP/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 和昭 (NAKAMURA KAZUAKI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・研究所薬剤治療研究部・室長

研究者番号：80392356