

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860153

研究課題名(和文)低浸透圧条件下におけるバソプレシンの分泌抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文)The inhibitory mechanism of AVP release under hyposmotic conditions

## 研究代表者

沼田 かのり(佐藤かのり)(Sato-Numata, Kaori)

福岡大学・医学部・特別研究員(RPD)

研究者番号：60614196

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):ラット視索上核から採取したアストロサイトの初代培養細胞を用いて、低浸透圧条件下で分泌される物質を同定した結果、タウリンのほかに、グルタミン酸とアスパラギン酸も分泌していることを見出した。低浸透圧条件下でAVPニューロンにタウリン又はGABAを暴露すると、脱分極が起こるにもかかわらず自発的興奮は抑制された。タウリン暴露による膜電位と自発的興奮への影響は、GABAA受容体又はグリシン受容体の阻害剤では解除されたが、GABAB受容体の阻害剤では影響がなかった。これらの結果より、タウリンによる膜の脱分極や自発的興奮の抑制効果は、グリシン受容体とGABAA受容体を介して起こっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文): We checked substances secreted under hypotonic conditions using primary cultured astrocytes collected from the rat SON region, and found that glutamic acid and aspartic acid are secreted in addition to taurine. Exposure of taurine or GABA to vasopressin neurons under hypotonic conditions suppressed spontaneous excitation despite membrane depolarization. The effect on membrane potential and spontaneous excitation by taurine exposure was abolished with inhibitors of GABAA receptors or glycine receptors but was not affected by inhibitors of GABAB receptors. From these results suggest ed that the effect on taurine to membrane depolarization and suppression of spontaneous excitation is occurred via glycine receptor and GABAA receptors.

研究分野：細胞生理学

キーワード：AVPニューロン 低浸透圧 タウリン アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

低浸透圧条件下では、脳下垂体後葉に局在する AVP ニューロンの軸索終末から血中へ分泌される AVP 量が減少する (Dunn et al 1973, J Clin Invest)。現在、この体液低浸透圧条件下におけるアルギニンバソプレシン (AVP) ニューロンの血中への AVP 分泌抑制のメカニズムは、低浸透圧刺激により、AVP ニューロン近傍のアストロサイトからタウリンが放出され、AVP ニューロンに発現するグリシンレセプター (GlyR) を活性化し、膜を過分極させることで、AVP ニューロンの自発的興奮が抑制される事によるという「タウリン-GlyR-過分極」説で広く説明されている (Hussey et al. 2000 Prog Neurobiol, Voisin & Bourque 2002 Trends in Neurosciences)。しかし最近、AVP ニューロンは、41 mM という比較的高い細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度をもち、その平衡電位から GlyR の活性化は膜を脱分極させる事をほのめかす報告 (Haam et al. 2012 J Neurosci) がなされ、低浸透圧刺激後の AVP ニューロンからの AVP 分泌抑制メカニズムは、根本的に再検討される必要が生じてきた (図 1 参照)。そこで、この真のメカニズムを解明するべく、まず、AVP ニューロンを含むラット視床下部視索

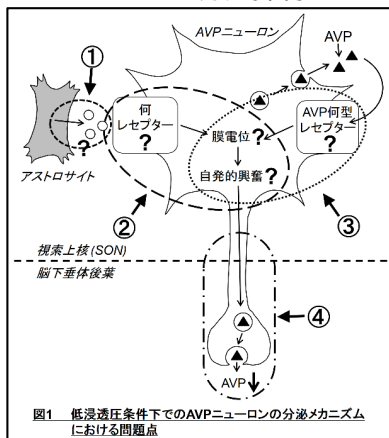


図1 低浸透圧条件下でのAVPニューロンの分泌メカニズムにおける問題点

上核 (supraoptic nucleus: SON) 領野からアストロサイトを単離・培養した。低浸透圧刺激によって放出されるタウリンは、エキソサイトーシス阻害剤のテタヌトキシン (TnTX) で影響を受けないが、容積感受性外向整流性 Cl<sup>-</sup>チャネル (VSOR) ブロッカーである DCPIB で抑制された。これらの実験結果より、低浸透圧条件下において、タウリンはアストロサイトからエキソサイトーシスによってではなく VSOR を介して放出されることが明らかとなった (図 2 参照, Sato-Numata et al. 2013 J Physiol Sci: 日本生理学会報告)。次に、以前に報告した SON 領野から他ニューロンと区別して AVP ニューロンを単離できる AVP-GFP ラットの実験系 (Ueta et al. 2005 Endocrin, Sato et al. 2011 Science

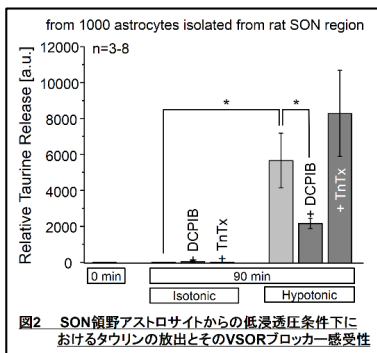


図2 SON領野アストロサイトからの低浸透圧条件下におけるタウリンの放出とそのVSORブロッカー感受性

Signaling) を用いて、GlyR を介する AVP ニューロンの活性化機構を確かめた。ナスタチン穿孔パッチクランプ法によって、細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度を 41 mM に保った状態で、膜電位の変化を確かめた結果、低浸透圧刺激そのものは静止膜電位レベルに影響を与えないが、事実、タウリンによって過分極ではなく著しい脱分極が引き起こされることを明らかにした。またこの脱分極応答は、GlyR アンタゴニストであるストリキニンで消失した事から GlyR の活性化を介していることが判明した。さらに、AVP ニューロンの自発的興奮を観察したところ、タウリンによって脱分極が起こるにもかかわらず、自発的興奮は完全に抑制された。その抑制はストリキニンで完全に回復した (図 3 参照, Sato-Numata et al. 2013 J Physiol Sci: 日本生理学会報告)。これらの実験結果より、低浸透圧刺激により AVP ニューロン近傍のアストロサイトから VSOR を介してタウリンが放出されること、そしてこのタウリンは AVP ニューロンの GlyR を活性化することの 2 点は確認された。しかし、in vivo と同じ正常の細胞内

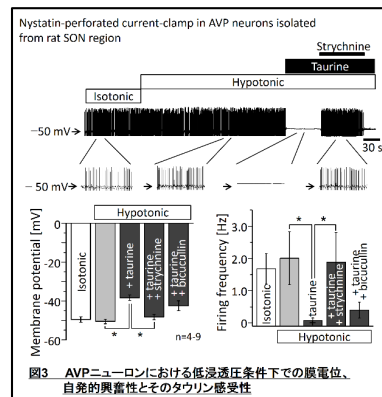


図3 AVPニューロンにおける低浸透圧条件下での膜電位、自発的興奮性とそのタウリン感受性

Cl<sup>-</sup>環境においてもタウリンによる GlyR 活性化が脱分極をもたらすのか、またそうだとすると脱分極がいかにして興奮性の抑制をもたらすのかは不明である。更には、タウリンによる GlyR 活性化が、低浸透圧条件下での AVP 分泌抑制にどの程度実際に関与しているのか、他の因子の関与は排除できるのかは全く不明のままである。今回の研究ではこれらの疑問に答えることを目的とする。また、私達は、低浸透圧刺激は AVP ニューロンの細胞体・樹状突起からの AVP 分泌をむしろ亢進することを見出しており (Sato et al. 2011 Science Signaling)、これによるオートクリン的作用がいかに関与するのかも含めて解明される必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、研究開始当初の背景及び研究経過から得られた予備実験結果を元に、AVP 分泌抑制メカニズムの解明するために研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした (図 1 参照)。低浸透圧条件でアストロサイトからタウリンの他に何がどのように放出されるのか？ AVP ニューロンは、で放出された物質によって、どのレセプターを介して、正常細胞内 Cl<sup>-</sup> 環境下で膜電位や興奮性にいかなる影響を与えるのか？ 低浸透圧条件で AVP ニューロンの

細胞体・樹状突起から分泌される AVP は、どのタイプの AVP レセプターを介して、正常細胞内 Cl<sup>-</sup> 環境下で膜電位や興奮性にいかなる影響を与えるのか？

### 3. 研究の方法

実験には、産業医科大学の上田陽一博士が開発した AVP-eGFP-TG ラットの視索上核 (SON) 領野を単離した AVP ニューロンを使用し、GFP 発現の有無によって他と区別した。細胞内電位測定、及び自発的発火活動の測定は、ナスタチン、又はグラミシジンによる穿孔パッチ電流固定法を用いて行った。電流測定は、パッチクランプ全細胞電圧固定法を用いて行った。遺伝子発現の確認は、SON 領野のスライス標本を用いた RT-PCR 法と、GFP 陽性 AVP ニューロンをパッチピペットで回収した細胞標本を用いた RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法を適用した。アストロサイトから分泌される物質の同定には、AVP-eGFP-TG ラット SON 領野のスライス標本から単離して初代培養したアストロサイトを用いて、質量分析法を適用して行った。AVP ニューロンの細胞体/樹状突起からの AVP 分泌量の測定は、ELISA 法を適用して実験を行った。

### 4. 研究成果

(1) 低浸透圧条件下でアストロサイトからタウリンの他に何がどのように放出されるのか？

ラット SON 領野から採取したアストロサイトの初代培養細胞を用いて、低浸透圧条件下で分泌される物質について質量分析法を適用して同定した。その結果、アストロサイトからタウリンのほかに、グルタミン酸とアスパラギン酸も分泌されることが明らかになった。

(2) AVP ニューロンは、 $\text{Cl}^-$  で放出された物質によって、どのレセプターを介して、正常細胞内  $\text{Cl}^-$  環境下で膜電位や興奮性にいかなる影響を与えるのか？

研究開始当初の背景及び研究経過から得られた予備実験結果によって、低浸透圧条件下でアストロサイトから分泌される事がすでに明らかになっていたタウリンを用いて主に実験を行った。低浸透圧条件下で起きている AVP ニューロンの自発的興奮にタウリンを暴露すると、脱分極が起こるにもかかわらず、自発的興奮は抑制された。この現象は、GABA を暴露した時にも同様に行き起こることが分かった。これらの結果から GABA レセプターがタウリン、または GABA 暴露による細胞内  $\text{Cl}^-$  環境下での膜電位や興奮性に影響を与えていると考えて、まず、AVP ニューロンに GABA レセプターが発現しているか否かを RT-PCR 法を適用して検討した。その結果、SON 領野には、GABA<sub>A</sub>、GABA<sub>B</sub> 共に発現していることが明らかになった。更に、AVP ニューロンにも GABA<sub>B</sub> レセプターが発現が認められた。しかしながら、タウリン暴露による膜電位及び自発的興奮への影響が、GABA<sub>A</sub> またはグリシンレセプターの阻害剤では解除されるのに対して、GABA<sub>B</sub> の阻害剤では全く影響がなかったことから、タウリンによる膜電位や自発的興奮性への

影響には、グリシンレセプターまたは GABA<sub>A</sub> レセプターを介して起こっていることが示唆された。

(3) 低浸透圧条件下で AVP ニューロンの細胞体・樹状突起から分泌される AVP は、どのタイプの AVP レセプターを介して、正常細胞内  $\text{Cl}^-$  環境下で膜電位や興奮性にいかなる影響を与えるのか？

低浸透圧条件下における AVP ニューロンの膜電位及び自発的興奮に、AVP がどのような影響を与えるのか、パッチクランプ法を用いて実験を行った。しかしながら、今日までに、報告できるまでの成果は得られておらず、今後の課題として残った。

### 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 4 件)

Tomohiro Numata, Kaori Sato-Numata, Yasunobu Okada, Ryuji Inoue  
Cellular mechanism for herbal medicine Junchoto to facilitate intestinal Cl<sup>-</sup>/water secretion that involves cAMP-dependent activation of CFTR.

Journal of Natural Medicines, 査読有, 72, 2018, 694-705

DOI: 10.1007/s11418-018-1207-9

Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata, Ryuji Inoue, Ravshan Z. Sabirov, Yasunobu Okada  
Distinct contributions of LRRRC8A and its paralogs to the VSOR anion channel from those of the ASOR anion channel.

Channels, 査読有, 11 (2), 2017, 167-172

DOI: 10.1080/19336950.2016.1230574

Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata, Ryuji Inoue, Yasunobu Okada  
Distinct pharmacological and molecular properties of the acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channel from those of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel.

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 査読有, 468 (5), 2016, 795-803

DOI: 10.1007/s00424-015-1786-1

Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata, Yasunobu Okada

Temperature sensitivity of acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in cortical neurons is involved in hypothermic neuroprotection against acidotoxic necrosis.

Channels, 査読有, 8 (3), 2014, 278-283

DOI: 10.4161/chan.27748

(学会発表) (計 6 件)

佐藤(沼田)かお理, 沼田朋大, 上田陽一,  
井上隆司, 岡田泰伸

パソプレシニューロンの高浸透圧で活性化されるフルフェナム酸感受性イオンチャネルの性質と役割

第 95 回日本生理学会大会, 2018 年 3 月 28-30 日、高松

佐藤(沼田)かお理, 沼田朋大, 井上隆司,  
サビロフ ラブシャン, 岡田泰伸

LRRC8 ファミリーは容積感受性外向整流性アニオンチャネル(VSOR)の活性に關与するが酸感受性外向整流性アニオンチャネル(ASOR)には關与しない.

第 94 回日本生理学会大会, 2017 年 3 月 28-30 日、浜松

佐藤(沼田)かお理, 沼田朋大, 井上隆司,  
岡田泰伸

酸感受性外向整流性アニオンチャネル(ASOR)と容積感受性外向整流性アニオンチャネル(VSOR)の薬理学的分別.

第 93 回日本生理学会大会, 2016 年 3 月 22-24 日、札幌

佐藤(沼田)かお理, 沼田朋大, 井上隆司,  
岡田泰伸,

酸感受性外向整流性 Cl<sup>-</sup>チャネル(ASOR)と容積感受性外向整流性 Cl<sup>-</sup>チャネル(VSOR)の薬理学的相違.

第 68 回日本薬理学会西南部会  
2015 年 11 月 21 日、下関

佐藤(沼田)かお理, 沼田朋大, 井上隆司,  
岡田泰伸

ニューロン酸感受性外向整流性アニオンチャネル(ASOR)のアシドーシス性脳神経細胞障害に対する低温救済への關与.

第 66 回西日本生理学会,  
2015 年 10 月 9-10 日、久留米

Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata,  
Yasunobu Okada,

Exploration of temperature sensitivity and new antagonists of acid-sensitive outwardly rectifying anion channel (ASOR).

第 92 回日本生理学会大会,  
2015 年 3 月 21-23 日、神戸

{その他}

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/physiol/study5.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤(沼田)かお理 (SATO-NUMATA, Kaori)

福岡大学・医学部・日本学術振興会特別研究

員(RPD)

研究者番号:60614196

(2)研究協力者

岡田 泰伸(OKADA Yasunobu)

京都府立医科大学・医学部・特任教授

研究者番号:10025661