

細胞容積調節機構と体液浸透圧調節機構の相関的研究

岡田泰伸, 沼田かお理 (生理学研究所)

体液浸透圧のホメオスタシスは視床下部内オスモセンサーニューロンであるアルギニンバソプレシン (AVP) ニューロンの下垂体内神経末端からの AVP 放出応答によって担われている。即ち、体液浸透圧上昇時には AVP 放出が高まり、逆にその減少時には AVP 放出が抑制される。前者のメカニズムに対する現在の教科書的な学説は、AVP ニューロンに存在する stretch-inactivated cation channel (SICC) が浸透圧性細胞縮小時に活性化されて脱分極を引き起こされて、AVP 放出を高めるというものである [1]。しかし私達の実験では、SICC の存在の確認はできなかった。後者メカニズムに関する最も有力な学説は、体液浸透圧減少によるグリア細胞の膨張がグリア細胞からのタウリンの分泌を亢進し、そのタウリンが AVP ニューロンのグリシンレセプター・アニオンチャネル活性化による過分極の発生をもたらし、AVP 放出を抑制するというものである。しかし私達の実験では、視床下部オスモセンサー領域にあるアストロサイトからの低浸透圧応答性タウリン放出は実際に確認されたが、タウリンによる AVP ニューロンの過分極応答の発生は確認できなかった。それゆえ、これら両説は再検討される必要がある。ところで、殆ど全ての動物細胞は、内外の浸透圧変化による細胞容積変化の強制から、比較的速やかに容積を回復させるという容積調節能を持っており、この過程には多種のイオンチャネルやイオントランスポーターの働きが関与することが知られている。しかるに、AVP ニューロンにおいては、低浸透圧性膨張後の容積調節 (調節性容積減少: RVD) も、高浸透圧性縮小後の容積調節 (調節性容積増加: RVI) も見られないことが報告されている [4]。しかし私達は、単離 AVP ニューロンも容積調節能力を有しており、RVI も RVD も適当な条件下においては示すことができることを明らかにした [3, 5]。それゆえ、上記の容積感受性もしくは容積調節性チャネル/トランスポーターが、体液浸透圧センサーメカニズムや体液恒常性維持メカニズムにおいて重要な役割を果たしている可能性がある。その観点からの今後の更なる研究が待ち望まれる。

本シンポジウム発表に関して開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Bourque CW: Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* **9**: 519-531, 2008

2. Hussy N et al: Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol* **62**: 113-134, 2000
3. Sato-Numata K et al: AVP neurons possess the cell volume regulation mechanism under hyperosmotic conditions. *J Physiol Sci* **64** (Suppl 1): S213, 2014
4. Zhang Z et al: Osmometry in osmosensory neurons. *Nat Neurosci* **6**: 1021-1022, 2003
5. Sato K et al: V₂ receptor-mediated autocrine role of somatodendritic release of AVP in rat vasopressin neurons under hypo-osmotic conditions. *Sci Signal* **4**: ra5, 2011

脳内浸透圧感受性部位およびバソ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

上田陽一 (産業医科大学医学部第1生理学)

私たちは体の水分を発汗などにより失う(脱水)と血漿浸透圧が上昇し、それを感知して水分の補給(飲水行動)および下垂体後葉からのバソプレッシン(抗利尿ホルモン)分泌が亢進して腎臓からの水の再吸収を促進することにより水分を保持しようとする。

脳内には血液脳関門が欠如している部位(脳室周囲器官)が存在し、そこでは血漿浸透圧を敏感に感知することが知られている。しかしながらその浸透圧受容機構については不明な点が多い。

私たちは、神経活動の指標として汎用されている *c-fos* 遺伝子発現を赤色蛍光タンパク (mRFP1) を用いて可視化した *c-fos*-mRFP1 トランスジェニックラットおよびバソプレッシンを緑色蛍光タンパク (eGFP) で可視化したトランスジェニックラットを用いて高浸透圧刺激に対する反応性を検討した。

成熟雄および雌性 *c-fos*-mRFP1 トランスジェニックラットを用いて、脱水刺激 (12, 24, 48 時間) 後の脳室周囲器官および視床下部室傍核・視索上核における mRFP1 赤色蛍光の発現を検討した [1]。その結果、脱水の時間経過とともに *c-fos* 遺伝子発現を反映する mRFP1 赤色蛍光が有意に増加した。さらに、興味深いことに、脳幹部(孤束核および最後野)においては脱水時には mRFP1 赤色蛍光の発現は見られず、再飲水 6 時間後に著明な発現が見られた。脳内において、血漿浸透圧変化に反応する部位と容積変化に反応する部位が異なることが示唆された。なお、脱水および再飲水に対する mRFP1 発現の雌雄差は見られなかった。

バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットの視床下部室傍核および視索上核には細胞質がeGFP陽性の細胞性神経分泌ニューロンの細胞体が局在している。これらの細胞体を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、細胞質内に分泌顆粒として観察することができた。今後、これらの分泌顆粒が *in vivo* の状態でどのような振る舞いをするかについて検討したいと考えている。

なお、本発表において開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Yoshimura M et al: A c-fos-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgene is differentially expressed in rat forebrain and brainstem after chronic dehydration and rehydration. *J Neuroendocrinol* **25** (5): 478-487, 2013
2. Katoh A et al: Fluorescent visualization of the hypothalamic oxytocin neurones activated by cholecystokinin-8 in rats expressing c-fos-enhanced green fluorescent protein and oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgenes. *J Neuroendocrinol* **26** (5): 341-347, 2014
3. Fujihara H et al: Robust up-regulation of nuclear red fluorescent-tagged fos marks neuronal activation in green fluorescent vasopressin neurons after osmotic stimulation in a double-transgenic rat. *Endocrinology* **150** (12): 5633-5638, 2009

マウス ES 由来バゾプレッシン細胞の異種移植

長崎 弘 (藤田保健衛生大学医学部生理学講座 I)
近年、マウス胚性幹細胞 (mESC) から種々の中枢神経組織を分化誘導する手法が開発され、新たな *in vitro* 実験系として、また再生医療への応用が期待されている。フィーダーレスの mESC 細胞株である EB5 から各種神経組織を誘導する場合、まず、無血清、成長因子無添加培地での浮遊凝集培養が出発点となる。この際インスリンを含む全ての成長因子を培地から取り除くと、視床下部前駆細胞群への自発的分化が起こり、細胞塊の中に、バゾプレッシン、NPY、AGRP、MCH、Orexin 等の視床下部ペプチドをそれぞれ発現する細胞が発生する [1]。その中で最も多い (全体の 6%) バゾプレッシン細胞は小細胞及び大細胞様いずれの形態もみられること、 K^+ やアンジオテンシン II 添加、 Na^+ 、マンニトールなどの浸透圧刺激に応じて培養液にバゾプレッシン分泌がみられること等から、生体のそれと同一と考えている。

ESC 由来視床下部細胞の移植の可能性を検討するため、分散した細胞を SD ラットの脳皮質部に移植した。移植後 90 日以上観察で細胞の生存が確認でき、50 例以上の移植を行っているが腫瘍化はみられなかった。宿主組織内での移植細胞の分化度は、*in vitro* での分化誘導期間の長さに比例した：誘導期間が 18 日と短い場合、宿主内でそれ以上分化が進むことはなく低分化度のままであり、誘導後 27 日以上の場合のみ、大細胞を含む分化度の高いバゾプレッシン細胞が宿主組織に生着した。

また、バゾプレッシン細胞の高収量化を目指し培養条件検討を行った。様々な神経増殖因子を添加したが、効果はなかった。逆に原法に基づき添加していた CNTF を省いた所、バゾプレッシン陽性の細胞の出現率が数倍に増加した。神経成長因子を出来るだけ省いた環境でバゾプレッシンニューロンがよく発現すると言う仮説を傍証するものと考えられる。

上述の視床下部誘導培養は細胞塊の中で視床下部ニューロンが分化・成熟してくるため、個々の細胞としての観察が困難である。より生理学的な解析を可能にする基盤技術として、分散培養を行なった。視床下部および視神経の前駆細胞のマーカーである Rax 遺伝子領域に GFP をノックインした mESC 株 Rx20-10 を Rax の発現が最も高くなる浮遊培養 7 日目まで細胞を分散し、GFP により FACS ソーティング、その後スライドガラス上で培養した (Fig. 1)。上皮細胞やアストロサイトと接触のある神経細胞は 2 週間以上生存し、その中でバゾプレッシンニューロンも多数出現した (Fig. 2)。unipolar, bipolar 等未熟な形態から、多数の突起を持つ成熟したものまで様々な形態が混在していた。また、一部にバゾプレッシンとのネスファチン 1 の共局在を認めた。

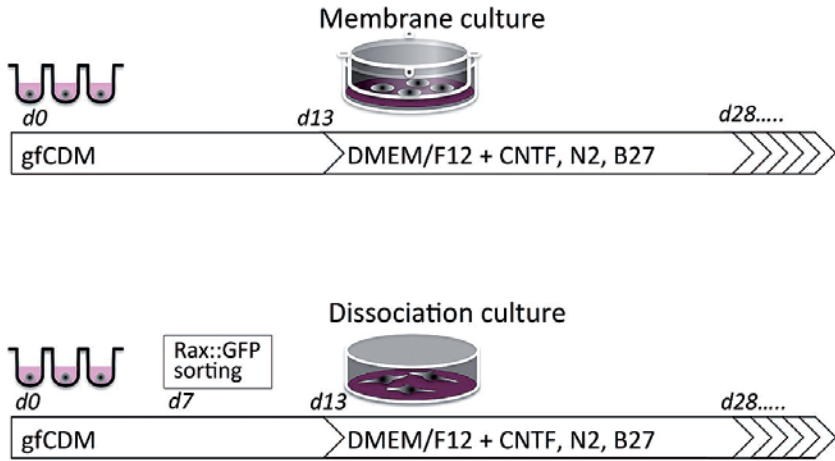
mESC 由来視床下部誘導系は再生医療の基盤技術開発だけでなく、生理学的解析の有用なツールとなることを期待している。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Wataya T et al: Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *PNAS* **106** (33): 11796-11801, 2008

胎生脳の細胞容積調節及び細胞間情報伝達におけるアニオンチャネルの役割の解明に向けて

秋田天平, 福田敦夫 (浜松医科大学医学部医学科神経生理学講座)



* gfCDM:Growth factor free chemically-defined medium

Fig. 1 Induction of hypothalamic cells from mESC

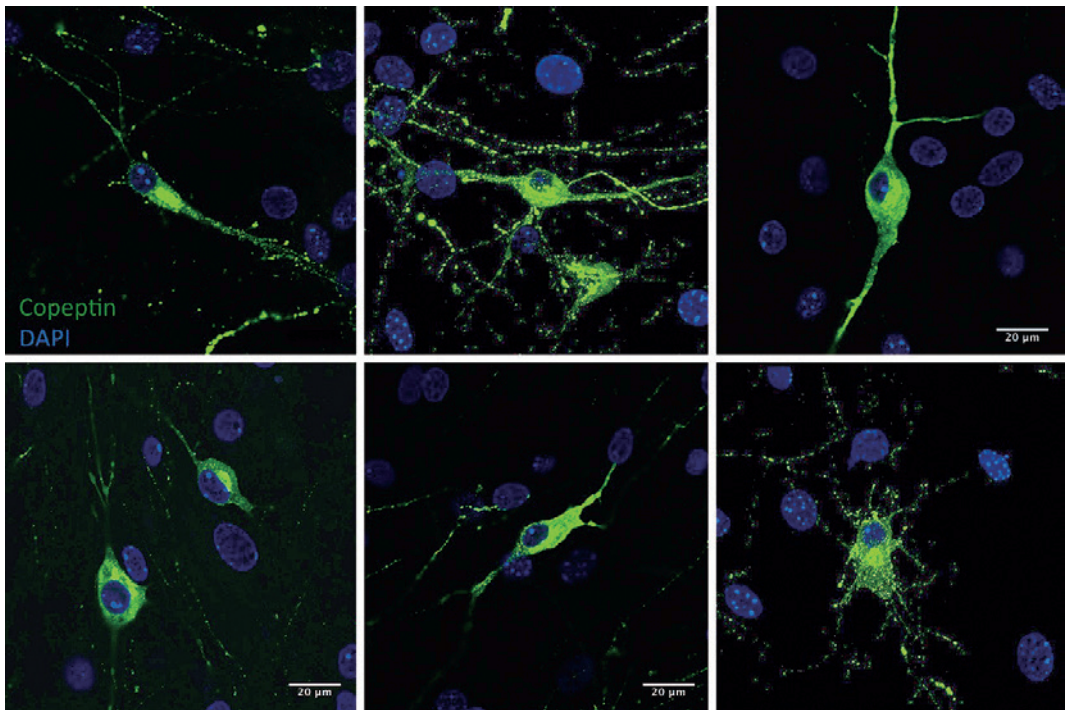


Fig. 2 Various forms of AVP neurons in dissociation culture of mESC derived hypothalamus

胎生期の脳の発達過程では、数多くの神経細胞が産生され移動・分化して脳の基本構造が構築されており、極めてダイナミックな神経細胞の形態変化が起こっている。しかし、その形態変化に要する神経細胞の容積調節が如何に制御されているかについては全く分かっていない。本発表では、胎生脳の発達過程において細胞容積調節に関わる陰イオン（アニオン）チャンネルが担いする種々の役割の可能性について、最近公表したデータを基に議論を行った。

一般に、アニオンチャンネルによる細胞容積調節の例として最もよく知られるのは、細胞膨張後の容積回復過程、即ち調節性容積減少である。低浸透圧刺激等により細胞が膨張すると、細胞容積感受性外向整流性アニオンチャンネル (VSOR) が活性化され、同時に開口している K^+ チャンネルと相俟って電気化学勾配に従った Cl^- と K^+ の細胞外への流出とそれらに付随する水の流出を誘導し、その結果細胞容積が元に戻る。一方、VSOR は細胞膨張を伴わずとも、或る種の受容体刺激により細胞内活性酸素種 (ROS) シグナルを介しても活性化され、その場合同様なイオンと水の流出が促されて細胞の縮小が起こりうる。成熟動物の中枢神経系の細胞での VSOR 電流の特徴として、他器官の上皮細胞で見られるような高い細胞膜電位での不活性化が弱いことが挙げられるが、緩やかな外向整流性、及び現時点で最も選択的とされる VSOR 阻害剤の DCPIB に対する感受性は、他器官の細胞と同等である。また、中枢神経系の細胞における細胞膨張を伴わない VSOR 活性化様式として、近年我々はアストロサイトにおけるブラジキニン [1, 2]・ATP [3]・グルタミン酸 (投稿中) 等の化学伝達物質の Gq 型 G 蛋白共役型受容体への作用による ROS シグナルを介するものを報告したが、この様式で重要な機序として、VSOR 活性化が Ca^{2+} 透過型イオンチャンネル開口部近傍 20 nm 以内の高 Ca^{2+} 濃度領域「 Ca^{2+} ナノドメイン」を介して行われることが判明している [2, 3]。即ち、この活性化機序は、例えごく少量の伝達物質が細胞の 1 部分に作用した場合でも、その作用部位近傍の VSOR を選択的且つ確実に活性化することを保障するものであり、細胞の形態変化や移動の際に 1 細胞の部分毎に独立した容積変化を誘導する役割を持つと考えられる。さらに、VSOR はグルタミン酸やタウリン等のアミノ酸類を有意に透過し、その透過したアミノ酸を介して細胞間シグナル伝達にも寄与する [1]。

現在我々はマウス胎生脳発達過程 (E14-E17) における VSOR 活性化機構とその意義についての

検討を行っているが、胎生脳神経細胞での VSOR 電流記録の報告はまだ 1 つもないことから、まず胎生脳大脳基底核原基内の神経細胞を無酵素処理で急性単離した標本を用いて、低浸透圧刺激により確かに典型的な VSOR 電流が発生することを確認した (未発表)。現在、細胞膨張を伴わずに VSOR を活性化しうる伝達物質を探索中である。また最近、大脳皮質の層構造発達過程における錐体神経前駆細胞の脳室帯からの放射状移動の際に、VSOR を通じて常時タウリンが細胞外に放出されていることを見出した [4]。タウリンが作用しうる受容体の 1 つに $GABA_A$ 受容体があり、一方で胎生脳での $GABA_A$ 受容体の豊富な発現とその活性化による放射状移動の抑制作用がこれまでに報告されている [5]。我々が胎生脳での $GABA$ 合成がほぼ消失している GAD67-GFP ノックインマウスでの放射状移動の様子を調べたところ、通常マウスの場合に比して有意に異なる点は認められなかったが、その放射状移動の過程で $GABA_A$ 受容体の阻害剤を作用させると、通常マウスの場合と同様に移動の加速が認められ、GAD67-GFP マウスにおいても $GABA_A$ 受容体が活性化されていることが示唆された [4]。そこで、母体内のタウリン合成を D-CSA により阻害することで胎仔へのタウリン供給を阻止したところ、GAD67-GFP マウス及び通常マウスの双方で、 $GABA_A$ 受容体阻害時と同様な放射状移動の加速が認められた [4]。以上の結果から、胎生脳の発達過程において $GABA_A$ 受容体に主に作用しているのは実は $GABA$ ではなく、VSOR を通じて放出されたタウリンであることが判明し、これまでの常識を大きく覆す新発見となった。今後、この VSOR が放射状移動の過程でどのように活性化され、タウリン放出による細胞間シグナル伝達と同時に、如何に神経移動時の細胞容積及び形態の変化を駆動しているかについて明らかにしていきたい。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Liu HT et al: Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. *J Physiol* **587** (10): 2197-2209, 2009
2. Akita T et al: Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels by Ca^{2+} nanodomains in mouse astrocytes. *J Physiol* **589** (16): 3909-3927, 2011
3. Akita T et al: Ca^{2+} nanodomain-mediated

- component of swelling-induced volume-sensitive outwardly rectifying anion current triggered by autocrine action of ATP in mouse astrocytes. *Cell Physiol Biochem* **28**: 1181–1190, 2011
4. Furukawa T et al: Roles of taurine-mediated tonic GABA_A receptor activation in radial migration of neurons in the fetal mouse cerebral cortex. *Front Cell Neurosci* **8**: 88, 2014
 5. Fukuda A et al: Multimodal GABA_A receptor functions on cell development. In: *Comprehensive Developmental Neuroscience: Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections*, Ed. Rubenstein JLR & Rakic P, Elsevier, Amsterdam, Vol **2** pp 921–939, 2013
-