

学 位 論 文 要 旨

氏名 守屋 大樹

題 目 : **The osmolality-regulated mechanism of AVP neurons
and the effect of AVP on DRG glial cells**

(浸透圧による AVP ニューロン調節機構と DRG グリア細胞に対する AVP の作用)

論文要旨 :

【INTRODUCTION・PURPOSE】 Arginine vasopressin (AVP) is a neuropeptide synthesized in the cell bodies of the magnocellular neurosecretory cells (MNCs) and parvocellular neurosecretory cells in the supraoptic nucleus (SON) and the paraventricular nucleus in the hypothalamus. AVP is known to play a crucial role in maintaining the osmolality and volume of the body fluid. It has been argued that MNCs in the SON possess intrinsic osmosensing mechanisms, which are lost in transient receptor potential vanilloid 1 (*Trpv1*)-knock-out mice. The molecular identity of the osmoreceptors expressed in MNCs is believed to be associated with the N-terminal splice variants of *Trpv1*, however, their entire molecular structures have not been identified. The purpose of the Chapter 1 was to uncover the structure and function of molecules related to the central osmoreceptor in the rat SON. RT-PCR and immunohistochemistry were performed for TRPV1-related molecules, and electrophysiological parameters and intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in rat SON neurons were measured in response to osmolality changes and TRPV-related drugs.

Besides its function in the osmolality regulation, AVP has been shown to exert other important physiological functions in the central and peripheral nervous systems. In the dorsal root ganglion (DRG), it has been reported that AVP-like immunoreactivity is detected in the DRG neurons and exposure to AVP induced phosphatidylinositol turnover in the DRG. In the Chapter 2, AVP-induced responses in rat DRG cells were investigated using $[Ca^{2+}]_i$ imaging, immunohistochemistry and RT-PCR.

【RESULTS・DISCUSSION】 In the Chapter 1, RT-PCR analysis revealed full-length *Trpv1* and a new N-terminal splice variant, *Trpv1_SON* (LC008303) in the rat SON. Positive immunostaining was observed using an antibody against the N-terminal portion of TRPV1 in arginine vasopressin (AVP)-immunoreactive neurons, but not in oxytocin (OT)-immunoreactive neurons. Approximately 20% of SON neurons responded to 50 mM mannitol (+30 mOsm/kg), with $[Ca^{2+}]_i$ increases. Mannitol-induced responses were observed in AVP neurons isolated from AVP-eGFP transgenic rats and identified by GFP fluorescence, but not in OT neurons isolated from OT-mRFP transgenic rats and identified by RFP fluorescence. The

mannitol-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses were reversibly blocked by the non-selective TRPV antagonist, ruthenium red (10 μ M) and the selective TRPV1 antagonists, capsazepine (10 μ M) and BCTC (10 μ M). These antagonists had little or no effect on K^+ -induced $[Ca^{2+}]_i$ responses. Mannitol-induced increases in the frequency of action potentials were reversibly suppressed by capsazepine (10 μ M). Although the TRPV1 agonist, capsaicin (100 nM) evoked no response at room temperature, it triggered cationic currents when the temperature was increased to 36 °C, and the reversal potential (E_{rev}) was -46.4 ± 4.1 mV, which is close to the reported E_{rev} of hyperosmolality-induced current in rat SON, but different from E_{rev} of capsaicin-induced currents recorded in rat DRG neurons or TRPV1-expressing cells. Although the I-V relation of capsaicin-induced currents reported in DRG neurons or TRPV1-expressing cells showed evident outward rectification, that observed in SON neurons was ohmic, Capsaicin (100 nM) caused only a minute $[Ca^{2+}]_i$ increase (8.5 ± 2.7 nM) in nine SON neurons that responded to mannitol (50 mM) with a large $[Ca^{2+}]_i$ transients (135 ± 15 nM) at 24 °C. In contrast, capsaicin (100 nM) evoked significant $[Ca^{2+}]_i$ elevations (134 ± 14 nM) at 36 °C in all the nine SON neurons. Capsaicin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases were reversibly blocked by capsazepine (10 μ M).

In the Chapter 2, $[Ca^{2+}]_i$ measurements showed that AVP evoked $[Ca^{2+}]_i$ responses in non-neuronal cells in a concentration-dependent manner (100 pM to 1 μ M). The amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ responses increased with days *in vitro* in culture, reaching a maximum amplitude after 4-5 days. Immunostaining by anti-S-100 antibody revealed that more than 70% of S-100 positive cells were AVP-responsive, indicating that glial cells responded to AVP and increased their $[Ca^{2+}]_i$. The responses were inhibited by depletion of the intracellular Ca^{2+} stores by the inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase expressed on the endo/sarcoplasmic reticulum, cyclopiazonic acid (10 mM), or in the presence of the inhibitor of phospholipase C, U73122 (1 μ M), indicating that the responses are mediated by a metabotropic mechanism involving inositol trisphosphate ($InsP_3$). The AVP-evoked responses were blocked by the specific blockers for V_1 receptors, $(d(CH_2)_5^1, Tyr(Me)^2, Arg^8)$ -Vasopressin, but unaffected by the OT receptor blocker, $(d(CH_2)_5^1, Tyr(Me)^2, Thr^4, Orn^8, des-Gly-NH_2^9)$ -Vasotocin. Moreover, V_{1a} but not V_{1b} receptor mRNA was expressed sustainably through the culture period in cultured DRG cells.

【CONCLUSION】 The results in the Chapter 1 suggest that AVP neurons in the rat SON possess functional full-length TRPV1. Moreover, differences between the responses to capsaicin or hyperosmolality obtained in rat SON neurons and those obtained from DRG neurons or TRPV1-expressing cells indicate that the osmoreceptor expressed in the SON may be a heterotetramer, in which TRPV1 is co-assembled with some other, yet unidentified, molecules.

The results in the Chapter 2 indicate that AVP induces a $[Ca^{2+}]_i$ increase involving an $InsP_3$ -evoked release of Ca^{2+} from intracellular stores in rat DRG glial cells through their AVP V_{1a} receptor.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	守屋 大樹
審査委員	主査： 鳥取大学 教授 澁谷 泉
	副査： 鹿児島大学 教授 川崎 安亮
	副査： 鳥取大学 教授 保坂 善真
	副査： 鳥取大学 准教授 北村 直樹
	副査： 鳥取大学 准教授 浅野 淳
題目	The osmolality-regulated mechanism of AVP neurons and the effect of AVP on DRG glial cells. (浸透圧による AVP ニューロン調節機構と DRG グリア細胞に対する AVP の作用)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>守屋大樹君の博士課程における研究は、神経ペプチドであるアルギニン・バソプレシン (AVP) に関して、視床下部・視索上核 (SON) の AVP ニューロンの浸透圧依存性調節機構と背根神経節 (DRG) の細胞への AVP による調節機構を細胞生理学、電気生理学、免疫組織学、分子生物学などの手法を用いて、詳細に解析したものである。</p> <p>中枢性浸透圧感知分子が TRPV1 関連分子であることは判明していたものの、その分子実体は不明であった。第一章では、ラット SON の AVP ニューロンにおける中枢性浸透圧感知分子の分子実体に関して解析を行った。RT-PCR により全長 TRPV1 と新しい TRPV1 のサブライスバリエントである TRPV1_SON がラット SON に存在することを明らかにした。AVP 免疫陽性細胞では TRPV1 の N 末端の免疫原性が確認されたがオキシトシン(OT)陽性細胞では確認されなかった。約 20% の SON ニューロンが 50 mM マンニトール(+30 mOsm/kg)による高浸透圧刺激に応答し $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を示した。マンニトール誘発性の反応は AVP-eGFP トランスジェニックラットから単離し GFP 蛍光を確認した SON の AVP ニューロンでは見られたものの OT-mRFP トランスジェニックラットから単離し RFP 蛍光を確認した OT ニューロンでは見られなかった。マンニトール誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は非選択的 TRPV 阻害薬のルテニウムレッド(10 μM)、選択的 TRPV1 阻害薬のカプサゼピン(10 μM)、BCTC(10 μM)で可逆的に阻害された。SON ニューロンにおいて室温では TRPV1 の作動薬であるカプサイシン(100 nM)に対する応答が観察されなかったが、36°Cでは陽イオン電流が観察された。カプサイシン誘発電流の逆転電位は -46.4 ± 4.1 mV でありラット SON ニューロンの高浸透圧刺激誘発性電流の逆転電位(-41.5 ± 2.6 mV)と近い値であつ</p>	

たが DRG ニューロンや TRPV1 発現細胞のカプサイシン誘発電流の逆転電位(0 mV 付近)とは異なっていた。カプサイシン誘発性の応答は $[Ca^{2+}]_i$ 測定でも観察された。マンニトール刺激に応答した細胞は、24℃ではカプサイシン適用による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は見られなかったが、36℃では全ての SON ニューロンで $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された。カプサイシン誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応はカプサゼピン(10 μ M)により抑制された。

第二章では、これまで不明であった DRG における AVP の機能について解析を行った。AVP が濃度依存性に DRG から単離した非興奮性細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすことを明らかにした。AVP 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の大きさは培養日数の増加に伴い増加し 4-5 日で最大となった。抗 S-100 抗体を用いた免疫染色では 70%以上の S-100 陽性細胞が AVP に対する応答性を示したことから DRG のグリア細胞が AVP に応答し $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を示すことが明らかとなった。この AVP に対する応答は Ca^{2+} -ATPase 阻害剤であるシクロピアゾン酸(10 μ M)による細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇や PLC 阻害薬である U73122(1 μ M)により抑制されたことからイノシトール 3 リン酸(IP₃)を介した代謝向性の反応であることが示された。また AVP による $[Ca^{2+}]_i$ 反応は AVP-V₁受容体阻害薬により消失したが OT 受容体阻害薬の影響を受けなかった。RT-PCR により V_{1a}受容体 mRNA は培養期間を通じて安定して発現していたのに対して V_{1b}受容体 mRNA は発現が減少傾向にあることが明らかになった。

以上の結果より、SON に存在する AVP ニューロンが機能的な全長 TRPV1 と新しいスプライスバリエント TRPV1_SON の両者を発現していることが明らかとなった。ラット SON ニューロンとその他の TRPV1 発現細胞の間でのカプサイシンや高浸透圧刺激に対する応答性が異なることからラット SON に発現する浸透圧受容器は全長 TRPV1 とその他の分子で構成されるヘテロ 4 量体であることが考えられた。また、AVP はラット DRG グリア細胞に発現する AVP-V_{1a} 受容体を活性化し $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を惹起することが明らかとなった。さらにこの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応には IP₃による細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が関与することが明らかになった。

以上の成果により、本論文は博士(獣医学)の学位論文にふさわしい価値があると認める。