

体液の恒常性調節における
M₂ ムスカリン受容体サブタイプの役割
に関する研究

2018 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(岐阜大学)

永野 宏

体液の恒常性調節における
M₂ムスカリン受容体サブタイプの役割
に関する研究

永野 宏

目次

略語一覧.....	1
序論.....	2
第1章.....	5
緒言.....	6
材料と方法.....	8
結果.....	15
考察.....	19
第2章.....	24
緒言.....	25
材料と方法.....	27
結果.....	30
考察.....	33
総合考察.....	36
結論.....	40
謝辞.....	42
文献.....	43
図表.....	56

略語一覧

2-AG	2-arachidonoylglycerol	2-アラキドノイルグリセロール
aCSF	artificial cerebrospinal fluid	人工脳脊髄液
AVP	arginine-vasopressin	バゾプレシン
ChAT	choline acetyltransferase	コリンアセチル転移酵素
CRH	corticotropin-releasing hormone	副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン
eGFP	enhanced green fluorescent protein	緑色蛍光タンパク質
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
GABA	gamma-aminobutyric acid	γ -アミノ酪酸
M ₂ KO	M ₂ receptor knockout	M ₂ 受容体欠損
mIPSC	miniature inhibitory postsynaptic current	微小抑制性シナプス後電流
MNC	magnocellular neurosecretory cell	大細胞性神経内分泌細胞
MnPO	median preoptic nucleus	正中視索前核
PNZ	perinuclear zone	(視索上核の背外側領域の呼称)
PVN	paraventricular nuclei	室傍核
SON	supraoptic nuclei	視索上核
TTX	tetrodotoxin	テトロドトキシン
WT	wild-type	野生型

序 論

体液の恒常性調節は生命の維持に不可欠であり、生体内では様々な機構によって体液量が調節されている。脳室周囲器官である終板脈管器官および脳弓下器官には浸透圧受容器が存在し、血中の浸透圧をモニターしている(16, 38)。生体が脱水状態になると血中浸透圧は上昇し、これらの領域の受容器が興奮すると口渇による飲水行動の誘発と抗利尿ホルモンであるバゾプレシン (arginine-vasopressin: AVP) の分泌が促進される。AVPは視床下部の室傍核 (paraventricular nuclei: PVN) および視索上核(supraoptic nuclei: SON)に存在する大細胞性神経分泌細胞(magnocellular neurosecretory cell: MNC)の細胞体で合成され、軸索輸送を介して神経終末の存在する下垂体後葉へと運ばれて分泌顆粒内に貯蔵される。開口分泌によって循環血中へと分泌されたAVPは、腎臓に到達すると集合管の細胞膜にあるV₂受容体に作用し、水分子のみを選択的に取り込むアクアポリン2を管腔側の細胞膜に発現させ、原尿中の水を血中へと再吸収することで体液量の恒常性を維持している(Fig.1)。

AVPの分泌不全あるいは分泌亢進に起因する下垂体性ADH分泌異常症は、厚生労働省の定める指定難病の一つである(91)。このうち、AVP分泌の低下により生じる中枢性尿崩症は、腎臓における水の再吸収が十分になされず多量の水が希釈尿として体外へと排出されてしまう疾患であり、成人患者の1日の排尿量は10 L以上に及ぶこともある。それに伴う、激しい口渇や食欲低下、夜間頻尿などの症状は患者のQOLを著しく低下させ、さらには水分補給ができない状況では脱水によってショック症状となる恐れもある。現在確立されている治療法はAVPの合成アナログであるデスマプレシンを用いたホルモン補充療法であるが、デスマプレシンに対する感受性は個人差が極めて大きく、過量投与は水中毒や

脳浮腫を引き起こす恐れがあることから、患者ごとの適切な投与量を十分に管理する必要がある(5)。また、一度発症すると改善することは稀であるため、患者は従来の補充療法を生涯に渡り継続しなければならない。もし内因性のAVP分泌を調節することができるようになれば、患者のQOLを向上させる新たな治療法の開発が期待できるかもしれない。このようにAVPの合成および分泌調節機序を詳細に明らかにすることは重要な研究課題となっている。

AVPの合成および分泌は、様々な神経伝達物質によって調節されている。グルタミン酸および γ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid: GABA) 作動性ニューロンによる制御はこれまでに数多く研究されてきたが(48, 59, 72, 83), 同様にコリン作動性の調節についても長年議論がなされてきた。視床下部-神経下垂体組織培養標本における電流記録を行った薬理学的研究によって、ニコチン受容体がMNCの興奮を引き起こしAVPの放出を促進することが示されてきた(4, 24, 89)。一方でムスカリン受容体媒介性の調節も示唆されており(29, 51), 特にSONではムスカリン受容体作動薬の局所投与がMNCにおいて神経活性マーカーであるc-fosの発現を増加させ(65), 排尿量を減少させることが報告されている(52)。

ムスカリン受容体はM₁からM₅までの5つのサブタイプが存在し、中枢から末梢にかけて広く分布している(6)。各サブタイプの結晶構造は長らく明らかにされていなかったため、各サブタイプに選択性の高い作動薬および拮抗薬の開発がこれまで困難であった。また、中枢の多くの領域において複数のサブタイプが重複して発現しており、各サブタイプの役割を弁別することも困難であった。このような理由から、AVPの合成および分泌調節に寄与するムスカリン受容体サブタイプの同定と役割の解明はほとんど行われてこなかった。これまでに、in situ hybridizationやRT-PCRなどの手法によりPVNとSONを含む視床下部では、

M₂受容体のmRNAが豊富に発現していることが明らかにされており(54, 76, 78), またM₂受容体に比較的高い選択性を持つ拮抗薬を用いた実験では, 脳内のM₂受容体の活性化は飲水行動の発現を誘導し(22), また血中AVP濃度の増加を伴う昇圧反応を生じさせることも報告されている(1, 2, 8, 43)。そこで本研究ではM₂受容体に着目し, 同受容体を介したAVPの合成および分泌調節機構を明らかにすることを目的とした。

第1章では, まず野生型(wild-type: WT)マウスのPVNおよびSONにおけるM₂受容体の発現を確認し, 続いてM₂受容体欠損(M₂KO)マウスの両神経核におけるAVP合成および分泌能についてWTマウスと比較することで評価した。さらに, 同受容体を介したAVPの合成および分泌調節がAVPの表現型である抗利尿作用に与える効果を検討した。第2章では生細胞状態でAVP発現ニューロンを同定する目的でAVPを緑色蛍光タンパク質(enhanced green fluorescent protein: eGFP)で標識したトランスジェニックラットを使用し, ホールセルパッチクランプ法にてSONのAVPニューロンより微小抑制性シナプス後電流(miniature inhibitory postsynaptic current: mIPSC)を記録することで, 同ニューロンへのGABA作動性抑制性入力におけるM₂受容体の作用を解析した。

第1章

M₂受容体欠損マウス視床下部における AVPの合成および分泌調節機構

緒 言

AVPの合成を行うMNCはPVNおよびSONという異なる2つの神経核に局在している(Fig.1)。PVNは視床下部背側の第三脳室壁の両側に位置しており、この領域ではMNCに加えて、ストレス応答に対して副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(corticotropin-releasing hormone: CRH)の合成および分泌を行う小細胞性神経分泌細胞も存在している。一方、SONは視床下部底面の視索の上に接して両側性に存在し、MNCのみによって構成される。MNC自体はどちらの神経核においても同質のものとされており、これらの解剖学的に離れた両神経核内でMNCがAVPの合成を行っていることにどのような意義があるのかは明らかにされていない。しかしながら最近の研究では、コリン作動性ニューロンのマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ(choline acetyltransferase: ChAT)陽性ニューロンがSONの周囲では大型と小型の2種類のもが存在し、PVNでは小型のニューロンのみが存在するという両神経核間での異なる神経支配を示唆する報告がされている(77)。

コリン作動性ニューロンより放出されるアセチルコリンの効果を伝達する受容体は、ムスカリン受容体およびニコチン受容体の2種類に大別され、これらの受容体は全身に広く分布している。PVNおよびSONは、体液調節のみならず、ストレス応答や免疫応答、情動行動などに関連付けられる視床下部-下垂体-副腎系の研究においても対象とされ(17, 23, 80)、これらの領域におけるコリン作動性の調節機構についてこれまで多くの知見が得られてきた(29, 51, 52, 85)。その中で、ニコチン受容体がAVPの合成および分泌を促進性に調節していることを示す報告(4, 24, 89)は多くなされてきた反面、ムスカリン受容体による調節については議論が分かれていた。ニコチン受容体についてはAVPニューロン上に

発現していることが組織学的にも明らかになっており(50, 68), 直接AVPニューロンの興奮に関与すると考えられている。しかし, ムスカリン受容体に関しては両神経核内における同受容体の発現を示す組織学的研究は多くなく, 電気生理学的研究の結果からはムスカリン受容体媒介性のAVPニューロン興奮作用はニコチン受容体の興奮性作用に対して補助的に働く程度であるとの見解もある(19)。このような背景に加えて, ムスカリン受容体には5つのサブタイプが存在し(6), 各サブタイプに特異的な作動薬および拮抗薬の開発が困難であったことも, ムスカリン受容体に着目した研究がこれまであまり行われてこなかった理由の一つと思われる。しかしながら, 遺伝子改変技術の発展とともに各サブタイプを遺伝的に欠損させたマウスが開発され(79), 現在では各サブタイプの機能解析が可能となった。

本研究では視床下部における主要なサブタイプであるM₂受容体に着目し, PVNおよびSONにおけるAVP合成および分泌に同受容体に関与する可能性についてM₂KOマウスを用いて検証した。また同受容体媒介性の成分が体液恒常性にどのような影響を及ぼしているのかを評価した。

材料および方法

動物

実験にはメスのM₂KOマウスおよびそのWTマウス（3-4ヶ月齢）を用いた。これらは129JとCF-1の交雑種（50:50）である。M₂KOマウスはムスカリン受容体のM₂サブタイプをコードしている遺伝子の代わりにネオマイシン耐性遺伝子を組み込むことで作出した(20, 70)。M₂KOマウスおよびそのWTマウスはTaconic Farms(Germantown, New York, USA)より入手し、当研究室で繁殖させて使用した。

各マウスはP2レベル実験室に備え付けたアイソレーター内のアクリル製ケージに入れて、明期と暗期が12時間周期（7:00-19:00）、室温が22-25°Cとなる条件のもとで飼育した。通常時には飼育用固形飼料(MF; Oriental Yeast co, Tokyo, Japan), 0-3ヶ月齢の幼若期および繁殖期には特殊系統繁殖用固形飼料（CMF; Oriental Yeast co, Tokyo, Japan）を与えた。餌と水は自由摂取させた。

本実験は、国立大学法人岐阜大学動物実験取扱規程に準拠して実施した。

抗M₂受容体抗体を用いた免疫組織化学

野生型マウスはケタミン(80 mg/kg, i.p.)およびキシラジン(10 mg/kg, i.p.)で麻酔後、直ちに左心室よりヘパリン加生理食塩水を灌流させ、その後4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いて灌流固定を行った。脳を取り出し、同じ固定液にて4°Cで一晩後固定した後、視交叉より尾側方向へ3 mmの領域を冠状に切り出して30%スクロース溶液中で一晩浸漬させた。凍結切片用包埋剤（Tissue-Tec OCT Compound, SAKURA Finetek JAPAN, Tokyo, Japan)にて包埋し、-78°Cアセトンにて凍結し

た。クライオスタットを使用して、PVN、またはSONを含む25 μm の冠状切片を作製し、氷冷したリン酸緩衝液中に保存した。これらの浮遊切片は同緩衝液で再び洗浄後、0.3%過酸化水素水にて室温で10分間反応させた。切片は0.1% TritonX-100を加えたリン酸緩衝液(PBST)で5分間3回洗浄し、0.1%正常ヤギ血清、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウムを含むブロッキング液を用いて室温で30分間ブロッキング処置を行った。PBSTで洗浄後、ラット抗M₂受容体モノクローナル抗体(1:100, AB1565, Merck, Darmstadt, Germany)を処置して4°Cで一晩インキュベートした。PBSTで洗浄してビオチン化ヤギ抗ラットIgG抗体(1:4000, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)を室温で30分間反応させ、その後、ペルオキシダーゼ標識アビジン-ビオチン複合体混合液(1:400, Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)にて室温で30分間反応させた。反応後、M₂受容体の免疫反応性は発色反応液(0.02%ジアミノベンジジン, 0.003%過酸化水素水, 10 mM トリス塩酸緩衝液)で10分間反応させることで可視化し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。切片はスライドガラスに貼り付けて風乾させ、エタノール希釈系列で脱水、キシレンで透徹した後、カバーガラスで封入した。SONおよびPVNの神経核内およびその周辺領域におけるM₂受容体の発現を光学顕微鏡(Eclipse E600, Nikon, Tokyo, Japan)下で観察した。

抗AVP抗体を用いた免疫組織化学実験およびAVP免疫陽性細胞数の評価

AVP合成の日内変動の影響を避けるため、マウスの屠殺は9:00-12:00の間に行った。動物は上述の方法で灌流固定し、脳を採取した。後固定した後、組織はエタノールの希釈系列(70, 80, 90, 95, 100%)で脱水し、キシレンで透徹させた後、パラフィンで包埋した。PVN、またはSONを含む5 μm の冠状切片を視交叉から正中

隆起の間で切り出し、5枚おきに回収してスライドガラスに貼り付けた。それらはキシレンで脱パラフィン化し、エタノール希釈系列で再水和した後、上述と同様の酵素抗体法にて免疫組織化学を行った。一次抗体はウサギ抗AVPポリクローナル抗体(1:2500, AB1565, Chemicon International, Temecula, CA, USA), 二次抗体はビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体(1:1000, B8895, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を使用した。

AVP免疫陽性ニューロンの数を計測するため、デジタルカメラ(Pro 600ES, Pixera Corporation, Santa Clara, CA, USA)でPVNおよびSONを含む領域を撮影した。画像処理ソフトウェアImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて免疫陽性細胞と背景の非特異的染色シグナルが区別されるように染色強度の閾値を設定し、AVP免疫陽性と判定された細胞数を肉眼で計測した。PVNの大細胞性領域はPaxinos & Franklineのマウス脳アトラス(55)に基づいて区別し、小細胞性領域のAVP免疫陽性細胞は計測から除外した。

血漿AVP濃度

ジエチルエーテルを含ませた脱脂綿とマウスを密閉容器に入れて麻酔した後、心臓より血液を採取しエチレンジアミン四酢酸入りチューブへ移して遠心分離した(2000 ×g, 10分)。上清は-20°Cで保存し、ラジオイムノアッセイによる血漿AVP濃度の測定を株式会社モノリス(Tokyo, Japan)に委託した。

飲水および排尿試験

AVPによる抗利尿作用を評価する目的で飲水量、排尿量および排尿回数を測定した。計測には、代謝ケージ (3600M021, Techniplast, VA, Italy)を用いた。マウスは実験の前日より代謝ケージ内で馴化した。測定時には代謝ケージの下部

チャンバーを取り外し、撥水加工を施した金網を上部チャンバーの底に装着し、電子天秤上に設置した。排尿量および排尿回数は、電子天秤に接続したコンピュータ上で計測用ソフトウェア (Salto In TIMER, Sartorius Mechatronics, Göttingen, Germany) を用いて1秒ごとに連続で記録した。Yamamotoらの報告(88)に従い、0.10g以上のイベントを排尿と判定した。また10秒以内に複数回のイベントが認められた場合も排尿と判定し、それらはまとめて1回の排尿とした。飲水量は計測前後における給水瓶の重量の差から求めた。尿量測定は19:00から翌13:00まで18時間連続して行った。実験中、マウスは絶食とした。

血液生化学検査および血漿浸透圧

尾静脈より採取した血液をヘパリン入りの氷冷チューブへ移し、遠心分離した(1500 ×g, 5分)。血漿中の以下の項目を生化学分析装置(FUJI DRI-CHEM 7000V, FUJIFILM, Tokyo, Japan) により測定した; 血液尿素窒素(BUN), グルコース(GLU), ナトリウム(Na), カリウム(K), カルシウム(Ca)。血漿浸透圧の概数値は以下の式にNa, K, GLU, BUNの値を代入し算出した(11)。

$$\text{血漿浸透圧} = 2 [\text{Na}] + 2 [\text{K}] + [\text{GLU}] / 18 + [\text{BUN}] / 2.8 \text{ (mOsmol/kg)}$$

尿検査

末梢の異常を検出するスクリーニング検査として尿検査を行った。圧迫排尿によって採取した尿を遠心分離し、その上清の尿比重を尿比重計 (UR-JE, ATAGO, Tokyo, Japan) により測定した。

尿中に含まれるヘモグロビン, ビリルビン, ウロビリノゲン, ケトン, タンパク質, ブドウ糖, 亜硝酸塩の概算濃度を尿検査用試験紙 (Uropaper III, Eiken Chemical, Tokyo, Japan) により測定した。

病理学的解析

末梢臓器における器質的異常の有無を病理学的検索により評価した。各マウスを頸椎脱臼により屠殺し、腎臓、膀胱、甲状腺、副腎、肝臓、心臓を採取した。これらの臓器は4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて4°Cで一晩固定した。これらの組織を上述の方法でパラフィン包埋し、4 µm厚の切片を作成した。切片は、ヘマトキシリン-エオジン染色後、カバーガラスで封入し、光学顕微鏡下で病理学的検索を行った。

V₂受容体の免疫組織化学

腎臓のV₂受容体の発現を免疫組織化学的に評価した。両マウスの腎臓のパラフィン切片を上述のように作製した。抗AVP抗体を使用した免疫組織化学と同様の方法により抗V₂受容体抗体を用いた染色を行った。一次抗体にはウサギ抗V₂受容体ポリクローナル抗体(1:100, Bioss, Woburn, MA, USA)を使用し、二次抗体にはビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体(1:1000, B8895, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いた。

ELISA

腎臓のV₂受容体の発現を定量的に評価するために抗V₂抗体を用いてELISAを行った。採取した腎臓50 mgあたり1 ml CellLytic MT(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を加えてホモジナイズした。遠心分離(15,000 ×g, 10 min)後、上清をサンプル液として-80°Cで保存した。検量線を作成するため、ウシ血清アルブミンを適当な濃度になるよう蒸留水で希釈し、その595 nmにおける吸光度を分光光度計で計測した。吸光度はプロテインアッセイCBB溶液(Nakalai-tesque,

Kyoto, Japan) を用いて、付属の説明書に従い計測した。サンプル液の吸光度も同様に測定し、検量線よりタンパク質濃度を算出した。

サンプル液は0.05 M炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6)で10 µg/mlに希釈し、96穴マイクロタイタープレートのウェルに50µlずつ分注し、4°Cで一晩インキュベートした。各ウェルをPBSTで洗浄後、3%スキムミルク含有PBSを滴下して37°Cで1時間ブロッキングを行った。同様にPBSTで洗浄した後、ウサギ抗V₂受容体ポリクローナル抗体 (1:30; Santa Cruz Biotechnology) を分注し37°Cで1時間感作させた。PBSTで6回洗浄し、V₂受容体の免疫組織化学に用いたものと同じ2次抗体 (1:1) をウェルに加えて37°Cで1時間反応させた。再び洗浄し、基質溶液を各ウェル100 µLずつ分注し、暗所において室温下で1時間インキュベートした。反応終了後、吸光度計 (model 680, Bio-Rad Laboratories) により415 nmにおける吸光度の計測を行った。

デスモプレシン投与試験

腎臓のV₂受容体の反応性を評価するため、同受容体に選択的に作用するAVP合成アナログであるデスモプレシンを使用し、投与後の排尿量の変化から抗利尿作用の発現を検討した。マウスに蒸留水(15ml/kg)を経口投与した後、デスモプレシン酢酸塩水和物 (1.0 µg/kg, Kyowa Hakko Kirin, Tokyo, Japan) を腹腔内投与し、その後5時間の排尿量を記録した。実験中、マウスは絶食、絶水とした。対照群は同様に蒸留水を経口投与した後に生理食塩水 (5 ml/kg) を腹腔内に投与した。デスモプレシンの投与量を決定するために、販売元が開示する無毒性量以下の濃度(0.15, 0.50, 1.0 µg/kg)でWTマウスにおける予備実験を行い、排尿量に有意差が認められた最小濃度 (1.0 µg/kg) を採用した。

統計解析

値は平均値とその標準誤差で表した。有意性の判定にはStudentの t 検定を使用し、 $P < 0.05$ を統計学上の有意水準とした。実験に供した動物数を n で表した。

結 果

PVNおよびSON周辺領域におけるM₂受容体の発現

M₂受容体の局在を明らかにするために、抗M₂受容体抗体を用いて免疫染色を行ったところ、視床下部の広範な領域において同受容体の免疫陽性像が認められた (Fig.2A)。SON内においても同様の陽性シグナルが細胞間隙において観察されたが、細胞体における発現は見られなかった (Fig.2B)。一方、SONの背外側領域において濃染された神経線維が観察され、これらはSONの腹側方向へ投射している所見が認められた (Fig.2B, C)。また同領域において免疫陽性像を示す細胞体もわずかに存在した (Fig.2B, C)。PVNでは神経核内およびその周辺領域において明らかな免疫陽性像は認められなかった (Fig.2D)。なお、M₂KOマウスを用いて同様の免疫染色を行ったところ、SONおよびその周辺領域で認められたような免疫陽性像は全く観察されなかった。

これらの結果は、SONの背外側領域にM₂受容体発現ニューロンが存在し、同神経核内へ投射している可能性を示唆している。

PVNおよびSONにおけるAVP免疫陽性ニューロン

抗AVP抗体を用いて免疫染色を行ったところ、AVP免疫陽性を示す細胞体と神経線維が両マウス視床下部のPVNおよびSONにおいて認められた (Fig.3)。M₂KOマウスのPVNにおけるAVP免疫陽性細胞数はWTマウスにおけるものと明らかな差は認められなかった (Fig.3A, B)。しかし、M₂KOマウスのSONでは、WTと比較してAVP免疫陽性細胞が少ない所見が認められた (Fig.3C, D)。

PVNにおけるAVP免疫陽性細胞数は、WT およびM₂KOマウスでそれぞれ 343.2 ± 45.2 細胞 ($n=5$) および 313.8 ± 37.5 細胞 ($n=5$) であり、両マウス

間で有意差は認められなかった ($P > 0.05$; Fig.4A)。一方, SONにおけるAVP陽性細胞数はWT およびM₂KOマウスでそれぞれ 2353.8 ± 245.4 細胞 ($n=5$) および 898.2 ± 142.4 細胞 ($n=5$) であり, M₂KOマウスでは有意に少なかった ($P < 0.01$; Fig.4B)。

血漿AVP濃度

M₂KOマウスではAVP免疫陽性細胞数がWTと比較して有意に少なかったことから, AVPの分泌量が定値を示しているか検討するため, 血漿中のAVP濃度を測定した。Fig.5に示したように, M₂KOマウスにおける血漿AVP濃度は 341.8 ± 105.7 pg/ml ($n=8$) であり, WTの値 (1029.9 ± 233.8 pg/ml, $n=10$) の約30%程度であり有意に低値を示した ($P < 0.05$)。

以上の結果は, M₂受容体がSONにおけるAVPの合成を促進性に調節していることを示唆している。

飲水および排尿

M₂KOマウスにおいて認められた血漿AVP濃度の減少が抗利尿作用に与える効果を検証するため, 飲水量, 排尿量および排尿回数を計測したところ, M₂受容体の欠損は飲水と排尿の著しい増加を生じた。M₂KOマウスにおける飲水量はWTの約9.6倍であった (0.69 ± 0.12 g, $n=27$, vs 10.0 ± 0.80 g, $n=8$; $P < 0.01$; Fig.6A)。また, M₂KOマウスの排尿量はWTの14.5倍 (5.6 ± 0.33 g, $n=27$, vs 43.5 ± 1.8 g, $n = 8$; $P < 0.01$; Fig.6B), 排尿回数は7.8倍 (1.2 ± 0.13 , $n=27$, vs 11.5 ± 0.80 , $n=8$; $P < 0.01$; Fig.6C) であった。

血液生化学および血漿浸透圧

体液量が増加すると血漿浸透圧は低下して排尿が亢進され、一方で体液量が減少すると血漿浸透圧は上昇して飲水が亢進される。M₂KOマウスにおける多飲多尿症状がどちらを原発とするのかを判断するために、血液生化学検査の結果より血漿浸透圧を算出した。その結果、すべてのパラメータにおいて両マウス間での有意な差は認められなかった(Table 1)。Na, K, GLUおよびBUNの値から算出された血漿浸透圧の値はM₂KOマウスにおいて有意に高値を示した(325.6 ± 1.4, *n*=13, vs 331.3 ± 2.3 mOsmol/kg, *n*=8: *P*<0.05; Fig.7)。

尿検査

諸臓器における異常を検出するために尿検査を行った。M₂KOマウスにおいて尿比重はWTと比較して有意に低値を示していた(1.07 ± 0.03, *n*=27, vs 1.04 ± 0.05, *n*=8: *P*<0.05)。ヘモグロビン、ビリルビン、ウロビリノーゲン、ケトン、タンパク質、ブドウ糖、亜硝酸といった異常を示す尿中成分は両群において検出されなかった。

病理学的検索

腎臓、膀胱、甲状腺、副腎、肝臓および心臓において肉眼的な異常所見は認められず、鏡検でも両群のこれらすべての組織で病理学的な異常所見は認められなかった(Fig.8)。

V₂受容体の発現および反応性

AVPの標的器官である腎臓におけるV₂受容体の発現および機能を評価した。M₂KOマウスの腎臓におけるV₂受容体の免疫陽性反応は尿細管上皮細胞中に認められ(Fig.9A(b))、この所見はWTマウスのものと類似していた(Fig.9A(a))。

腎臓におけるV₂受容体の発現量はELISAによる吸光度として示され、これらは両系統間で有意な差が認められなかった(0.756 ± 0.058 , $n=6$, vs 0.923 ± 0.067 , $n=6$: $P>0.05$; Fig.9B)。

WT群における排尿量はデスモプレシンの投与により有意に減少した(WT: 0.63 ± 0.17 g, $n=5$ vs 0.06 ± 0.06 g, $n=6$: $P<0.05$)。またM₂KOマウスの対照群における排尿量はWT対照群の値の約2倍ほどであったが、デスモプレシンの適用によりその値はWTのデスモプレシン処置群の値と同程度まで減少した(1.19 ± 0.10 g, $n=5$ vs 0.08 ± 0.09 g, $n=6$: $P<0.05$; Fig.10)。

以上の結果はM₂KOマウスが多飲多尿症状を呈することを示しており、このような機能的変化は、排尿および飲水行動に関わる末梢臓器の異常ではなく、AVPの分泌減少により表れたと考えられる。

考 察

WTマウスの視床下部におけるM₂受容体の発現を検証したところ、SON内においては細胞間隙における陽性反応が認められたが、細胞体に陽性像は観察されなかった。したがって、AVPを合成するMNC自体がM₂受容体を発現している可能性は低いと考えられる。SONの周辺では、背外側領域において相対的に強い染色強度を示す神経線維が多数存在し、これらはSONの腹側方向へと走行しており、またM₂受容体を発現をする細胞も観察された。このSONの背外側領域はperinuclear zone (PNZ)と呼ばれ、この領域に局在するニューロンはSONのMNCへ投射して興奮の調節を担っていることが明らかになっている(24, 72, 73)。またSONを構成するMNCは、AVPを合成するものとオキシトシンを合成するものに分けられるが、AVP合成ニューロンは腹側に、オキシトシン合成ニューロンは背側に集簇している(60)。このことから、M₂受容体を発現するニューロンがSONの腹側に局在するAVPニューロンに投射している可能性が示唆された。一方、PVNでは神経核内およびその周辺領域において明らかな免疫陽性像が認められなかった。これらの所見は、AVPの合成を担う両神経核のうち、M₂受容体を介した調節成分はSONでのみ存在する可能性を示している。

M₂KOマウスのSONにおけるAVP免疫陽性ニューロンはWTと比較して有意に低値を示した。陽性細胞数の減少は、必ずしもAVPの合成の低下を意味するとは限らない。しかし、M₂KOマウスにおける血漿AVP濃度もWTより有意に低かったことから、M₂受容体がSONにおけるAVPの合成および分泌を促進性に調節していることが考えられた。一方、M₂KOマウスのPVNにおけるAVPニューロンの数は、WTのものと同等であった。この結果は、上述の組織学的所見と同様に、AVPの合成および分泌調節機構において両神経核間で異なる調節経路が存在す

ることを示している。これまでもPVNおよびSONの各神経核における機能的な違いはいくつか報告されている(66, 71)。Wangらは、コリン作動性ニューロンのマーカーであるChATをeGFPで標識したトランスジェニックマウスにおいて、2種類のChAT-eGFP陽性ニューロンがPVNとSONで異なる分布を示すことを明らかにしており、これらのうちChAT免疫陽性を示すものは両神経核のうちSONのみで認められたと報告している(77)。これはPVNよりもSONにおけるコリン作動性調節が優位である可能性を示唆している。またAlvesらは、非選択的ムスカリン受容体作動薬であるカルバコールを分界条床核に投与した際に生じるAVP分泌の増加が、神経伝達遮断作用を有する塩化コバルトのSON内前投与により阻害されることを実証し、またPVNへの塩化コバルト投与では阻害されないことを示している(2)。さらに彼らは、分界条床核へのカルバコール投与で生じる血圧上昇作用が、M₂受容体拮抗薬の分界条床核への前投与、またはAVP受容体拮抗薬の静脈内への前投与によって阻害できることも報告している(1)。すなわち、これらの所見は、分界条床核に発現するM₂受容体がSONへの神経伝達を媒介し、AVPの血中への分泌に関与している可能性を示唆している。本結果は、M₂受容体がSONにおけるAVPの合成および分泌の促進性調節に関与していることを示唆しており、脳内のムスカリン受容体の活性化によってAVPの分泌が促進されるという過去の報告を支持している。

M₂受容体媒介性のAVP合成および分泌調節が、抗利尿作用の発現にどのように影響するのかを検討したところ、M₂KOマウスにおける飲水量、排尿量、および排尿回数著しい増加が明らかとなった。これはM₂受容体によるAVPの調節機構が体液の恒常性調節において重要な役割を担っていることを示している。しかしながら、これまでの報告において、サブタイプは明らかでないがムスカリン受容体の活性化が飲水行動を調節することも示唆されている(22, 42, 62, 71)。そこでこ

のM₂受容体の欠損が飲水の促進を引き起こし排尿が増加しているのか、または排尿を増加させることで飲水の亢進が起こっているのかを判断する必要がある。前者であれば飲水の亢進によって体液量が過剰となり血漿浸透圧は低下し、後者であれば体液中に十分な水を維持できず血漿浸透圧は増加すると推測される。本研究で得られたM₂KOマウスにおける血漿浸透圧は、WTと比較して有意に増加していた。従って、M₂KOマウスで認められた多飲多尿は排尿の増加によるものであると考えられる。

M₂KOマウスに認められた多飲多尿が必ずしもAVPの分泌低下によるのみ引き起こされるとは限らない。実際にM₂KOマウスでは、先天的なM₂受容体の欠損に起因してその表現型の異常を示すことがいくらか報告されており(9, 20, 90), 末梢器官における器質的および機能的異常が体液恒常性に影響を与えている可能性も否定できない。そこで、排尿に関わる器官における病変の有無を確認した。膀胱はM₂受容体を豊富に発現しており(41, 87), また心臓において同受容体の活性化は徐脈を引き起こすことが広く知られている(21, 26, 45)。したがって、M₂受容体の欠損が膀胱の収縮機能や心血管機能に影響を及ぼして尿量の増加に関与している可能性が考えられたが、これらの領域で特筆すべき病理所見は認められなかった。過去の報告においても、M₂KOマウスにおける膀胱の収縮力(14, 27, 74)や心拍数、血圧(35)においてWTのものとは比べて有意な差は認められないという機能的な知見が得られている。また、内分泌器官である甲状腺や副腎においても明らかな病変は認められず、甲状腺機能亢進症や副腎皮質機能亢進症といった多飲多尿を示すこれらの内分泌疾患の可能性は否定できる。同様に肝臓においても顕著な異常は検出されず、血漿AVP濃度の減少は肝臓におけるAVP代謝の亢進によるものとは考えにくい。また多飲多尿症状を呈する原因として、糖尿病、心因性多飲(15)、高カルシウム血症、

低カリウム血症なども考えられたが、これらは尿検査や血液生化学検査、血漿浸透圧の値から否定された。以上の結果から、M₂KOマウスにおいて観察されたAVP合成の減少や多飲多尿症状は、今回検索を行ったこれらの臓器および器官がM₂受容体の欠損により機能的な障害を生じ、その影響により発現しているわけではないと結論づけた。

多尿の原因としては、腎性尿崩症のようにAVPの作用部位である腎臓の受容体側の機能低下が生じている可能性も残されている。そこで、腎臓におけるV₂受容体の発現を評価したところ、免疫組織化学ではどちらのマウスにおいても尿細管上皮における同受容体の発現が認められ、またELISAによる受容体タンパク質の定量でも両マウスの腎組織中のV₂受容体の発現量に有意差はなかった。さらにV₂受容体の機能を評価するデスモプレシン投与試験では、M₂KOマウスの対照群において認められた多量の尿がデスモプレシンの投与によってWTマウスと同レベルまで減少した。したがって、M₂KOマウスのV₂受容体は抗利尿作用を誘引するために十分な発現量および機能性を有していることが確認できた。

以上の所見は、M₂受容体が腎機能や他の器官に作用して体液調節に影響している可能性は低く、またM₂受容体媒介性のAVP合成および分泌メカニズムが体液恒常性を維持する上で重要なことを示している。

本研究において、M₂KOマウスのPVNにおけるAVP陽性細胞数がWTと比較して有意差が認められなかったことは興味深く、重要な所見である。生体内において血漿浸透圧は1-2%の狭い範囲で厳密に制御されており、その上昇はAVPの合成および分泌を促進する強力な刺激となる(43)。M₂KOマウスでは血漿浸透圧の上昇が認められたにもかかわらず、PVNにおけるAVP陽性細胞の数はWTのものと有意な差が認められなかった。これは循環血中へのAVP分泌を主にSONが担っている可能性を示唆している。AVPを合成するMNCは、AVPを軸索終末から血中

へ分泌し体液調節に寄与することで知られるが、その他にも細胞体および樹状突起から細胞外液中へもAVPを放出する場合がある(36, 40, 58)。過去の報告において、強制水泳試験や社会的敗北ストレスなど特定のストレス刺激は、PVN内におけるAVPのmRNAレベルおよびPVN領域における細胞外液中のAVP濃度を増加させるが、SONではそれらの増加が認められなかったことが示されている(81, 82)。さらに、それらのストレス刺激は血漿AVPレベルを増加させなかった。この結果は特定のストレス刺激がPVNにおける神経核内でのAVP分泌のみを誘引し、血中へのAVP分泌には影響しないことを示しており、このことからPVNはストレス応答により密接に関与していることが考えられる。実際にSONがAVPまたはオキシトシンの合成を行うMNCのみで構成されるのに対し、PVNはCRHの合成を行う小細胞性神経分泌細胞も存在している。この小細胞性ニューロンはCRHのみならず、同一の細胞内でAVPも合成し、ストレス負荷時に両ホルモンを下垂体門脈中へと同時に放出する。下垂体前葉細胞ではCRH受容体に加えてAVP受容体も発現しており、AVPはCRHにより誘導される副腎皮質刺激ホルモンの放出に相乗的に作用する(3)。一方で、高浸透圧や血液量減少などの脱水刺激に対しては、SONの方がPVNより早期に反応し、より多くのAVPの合成を行っていることを示唆する報告もある(66, 67, 69)。したがって、PVNはストレス応答における役割を担っており(Fig.11B)、体液恒常性調節において主な役割を担っているのはSONであるのかもしれない(Fig.11A)。同じホルモンを合成し、同じ下垂体後葉へと終末を伸ばす同質のMNCの細胞体がなぜこのような解剖学的に離れた領域に存在しているのかという点については未だ明らかになっていないが、本所見はSONおよびPVNの両神経核間でAVP分泌における機能的な違いが存在することを示唆している。

第2章

ラットSONのAVPニューロンにおける
GABA作動性mIPSCに対する
ムスカリン受容体刺激の効果

緒 言

第1章では、 M_2 受容体が視床下部SONにおけるMNCのAVPの分泌および合成を促進性に調節して排尿および飲水行動に影響を及ぼしていることを示した。本章では、 M_2 受容体がどのようなメカニズムでAVPの分泌を促進しているのかを明らかにする一環として、同受容体がAVPニューロンの興奮を促進させる可能性について検討した。

M_2 受容体は $G_{i/o}$ タイプのGタンパク質結合型受容体であり、その活性化はアデニル酸シクラーゼ活性を抑制し、細胞内のcAMPを減少させるため、一般に神経細胞の機能に対して抑制的に働く。一次聴覚野や海馬では、 M_2 受容体刺激がGABA作動性ニューロンの興奮を抑制することで抑制性神経伝達物質であるGABAの放出を減弱させ、その結果シナプス後膜側の細胞興奮に寄与することが報告されている(18, 63)。そこで、同様のメカニズムにより M_2 受容体がSONにおけるAVPニューロンの興奮を間接的に調節している可能性を検証しようとした。

本章ではラット脳スライス標本を用いたホールセルパッチクランプ法を採用し、SONのAVPニューロンからmIPSCを記録した。mIPSCは Na^+ チャネル阻害薬であるテトロドトキシン(tetrodotoxin: TTX) 存在下で活動電位の発生が起こらない条件で記録される自発性の抑制性シナプス後電流である。SONにおいては抑制性の神経支配のほとんどはGABA作動性ニューロンであることが知られており(34, 49, 56, 83), M_2 受容体を薬理的に活性化させたときのmIPSCの振幅と発生頻度の変化を解析することでシナプス前膜におけるGABA放出に寄与しているかどうかを検討した。

SONではAVPの他にオキシトシンも合成されており、基本的にMNCはこの

どちらか一方のホルモンを合成している。AVPニューロンはSONの腹側に多く、オキシトシンニューロンは背側に多く認められるという分布の偏りはあるものの、両者は神経核内で混在しているために形態学的に区別することは難しい。過去の電気生理学的研究では、解剖学的にAVPニューロンが多いと報告されている箇所を狙って電流記録を行いAVPニューロンからの記録であると推定する方法(39)や、ピペット内液に色素を加えて記録細胞内に導入して実験後免疫組織化学によりAVPニューロンを同定する方法(89)などが行われていたものの、確実にAVPニューロンを同定することはできず、この点が課題となっていた。しかしながら、2005年にUetaらによってAVP-eGFPトランスジェニックラットが作出された(75)ことにより、蛍光顕微鏡下でAVPニューロンを生細胞の状態で同定することが可能となり、AVPニューロンにおける電気生理学的解析が容易なものとなった。そこで本研究においても、このAVP-eGFPラットを使用してmIPSCの記録を行った。

材料および方法

動物

実験にはメスのAVP-eGFPトランスジェニックWistarラット(6-9週齢)を用いた。産業医科大学の上田陽一教授により作出されたものを入手し、施設内で繁殖させたものを使用した。ラットはアクリル製ケージに入れて、明期と暗期が12時間周期(6:00-18:00)、室温が23-25°Cとなる条件のもとで飼育された。餌は飼育用固形肥料(Purina Rat Chow; Ralston Purina, St. Louis, MO, USA)を与えた。餌と水は自由摂取とした。

本実験プロトコールはTulane University Institutional Animal Care and Use Committeeの承認を受け、United States Public Health Service guidelinesに準拠して実施した。

脳スライス標本の作成

イソフルランを含ませた脱脂綿をラットと共に密閉容器に入れて十分に麻酔した後に断頭した。直ちに脳を取り出し、氷冷した切片作製用人工脳脊髄液(artificial cerebrospinal fluid: aCSF)中に1分間浸漬し、視床下部を含む組織ブロックを切り出してビブラトーム(VT1200S, Leica, Wetzlar, Germany)のステージ上に接着剤で固定してチャンバーに設置し、同氷冷aCSFでチャンバー内を満たした。ビブラトームを用いて、SONを含む3-4枚の脳スライス標本(300 μ m)を組織ブロックより作製した。脳スライス標本はO₂ 95% -CO₂ 5%の混合ガスを通気させたaCSF中で32-34°Cで30分平衡化させた。その後、標本を混合ガスで通気した記録用aCSF中へ移し実験に供するまで32-34°Cで維持した。各aCSFの組成は以下の通りである：スライス用:(mM) 124 NaCl, 3 KCl, 6 MgSO₄, 1.4

NaH₂PO₄, 1.0 CaCl₂, 10 glucose, 26 NaHCO₃; 記録用: (mM) 124 NaCl, 3 KCl, 1.3 MgSO₄, 1.4 NaH₂PO₄, 2.4 CaCl₂, 10 glucose, 26 NaHCO₃.

ホールセルパッチクランプ法によるmIPSCの記録

記録用aCSFを0.5 ml/minで灌流させたステージに脳スライス標本を設置し、正立蛍光顕微鏡(BX51WI, Olympus, Tokyo, Japan)下で488 nmの励起波長で緑色蛍光を呈するAVPニューロン(Fig.12)を同定し、膜電位固定下でホールセルパッチクランプ記録を行った。ガラスピペット電極は外径1.65 mm 内径1.2 mmのホウケイ酸ガラス製の毛細管を使用しガラス電極作製装置(P-97, Sutter Instrument, Novato, CA, USA)で先端抵抗が3-4 MΩとなるように作製した。電極内には高濃度Cl⁻ピペット内液を充填した。内液の組成 (mM) は、110 CsCl, 1.0 CaCl₂, 11 EGTA, 30 K-gluconate, 3.8 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, 10 HEPESとした。

AVPニューロンの電流反応は、Multiclamp 700A amp (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)により増幅し、2 kHzのローパスフィルターを通過させた後、A/Dコンバータ(Digidata1440A, Molecular Devices)でデジタル化したデータをpClamp 9ソフトウェア(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)によりコンピュータ内に保存した。ホールセルパッチクランプ記録を開始した時の入力抵抗、およびシリーズ抵抗が実験中に20%以上変化した場合はデータから除外した。mIPSCは、Na⁺チャンネル阻害薬であるTTX(1 μM)およびグルタミン酸受容体拮抗薬であるDNQX(20 μM)とDL-AP5(40 μM)(Hello Bio Inc., Montgomery NJ, USA)をaCSF内に加えた条件下で記録した。ムスカリン(10 μM)およびM₂受容体拮抗薬であるAFDX-116(10 μM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を投与する際も同様にaCSF内に加えて灌流させた。記録細胞におけるGタンパク質結合

型受容体を阻害した条件下で実験を行う際には、Gタンパク阻害薬であるGDPβS(500 μM)を添加したピペット内液を使用した。mIPSCの記録は、ホールセルを形成して10分間平衡化した後に開始し、その5分後にムスカリンの投与を開始して更に10分間記録した。mIPSCの振幅と頻度は解析用ソフトウェアMinianalysis (Synaptosoft Inc., Decatur, GA, USA)によって解析した。対照群としてムスカリン非存在下で15分間記録を行った。電極内液の灌流で細胞内成分が流されてしまうことで細胞機能のランダウン(時間経過に従い反応性が低下する等)が生じる可能性があり、その影響を補正する目的ですべてのデータは対照群の値に対する百分率で表した。ムスカリンの投与前および投与後におけるmIPSCの値は、それぞれ記録開始から2-5分区間および12-15分区間の各3分間のデータの平均値を算出して求めた。また、ムスカリン投与前と投与後の振幅および発生間隔 (inter-event interval)の累積相対度数分布を求めた。

統計解析

値は平均値とその標準誤差で表した。mIPSCの振幅および頻度の分布の正規性をKolmogorov-Smirnov検定によって判定し、正規分布に従う場合はStudentのpaired *t*検定、従わない場合はWilcoxonの符号順位検定によりムスカリンによる効果の有意性を評価した。また累積相対度数分布の比較にもKolmogorov-Smirnov検定を用いた。 $P < 0.05$ を統計学上の有意水準とした。mIPSCを記録した細胞数を*n*で表した。

結果

mIPSCに対するムスカリンの効果

AVPニューロンにおいて-70 mVの保持電位に膜電位固定すると、短鋒性のmIPSCが記録された。mIPSCの発生間隔は0.001-3.0 secでその振幅は50-500 pAの範囲にあり、発生間隔と振幅の大きさにはばらつきが見られた(Fig.13)。

ムスカリン受容体刺激がGABA作動性シナプスに与える作用を検討するため、同受容体作動薬であるムスカリン (10 μ M) を投与したところ(Fig.13, 14A, 15A), mIPSCの振幅の平均値は有意な影響を受けなかった。ムスカリン投与後の平均振幅は $101.2 \pm 6.75\%$ ($n=9$)であり、投与前の値 ($98.51 \pm 0.72\%$, $n=9$)と比較して有意な差は認められなかった ($P=0.68$; Fig. 14B)。また、累積相対度数分布の比較においてもムスカリン投与後に有意な差は認められなかった ($P=0.77$; Fig.14C)。一方、mIPSCの発生頻度の平均値は、ムスカリン投与後に $50.1 \pm 4.27\%$ ($n=9$) となり、投与前の値 ($94.9 \pm 1.68\%$, $n=9$) の約50%まで有意に減少した ($P<0.01$; Fig.15B)。累積相対度数分布を比較すると、inter-event intervalがムスカリン投与後に右方移動していることが明らかとなり、これらの分布度合には有意な差が認められた ($P<0.01$; Fig.15C)。

これらの結果は、ムスカリン受容体の活性化がシナプス前膜からのGABAの放出を減少させたことを示唆している。

ムスカリンの作用に対するM₂受容体拮抗薬の効果

ムスカリンによって生じるmIPSCの頻度の減少がM₂受容体を介したものであるかどうか検討するために、M₂受容体に選択性を有する拮抗薬であるAFDX-116存在下でムスカリンを投与した(Fig.16, 17A, 18A)。AFDX-116 (10

μM) を単独投与しても, mIPSCの平均振幅および頻度に変化は認められなかった。AFDX-116 (10 μM) 存在下でムスカリン (10 μM) を投与しても, ムスカリンの単独投与の場合と同様にmIPSCの平均振幅には有意な変化は認められず, ムスカリン投与前後の平均値はほぼ同じであった(投与前: $103.9 \pm 1.02\%$, 投与後: $96.4 \pm 3.07\%$, $n=8$; $P=0.13$; Fig.17B)。また, 累積相対度数の分布もムスカリン投与前後で類似していた($P=0.07$; Fig.17C)。一方, Fig.15で示したようなムスカリン投与による平均頻度の減少は, AFDX-116を前投与することで消失した。AFDX-116存在下におけるムスカリン投与後の平均頻度は $100.9 \pm 5.26\%$ ($n=8$) であり, 投与前の値 ($100.3 \pm 2.36\%$, $n=8$) と比較して有意な差は認められなかった ($P=0.95$; Fig.18B)。また, 頻度の累積相対度数分布曲線における右方移動も見られず, ムスカリン投与前後で曲線間に有意差も認められなかった($P=0.59$; Fig.18C)。

これらの結果は, ムスカリンによるGABAの放出抑制を M_2 受容体が媒介している可能性を示している。

ムスカリン受容体を介した逆行性抑制性神経伝達による効果の検討

AVPニューロンにおいてはエンドカンナビノイドによる逆行性神経伝達経路が存在することが明らかになっており(11, 12, 57), また, M_1 および M_3 ムスカリン受容体サブタイプは, シナプス後膜におけるエンドカンナビノイドの産生を促進することが知られている(18, 53)。ムスカリンの投与によるmIPSCの頻度の減少がこのようなエンドカンナビノイドの産生を介した逆行性の抑制経路によって生じている可能性を除外するために, 記録するAVPニューロン内にGDP β S (500 μM) を導入して記録細胞の細胞膜上のGタンパク質結合型受容体を阻害した状態でムスカリンを投与した(Fig.19, 20A, 21A)。GDP β Sを

導入した細胞でムスカリンを投与しても、mIPSCの振幅はGDPβS非存在下の場合と同様に平均値(ムスカリン投与前：96.3±0.98% vs 投与後：105.2±5.28%， $n=7$ ； $P=0.15$ ；Fig.20B)および累積相対度数曲線($P=0.10$ ；Fig.20C)において顕著な変化は認められなかった。一方、mIPSCの頻度はGDPβS存在下においてもムスカリンによって約50%まで有意に減少した(ムスカリン投与前：101.1±2.84% vs 投与後：56.8±8.58%， $n=7$ ； $P<0.01$ ；Fig.21B)。また、累積相対度数分布もムスカリンによって右方移動し、投与前と投与後の曲線において有意差が認められた($n=7$ ； $P<0.01$ ；Fig.21C)。

これらの結果は、ムスカリンによるGABA放出抑制において逆行性神経伝達経路は関与していないことを示唆している。

考察

SONにおいてMNCの興奮性を制御しているニューロンのほとんどはグルタミン酸作動性およびGABA作動性であることが知られており(32, 34, 59, 83), SONに投射しているニューロンのそれぞれ30%と50%を占めると言われている(49)。実際にラットSONにおけるMNCにおいて記録されたmIPSCは, GABA_A受容体拮抗薬であるビククリンによって消失することが確認されている(28, 73)。本研究においてAVP-eGFPニューロンより記録されたmIPSCは, GABA作動性神経終末の単一シナプス小胞における自発性GABA放出を反映している。サブタイプ非選択的な作動薬であるムスカリンの投与はmIPSCの振幅に影響を与えなかったことから, 小胞からのGABA放出における最小放出単位, あるいはGABA受容体の親和性および情報伝達機構には影響を及ぼしていないことが考えられる。一方, mIPSCの発生頻度は有意に減少させた。この結果は, GABA作動性ニューロンの終末に発現するムスカリン受容体の活性化によってシナプス前膜における小胞の開口確率が減少し, GABAの放出頻度が減少したことを示している。また, 累積相対度数分布曲線に関しても振幅は変動せず, inter-event intervalがムスカリンの投与によって右方移動した。Inter-event intervalは先行するmIPSCが発生してから次のmIPSCが発生するまでの時間を示しており, ムスカリンによってその間隔の長いものが増えたことを示している。すなわち, これらの結果もまたムスカリンによってGABAの放出が減少したことを示している。ムスカリンによるmIPSCの頻度の減少および累積相対度数分布曲線の右方移動はM₂受容体拮抗薬AFDX-116の前投与により消失したことから, この反応を媒介するサブタイプがM₂であることが示唆された。ムスカリン受容体サブタイプの中でM₂およびM₄受容体はG_{i/o}タンパク質共役型であり,

神経細胞の興奮に抑制的に働く。中でもM₂受容体は一次聴覚野や海馬においてGABA作動性ニューロン上に発現しシナプス終末の興奮を抑制することでGABAの放出確率を低下させ、シナプス後膜側のニューロンの興奮を間接的に促進していることが報告されている(18, 63)。第1章で得られたSONの神経核内におけるM₂受容体の発現を示す組織学的根拠からも、M₂受容体によるGABA放出抑制機構の存在が推察される。

MNCはエンドカンナビノイドの一種である2-アラキドノイルグリセロール(2-arachidonoylglycerol: 2-AG)を介した逆行性神経伝達経路を持つことが知られている(11, 12, 57)。2-AGはシナプス後膜のG_{q/11}タンパク質結合型受容体の活性化によりホスホリパーゼC β を介する経路によって生合成され、シナプス前膜に発現するカンナビノイド受容体であるCB₁受容体に逆行性に作用して神経伝達物質の放出を抑制する。この2-AGの生合成を担うG_{q/11}タンパク質結合型受容体として、M₁およびM₃ムスカリン受容体が知られている(18, 53)。本研究では、ムスカリンによる作用がM₂受容体拮抗薬であるAFDX-116によって抑制されたことから、M₂受容体によるGABA放出の抑制作用が示唆されたが、用いたAFDX-116の濃度では、M₂受容体以外にM₁やM₃受容体もブロックしている可能性が除外できない。したがって、ムスカリンがAVPニューロン上のM₁およびM₃受容体を活性化し2-AGを介した逆行性抑制によって前膜からのGABA放出を抑制している可能性も考えられた。そこで、Gタンパク質阻害薬であるGDP β SをAVPニューロン内に導入してmIPSCの記録を行った。この条件下において、ムスカリンの投与はmIPSCの振幅に影響を及ぼさず頻度のみを減少させ、またinter-event intervalの累積相対度数分布を有意に右方移動させた。これらの結果は、GDP β Sを導入していない条件下での結果と同じであり、AVPニューロンとGABA作動性ニューロン間において他のムスカリン受容体サブタイプを介した逆行性抑制性神経伝達は存在していない

ことを示唆している。

本章の結果は、AVPニューロンを抑制性に支配しているGABA作動性ニューロンの終末上にM₂受容体が発現し、GABAの放出を抑制することでSONにおけるAVPニューロンの興奮を間接的に調節していることを示唆している。本研究では、AVP-eGFPトランスジェニックラットを用いたが、最近ではAVPを蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックマウスも開発されている。AVPニューロンの神経性調節機構にラットとマウスの間で種差が認められる可能性も否定できないことから、今後はマウスにおいても同様な結果が得られるのか検討が必要であろう。

総合考察

本研究ではAVPを介した体液恒常性調節におけるM₂受容体の役割について検討した。第1章ではM₂受容体がSONおよびその周辺領域に発現しており、同神経核におけるAVPの合成および血中への分泌を媒介していることを明らかにし、この機構が体液の恒常性維持において大きな役割を占めていることが示唆された。第2章ではM₂受容体がGABA作動性神経終末からのGABAの放出を抑制することでSONのAVPニューロンを間接的に興奮させることを示した。これらの結果は、M₂受容体がGABA放出抑制を介してSONのAVP合成および分泌を促進し、抗利尿作用を発揮することにより体液の恒常性調節を担っていることを示唆している。本研究は、これまで議論されてきたAVPの合成および分泌におけるコリン作動性調節機構において、M₂受容体媒介性の調節という新たな知見を提唱するものである。

AVPを介した体液調節は様々な生理学的刺激によって引き起こされる。中でも血圧および血漿浸透圧の変化はAVP分泌の引き金となる重要な因子である。生体内において血圧の増加は頸動脈洞や大動脈弓の高圧受容器によってモニターされており、その活性化はAVPの分泌を抑制する(10, 30, 31)。血圧の上昇によって圧受容器が活性化されると、その情報は迷走神経を介して延髄の孤束核へと伝えられる。この領域は他にも化学受容器や低圧受容器からの入力も存在し、末梢の心血管系の情報を統合して求心路へと出力している中継点であると考えられている。AVPの分泌調節においては、孤束核からブローカ対角帯を介した経路が示唆されており、そこからGABA作動性ニューロンがSONのAVPニューロンへ投射し、AVPの分泌は抑制される(10, 30, 50)。一方、血漿浸透圧の変化は脳室周囲器官である脳弓下器官、終板脈管器官の浸透圧受容器によって媒介される。これらの領域で

は血液脳関門を欠いており、特殊なNa⁺チャンネルが体液中のNa⁺濃度を直接モニターしている(25)。これらの領域と相互に投射ニューロンを送っている正中視索前核(median preoptic nucleus: MnPO)は浸透圧変化の情報を統合する領域であり、口渴や飲水行動の誘発にも関与すると考えられている(37, 46)。MnPOはコリン作動性神経の軸索をSONへと投射しており、このニューロンは血漿浸透圧の上昇で興奮することが報告されている(86)。また終板脈管器官からはグルタミン酸作動性ニューロンがSONへと入力しており、AVPニューロンの興奮に寄与していると考えられている(7)。

これらの血圧性および浸透圧性のAVP分泌調節機構において、M₂受容体はどのように関与しているのだろうか。本研究における組織学的および電気生理学的実験結果から、SONのAVPニューロンに投射するGABA作動神経終末にM₂受容体が発現していることが示唆された。このGABA作動性の投射が、圧受容器媒介性経路であるブローカ対角帯からの入力であるとする、浸透圧受容器媒介性経路のMnPOからのコリン作動性ニューロンが、M₂受容体を介してこのGABA作動性ニューロンの活性を抑制している可能性がある(Fig.22)。MNCは多くの興奮性および抑制性の入力を持続性に受けており、種々の生理学的刺激に応じてその興奮性を変化させることでAVPの放出を調節していると思われる。例えば急性の脱水によって血漿浸透圧が上昇した際には、浸透圧性のMNCへの興奮性入力だけでなく、圧受容器性の抑制性の信号入力を抑えることでAVPの分泌量を増大させて体液の保持を促しているのかもしれない。本研究でM₂KOマウスの血漿AVP濃度が生理学的な刺激を与えていないにもかかわらず低値を示したのは、このようにM₂受容体の欠損によって抑制性のトーンが制御できなくなっていることが予想される。さらに、浸透圧性の情報を統合するMnPOは血圧性の情報を統合する孤束核とも解剖学的な連絡があることが知られており(64)、また浸透圧性の刺激は

MnPOなどの浸透圧感受性器官のみならず孤束核における神経の活性を引き起こすことも報告されている(37)。これらは浸透圧性および血圧性の両経路が相互に作用し合ってAVPの分泌を調節している可能性を示唆している。したがって、M₂受容体による脱抑制作用は、単に浸透圧性のAVP分泌の効率を上げるのみならず、両経路による包括的な体液調節においても重要な意味を持つのかもしれない。

本研究では第2章において、SONのAVPニューロンに投射するGABA作動性神経に対するM₂受容体の抑制作用を明らかにした。しかし、第1章において示したM₂受容体欠損による体液恒常性への影響が必ずしもSONにおけるM₂受容体のみによるものであるとは言えない。すなわち、他の脳領域のM₂受容体によるAVP分泌調節機構が存在する可能性も残されている。第1章で述べたように、大脳辺縁系の分界条床核に発現するM₂受容体はSONにおけるAVP分泌作用を媒介することが示唆されている(1)。また、SONの背外側のPNZにはGABA作動性神経およびコリン作動性神経が存在し、それらの多くはSONへと投射していることも知られている(38, 47, 62, 67)。本研究においてもM₂受容体を発現する細胞の存在がPNZにおいて認められたが、それらがSONへ投射しているのか、またGABA作動性ニューロンであるのかどうかは明らかでない。しかしながら、このPNZは孤束核、ブローカ対角帯、孤束核、脳弓下器官、終板脈管器官、MnPOなどの領域からの投射があることが逆行性色素による標識で明らかにされている(63)ことから、PNZにおけるコリン作動性の機構もSONにおけるAVP分泌調節において重要であると思われる。これらに加えて、脳弓下器官におけるムスカリン受容体刺激が飲水行動を促進するとともにSONおよびPVNにおける神経活性を生じることが報告されている(84)。この作用を媒介するサブタイプは明らかにはなっていないが、このことはムスカリン受容体が、AVPの分泌に関わる求心性の情報伝達に加えて、飲水行動の誘引も媒介しており、体液の恒常性調節における同受容体の重要性を示

している。このようにムスカリン受容体媒介性のコリン作動性調節機構は体液の恒常性調節において不可欠であると言える。

以上のように、本研究によって明らかになったM₂受容体によるAVPの合成および分泌調節機構の存在は、同受容体が中枢性尿崩症の新たな創薬ターゲットとして期待できる可能性を示すと同時に、体液恒常性の研究におけるSONの重要性を提唱している。

結 論

抗利尿ホルモンのAVPの合成は視床下部のSONおよびPVNのMNCで合成され、下垂体後葉から血中へ分泌されると腎集合管のV₂受容体に作用し、水の再吸収を誘導することで体液の恒常性維持を担っている。これまでにコリン作動性ムスカリン受容体によるAVPの合成および分泌調節メカニズムが示唆されてきたものの、ムスカリン受容体サブタイプの同定は行われてこなかった。本研究では5つのムスカリン受容体サブタイプのうち、M₂受容体に着目し、M₂KOマウスおよびAVP-eGFPラットを用いてAVPの合成および分泌調節機構における同受容体の関与を検討した。

第1章ではWTマウスの視床下部における抗M₂受容体抗体を用いた免疫組織化学、M₂KOマウスにおける抗AVP抗体を用いた免疫組織化学および血漿AVP濃度の測定を行った。さらに排尿および飲水量の計測、血液生化学検査による血漿浸透圧の算出、尿検査や病理学的検索を実施し、また免疫組織化学およびELISAによるV₂受容体の発現量の評価、V₂受容体選択的作動薬デスモプレシンの投与試験によるV₂受容体の反応性を検討した。その結果、M₂受容体がSON周辺領域に発現しておりSONにおけるAVPの合成および分泌を促進性に調節していることが示唆された。またM₂KOマウスにおいて多飲多尿症状が認められたが、尿中および組織中に異常な病理学的所見は観察されなかった。さらにV₂受容体の発現量及び反応性にも異常は認められなかったことから、中枢性尿崩症以外の疾患を否定し、M₂受容体に媒介されるAVPの合成および分泌が体液恒常性の維持に必要不可欠であることを示した。第2章ではAVPニューロンにおけるmIPSCの測定を行い、ムスカリン受容体刺激に対する振幅および頻度の変化を検討した。非選択的作動薬であるムスカリンを投与すると、GABAの自発性放出

によって生じるmIPSCの発生頻度が減少し、ムスカリン受容体刺激がGABA放出を抑制することが明らかとなった。ムスカリンで生じたmIPSC頻度の減少は、M₂受容体拮抗薬であるAFDX-116の投与によって抑制された。また他のムスカリン受容体による逆行性神経伝達が存在する可能性を否定するため、AVPニューロン内にGタンパク質阻害薬GDPβSを導入した条件下で同様にムスカリンを投与したところ、頻度の減少は抑制されなかった。これらの結果はM₂受容体がGABA作動性ニューロン上に発現し、シナプス前膜からのGABA放出を抑制している可能性を示唆している。

本研究により、SONに投射するGABA作動性ニューロン上にM₂受容体が発現しており、シナプス前膜からのGABAの放出を抑制することでAVPニューロンを間接的に興奮させ、AVPの合成および分泌を促進していることが示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、日頃よりご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医薬理学分野の海野年弘教授、松山勇人准教授、故小森成一名誉教授に深く感謝申し上げます。

また本論文を作成するにあたり、草稿をご校閲賜りました、岐阜大学獣医生理学分野の志水泰武教授、帯広畜産大学基礎獣医学研究部門薬理学教室の石井利明教授、岩手大学比較薬理毒性学研究室の佐藤洋教授、東京農工大学獣医薬理学研究室の佐々木一昭准教授に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、惜しみないご協力とご助言を賜りました岐阜大学獣医解剖学研究室の齋藤正一郎准教授、獣医病理学研究室の酒井洋樹准教授、Tulane University Department of Cell and Molecular Biology の Jeffrey G. Tasker 教授ならびに同研究室の皆様心より感謝致します。

文 献

1. Alves FHF, Crestani CC, Resstel LBM & Corrêa FMA 2007 Cardiovascular effects of carbachol microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. *Brain Research* **1143** 161–168.
2. Alves FHF, Crestani CC, Busnardo C, Antunes-Rodrigues J, Gomes F V., Resstel LBM & Corrêa FMA 2011 Hypothalamic supraoptic but not paraventricular nucleus is involved in cardiovascular responses to carbachol microinjected into the bed nucleus of stria terminalis of unanesthetized rats. *Brain Research* **1393** 31–43.
3. Antoni FA 1993 Vasopressinergic Control of Pituitary Adrenocorticotropin Secretion Comes of Age. *Frontiers in Neuroendocrinology* **14** 76–122.
4. Armstrong WE, Sladek CD & Sladek JR 1982 Characterization of noradrenergic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology* **111** 273–279.
5. Baldeweg SE, Ball S, Brooke A, Gleeson HK, Levy MJ, Prentice M, Wass J & Society for Endocrinology Clinical Committee the S for EC 2018 SOCIETY FOR ENDOCRINOLOGY CLINICAL GUIDANCE: Inpatient management of cranial diabetes insipidus. *Endocrine Connections* **7** G8–G11.
6. Bonner TI, Buckley NJ, Young AC & Brann MR 1987 Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science (New York, N.Y.)* **237** 527–532.
7. Bourque CW, Oliet SH & Richard D 1994 Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* **15** 231–274.

8. Brezenoff HE, Vargas H & Xiao Y-F 1988 Blockade of Brain M2 Muscarinic Receptors Lowers Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Pharmacology* **36** 101–105.
9. Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC & Wess J 2003 Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochemical Research* **28** 437–442.
10. Cunningham JT, Nissen R & Renaud LP 1992 Catecholamine depletion of the diagonal band reduces baroreflex inhibition of supraoptic neurons. *The American Journal of Physiology* **263** R363-7.
11. Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC & Tasker JG 2003 Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23** 4850–4857.
12. Di S, Popescu IR & Tasker JG 2013 Glial control of endocannabinoid heterosynaptic modulation in hypothalamic magnocellular neuroendocrine cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **33** 18331–18342.
13. Dorwart W V & Chalmers L 1975 Comparison of methods for calculating serum osmolality from chemical concentrations, and the prognostic value of such calculations. *Clinical Chemistry* **21** 190–194.
14. Ehlert FJ, Griffin MT, Abe DM, Vo TH, Taketo MM, Manabe T & Matsui M 2005 The M2 muscarinic receptor mediates contraction through indirect mechanisms in mouse urinary bladder. *The Journal of Pharmacology and*

- Experimental Therapeutics* **313** 368–378.
15. Evenson RC, Jos CJ & Mallya AR 1987 Prevalence of Polydipsia among Public Psychiatric Patients. *Psychological Reports* **60** 803–807.
 16. Fitzsimons JT 1998 Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiological Reviews* **78** 583–686.
 17. Frank E & Landgraf R 2008 The vasopressin system — From antidiuresis to psychopathology. *European Journal of Pharmacology* **583** 226–242.
 18. Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Tsubokawa H, Taketo MM, Watanabe M, Manabe T & Kano M 2004 Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *European Journal of Neuroscience* **19** 2682–2692.
 19. Ghamari-Langroudi M & Bourque CW 2004 Muscarinic receptor modulation of slow afterhyperpolarization and phasic firing in rat supraoptic nucleus neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24** 7718–7726.
 20. Gomeza J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H & Wess J 1999 Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** 1692–1697.
 21. Gupta RC, Neumann J, Boknik P & Watanabe AM 1994 M2-specific muscarinic cholinergic receptor-mediated inhibition of cardiac regulatory protein phosphorylation. *The American Journal of Physiology* **266** H1138–44.

22. Hagan JJ, Tonnaer JADM & Broekkamp CLE 1987 Cholinergic stimulation of drinking from the lateral hypothalamus: Indications for M2 muscarinic receptor mediation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **26** 771–779.
23. Hammock EAD & Young LJ 2006 Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **361** 2187–2198.
24. Hatton GI, Ho YW & Mason WT 1983 Synaptic activation of phasic bursting in rat supraoptic nucleus neurones recorded in hypothalamic slices. *J. Physiol.* **345** 297–317.
25. Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S & Noda M 2002 Nax channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neuroscience* **5** 511–512.
26. Howell RE & Kovalsky MP 1995 Hypotensive effect of an M2-selective muscarinic antagonist in anaesthetized guinea-pigs. *Journal of Autonomic Pharmacology* **15** 19–26.
27. Igawa Y, Zhang X, Nishizawa O, Umeda M, Iwata A, Taketo M, Manabe T, Matsui M & Andersson K 2004 Cystometric Findings in Mice Lacking Muscarinic M2 or M3 Receptors. *The Journal of Urology* **172** 2460–2464.
28. Iijima K & Kojima N 1985 GABA-T-positive neurons in the rat supraoptic nucleus as revealed by a pharmaco-histochemical method with gabaculine. *Acta Histochemica et Cytochemica* **18** 445–454.
29. Iitake K, Share L, Ouchi Y, Crofton JT & Brooks DP 1986 Central cholinergic control of vasopressin release in conscious rats. *The American Journal of Physiology* **251** E146-50.

30. Jhamandas JH & Renaud LP 1986a Diagonal band neurons may mediate arterial baroreceptor input to hypothalamic vasopressin-secreting neurons. *Neuroscience Letters* **65** 214–218.
31. Jhamandas JH & Renaud LP 1986b A gamma-aminobutyric-acid-mediated baroreceptor input to supraoptic vasopressin neurones in the rat. *The Journal of Physiology* **381** 595–606.
32. Jhamandas JH & Renaud LP 1987 Bicuculline blocks an inhibitory baroreflex input to supraoptic vasopressin neurons. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **252** R947–R952.
- 33.
34. Kabashima N, Shibuya I, Ibrahim N, Ueta Y & Yamashita H 1997 Inhibition of spontaneous EPSCs and IPSCs by presynaptic CABA(B) receptors on rat supraoptic magnocellular neurons. *Journal of Physiology* **504** 113–126.
35. LaCroix C, Freeling J, Giles A, Wess J & Li Y-F 2008 Deficiency of M2 muscarinic acetylcholine receptors increases susceptibility of ventricular function to chronic adrenergic stress. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **294** H810-20.
36. Landgraf R & Ludwig M 1991 Vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of the rat brain: osmotic stimulation via microdialysis. *Brain Research* **558** 191–196.
37. Leng G, Brown CH & Russell JA 1999 Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Progress in Neurobiology* **57** 625–655.

38. Leng G, Blackburn RE, Dyball REJ & Russell JA 1989 Role of Anterior Peri - Third Ventricular Structures in the Regulation of Supraoptic Neuronal Activity and Neurohypophysial Hormone Secretion in the Rat. *Journal of Neuroendocrinology* **1** 35–46.
39. Li D-P, Pan Y-Z & Pan H-L 2001 Acetylcholine attenuates synaptic GABA release to supraoptic neurons through presynaptic nicotinic receptors. *Brain Research* **920** 151–158.
40. Ludwig M, Callahan MF, Neumann I, Landgraf R & Morris M 1994 Systemic osmotic stimulation increases vasopressin and oxytocin release within the supraoptic nucleus. *Journal of Neuroendocrinology* **6** 369–373.
41. Maeda A, Kubo T, Mishina M & Numa S 1988 Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS Letters* **239** 339–342.
42. Mangiapane ML & Simpson JB 1979 Pharmacologic independence of subfornical organ receptors mediating drinking. *Brain Research* **178** 507–517.
43. Martin JR 1996 Mechanisms of the cardiovascular response to posterior hypothalamic nucleus administration of carbachol. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **27** 891–900.
44. Mason WT, Ho YW, Eckenstein F & Hatton GI 1983 Mapping of cholinergic neurons associated with rat supraoptic nucleus: Combined immunocytochemical and histochemical identification. *Brain Research Bulletin* **11** 617–626.
45. Matsumoto K & Pappano AJ 1991 Carbachol activates a novel sodium current in isolated guinea pig ventricular myocytes via M2 muscarinic receptors.

- Molecular Pharmacology* **39** 359–363.
46. McKinley MJ, Yao ST, Uschakov A, McAllen RM, Rundgren M & Martelli D 2015 The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiologica* **214** 8–32.
47. Meeker RB, Swanson DJ & Hayward JN 1988 Local synaptic organization of cholinergic neurons in the basolateral hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* **276** 157–168.
48. Meeker RB, Swanson DJ & Hayward JN 1989 Light and electron microscopic localization of glutamate immunoreactivity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroscience* **33** 157–167.
49. Meeker RB, Swanson DJ, Greenwood RS & Hayward JN 1993 Quantitative mapping of glutamate presynaptic terminals in the supraoptic nucleus and surrounding hypothalamus. *Brain Research* **600** 112–122.
50. Michels KM, Meeker RB & Hayward JN 1986 Differential distribution of muscarinic cholinergic and putative nicotinic cholinergic receptors within the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *Neuroendocrinology* **44** 498–507.
51. Michels KM, Meeker RB & Hayward JN 1991 Muscarinic cholinergic control of vasopressin secretion from the acute hypothalamoneurohypophysial explant. *Neuroendocrinology* **54** 219–226.
52. Mori M, Tsushima H, Kamiya T & Matsuda T 1994 Effect of muscarinic receptor modulators in the hypothalamic supraoptic nucleus of the rat. *Japanese Journal of Pharmacology* **66** 413–419.

53. Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, Taketo MM, Manabe T & Kano M 2003 Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience* **18** 109–116.
54. Oki T, Takagi Y, Inagaki S, Taketo MM, Manabe T, Matsui M & Yamada S 2005 Quantitative analysis of binding parameters of [3H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Brain Research. Molecular Brain Research* **133** 6–11.
55. Paxinos G & Franklin K 2004 *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.
56. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W & Sperk G 2000 GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **101** 815–850.
57. Popescu IR, Di S & Tasker JG 2014 Endocannabinoid Modulation of Synaptic Inputs to Magnocellular Neurons. In *Neurophysiology of Neuroendocrine Neurons*, pp 225–252. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
58. Pow D V & Morris JF 1989 Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis. *Neuroscience* **32** 435–439.
59. Randle JC & Renaud LP 1987 Actions of gamma-aminobutyric acid on rat supraoptic nucleus neurosecretory neurones in vitro. *The Journal of*

- Physiology* **387** 629–647.
60. Rhodes CH, Morriell JI & Pfaff DW 1981 Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: Distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin, and vasopressin. *The Journal of Comparative Neurology* **198** 45–64.
61. Rotter A, Birdsall NJ, Burgen AS, Field PM, Hulme EC & Raisman G 1979 Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of [3H]propylbenzilylcholine mustard and its distribution in the forebrain. *Brain Research* **180** 141–165.
62. Rowland NE, Farnbauch LJ & Robertson KL 2003 Brain muscarinic receptor subtypes mediating water intake and Fos following cerebroventricular administration of bethanecol in rats. *Psychopharmacology* **167** 174–179.
63. Salgado H, Bellay T, Nichols JA, Bose M, Martinolich L, Perrotti L & Atzori M 2007 Muscarinic M2 and M1 Receptors Reduce GABA Release by Ca²⁺ Channel Modulation Through Activation of PI3K/Ca²⁺-Independent and PLC/Ca²⁺-Dependent PKC. *Journal of Neurophysiology* **98** 952–965.
64. Senatorov V. & Renaud L. 1999 Projections of medullary and pontine noradrenergic neurons to the horizontal limb of the nucleus of diagonal band in the rat. *Neuroscience* **88** 939–947.
65. Shen E & Sun X 1995 Endogenous acetylcholine-induced Fos expression in magnocellular neurosecretory neurons in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters* **195** 191–194.
66. Shen E, Dun SL, Ren C, Bennett-Clarke C & Dun NJ 1992 Hypotension preferentially induces c-fos immunoreactivity in supraoptic vasopressin

- neurons. *Brain Research* **593** 136–139.
67. Sherman TG, McKelvy JF & Watson SJ 1986 Vasopressin mRNA regulation in individual hypothalamic nuclei: a northern and in situ hybridization analysis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **6** 1685–1694.
68. Shioda S, Nakajo S, Hirabayashi T, Nakayama H, Nakaya K, Matsuda K & Nakai Y 1997 Neuronal nicotinic acetylcholine receptor in the hypothalamus: morphological diversity and neuroendocrine regulations. *Molecular Brain Research* **49** 45–54.
69. da Silveira LTG, Junta CM, Monesi N, de Oliveira-Pelegrin GR, Passos GA & Rocha MJA 2007 Time Course of c-fos, vasopressin and oxytocin mRNA Expression in the Hypothalamus Following Long-Term Dehydration. *Cellular and Molecular Neurobiology* **27** 575–584.
70. Struckmann N 2003 Role of Muscarinic Receptor Subtypes in the Constriction of Peripheral Airways: Studies on Receptor-Deficient Mice. *Molecular Pharmacology* **64** 1444–1451.
71. Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E & Maruyama Y 2001 Opposite regulation of body temperature by cholinergic input to the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus in rats. *Brain Research* **909** 102–111.
72. Theodosis DT, Paut L & Tappaz ML 1986 Immunocytochemical analysis of the GABAergic innervation of oxytocin- and vasopressin-secreting neurons in the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience* **19** 207–222.
73. Tribollet E, Armstrong WE, Dubois-Dauphin M & Dreifuss JJ 1985 Extra-hypothalamic afferent inputs to the supraoptic nucleus area of the rat

as determined by retrograde and anterograde tracing techniques.

Neuroscience **15** 135–148.

74. Uchiyama T & Chess-Williams R 2004 Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *Journal of Smooth Muscle Research = Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* **40** 237–247.
75. Ueta Y, Fujihara H, Serino R, Dayanithi G, Ozawa H, Matsuda K, Kawata M, Yamada J, Ueno S, Fukuda A *et al.* 2005 Transgenic Expression of Enhanced Green Fluorescent Protein Enables Direct Visualization for Physiological Studies of Vasopressin Neurons and Isolated Nerve Terminals of the Rat. *Endocrinology* **146** 406–413.
76. Vilaró MT, Mengod G & Palacios JM 1993 Advances and limitations of the molecular neuroanatomy of cholinergic receptors: the example of multiple muscarinic receptors. *Progress in Brain Research* **98** 95–101.
77. Wang L, Ennis M, Szabó G & Armstrong WE 2015 Characteristics of GABAergic and cholinergic neurons in perinuclear zone of mouse supraoptic nucleus. *Journal of Neurophysiology* **113** 754–767.
78. Wei J, Walton EA, Milici A & Buccafusco JJ 2002 m1-m5 Muscarinic Receptor Distribution in Rat CNS by RT-PCR and HPLC. *Journal of Neurochemistry* **63** 815–821.
79. Wess J, Duttaroy A, Zhang W, Gomeza J, Cui Y, Miyakawa T, Bymaster FP, McKinzie L, Felder CC, Lamping KG *et al.* 2003 M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Receptors & Channels* **9** 279–290.
80. de Wied D, Diamant M & Fodor M 1993 Central Nervous System Effects of

- the Neurohypophyseal Hormones and Related Peptides. *Frontiers in Neuroendocrinology* **14** 251–302.
81. Wotjak CT, Kubota M, Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Neumann I & Landgraf R 1996 Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion? *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **16** 7725–7732.
82. Wotjak CT, Naruo T, Muraoka S, Simchen R, Landgraf R & Engelmann M 2001 Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *The European Journal of Neuroscience* **13** 2273–2281.
83. Wuarin JP & Dudek FE 1993 Patch-clamp analysis of spontaneous synaptic currents in supraoptic neuroendocrine cells of the rat hypothalamus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **13** 2323–2331.
84. Xu Z, Pekarek E, Ge J & Yao J 2001 Functional relationship between subfornical organ cholinergic stimulation and cellular activation in the hypothalamus and AV3V region. *Brain Research* **922** 191–200.
85. Xu Z, Ross MG & Johnson AK 2001 Intracerebroventricular carbachol induces FOS immunoreactivity in lamina terminalis neurons projecting to the supraoptic nucleus. *Brain Research* **895** 104–110.
86. Xu Z, Torday J & Yao J 2003 Functional and anatomic relationship between cholinergic neurons in the median preoptic nucleus and the supraoptic cells. *Brain Research* **964** 171–178.

87. Yamaguchi O, Shishido K, Tamura K, Ogawa T, Fujimura T & Ohtsuka M
1996 Evaluation of mRNAs encoding muscarinic receptor subtypes in human
detrusor muscle. *The Journal of Urology* **156** 1208–1213.
88. Yamamoto G, Kai N, Shirasaki T, Soeda F & Takahama K 2009 [Novel
method of sequential urine collection and recording in freely moving mice].
Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica **133** 332–336.
89. Zaninetti M, Tribollet E, Bertrand D & Raggenbass M 2002 Nicotinic
cholinergic activation of magnocellular neurons of the hypothalamic
paraventricular nucleus. *Neuroscience* **110** 287–299.
90. Zhang L 2006 Cholinergic Receptor Knockout Mice. In *Animal Models of
Cognitive Impairment*, pp 199–221. CRC Press/Taylor & Francis.
91. 厚生労働省 健康局疾病対策課 平成27年1月1日施行の指定難病
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000062437.html>

図 表

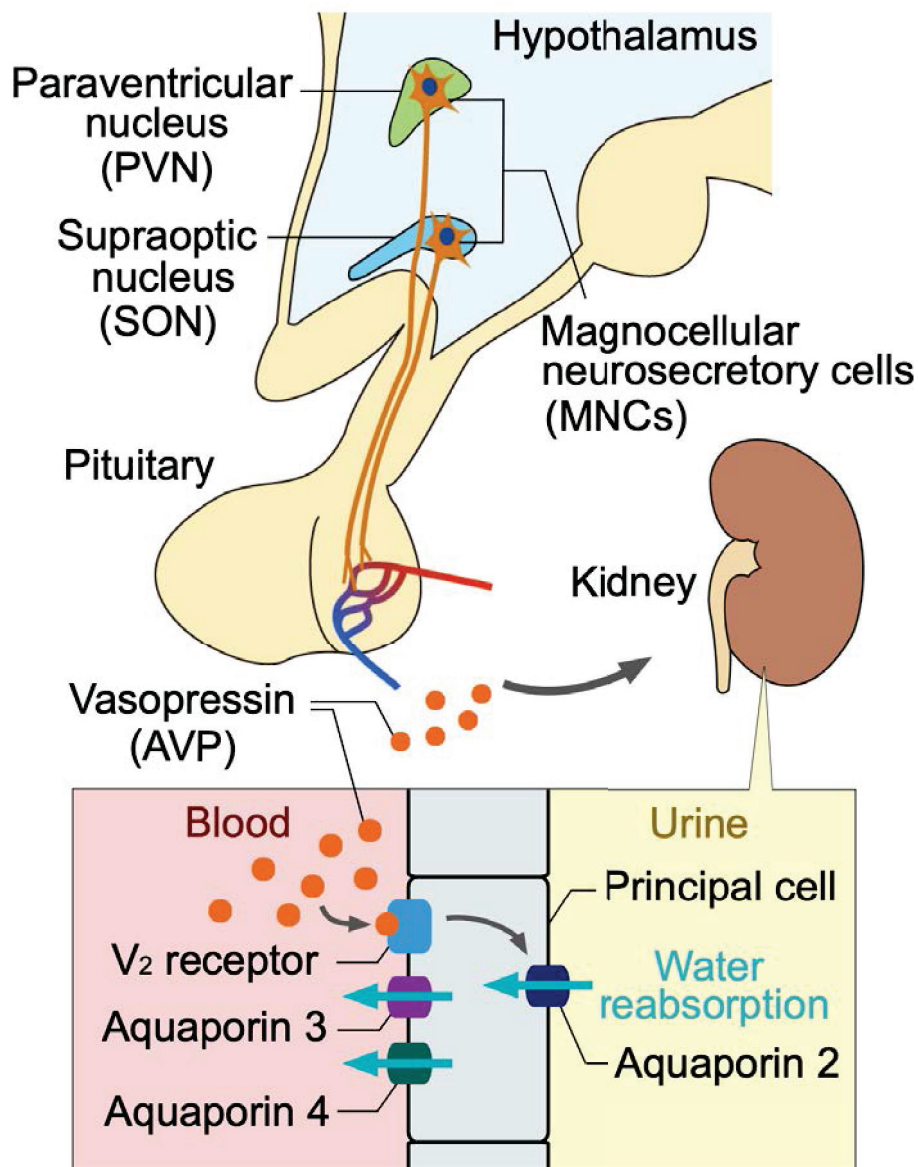


Fig.1. Diagram of synthesis and secretion of AVP. AVP is synthesized by MNCs in the PVN and SON of hypothalamus and released from the posterior pituitary into the blood circulation. It acts on V_2 receptors on the principal cells of the collecting duct in the kidneys. Activation of V_2 receptors induces transportation of aquaporines, which are known as water channels, from cytoplasm to the surface of the cell membrane and these channels allow water to be reabsorbed from urine into the blood.

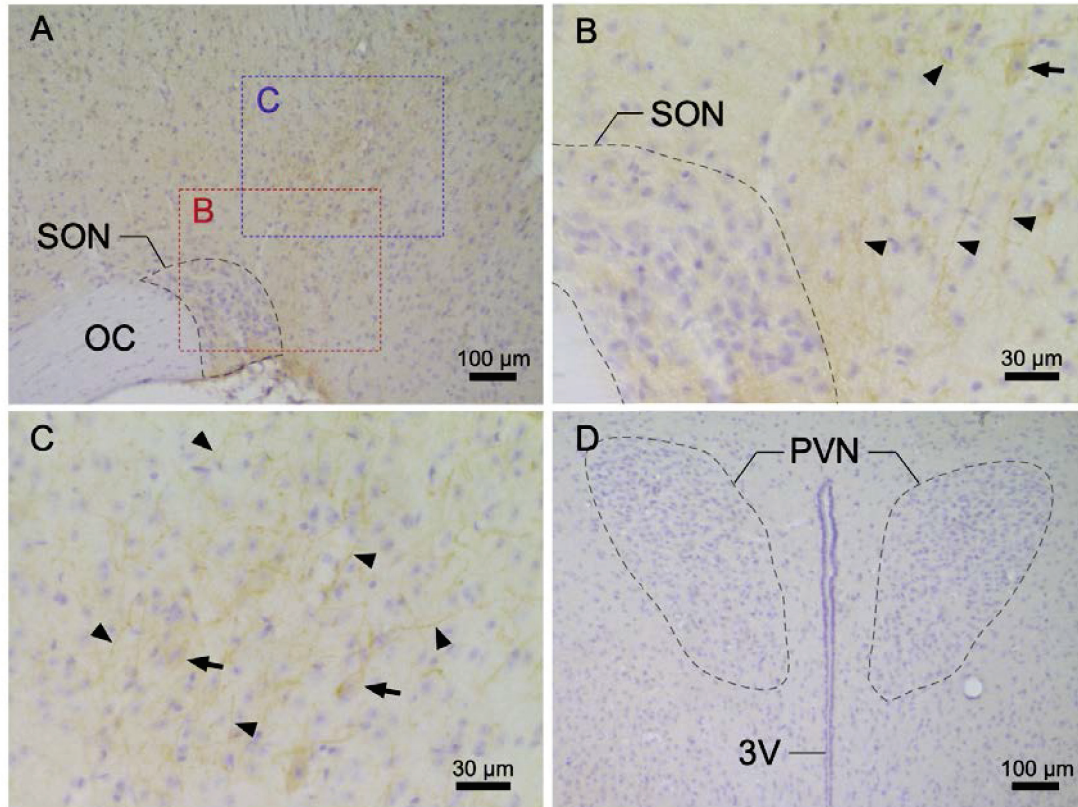


Fig.2. Immunohistochemistry of M_2 receptor in the hypothalamus of WT mice. Immunoreactivity for anti- M_2 receptor antibody were neither detected in MNCs in the SON (A, B) nor PVN (D). However, the intercellular region in the SON had weak immunoreactivity (A). Some immunopositive nerve fibers (arrowhead) projecting towards the SON were also found in the perinuclear zone of SON (B,C). A few somata have immunoreactivity (arrow). No any immunoreactivity were observed in or around the PVN (D). B and C are expanded scale of regions indicated by red (B) or blue (C) dotted lines in A. 3V, third ventricle; OC, optic chiasm. Scale bars indicate 30 (B, C) or 100 μm (A, D) .

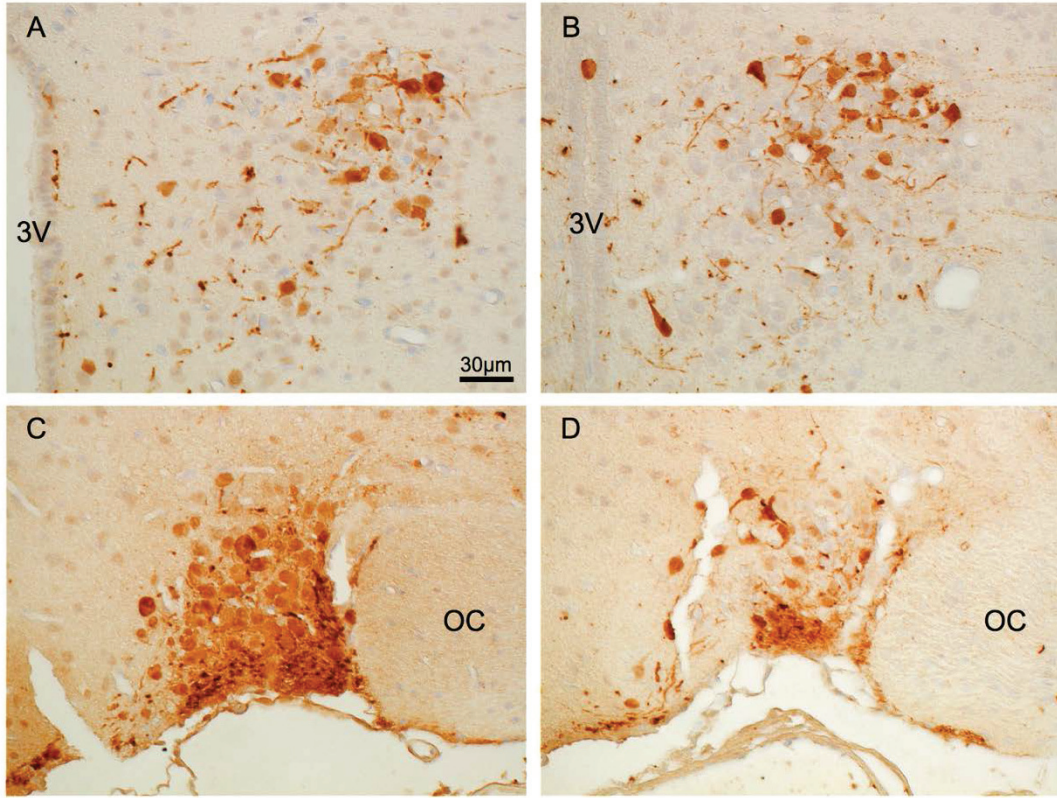


Fig.3. Localization of AVP-immunoreactive cells in the PVN (A, B) and SON (C,D) of WT (A,C) and M₂KO mice (B,D). AVP immunoreactivity was detected in perikarya and fibers. 3V, third ventricle; OC, optic chiasm. Scale bar indicates 30 µm.

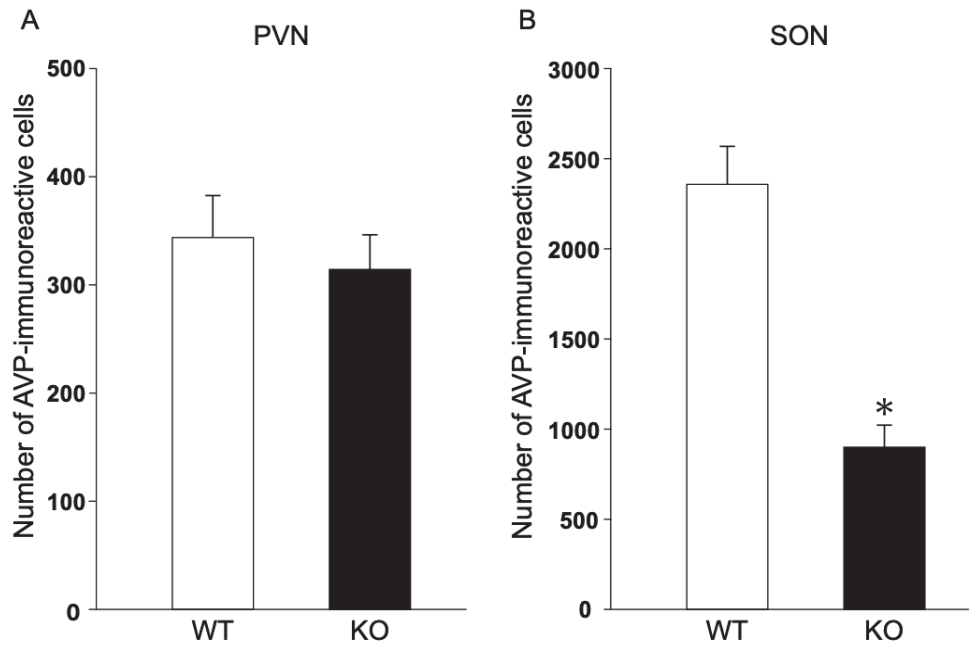


Fig.4. Number of AVP-immunoreactive cells in the PVN (A) and SON (B) of WT ($n=5$) and M_2 KO mice ($n=5$). A significant difference in the SON is found between WT and M_2 KO groups, but not in the PVN. * $P<0.05$ vs. WT group.

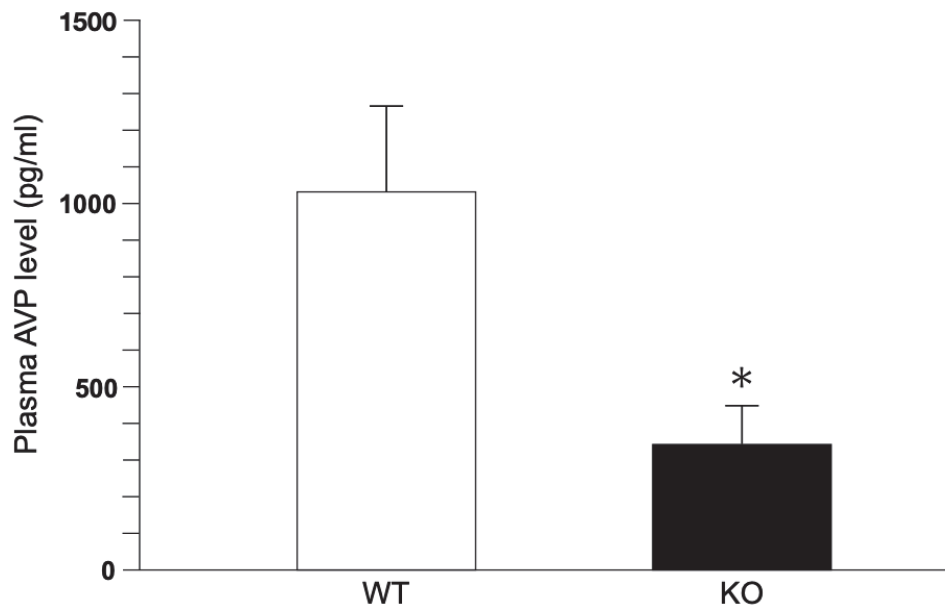


Fig.5. Plasma AVP level in WT and M₂KO mice. The value in M₂KO mice ($n=8$) is significantly lower than that in WT mice ($n=10$). * $P<0.05$ vs. WT group.

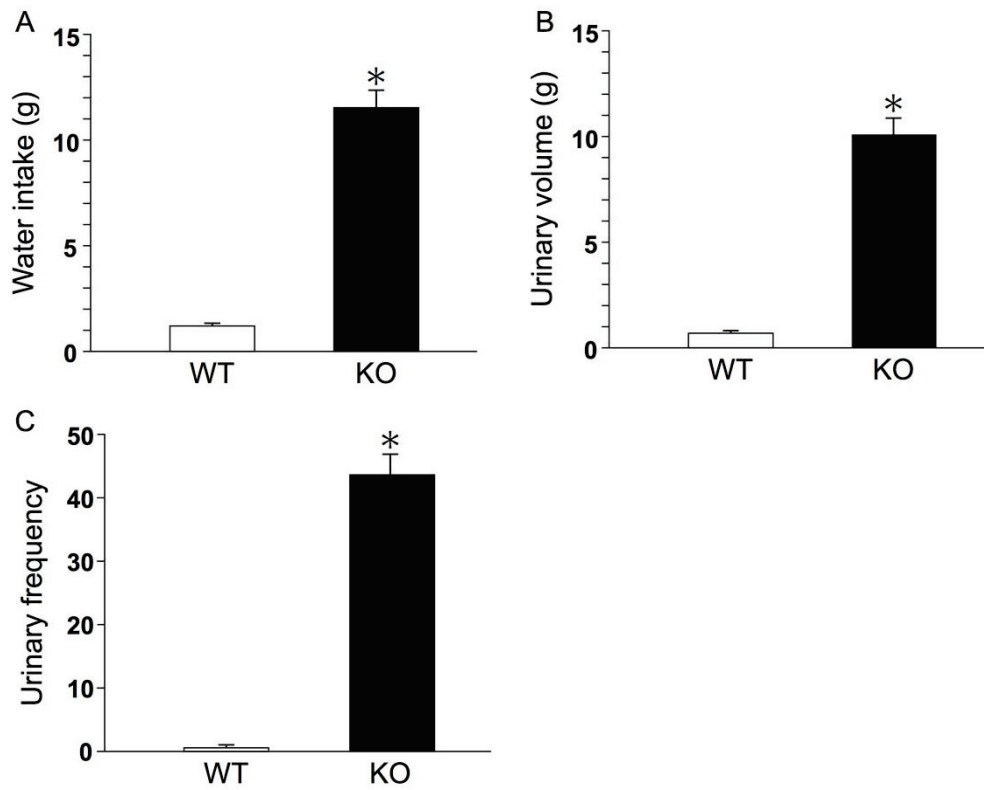


Fig.6. Effect of M_2 deficiency on water intake (A), urinary volume (B), urinary frequency (C). Recordings are performed for 18 h while avoiding food and drinking. In all parameters, M_2 KO mice ($n=8$) showed significantly higher values than WT mice ($n=27$). * $P < 0.05$ vs WT group.

Table 1. Blood serum chemistry of WT and M₂KO mice. There was no significant difference between these mice strains.

	BUN (mg/dl)	GLU (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Ca (mEq/l)
WT	20.8 ± 0.4 (n=22)	141 ± 1.4 (n=12)	152 ± 0.3 (n=13)	5.2 ± 0.3 (n=13)	9.0 ± 0.3 (n=14)
KO	23.0 ± 0.5 (n=9)	148 ± 2.4 (n=7)	153 ± 0.4 (n=8)	6.2 ± 0.5 (n=8)	8.8 ± 0.5 (n=7)

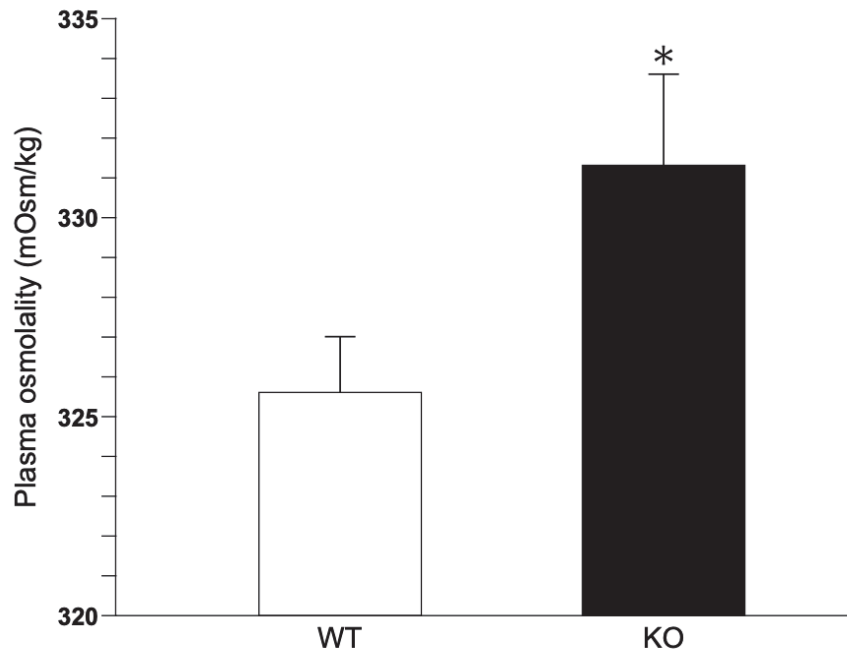


Fig.7. Plasma osmolality in WT and M₂KO mice. The values are calculated by using the value of sodium, potassium, glucose, and blood urea nitrogen obtained from blood tests: Calculated osmolality = 2 [Na] + 2 [K] + [GLU] / 18 + [BUN] / 2.8 (mOsm/kg). The value in M₂KO mice is significantly higher than that in WT mice (325.6 ± 1.4, n=13; vs 331.3 ± 2.3, n=8). *P<0.05 vs. WT group.

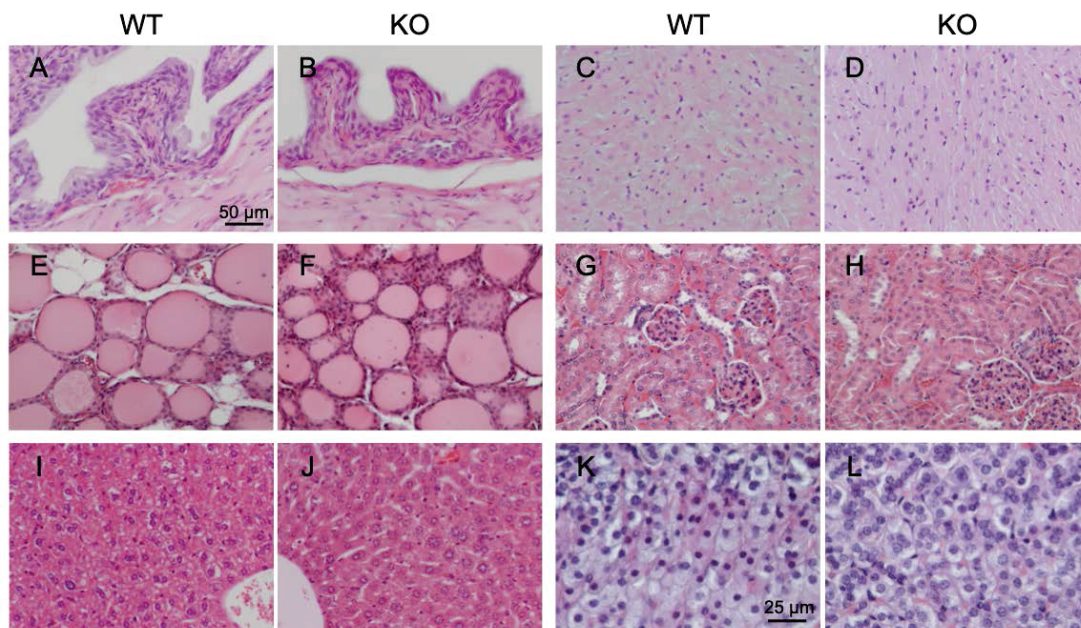


Fig.8. Morphology of the urinary bladder (A and B), heart (C and D), thyroid glands (E and F), kidney (G and H), liver (I and J) and adrenal glands (K and L) in WT (A, C, E, G, I and K) and M₂KO mice (B, D, F, H, J and L). No pathological changes were founded in all of these organs. Scale bar indicates 50 or 25 μm.

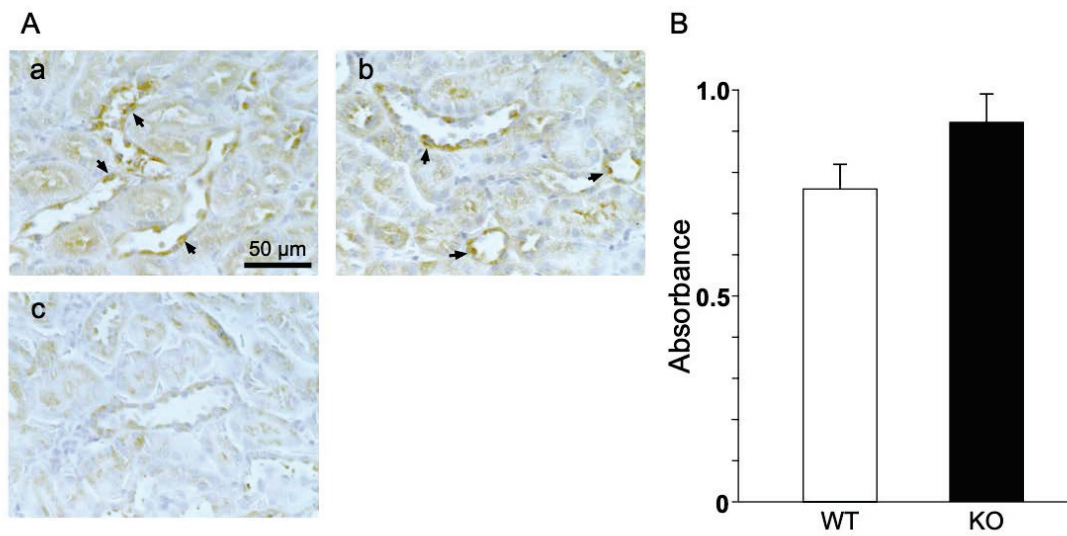


Fig.9. Expression of V₂ receptor in kidney. Immunohistochemistry for V₂ receptor (A). V₂ receptor immunoreactivity is detected in in the tubular epithelial cells of WT (a) and M₂KO mice (b). Negative control was performed without the primary antibody in WT mice (c). Scale bar indicates 50 μm. Arrows show immunoreactive cells to anti-V₂ receptor antibody. Expression level of V₂ receptor obtained from ELISA (B). No significant difference is found between both mice groups (WT, *n*=6; KO, *n*=6).

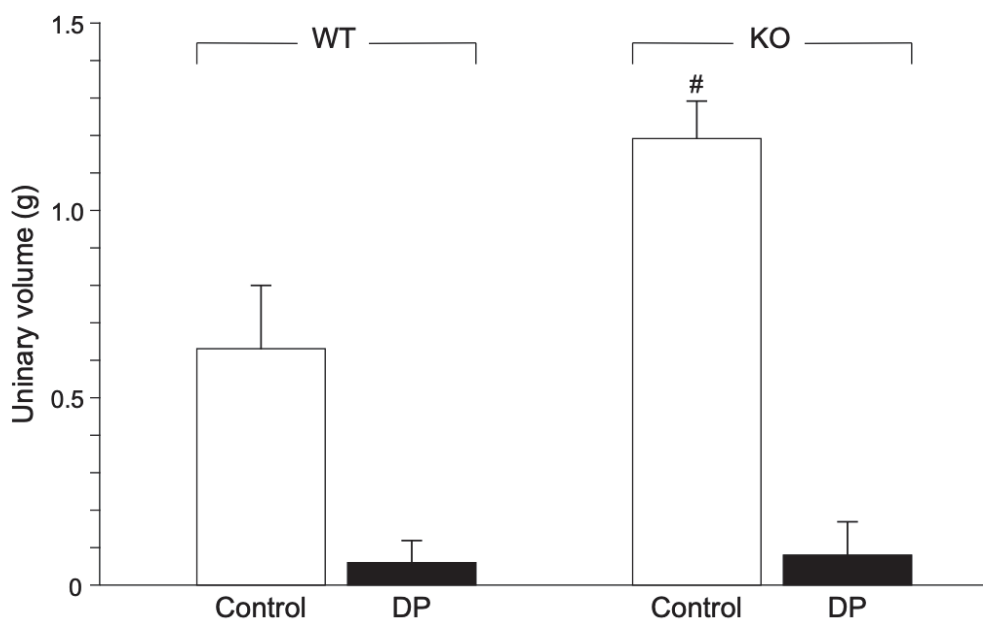


Fig.10. Effect of desmopressin on urinary volume in WT and M2KO mice. Animals are loaded with distilled water (15 ml/kg, p.o.) and administered with saline (5 ml/kg, i.p.) or desmopressin acetate hydrate (1 µg/kg, i.p.) before recording. Urinary volumes are recorded for 5 h while avoiding of food and drink. Control, saline-injected group; DP, desmopressin-injected group. Urinary volume of DP group is significantly decreased compared with the control group in both strains (WT, control, $n=5$; DP, $n=6$; KO, control, $n=5$; DP, $n=6$).
^{*} $P<0.05$ vs control of the corresponding mice group, [#] $P<0.05$ vs control of the WT mice group.

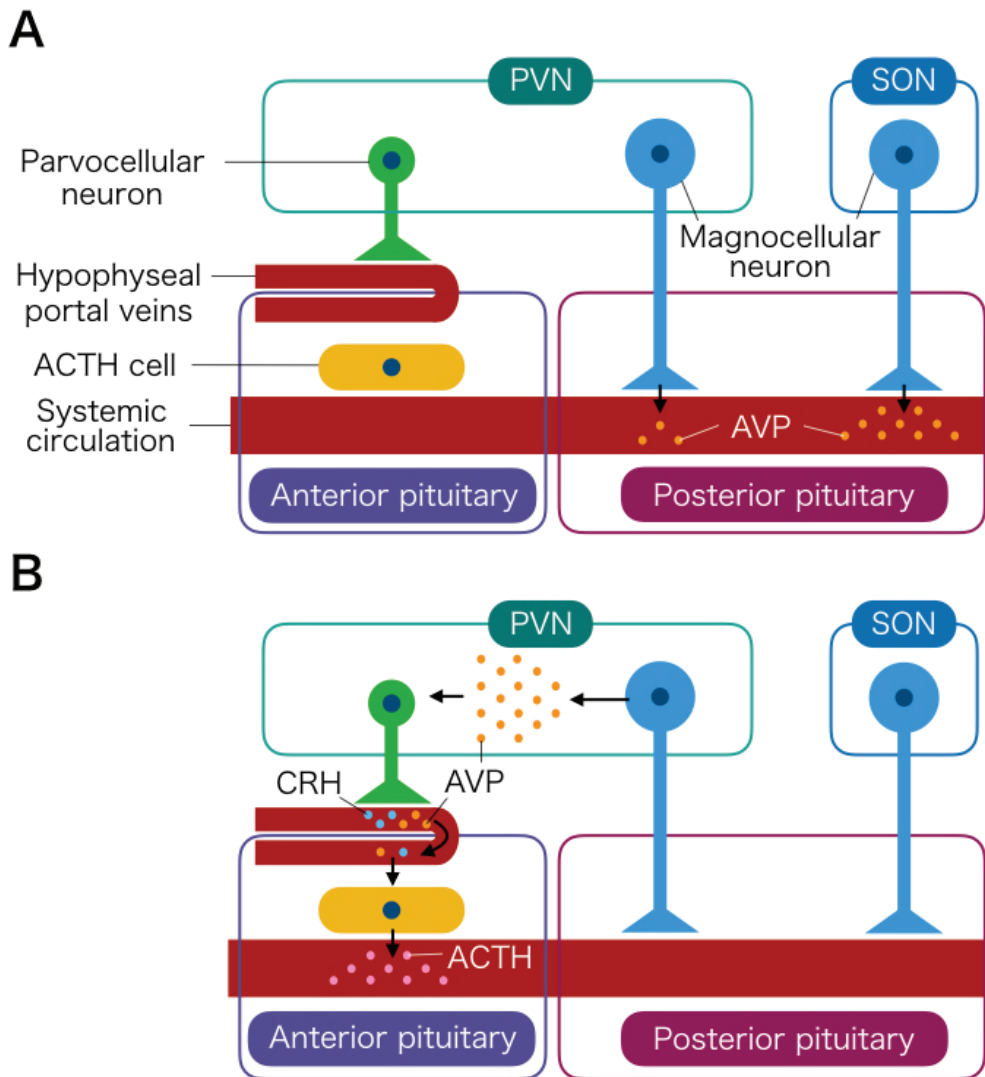


Fig.11. Potential functional difference between PVN and SON in release of AVP. In the state of hyperosmolality, hypovolemia or hypotension, magnocellular AVP neurons synthesize and secrete AVP from nerve terminals locating in the posterior pituitary into the systemic circulation (A). On the other hand, stressors like social defeat cause secretion of AVP from dendrites and/or somata of magnocellular neurons into the extracellular fluid in the PVN and then parvocellular neurons co-release AVP and CRH into hypophyseal portal veins. These hormones act on the ACTH-synthesizing cells in the anterior pituitary. ACTH is released from ACTH cells into the blood circulation (B).

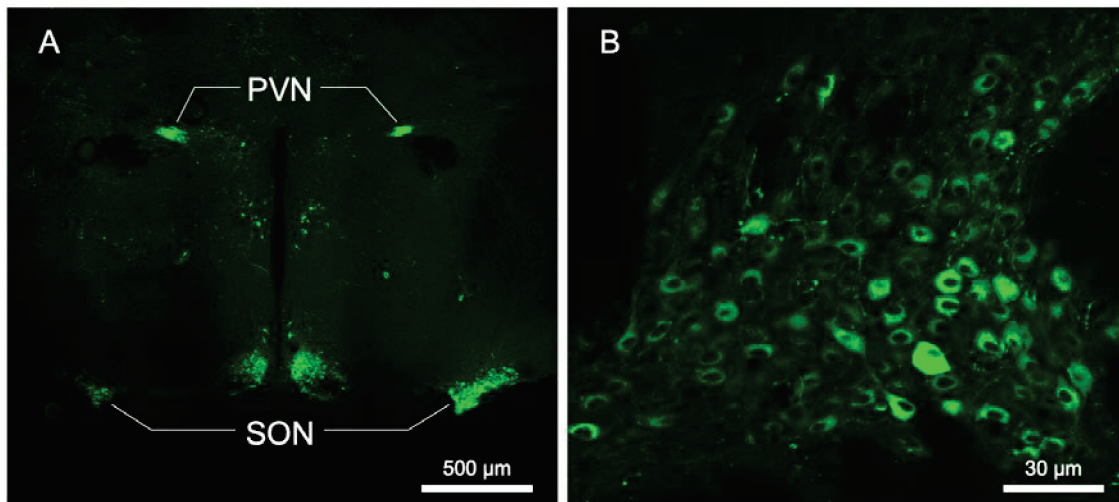


Fig.12. eGFP expression in the hypothalamus of AVP-eGFP rats. Fluorescence of eGFP was detected in some regions including the PVN and SON (A). eGFP-positive MNCs in the SON (B) were used for recording mIPSCs. Scale bars indicate 500 (A) or 30 μm (B).

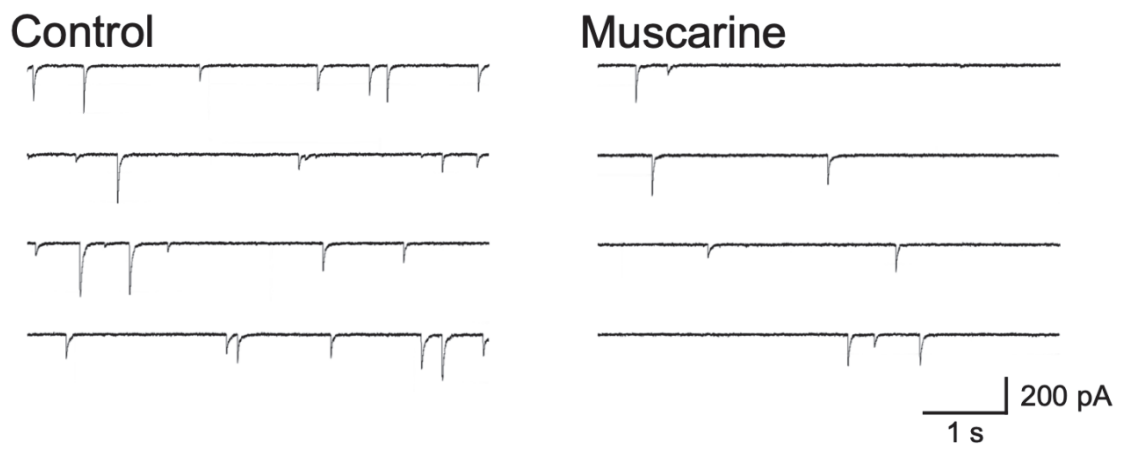


Fig.13. Typical tracings of mIPSCs from AVP neurons in the SON of rats before and during muscarine (10 μ M) application. mIPSC was recorded as a small single spike. The number of mIPSCs appeared to decrease in the presence of muscarine.

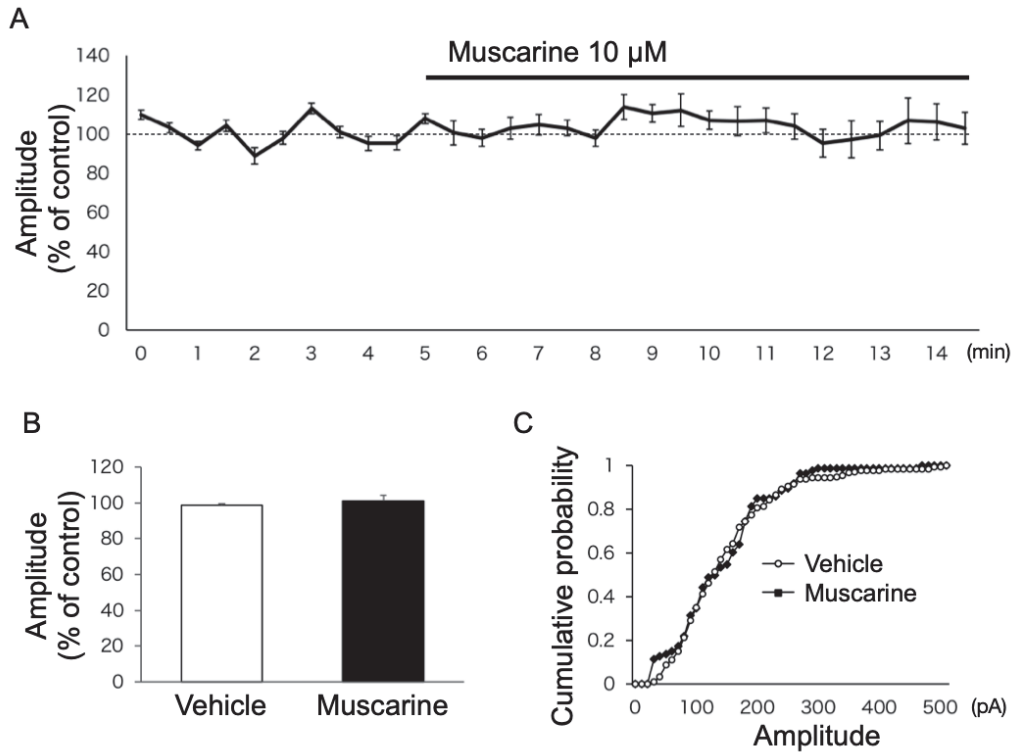


Fig.14. Effect of muscarine on amplitude of mIPSCs. 10 μ M of muscarine was applied 5 minutes after the start of recordings (A) ($n=9$). Muscarine didn't affect the mean value (B) and cumulative probability of amplitude(C).

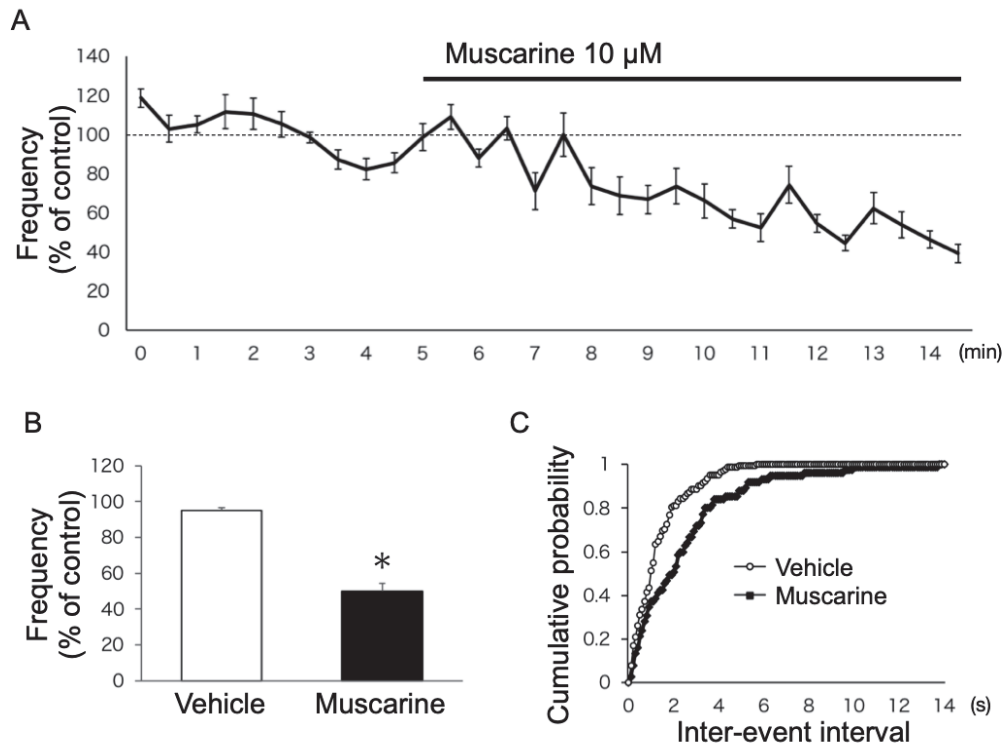


Fig.15. Effect of muscarine on frequency of mIPSCs. 10 μ M of muscarine was applied 5 minutes after the start of recordings (A) ($n=9$). Muscarine significantly decreased the mean value (B) and shifted cumulative probability (C) of amplitude to the right. * $P<0.05$ vs. Vehicle

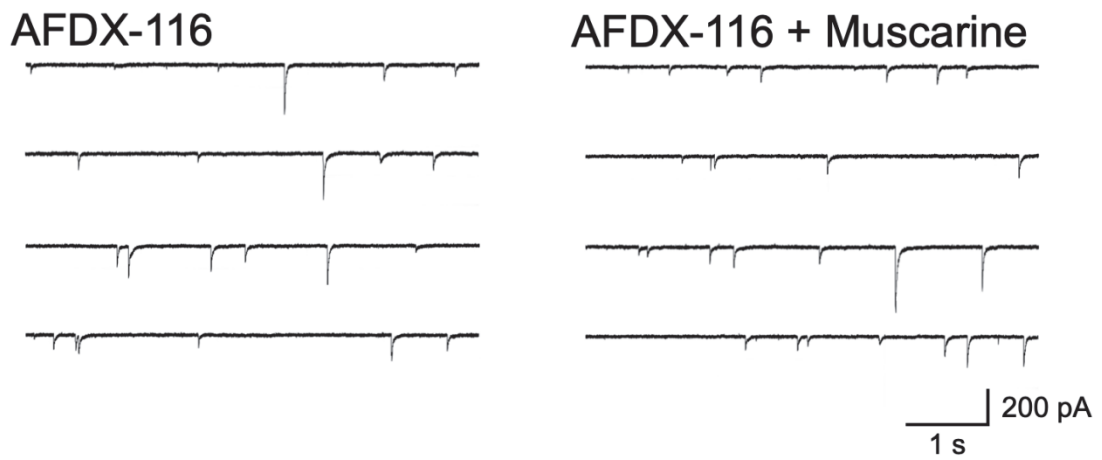


Fig.16. Typical tracings of mIPSCs from AVP neurons in the SON of rats before and during muscarine application (10 μ M) in the presence of AFDX-116 (10 μ M). The effect of muscarine was inhibited by pretreatment of AFDX-116.

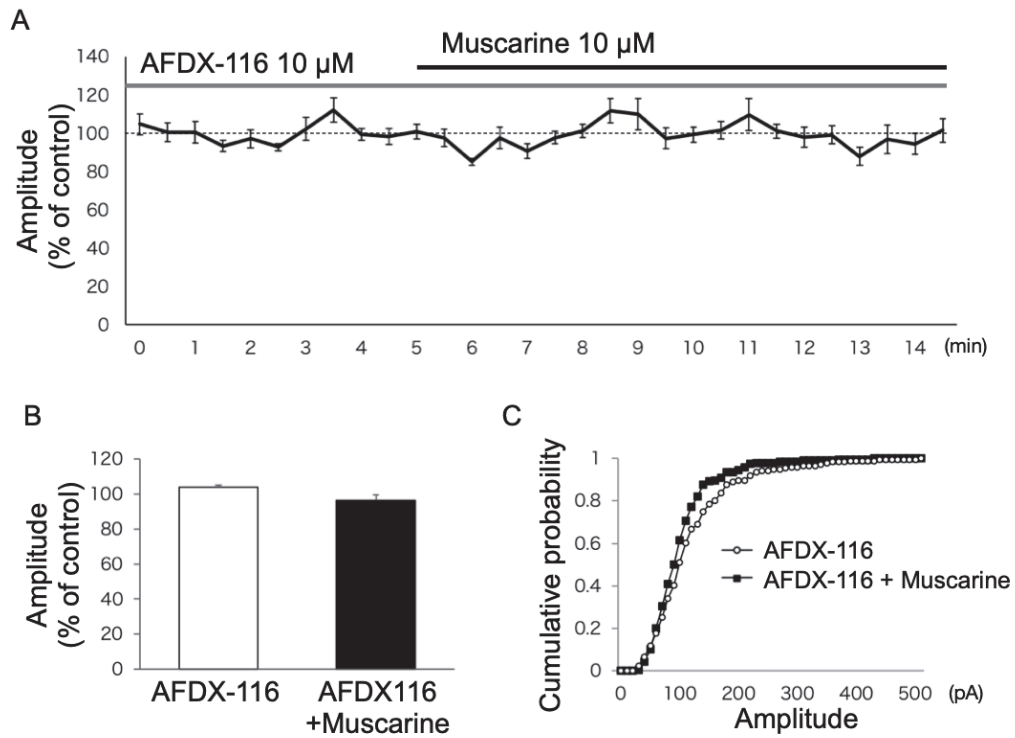


Fig.17. Effect of muscarine on amplitude of mIPSCs in the presence of AFDX-116 (10 μ M). 10 μ M of muscarine was applied 5 minutes after the start of recordings (A) ($n=8$). Muscarine didn't affect the mean value (B) and cumulative probability of amplitude(C).

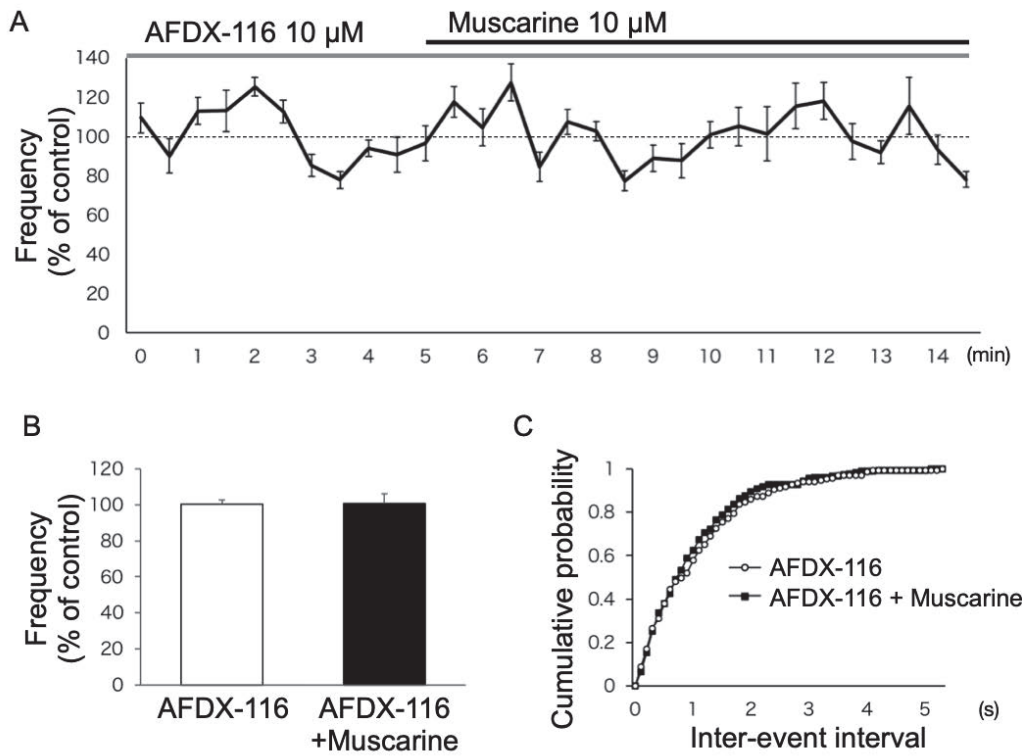


Fig.18. Effect of muscarine on frequency of mIPSCs in the presence of AFDX-116 (10 μ M). 10 μ M of muscarine was applied 5 minutes after the start of recordings (A) ($n=8$). Pretreatment of AFDX-116 prevented muscarine from decreasing the mean value (B) and shifting the distribution of cumulative probability (C) of frequency.

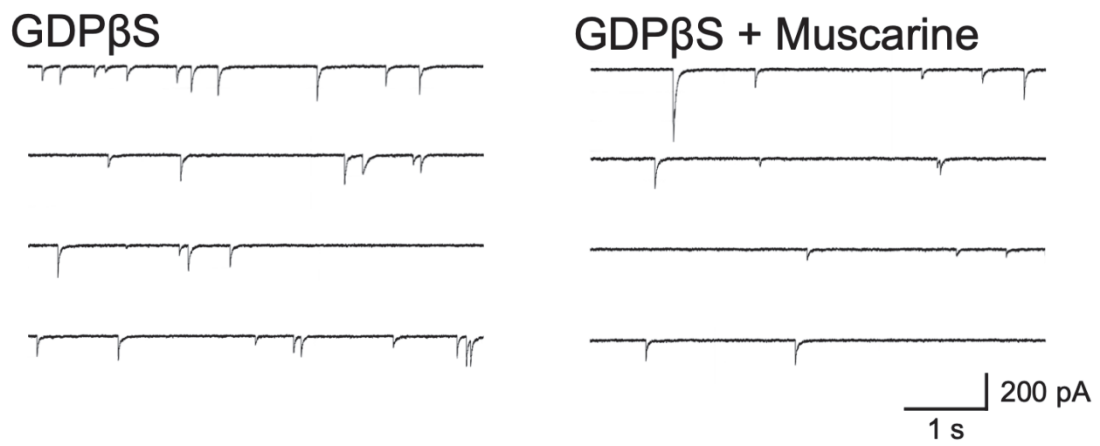


Fig.19. Typical tracings of mIPSCs from AVP neurons in the SON of rats before and during muscarine application (10 μ M) in the presence of GDP β S (500 μ M). Muscarine appeared to decrease the number of mIPSCs.

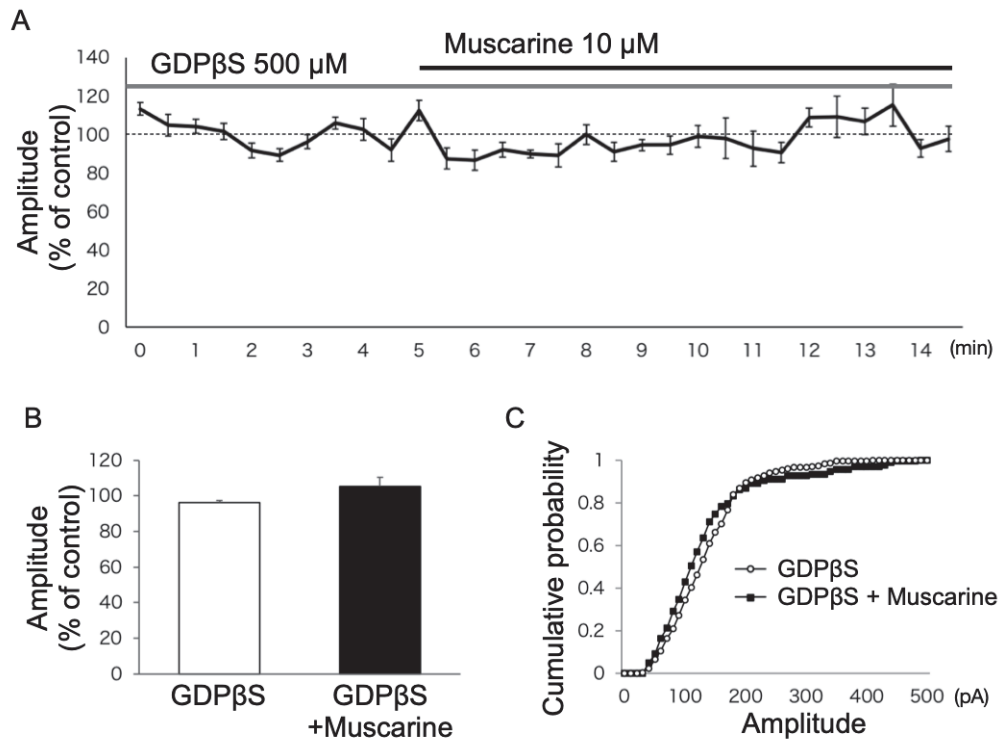


Fig.20. Effect of muscarine on amplitude of mIPSCs in the presence of GDPβS (500 μM). 10 μM of muscarine was applied 5 minutes after the start of recordings (A) ($n=7$). Muscarine didn't affect the average (B) and cumulative probability of amplitude(C).

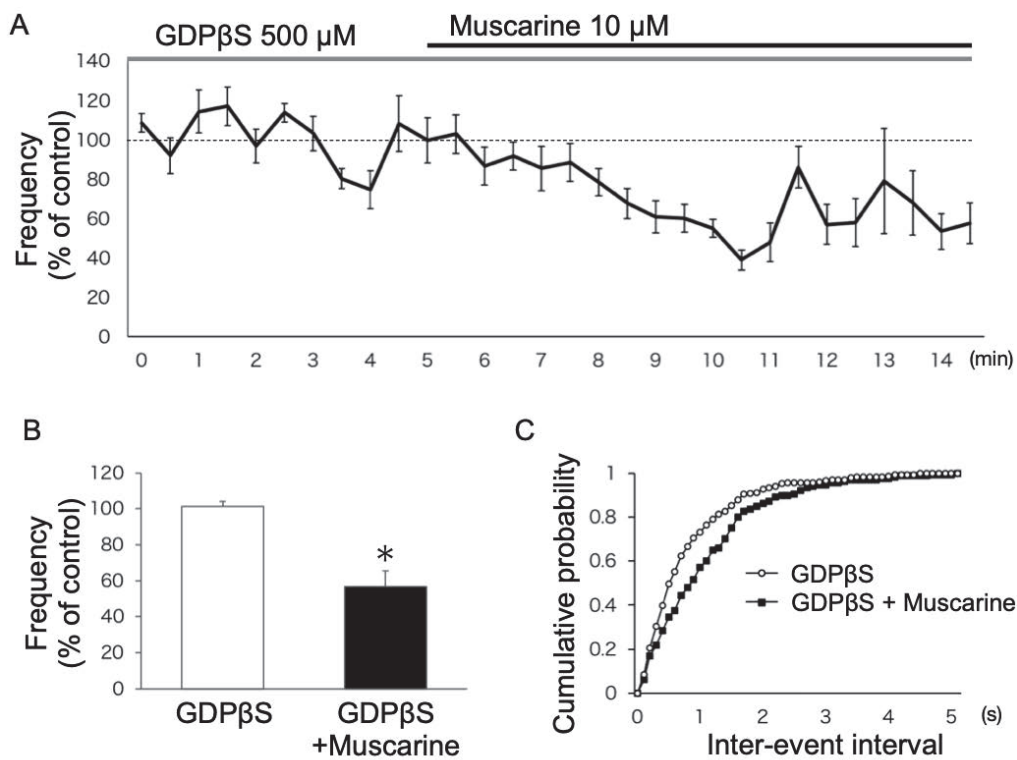


Fig.21. Effect of muscarine on frequency of mIPSCs in the presence of GDPβS (500 μM). 10μ M of muscarine was applied 5 minutes after the start of recordings (A) ($n=7$). Introducing GDPβS into recording cells didn't prevent muscarine from decreasing the mean value (B) and shifting the distribution of cumulative probability (C) of frequency. * $P<0.05$ vs. GDPβS.

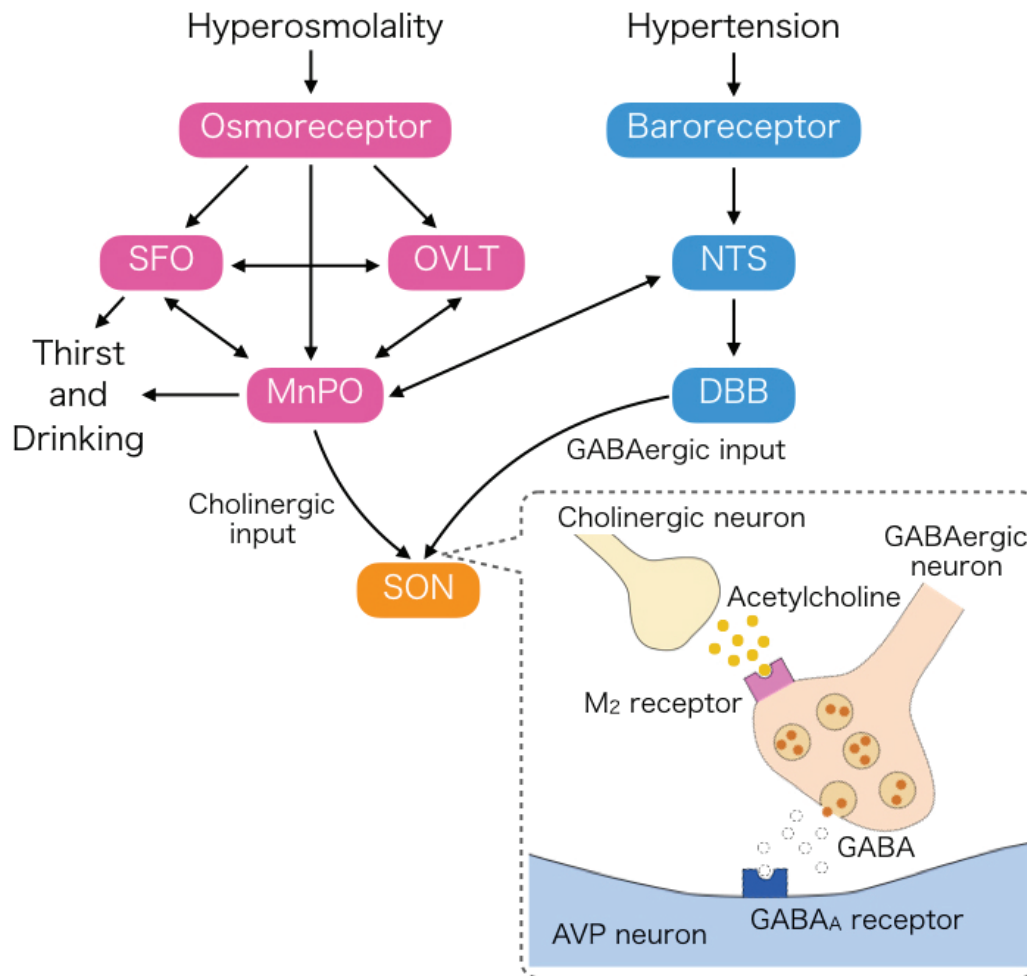


Fig.22. A schematic diagram of neuronal pathway from baroreceptor and osmoreceptor to the SON in the regulation of AVP synthesis and secretion.

The present study indicates that activation of M_2 receptors expressing on GABAergic terminals inhibits releasing of GABA and indirectly activates AVP neurons in the SON. Hyperosmolality may possibly stimulate AVP secretion in the SON through cholinergic neurons from MnPO. On the other hand, hypertension may inhibit AVP secretion in the SON through GABAergic neurons from the diagonal band of Broca. For details, see text. SFO, subfornical organ; OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; MnPO, median preoptic nucleus; NTS, nucleus tractus solitarii; DBB, diagonal band of Broca.