

氏名（本（国）籍）	永 野 宏（愛知県）
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 海 野 年 弘
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第524号
学位授与年月日	平成31年13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	体液の恒常性調節における M_2 ムスカリン受容体サブタイプの役割に関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 志 水 泰 武 副査 帯広畜産大学 教 授 石 井 利 明 副査 岩 手 大 学 教 授 佐 藤 洋 副査 東京農工大学 准教授 佐 々 木 一 昭 副査 岐 阜 大 学 教 授 海 野 年 弘

学位論文の内容の要旨

バゾプレシン(AVP)は、脱水に伴う体液浸透圧の増加や血圧の低下により分泌されるホルモンであり、視床下部の室傍核(PVN)および視索上核(SON)に存在する大細胞性神経分泌細胞の細胞体において合成され、下垂体後葉へ投射する終末から血中へと分泌される。分泌されたAVPは、腎臓の集合管における V_2 受容体に作用し、水チャネルの開口を誘導して水の再吸収を促進させ、体液を保持する役割を果たしている。AVPの合成および分泌調節において、これまでにムスカリン受容体の関与が示唆されているものの、サブタイプの同定には至っていない。 M_1 から M_5 までの5つのムスカリン受容体サブタイプのうち、PVNおよびSONを含む視床下部では M_2 受容体の豊富な発現が知られている。そこで本論文では、 M_2 受容体に着目して、同受容体がAVPの合成および分泌調節機構に果たす役割を解明しようとした。

第1章では、マウス視床下部における M_2 受容体の局在を明らかにするために、抗 M_2 受容体抗体を用いた免疫組織化学を行った。SONの神経核内では細胞間隙において染色シグナルが観察され、また、神経核の背外側領域では、比較的強い染色強度を示す多数の神経線維と少数の細胞体が認められた。一方、PVNでは明らかな染色像は認められなかった。次に、抗AVP抗体を用いた免疫組織化学により M_2 受容体欠損(M_2KO)マウスにおけるAVP合成ニューロンを両神経核において同定し、その数を計測して野生型(WT)と比較した。AVP陽性細胞数は、 M_2KO マウスのSONにおいて有意に減少していたが、PVNにおける細胞数には差が認められなかった。ラジオイムノアッセイ法により血漿AVP濃度を測定すると、 M_2KO マウスではAVP濃度が有意に低下していた。以上の結果は、 M_2 受容体発現ニューロンがSONのAVPニューロンに投射しており、AVPの合成および分泌を促進的に調節していることを示唆している。続いて、 M_2 受容体によって媒介されるAVP合成および分泌調節機構が体液の恒常性にどのような影響を与えているのかを検証するために、 M_2KO マウスにおける飲水量、排尿量および排尿回数を測定したところ、WTと比較していずれも高値を示し、欠損型と野生型との間に統

計学的な有意差が認められた。血液生化学検査の値より算出した血漿浸透圧もM₂KOマウスで有意に上昇しており、また尿比重の測定からは低比重尿も観察された。これらの結果から、M₂KOマウスはAVP産生の低下により多飲多尿を呈することが示唆された。そこで他の末梢器官の異常が多飲多尿を誘発する可能性を検証するため、腎臓、膀胱、甲状腺、副腎、肝臓および心臓における病理学的検索を行った。しかし、いずれの臓器も異常所見は観察されなかった。さらに、腎臓におけるV₂受容体の発現を評価するため、同受容体に対するELISAおよび免疫組織化学を行ったが、V₂受容体の発現量には両群で有意差が認められなかった。また、V₂受容体の反応性を評価するために、同受容体作動薬であるデスモプレシンを腹腔内投与したところ、M₂KOマウスの排尿量はWTと同レベルまで減少した。これらの結果から、M₂KOマウスにおける多飲多尿症状はAVPの作用部位である腎臓や他の器官における異常が原因ではないと考えられ、M₂受容体がAVPの合成および分泌を促進性に調節することにより体液の恒常性に関与することが明らかとなった。

第2章では、M₂受容体がAVPの合成および分泌を促進性に調節する機序を明らかにする一環として、SONのAVPニューロンを抑制性に支配しているγ-アミノ酪酸（GABA）作動性ニューロンに着目し、同ニューロンからのGABA放出をM₂受容体が抑制することでAVPニューロンを興奮させるという仮説を検証した。実験には、生細胞の状態でAVPニューロンを同定する目的で、AVPを緑色蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックラットを使用し、脳スライス標本を用いたパッチクランプ法によりSONのAVPニューロンにおける微小抑制性シナプス後電流（mIPSC）を記録した。mIPSCは、GABA作動性ニューロンからの自発性GABA放出を反映した電流反応であり、その振幅および発生頻度を解析することによりGABA放出が受ける影響を把握することができる。ムスカリン受容体作動薬であるムスカリンを脳スライス標本に投与すると、mIPSCの振幅は変化せず頻度のみが有意に低下し、GABA放出の抑制が観察された。また、M₂受容体拮抗薬であるAFDX-116を前処置すると、ムスカリンによるmIPSC発生頻度の減少作用は消失した。これらの結果から、M₂受容体がシナプス前性にGABA放出を抑制していることが明らかとなった。

以上の研究成果は、GABA作動性ニューロンがSONのAVPニューロンに投射しており、M₂受容体はシナプス前性にGABAの放出を抑制することでAVPニューロンの興奮性を増加させ、その結果、AVPの合成および分泌を促進性に調節して体液量の恒常性維持に関わることを示唆するものであり、AVPの合成・分泌調節におけるM₂受容体の新たな役割を提唱するものである。

審 査 結 果 の 要 旨

バゾプレシン(AVP)は、腎臓における水の再吸収を促進させて体液の恒常性を維持するホルモンであり、視床下部の室傍核(PVN)および視索上核(SON)に存在する大細胞性神経分泌細胞において合成、分泌される。AVPの合成および分泌は、コリン作動性神経を介した調節を受けることが知られている。しかし、同神経の伝達物質であるアセチルコリンがM₁からM₅まであるムスカリン受容体のうち、どのサブタイプを介してAVPの合成および分泌を調節しているのかは明らかになっていない。本研究では、視床下部において豊富な発現が知られているM₂受容体に着目し、同受容体がAVPの合成および分泌調節にどのような役割を果たしているのか解明することを目的としている。

第1章では、M₂受容体欠損(M₂KO)マウスを用い、PVNおよびSONにおけるAVP抗体陽性細胞数、血中のAVP濃度、単位時間当たりの飲水量、排尿量および排尿回数を測定し、野生型(WT)と比較した。M₂KOマウスでは、SONにおけるAVP抗体陽性細胞数および血中AVP

濃度が野生型と比べ有意に低下しており、また飲水量、排尿量および排尿回数は野生型と比べ有意に増加していた。これらの結果から、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することにより体液の恒常性を調節することが明らかとなった。

第2章では、M₂受容体が AVP の合成および分泌を促進性に調節する機序を明らかにする一環として、SON の AVP ニューロンを抑制性に支配しているγ-アミノ酪酸 (GABA) 作動性ニューロンに着目し、同ニューロンからの GABA 放出を M₂受容体が抑制することで AVP ニューロンを興奮させるという仮説を検証した。実験には AVP を緑色蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックラットを用い、同マウスの脳スライス標本における SON の AVP ニューロンから、パッチクランプ法により GABA 放出の指標となる微小抑制性シナプス後電流を記録、解析した。その結果、M₂受容体がシナプス前性に GABA 放出を抑制することで AVP ニューロンの興奮性を促進し、その結果 AVP の合成および分泌を促進することが明らかとなった。

上記の研究結果は、視床下部 SON における AVP の合成・分泌調節ならびに体液の恒常性調節に関して M₂受容体の新たな役割を提示するものであり、非常に意義がある成果である。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Muscarinic M₂ receptor promotes vasopressin synthesis in mice supraoptic nuclei
著 者 名 : Nagano, H., Sobue, Y., Matsuyama, H., Saito, S., Sakai, H., Alom, F., Tanahashi, Y., Ishii, T. and Unno, T.
学術雑誌名 : Journal of Endocrinology
巻・号・頁・発行年 : 237 (2) : 207-216, 2018

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Inhibitory effects of SKF96365 on the activities of K⁺ channels in mouse small intestinal smooth muscle cells
著 者 名 : Tanahashi, Y., Wang, B., Murakami, Y., Unno, T., Matsuyama, H., Nagano, H. and Komori, S.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 78 (2) : 203-211, 2016
- 2) 題 目 : Possible antagonistic effects of the TRPC4 channel blocker ML204 on M₂ and M₃ muscarinic receptors in mouse ileal and detrusor smooth muscles and atrial myocardium
著 者 名 : Alom, F., Miyakawa, M., Matsuyama, H., Nagano, H., Tanahashi, Y. and Unno, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 80 (9) : 1407-1415, 2018