

9541 血中塩濃度変化に伴う下垂体後葉神経の形態的变化

助成研究者：宮田 清司 (京都工芸繊維大学 応用生物学科)

共同研究者：清原 壽一 (京都工芸繊維大学)

人類を含めた哺乳動物は、体内の塩濃度の調節を、下垂体後葉ホルモンであるオキシトシン (OXT) やバソプレッシン (AVP) を使って行っている。これらのホルモンは、視床下部の視索上核 (SON) 室傍核 (PVN) の大細胞系ニューロンにおいて合成され下垂体後葉より放出される。また、これらの後葉ホルモン産生ニューロンは、慢性の浸透圧刺激によりその形態を著しく変えることも知られている。本研究では、形態学的変化の詳細な機構について調べ、血漿浸透圧の変化に対する、脳の調節適応機構を解明することを目的としている。

脱水刺激 (慢性) 及び高張食塩水腹腔内投与刺激 (急性) による、SON, PVN ニューロンでのc-fos蛋白の発現を免疫組織化学に調べた。両刺激により、多くのc-fosの発現が認められたが、その時間経過は著しく異なり、急性刺激では一過性であるのに対し、慢性刺激では持続的発現を示した。これは、急性刺激では一過的に血漿浸透圧が上昇するのに対し、慢性刺激では徐々に血漿浸透圧が上昇する事実と一致する。慢性刺激では、刻々と変化する血漿浸透圧変化に対応するために、c-fosのような転写調節因子を介し、常に遺伝子レベルでの活性化が必要であると推測される。また、AV3V電気破壊の実験より、浸透圧刺激によるc-fos発現には、AV3V部位が上位中枢として重要な働きを持つことが示唆された。

さらに、AV3V電気破壊は、長期脱水刺激によるOXT, AVP両方の細胞サイズの増大を完全に抑制した。よって、慢性の浸透圧刺激による、下垂体後葉ニューロンの形態学的変化は、AV3Vからの興奮性入力ニューロンの興奮性を増大させ、それに伴う細胞内メッセンジャーが遺伝子レベルにて作用して、c-fos等の蛋白調節因子を活性化する。つぎに、遺伝子レベルの活性化はニューロン自身の形態をも変え、持続的血漿浸透圧上昇に対応して多くのホルモンを放出することを可能にしているものと考えられる。

9541 血中塩濃度変化に伴う下垂体後葉神経の形態的变化

助成研究者：宮田 清司 (京都工芸繊維大学 応用生物学科)

共同研究者：清原 壽一 (京都工芸繊維大学)

研究目的

下垂体後葉ホルモンのバソプレッシン (Arginine Vasopressin; AVP) とオキシトシン (Oxytocin; OXT) は、生理的に多様な刺激に反応して分泌される。AVP は主に抗利尿ホルモンとして腎臓における水の再吸収等の体液量調節に関与することが知られており、OXT は雌性動物の子宮筋収縮や授乳といった生殖現象に強く関与するが、構造が AVP に類似しているため浸透圧や電解質調節にも関与していると考えられている。AVP, OXT は視床下部の視索上核(SON)や室傍核(PVN)にある大細胞系神経分泌ニューロンで合成され、軸索輸送により下垂体後葉に運ばれ必要に応じて直接血液中へ分泌される。これら後葉ホルモン産生ニューロンは、授乳や長期脱水といったホルモンの要求が高まる生理学的刺激に対してその形態を著しく変えることが知られている。つまり正常な状態では細胞サイズも小さく個々のニューロン間も離れているが、長期脱水のような慢性高浸透圧刺激によりニューロンの肥大化、ニューロン間接着の増加、シナプスの変化が生じる。このように慢性の血液浸透圧上昇に対してニューロンは形態学的変化を生じ、より効率の良い下垂体後葉ホルモンの放出を可能にしていると考えられている。

本研究では主に浸透圧上昇に伴う後葉ホルモン産生ニューロンの 1) c-fos の発現、2) 第三脳室前腹側部 (AV3V) を電気破壊したときの c-fos 発現、形態的变化に及ぼす影響、について調べた。

研究方法

実験はすべてウイスター系雄ラット (10-11週齢) を用いた。

高浸透圧刺激として、1) 腹腔内への高張1.5%食塩水投与(急性)、2) 飲水をまったくさせない脱水刺激(慢性)の2種を用いた。

AV3V電気破壊のためには、まずラットをネンプタールにて麻酔後、脳定位固定装置を用い、ブレグマの後方0.3mmの位置にドリルにて頭蓋骨に穴をあけた。次に頭蓋骨表面から8.5mmの深さの位置まで白金電極を刺入し、30mA

で15秒間、直流電流を流してAV3Vを破壊した。また同様の手術を施すが通電しないものをSham群とした。手術後ラットの回復を図るため、最初の3日間は2.5% Sucrose 溶液を飲水させ、その後真水に切り換えて実験まで10日間以上放置した。

免疫組織化学に用いた動物はすべて、ペントバルビタールで麻酔し、4%パラフォルムアルデヒドにて灌流固定した。一昼夜、4℃にて後固定後、クリオスタットにて20 μ mの切片を作成した。c-fos, OXT及びAVPの免疫組織化学はすべてウサギポリクローナル抗体を用い、ABC法にて染色した。電子顕微鏡による検索に用いた動物は麻酔後、2.5% グルタルアルデヒドにて灌流固定し、定法により透過型電顕にて観察した。

研究結果

慢性の脱水刺激により、SON及びPVNの後葉ホルモン産生ニューロンに多くの濃染されたc-fos陽性細胞が観察された(Fig. 1)。同様のc-fos陽性細胞の発現は急性の高張食塩水投与群においても観察された。SONのc-fos発現の時間経過を形態定量的に分析した結果、急性刺激群と慢性刺激群ではその発現経過に違いが認められた。つまり、急性刺激群では投与後2時間から時間経過とともにc-fos発現数は減少し、8時間後にはほぼコントロールレベルにまで戻った。一方、慢性刺激群では、脱水2、4、及び6日間のいずれの実験群においても持続的に、多くのc-fos発現が認められた。また、PVNにおいてもほぼ同様のc-fos発現が認められた。さらに、免疫二重染色によりOXTニューロンあるいはAVPニューロンのいずれにc-fosの発現が認められるか検討したところ、SONのAVPニューロンにおけるc-fos陽性率は高張食塩水投与群では59%、脱水刺激群で69-81%と高い値を示した。PVNにおいても、高張食塩水投与群でAVPニューロンの34%、脱水刺激群で57-69%となった。一方、SONのOXTニューロンでは高張食塩水投与群で約34%、脱水刺激群で44-49%の陽性率を示したが、PVNのOXTニューロンにおいては、高張食塩水投与群ではコントロールとの間に差が認められず、脱水刺激群でもせいぜい8-20%程度の陽性率であった。傾向としては、OXTニューロンよりはAVPニューロンが、PVNよりはSONが高いc-fos陽性率を示した。

次に、AV3V部位を破壊してSONニューロンにおけるc-fos発現や形態変化に及ぼすAV3V神経核の影響を調べ、Fig. 2にその形態定量した結果を示した。急性及び慢性の浸透圧刺激に対してはIntact群、Sham群では有意なc-fos陽性細胞

数の増加が認められたが、AV3V 電気破壊群ではいずれの刺激に対しても、有意な c-fos 陽性細胞数の変化は観察されなかった。さらに AV3V 電気破壊群においても、慢性脱水刺激が SON ニューロンの形態的变化に及ぼす影響を形態定量的に調べた。一般に長期脱水刺激により、細胞サイズの増大と併行して細胞内微細構造レベルでも変化が生じる (Fig. 3)。よって、細胞サイズを調べることにより、形態学的変化の有無を予測することが可能になる。Intact 群の正常飲水ラットの細胞サイズを 100% として脱水処理群と比較した (Fig. 4)。Intact 群のラットは脱水処理により AVP 産生細胞で 150%、OXT 産生細胞で 170% の肥大化を示した。Sham 群においても同様の結果が得られたが、AV3V の電気破壊群では脱水処理にもかかわらず、細胞サイズに有意な変化は認められなかった。Fig. 4 のヒストグラム中の数字は血漿浸透圧を示している。

考察

本実験で明らかになったように、高張食塩水投与による急性刺激および長期脱水による慢性刺激により、SON ニューロンと PVN ニューロンに多くの c-fos 陽性細胞が発現することがわかった。しかし、その発現の時間経過は刺激の種類により著しく異なり、急性刺激では一過的发現であるのに対し、慢性刺激では持続的な発現を示した。c-fos は神経の興奮に対応してニューロンの遺伝子発現を調節する機能をもっている。急性刺激では、一過的に血漿浸透圧が上昇するのに対し、慢性刺激では徐々に血漿浸透圧が上昇するため、常にニューロンが活性化され、ホルモン分泌を調節する必要があると考えられる。ここで見られた c-fos 発現の差異は、そのようなニューロン活動の違いを反映しているのかも知れない。またこの c-fos 発現は、AV3V を電気破壊することによりほぼ完全に抑制されることより、AV3V からの神経入力が後葉ホルモン産生ニューロンの高浸透圧刺激による c-fos 発現に重要な働きを持つと考えられる。特に AV3V 領域の OVLT 部位は血液脳関門を欠き、血液脳関門の内側に存在する後葉ホルモン産生ニューロンよりも血漿浸透圧の微妙な変化に対応することができる浸透圧受容部位と考えられ、この浸透圧受容部位からの情報は後葉ホルモン産生ニューロンの活動に重大な影響を与えるであろう。

さらに、AV3V 電気破壊は、長期脱水刺激による OXT および AVP 両方の細胞サイズの増大を抑制し、コントロールとほとんど差がなかった。この結果と c-fos 発現の実験と合わせて考えると、長期脱水による血漿浸透圧上昇は、主として AV3V 部位にて検知されることを示唆している。AV3V からの興奮性入力は

OXT, AVP の後葉ホルモン産生ニューロンを興奮させる。そして、興奮に伴う細胞内メッセンジャーが遺伝子に作用してニューロンの形態的变化を引き起こすものと推測される。

今後の課題

本研究において、急性及び慢性の浸透圧刺激時の後葉ホルモン産生ニューロンにおける c-fos 発現とその経時変化、および細胞サイズの増大に AV3V が上位入力として重要な働きを持つことを明らかにした。AV3V 電気破壊の実験において、従来の報告を考えると、細胞サイズの変化は超微細構造レベルでの変化と対応するものと考えられるが、実際に微細構造（シナプスや細胞接着）レベルで検討する必要性があり、今後の検討課題である。

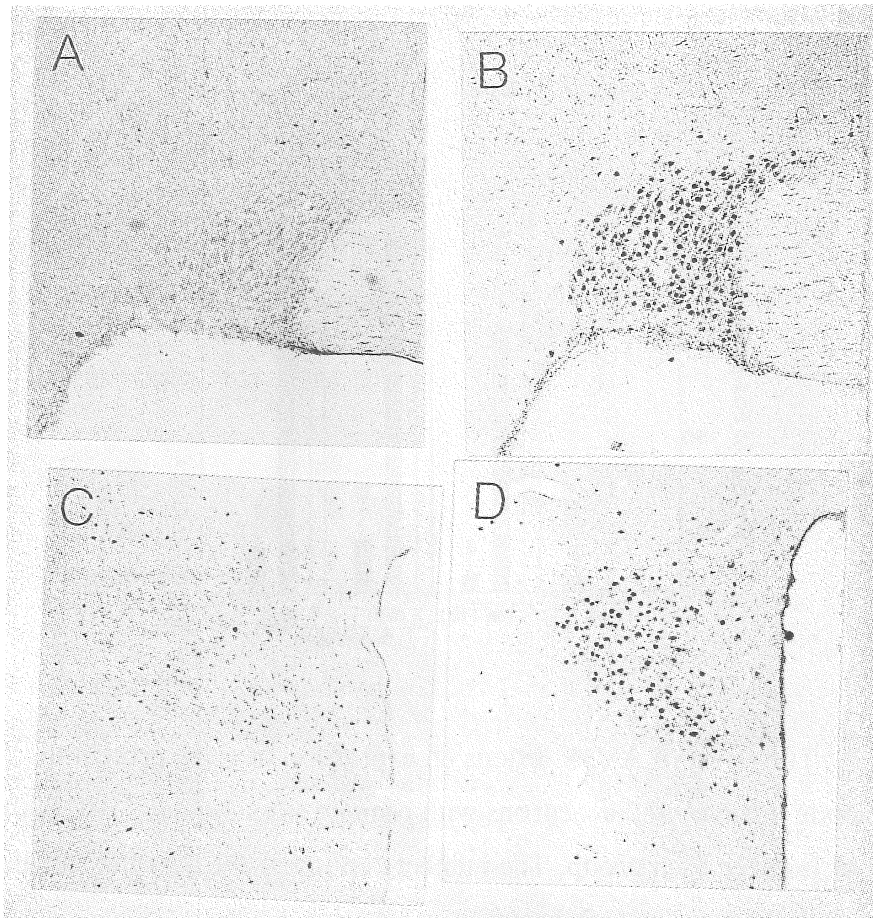


Fig. 1 Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic supraoptic nucleus (SON, A and B) and paraventricular nucleus (PVN, C and D). Intact control males, A and C; 4-days dehydrated rats, B and D.

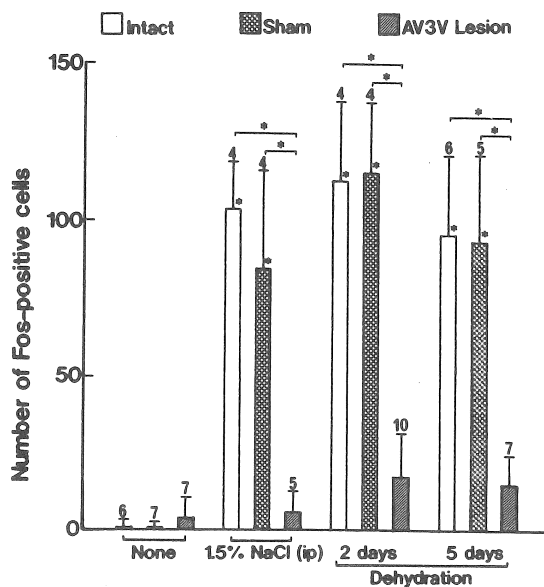


Fig. 2 The effect of AV3V lesions on expression of c-fos protein in supraoptic magnocellular neurons with osmotic stimulations. * $P < 0.0001$ vs none or between each group. The numbers on top of the bars indicate the number of used rats in each group.

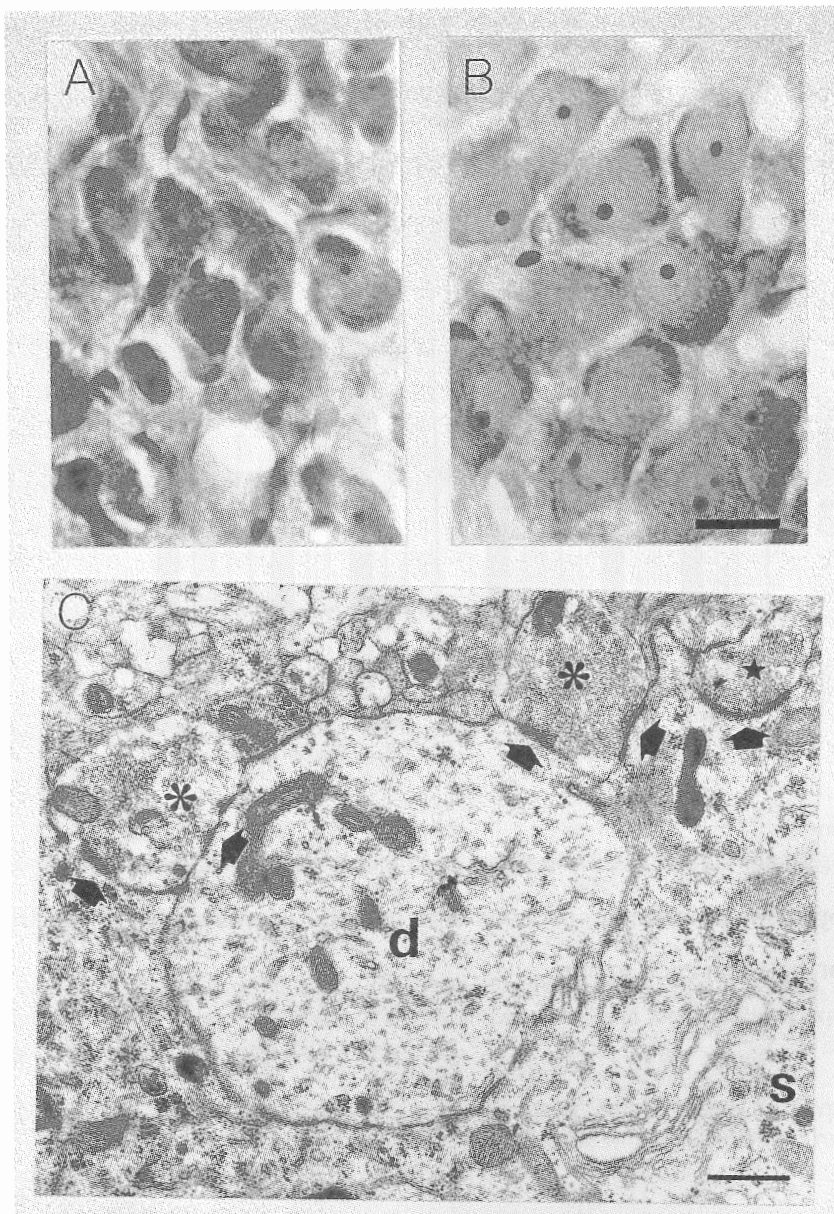


Fig. 3 Photomicrographs of Nissle stained supraoptic magnocellular neurons of the intact control (A) and 10-days dehydrated rats (B). An electronmicrograph of supraoptic magnocellular neurons of the 10-days dehydrated rats (C).

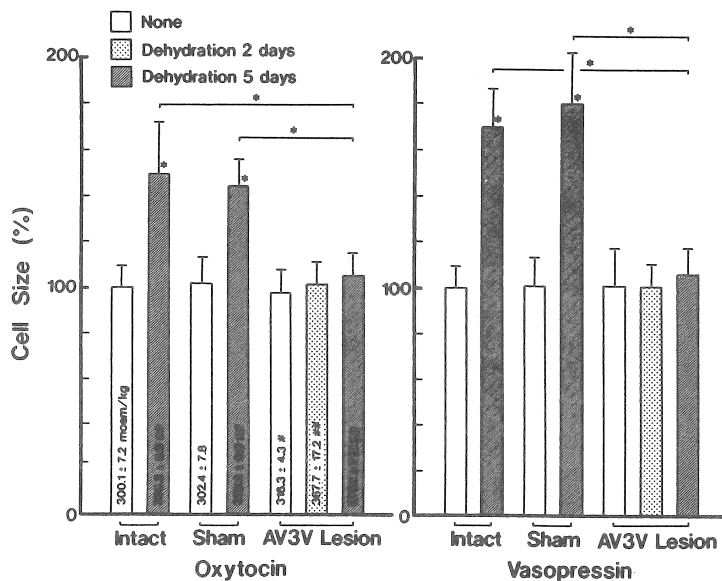


Fig. 4 The effect of AV3V lesions on the cell size increase in the supraoptic magnocellular neurons with osmotic stimulations. *P<0.001 vs none or between each group.

文献

Miyata, S., Itoh, T., Matsushima, O., Nakashima, T. and Kiyohara, T. ; Not only osmotic but also repeated restraint caused structural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.*, 33: 669-675; 1994.

Miyata, S., Nakashima, T. and Kiyohara, T.; Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neuron during osmotic stimulations. *Neurosci. Lett.*, 175: 63-66; 1994.

Miyata, S., Nakashima, T. and Kiyohara, T.; Structural dynamics of neural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus during dehydration and rehydration. *Brain Res. Bull.*, 34: 169-175; 1994.

Miyata, S., Lin, S., Kawarabayashi, T., Nakashima, T. and Kiyohara, T.: Maintenance of ultrastructural plasticity of the supraoptic nucleus in the ovariectomized rat. *Brain Res. Bull.*, 37: 405-409; 1995.

Miyata, S., Itoh, T., Lin, S-H., Ishiyama, M., Nakashima, T. and Kiyohara, T.: Temporal changes of c-fos expression in oxytocinergic magnocellular neurons of the rat hypothalamus with restraint stress. *Brain Res. Bull.*, 37: 391-395; 1995.

Miyata, S., Ishiyama, M., Shido, O., Nakashima, T., Shibata, M. and Kiyohara, T.: Central mechanism of neural activation with cold acclimation of rats using Fos immunohistochemistry. *Neurosci. Res.*, 22: 209-218; 1995.

Lin, S-H., Miyata, S., Itoh, T., Kawarabayashi, T., Nakashima, T. and Kiyohara, T.: Fos expression in magnocellular neuroendocrine cells of the rat hypothalamus during gestation, parturition, and lactation. *Neurosci. Res.*, 23: 29-34; 1995.

Kiyohara, T., Miyata, S., Nakamura, T., Shido, O., Nakashima, T. and Shibata, M. Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. *Brain Res. Bull.*, 38: 193-201; 1995.

Lin, S-H., Miyata, S., Kawarabayashi, T., Nakashima, T. and Kiyohara, T.: Hypertrophy of oxytocinergic magnocellular neurons in the hypothalamic supraoptic nucleus from gestation to lactation. *Zool. Sci.*, 13: 1161-1165; 1996.

Miyata, S., Matsunaga, W., Mondoh, H., Nakashima, T. and Kiyohara, T.: Effect of AV3V lesions on fos expression and cell size increases in magnocellular neurons of the rat hypothalamus during chronic dehydration. (submitted to *Neurosci. Res.*)

Morphological Changes of the Hypothalamic Magnocellular Neurons during Chronic Dehydration

Seiji Miyata and Toshikazu Kiyohara

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology

Summary

The immunoreactivity of c-fos protein was transiently detected in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus (SON) and paraventricular nucleus (PVN) of the rat hypothalamus after intraperitoneal injection of hypertonic saline solution. In contrast, c-fos immunoreactivity was persistently seen in the SON and PVN of the rats which were chronically dehydrated by water deprivation. Moreover, the effect of osmotic stimulation on c-fos expression and cell size increase in the SON were evaluated in intact, sham-operated, and AV3V-lesioned rats. c-fos positive neurons were found mainly in the AV3V regions and the hypothalamic magnocellular neurons in the forebrain in dehydrated intact rats. Intraperitoneal injection of hypertonic saline and chronic dehydration induced a significant increase in number of c-fos positive neurons in the supraoptic nucleus of intact and sham-operated rats. AV3V lesions completely abolished the expression of c-fos in SON neurons of rats that were intraperitoneally injected with hypertonic saline and were chronically dehydrated. Chronic dehydration increased significantly cell size of OXT and AVP magnocellular neurons in intact and sham-operated rats. However, there was no increase in cell size of those in the AV3V-lesioned rats. These results demonstrate that neural input deprived from AV3V regions plays a significant role in causing c-fos expression and structural changes such as cell size increase in the hypothalamic magnocellular neurons with osmotic stimulation.