

発表番号 60 (0336)

## 中枢神経系における TRP 受容体の浸透圧受容体としての 生理的意義とその活性化機構

助成研究者:津嶋宏美(名古屋市立大学大学院医学研究科)

共同研究者:森真由美(名古屋市立大学大学院医学研究科)

森山昭彦(名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科)

浸透圧感受性を示す TRPV4 の生体内における中枢浸透圧受容体としての機能を明らかにするため、TRPV4 のアゴニストの飲水行動への影響ならびにその活性化機構について検討した。

実験には9週齢のウイスター系雄性ラットを用いた。ラットにはペントバルビタール麻酔下で側脳室内にガイドカニューレを挿入固定した。1週間の回復期間に実験環境と手技に順化させた後、ガイドカニューレを介して TRPV4 の agonist である 4 $\alpha$ -phorbol 13, 14-didecanoate (PDD)を側脳室内へ投与した。飲水量は、1) 無処置明期と2) 無処置暗期、3) 16時間の絶食あるいは絶水後、4) 0.5M NaCl 4 ml の経口負荷の各条件下で測定し、同時に摂食量も測定した。1) の条件下では運動量と体温についても測定した。甘味に対する味覚実験は、12:00-15:00 の3時間のみ8% sucrose を与え、摂取量が一定になった4日目に PDD 投与し摂取量を測定した。血漿浸透圧の測定には、飲水量を測定した上記条件下で断頭採血し、遠心分離した血漿を用いた。拮抗薬は PDD 投与30分前に側脳室内へ前処置した。

側脳室内投与した PDD は無処置明期及び暗期の飲水量と絶食後の摂食に伴って増加した飲水量を抑制したが、絶水後や高張食塩水経口負荷による飲水量には影響しなかった。これらの条件下の血漿浸透圧は、飲水量を抑制した時は正常であったが抑制しなかった時は有意に上昇していた。PDD は体温、摂食量、sucrose 摂取量には影響しなかったが、運動量はわずかに減少した。PDD の無処置暗期と絶食後の飲水量抑制作用は、TRPV4 の antagonist である ruthenium red や gadolinium の前処置により抑制された。また、protein kinase C inhibitor である chelerythrine あるいは tyrosine kinase inhibitor である genistein の前処置で抑制された。

PDD は、ある条件下では飲水量を抑制することが示された。この作用は、TRPV4 antagonist で阻害されること、飲水量に関与すると考えられている体温や味覚には PDD は影響しないこと、PDD による運動量減少は小さく摂食量に影響しないことから、PDD は TRPV4 を介して飲水行動を制御することにより生理条件下での体液浸透圧ホメオスタシスに寄与していることが示唆された。また、この機能の活性化には protein kinase C と tyrosine kinase が関与しているものと思われる。



10

助成番号 0336

## 中枢神経系における TRP 受容体の浸透圧受容体としての 生理的意義とその活性化機構

助成研究者：津嶋宏美（名古屋市立大学大学院医学研究科）

共同研究者：森眞由美（名古屋市立大学大学院医学研究科）

森山昭彦（名古屋市立大学大学院

システム自然科学研究科）

### 1．研究目的

我々動物の体液の浸透圧は、体内に入る水分量(飲水量)と体外に排出される水分量(尿量、汗、唾液等)のバランスを取るにより常に一定に保たれている。この調節に中枢浸透圧受容体が重要な役割を果たしていることは広く知られている。これまでの研究から、中枢浸透圧受容体が the vascular organ of the lamina terminalis (VOLT)、the subfornical organ (SFO)、尿量を調節する抗利尿ホルモン vasopressin が生合成される the supraoptic nucleus (SON)と the paraventricular nucleus (PVN) に存在していることは示唆されている<sup>1,2)</sup>が、その実体は不明である。

TRP(transient receptor potential) は、TRPM、TRPC、TRPV の3つの subfamilies からなる非選択性陽イオンチャネルであり、温度依存感受性を示す<sup>3)</sup>。近年、TRPV subfamily のメンバーである TRPV4 が温度感受性に加え浸透圧に対しても感受性を示すことが TRPV4 を発現した培養細胞で見出された<sup>4,5)</sup>。さらに TRPV4 が VOLT や SFO にも存在するところから浸透圧受容体そのものである可能性が示唆されている<sup>4,6,7)</sup>。事実、TRPV4 knockout mice の浸透圧に対する vasopressin 遊離反応が野生型と異なることが報告されている<sup>6,7)</sup>。しかしながら、正常動物における TRPV4 の浸透圧受容体としての機能について調べられていない。本研究では、TRPV4 の agonist である 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate (PDD)と antagonist である ruthenium red (RR)と gadolinium (GAD)<sup>8)</sup>の飲水行動に対する作用を正常ラットを用いて検討し、TRPV4 の生理的役割ならびにその活性化機構について検討した。

### 2．研究方法

実験には九週令雄ウイスターラット(飼育条件:室温 23℃、湿度 60%、明期 8:00-20:00)を用いた。実験の約一週間前にペントバルビタール麻酔下でガイドカニューレを右側脳室内に挿入、デンタルセメントで固定し、回復期間内に実験環境と手順に順応させ

た。実験当日ガイドカニューレ内に挿入した薬物注入用のカニューレを介して薬物を投与した。拮抗薬は PDD 投与の 30 分前に前処置した。摂水量と摂食量の測定は、1) 無処置明期：PDD 投与は 11:30、2)無処置暗期：PDD 投与は 19:45、3)16 時間の絶食あるいは絶水：PDD 投与は 11:30、4)高張食塩水負荷：11:30 の PDD 投与に続いて 0.5M NaCl を 4ml 経口投与の各条件下で、PDD 投与 0.5、1、1.5、2、3、4 時間後に行った。甘味に対する味覚テストには、8% sucrose を 12:00-15:00 の 3 時間のみ与え摂取量が一定になった 4 日目の 11:45 に PDD を投与し、その時の摂取量を前日の摂取量あるいは溶媒投与後の摂取量と比較検討した。運動量と体温の測定は無処置明期に行い、それぞれ Automex II (Columbus Instruments, Ohio, USA)とテレメトリー法 (Minimitter, Eicom, Japan)を用いた。血漿浸透圧は、エーテルで麻酔したラットを断頭し採血後遠心分離した血漿を Auto-Osmometer (Osmostat OM-6020, Kyoto Daiichi Kagaku Co. Ltd., Kyoto, Japan)で測定した。

PDD は 10%DMSO、genistein は<5% ethanil、PD98059 は<5% DMSO、その他の薬物は生理食塩水に溶解した。

実験終了後にガイドカニューレが側脳室内に挿入されていることを確認した。

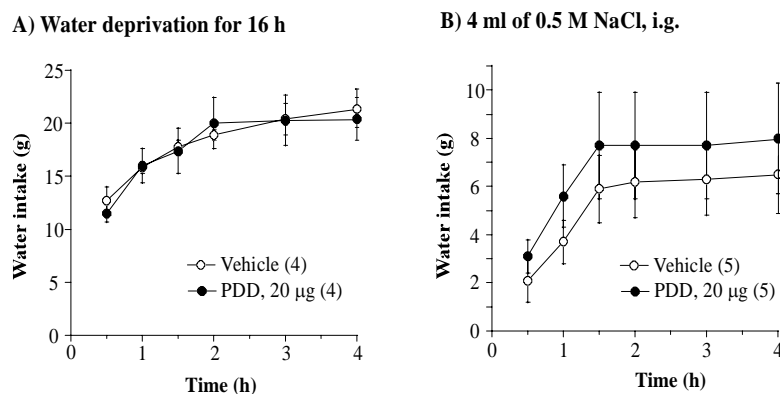
実験結果は Mean  $\pm$  S.E.で表した。有意差検定は two-way ANOVA、続いて non-paired t-test を用い、P 値が 5%以下を有意な差とした。

### 3 . 研究結果

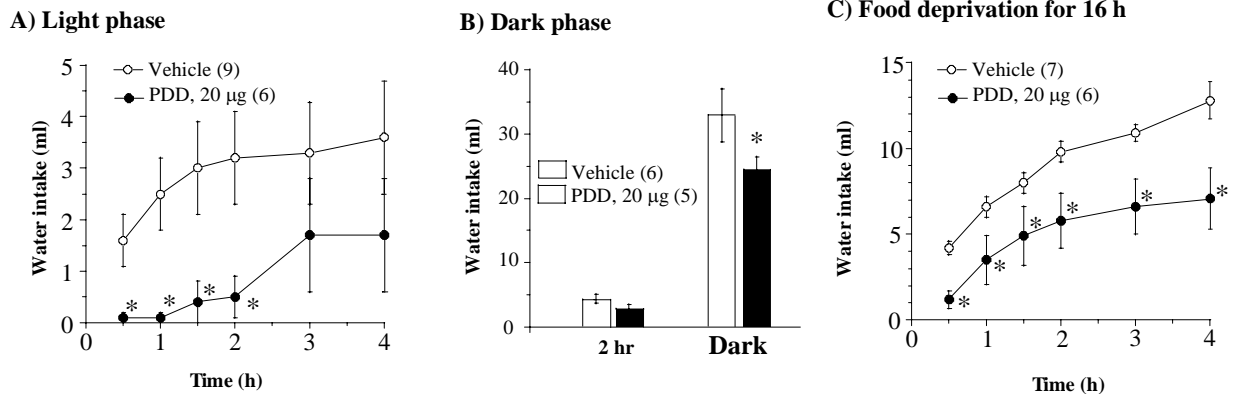
#### 3.1 PDD の作用

最初に、飲水行動が亢進している 16 時間絶水と高張食塩水経口負荷の条件下で側脳室内に投与した PDD (20  $\mu$ g)の飲水量を測定した。Fig. 1 に示すように、いずれの条件下においても PDD は飲水行動に影響しなかった。しかしながら、無処置明期および暗期、絶食後の摂食に伴う飲水に対し PDD は有意な抑制を示し

(Fig. 2)、この作用は用量依存性であった ( Vehicle/PDD 投与 0-0.5 h の飲水量 : Vehicle: 4.0  $\pm$  0.4 g, n = 9; 3  $\mu$ g PDD: 4.4  $\pm$  1.4 g, n = 5; 10  $\mu$ g PDD: 2.1  $\pm$  0.6 g\*, n = 5; 20  $\mu$ g PDD: 1.1  $\pm$  0.4 g\*, n = 8; \*P<0.05 vs. the vehicle-injected group )



**Fig. 1** Effects of PDD on water intake after water deprivation or intragastric administration of NaCl



**Fig. 2** Effects of PDD on water intake under basal condition and food deprivation for 16 h (\*P<0.05 vs. the vehicle-injected group)

飲水行動に影響を与える味覚、体温、運動量への PDD (20 µg)の作用を検討した。PDD は絶食後の摂食量と無処置暗期の摂食量や sucrose による甘味、体温には影響しなかったが、PDD 投与 0-1h の運動量はわずかに抑制した ( vehicle: 1941 ± 194 for 0-0.5 h, 1236 ± 222 for 0.5-1.0 h, n =7; PDD: 1137 ± 151\* for 0-0.5 h, 733 ± 121\* for 0.5-1.0 h, n = 5; \*P<0.05 vs. the vehicle-injected group )。

PDD の飲水行動への影響を検討した実験条件での血漿浸透圧を測定した。無処置明期と暗期、絶食後の血漿浸透圧は正常と差はなかった。一方、絶水と高張食塩水経口負荷後の血漿浸透圧は有意に上昇していた ( Table 1 )。

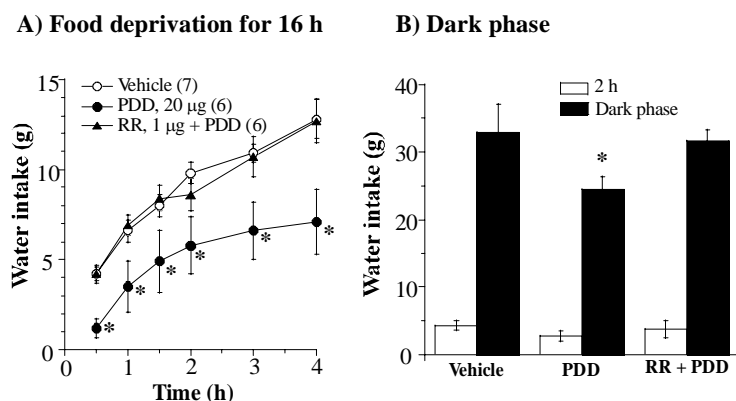
**Table 1** Plasma osmotic pressure under the various experimental conditions

	Basal condition		Deprived condition		0.5 M NaCl i.g.
	Light phase	Dark phase	Food	Water	
Osmotic pressure (mOsm/kg)	291 ± 2.5	292 ± 6.2	294 ± 1.3	305 ± 3.3*	307 ± 2.6*
N	8	6	6	6	6

\* P < 0.05 vs. the basal condition of the light phase

### 3.2 PDD の飲水抑制作用に対する TRPV4 antagonist の作用

**Fig. 3** Inhibitory effects of ruthenium red on the PDD-induced decreases in water intake (\*P<0.05 vs. the vehicle-injected group)



無処置暗期と絶食後の摂食に伴う飲水に対する PDD の抑制作用への TRPV4 antagonists (GAD と RR)の影響を検討した。antagonists は PDD 投与の 30 分前に側脳室内へ前処置した。RR (1  $\mu$ g) はいずれの実験条件下においても PDD の飲水抑制作用を阻害した (Fig. 3)。GAD (1  $\mu$ g) も絶食後の飲水促進作用に対する PDD の抑制作用を阻害した (Fig. 4)。

RR と GAD の 1  $\mu$ g 単独投与は飲水量に影響しなかった。

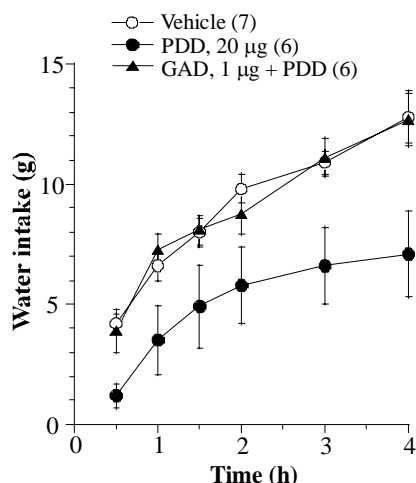


Fig. 4 Inhibitory effects of gadolinium on the PDD-induced decrease in water intake

### 3.3 PDD の飲水抑制作用に対する protein kinase inhibitor の作用

TRPV4 を発現した培養細胞における PDD の作用に、protein kinase C<sup>9)</sup>と tyrosine kinase<sup>10)</sup>が関与していることが報告されている。そこで、これらの inhibitors の影響を、絶食後の摂食に伴い飲水が増加している条件下での PDD の飲水抑制作用に対して検討した。Protein kinase C と tyrosine kinase の inhibitor としてそれぞれ chelerythrine (CHE; 2  $\mu$ g)、genistein (GEN; 2  $\mu$ g)を用いた。Fig. 5 に示すように、いずれの拮抗薬も PDD の作用を阻害した。これらの前処置はいずれも PDD 投与 30 分前に行われ、単独では作用を示さなかった。

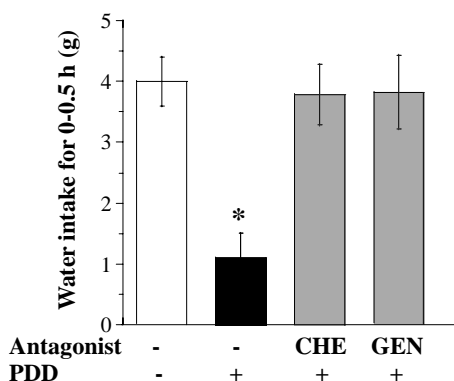


Fig. 5 Effects of protein kinase inhibitors on the PDD-induced decrease in water intake after food deprivation (\*P<0.05 vs. the vehicle-injected group)

## 4 . 考察

本研究で、1) PDD の側脳室内投与は 16 時間絶水や 0.5 M 高張食塩水経口負荷の条件下で生じる飲水量増加に対しては影響なかったが、無処置の明期あるいは暗期の摂水量、絶食後の摂食に伴う飲水量の増加を有意に抑制した、2) PDD は運動量を減弱したが、体温、摂食量と sucrose 摂取量には変化は認められなかった、3) 絶水や高張食塩水負荷の条件下では血漿浸透圧は有意に上昇していたが、明期、暗期及び絶食時の血漿浸透圧は正常であった、4) PDD の飲水量抑制作用は、TRPV4 antagonist である

RR と GAD の前処置で抑制された、5) PDD の飲水量抑制作用は、protein kinase C と tyrosine kinase の inhibitors で抑制されたことを明らかにした。

PDD により摂食量や sucrose 摂取量に影響がないことから味覚異常は生じていないものと思われる。また、体温も変化なかった。運動量はわずかに減少していたが、摂食量に減少が認められないことから、この運動量減少により飲水行動が抑制される可能性は少ない。従って、PDD の飲水量抑制作用は二次的なものでない。さらに、この作用が TRPV4 antagonist で抑制されることから、PDD が TRPV4 を介して飲水を抑制しているものと思われる。

PDD は、絶水あるいは高張食塩水負荷後の飲水量に対して影響なかったが、通常の飼育条件下の明期/暗期の飲水量と絶食後の摂食に伴う飲水量を減少した。PDD の作用が認められた時の血漿浸透圧は正常であったが、認められない時は上昇していた。このことから、我々は、PDD はごくわずかな浸透圧変化、つまり生理的条件下で生じる飲水行動を制御しているのではないかと推測している。浸透圧が絶水や高張食塩水負荷で大きく上昇する時生体は大きな影響を受け、浸透圧の恒常性を保つため TRPV4 以外の機構、例えば stretch-inactivated cation channel、volume regulated anion channel<sup>11)</sup>や Na sensor<sup>12)</sup>等が機能していることが考えられる。TRPV4 knockout mice が正常に発育成長し、浸透圧刺激に対する生体反応もほぼ正常に保たれていること<sup>6,7)</sup>も、体液浸透圧の恒常性が TRPV4 による一つの機構のみによって制御されていないことの傍証であろう。

TRPV4 を発現した培養細胞において、これまで protein kinase C<sup>9)</sup>、tyrosine kinase<sup>10)</sup> や細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇、calmodulin<sup>13)</sup>が TRPV4 の活性化に関与していることが報告されている。しかしながら、tyrosine kinase は TRPV4 をリン酸化し活性化する<sup>10)</sup>との報告と tyrosine kinase は関与しない<sup>14)</sup>との報告があり、また、protein kinase C の関与についても、TRPV4 を刺激するリガンドによるといわれ、TRPV4 の活性化機構の詳細は明らかでない。今回、PDD の飲水抑制作用が CHE と GEN で阻害されたことは、生体内での TRPV4 の活性化における protein kinase C と tyrosine kinase の関与を示唆している。現在、PDD 投与によってリン酸化されるタンパクの検索を行っている。

今回の研究では、これまで培養細胞を用いた実験結果より推測されていた TRPV4 の体液浸透圧調節機構での役割を、初めて生体内で明らかにし、この活性化には protein kinase C と tyrosine kinase が関与していることを示唆した。今後、TRPV4 の活性化機構をさらに検討する予定である。

## 5 . 文献

- 1) C. W. Bourque and S. H. R. Oliet: Osmoreceptors in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.*, 59, 601-619, 1997

- 2) J. Antunes-Rodrigues, M. De Castro, L. L. K. Elias, M. M. Valenca, and S. M. McCann: Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol. Rev.*, 84, 160-208, 2004
- 3) A. Patapoutian, A. M. Peier, G. M. Story and V. Viswanath: Thermotropic channels and beyond: Mechanisms of temperature sensation. *Nature Review Neuroscience*, 4, 529-539, 2003
- 4) W. Liedtke, Y. Choe, M. A. Marti-Renom, A. M. Bell, C. S. Denis, A. Sali, A. J. Hudspeth, J. M. Friedman and S. Heller: Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 103, 525-535, 2000
- 5) B. Nilius, H. Watanabe and J. Vriens: The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Pflüger. Arch. Eur. J. Physiol.*, 446, 298-303, 2003
- 6) A. Mizuno, N. Matsumoto, M. Imai and M. Suzuki: Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am. J. Physiol.* 285, C96-C101, 2003
- 7) W. Liedtke and J. M. Friedman: Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc. Nat. Sci.*, 100, 13698-13703, 2003
- 8) H. Watanabe, J. B. Davis, D. Smart, J. C. Jerman, G. D. Smith, P. Hayes, J. Vriens, W. Cairns, U. Wissenbach, J. Prene, V. Flockerzi, G. Droogmans, C. D. Benham and B. Nilius: Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J. Biol. Chem.*, 277, 13569-13577, 2002
- 9) X. Gao, L. Wu and R. G. O'Neil: Temperature-mediated diversity of TRPV4 channel gating: Activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathway. *J. Biol. Chem.*, 278, 27129-27137, 2003
- 10) H. Xu, H. Zhao, W. Tian, K. Yoshida, J.-B. Roullet and D. M. Cohen: Regulation of a transient receptor potential (TRP) channel by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 278, 11520-11527, 2003
- 11) D. L. Voisin and C. W. Bourque: Integration of sodium and osmosensory signal in vasopressin neurons. *Trends in Neurosciences*, 25, 199-205, 2002
- 12) T. Y. Hiyama, E. Watanabe, K. Ono, K. Inenaga, M. M. Tamkun, S. Yoshida and M. Noda: Nax channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neuroscience*, 5, 511-512, 2002
- 13) R. Strotmann, G. Schultz and T. D. Plant: Ca<sup>2+</sup>-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal calmodulin binding site. *J. Biol. Chem.*, 278, 26541-26549, 2003
- 14) J. Vriens, H. Watanabe, A. Janssens, G. Droogmans, T. Voets and B. Nilius: Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc. Nat. Sci.*, 101, 396-401, 2004



## Physiological roles of TRPV4 as osmoreceptors in the central nervous system and its underlying mechanisms

Hiromi Tsushima<sup>1)</sup>, Mayumi Mori<sup>1)</sup> and Akihiko Moriyama<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences;

<sup>2)</sup> Nagoya City University Graduate School of Natural Sciences

### Summary

Intracerebroventricular (i.c.v.) injections of 4 $\alpha$ -phorbol 13, 14-didecanoate (PDD), a TRPV4 agonist, decreased water intake under the basal condition during the light and dark phases in rats. Also an increased water intake accompanied with food intake after 16-h food deprivation was inhibited by PDD. However, PDD did not change an increased water intake after intragastric administration of hypertonic NaCl solution or 16-h water deprivation. Locomotor activity of the PDD-injected groups slightly decreased, compared with that of the vehicle-injected group. Sucrose intake, food intake or body temperature was not different between the PDD- and vehicle-injected groups. Plasma osmolality significantly increased after the 16-h water deprivation and NaCl-gastric administration, although the plasma osmolality after food deprivation did not change, compared the basal level during the light and dark phase. The antidipsogenic effects of PDD were blocked by pretreatment with ruthenium red or gadolinium. In addition, genistein (a tyrosine kinase inhibitor) and chelerythrine (a protein kinase C inhibitor) inhibited the effects. These findings suggest that TRPV4 is involved in the regulatory mechanisms of the physiological changes in body fluid osmolality mediated through water intake, and activation of tyrosine kinase and protein kinase C contribute to the regulation.