

脳室周囲器官における血管－グリアユニット新生による体液浸透圧調節に関する研究

宮田 清司

京都工芸繊維大学応用生物学部門生体機能学研究室

概要 体液浸透圧 (Na^+ 濃度) 上昇は、脳室周囲器官と呼ばれる部位で受容され、飲水行動や vasopressin 分泌を調節することで体液の浸透圧を一定に保つメカニズムがある。脳室周囲器官の特徴は、血液脳関門 (Blood-brain barrier; BBB) を欠いた有窓性血管であり、イオンや血液中物質の高い透過性を有している。しかし、BBB を欠くことは、血液中の分子が脳実質細胞などに障害を与え、神経細胞死を引き起こす可能性がある。このように、脳室周囲器官は、直接的に末梢血液情報を感知することができるが、そのメカニズムについては解明されていない。本研究において、1) 浸透圧感知をする終板器官 (OVLT) や脳弓下器官 (SFO) では、低分子分子の血管透過性は高いが、高分子分子の透過性は制御されていることを見出した。また、低分子の透過性も正中隆起や下垂体後葉よりも顕著に低く、OVLT や SFO では、血液由来分子を認識できれば良い最低限の透過性を有していることが明らかになった。2) 脳室周囲器官の血管周囲にはタイトジャンクションを持つ密なアストログリアのネットワークが存在し、脳室周囲器官から周辺の脳部位への分子拡散を抑制していることが明らかになった。脳室周囲器官の血管基底膜は2重になっており、グリア細胞質突起が血管内皮細胞直下に存在すること、ならびにこのグリア細胞質突起に浸透圧受容センサータンパクの TRPV1 が発現していた。3) 脳室周囲器官では、血管新生と共にグリア新生が常時生じ、血管－グリアセンサーユニットは再構築されていることが分かった。以上の結果は、浸透圧変化などの血液情報の変化は、脳室周囲器官で感知されるが、末梢器官と異なり必要最低限の血管透過性を有することで、神経毒性を回避しながら、血液内情報を感知している。さらに、ダイナミックな血管－グリア構築が、分子の拡散を防止するバリアーとして働くだけでなく、TRPV1 が発現することでセンサー機能も有していることが明らかになった。

1. はじめに

体液浸透圧 (Na^+ 濃度) の変化は、脳室周囲器官と呼ばれる脳部位で直接受容され、脳の体液浸透圧を一定に保つ中枢へ情報を伝達する。一般に、脳の血管系は、血液のイオン・ホルモン・アミノ酸などが透過して神経細胞などに影響を及ぼさないように、血液脳関門 (Blood-brain barrier; BBB) という特殊なバリアー機構を有している。一方、脳室周囲器官では内皮細胞のタイトジャンクションを欠き、BBB がルーズなので、血液中の分子が血管系から脳実質細胞へ入りこむ。よって、「脳の窓」ともいわれている。脳室周囲器官は、その機能から感知系と分泌系に分類されている。感知系は、終板器官 (OVLT)、脳弓下器官

(SFO)、最後野 (AP) を含み、血液中の浸透圧、イオン、毒物、サイトカイン、細菌構成成分を検知している。検知された情報は、他の脳部位へ情報を伝えることで、発熱、悪心・嘔吐を誘起するとともに、浸透圧調節・飲水行動・ペプチドホルモン分泌などを制御している。分泌系は、正中隆起 (ME) ならびに下垂体後葉 (NH) を含み、それぞれ前葉ホルモン分泌刺激因子や下垂体後葉ホルモンをペプチド性神経から血液中に直接放出する。下垂体後葉ホルモンであるバソプレッシン (AVP) は、腎臓からの水分吸収を促進することで、血液浸透圧を一定にする。このように、脳室周囲器官は、血液由来の末梢情報を感知するだけでなく、末梢への指令分子として血液中へペプチドホル

モンを分泌し、血液脳関門を欠くというリスクを持ちながらも、血管の高い透過性を維持している。しかし、なぜ血液脳関門を欠くのだろうか？本申請においては、脳室周囲器官の血管透過性を調べるとともに、これが血管新生に起因するのか明らかにする。さらに、グリア新生による血管-グリア相互作用が、血液情報分子感知メカニズムやペプチド分泌に関与していることを解明することを目的とする。

2. 方法と結果

一般に、低分子分子の血管透過性は Fluorescein や Evans blue を用いた試験が標準的に用いられてきた。しかし、これらの方法は、固定化ができないために、脳切片を作製し、免疫組織化学を行うことは不可能であった。そこ

で、固定化可能な低分子トレーサーの開発を行った。Fluorescein isothiocyanate (FITC) は、アルカリ性条件下でアミノ基に共有結合する Fluorescein 誘導体である。まず、心臓血管から血液成分を生理食塩水 (7.0) で洗浄後、FITC を含む生理食塩水 (pH 7.0) を環流、次に生理食塩水と固定液 (pH 8.0) を環流することで、成体成分のアミノ基へ結合させた。Fig. 1 に示すように、この方法で作製した脳切片標本は、FITC 蛍光が免疫組織化学後もほとんど移動・退光がないことがわかる^{1,2)}。

FITC 法の開発により、血液分子が脳室周囲器官の実質細胞へどのように拡散するのか、免疫組織化学と組み合わせることで可視化することができるようになった。脳室周囲器官における FITC トレーサーの血管透過性を調べたところ、OVLT、SFO、AP の透過性は ME、NH、腎臓に

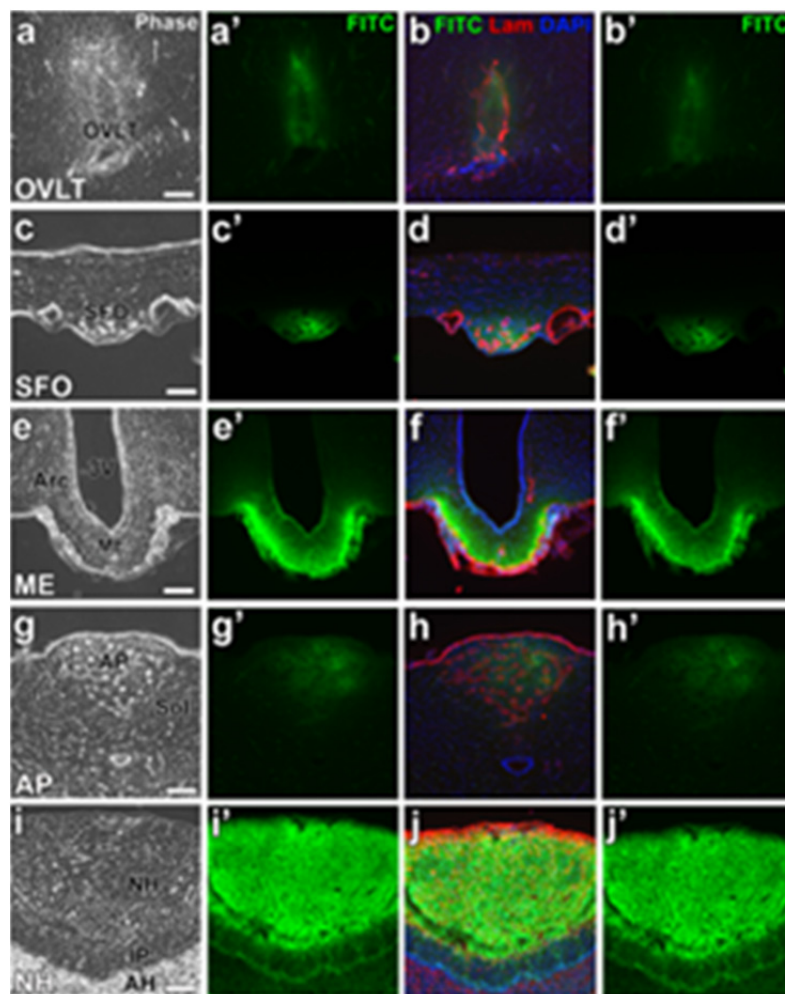


Fig. 1. FITC 還流後、脳切片を作製し速やかに観察した場合 (a, c, e, g, i & a', c', e', g', i') と免疫組織化学後 (b, d, f, h, j & b', d', f', h', j') ではほとんど蛍光の退縮が認められない。

比べ極端に低いことが分かる (Fig. 2)^{1,2)}。

次に、感知系の脳室周囲器官における、浸透圧を感知するセンサータンパク TRPV1 の局在を調べた。TRPV1 は、浸透圧、化学物質、温度、酸を感知することができるので、脳室周囲器官(終板器官、脳弓下器官、最後野)における血液情報の主要なセンサー機構と考えられる。TRPV1 は、血管系を取り囲むように非常に密なアストログリアネットワークに、顕著に存在していることが分かった (Fig. 3)。TRPV1 は、アストログリアに加え、神経の樹状突起にも発現しているが、細胞体には発現していなかった。

アストログリアや神経細胞の細胞質突起に TRPV1 が局

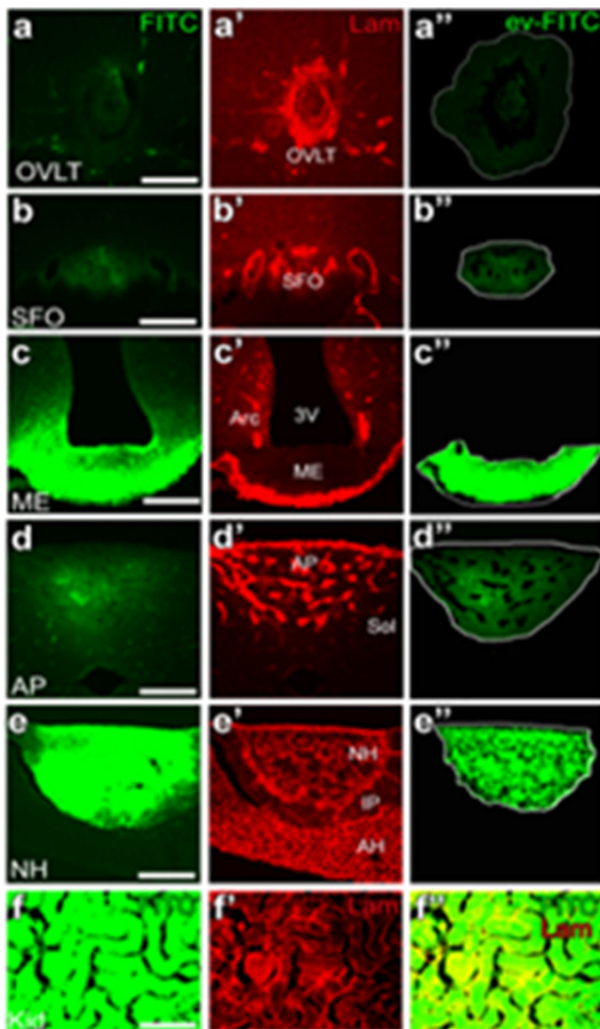


Fig. 2. FITC の血管透過性。OVLT (a-a')、SFO (b-b')、AP (d-d') の透過性は、ME (c-c')、NH (e-e')、腎臓 (f-f') に比べ著しく低い。

在している理由として、血液由来の低分子がより選択的に作用し、細胞体へ直接的に作用することを回避することで、神経細胞の細胞毒性を抑制していると考えられる。そこで、血液由来の低分子の移動・局在を FITC 法と細胞マーカーの免疫組織化学で調べた。

血管を透過した FITC は、アストログリアの細胞質突起ネットワークに高濃度で蓄積し、脳室周囲器官以外の周辺脳部位への拡散は認められなかった (Fig. 4)。よって、アストログリアのネットワークは、血液由来の低分子の拡散バリアーとして働いているだけでなく TRPV1 センサーなどの発現により、血液情報の認識にも関与している。

さらに、脳室周囲器官のアストロサイトは、神経幹細胞よりグリア新生により増殖して、血管と相互作用により新しいセンサーユニットを再構築するのか明らかにした。

BrdU を飲水に加え、脳室周囲器官の増殖細胞を検出したところ、多数の増殖細胞が認められた (Fig. 5)

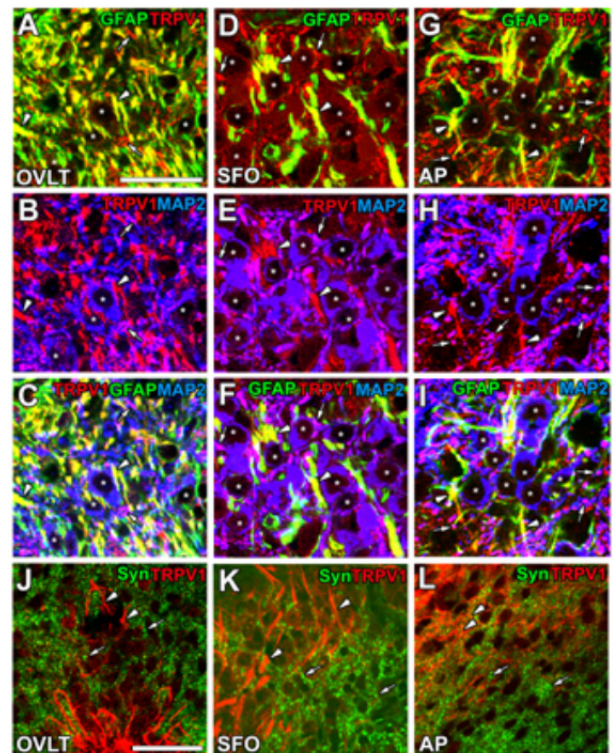


Fig. 3. TRPV1 の局在。OVLT (A-C)、SFO (D-F)、AP (G-I) において TRPV1 (red) は、アストログリア (green) や神経 (blue) の細胞質突起に認められるが、シナプスには存在しない (J-L)。

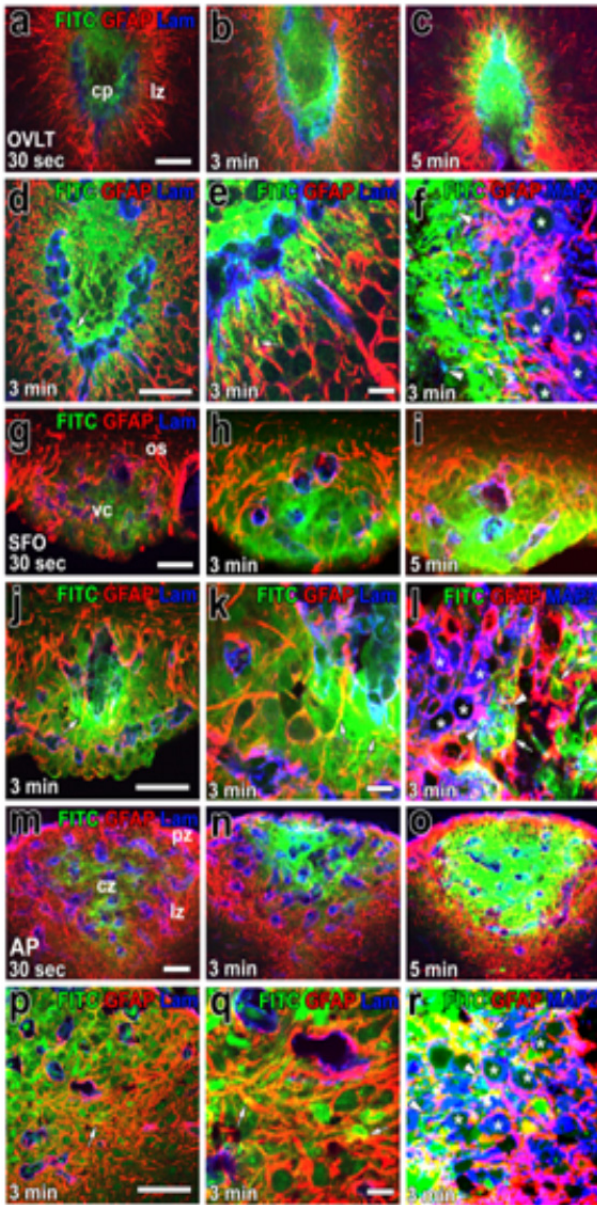


Fig. 4. TRPV1 の局在。OVLT(A-C)、SFO(D-F)、AP(G-I)において TRPV1 (red)は、アストログリア (green)や神経 (blue)の細胞質突起に認められるが、シナプスには存在しない(J-L)。

意外なことに、BrdU 陽性細胞は血管内にも多数認められ、内皮細胞の増殖が認められた。BrdU 陽性細胞が、増殖を停止しアストログリアに分化していることを調べるために、BrdU を含む飲水を2週間与え、その後3週間通常の飼育を行った。その結果、30-50%の BrdU 陽性細胞がアストログリアへ分化していることが明らかになった。さらに、20-30%の BrdU 陽性細胞が、内皮細胞に認められた (Fig. 6)。

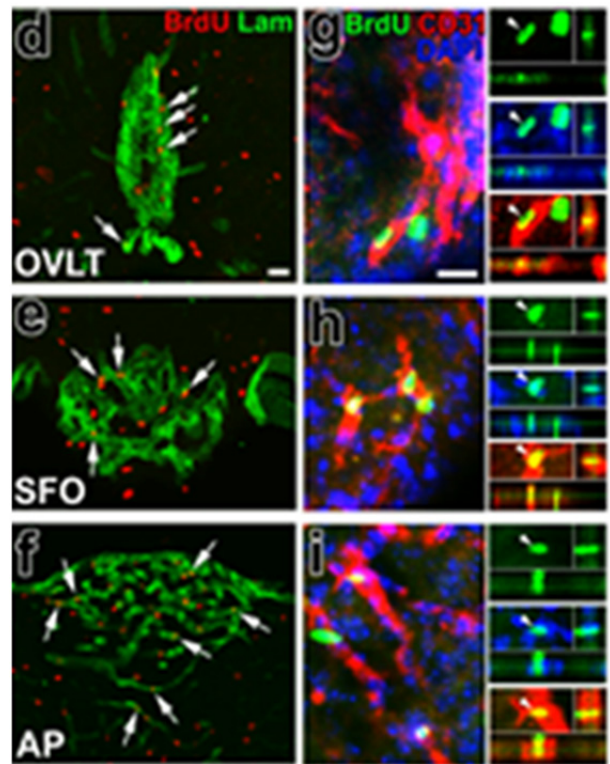


Fig. 5. BrdU 陽性細胞の局在。OVLT、SFO、APにおいて BrdU 陽性細胞 (red)は、血管に加え (green)や血管以外の部位にも多数認められる。

これらの結果は、脳室週器官では、アストログリアだけでなく、血管内皮細胞の活発な増殖が生じ、血管-アストログリアの再構築が起きていることを示している^{3,4)}。

血管新生は VEGF に制御されていることがよく知られている。そこで、VEGF 遺伝子やタンパクの発現を *in situ* hybridization ならびに免疫組織化学により調べた。その結果、脳室周囲器官では、VEGF の発現が著しく高いことが明らかになった (Fig. 7)。

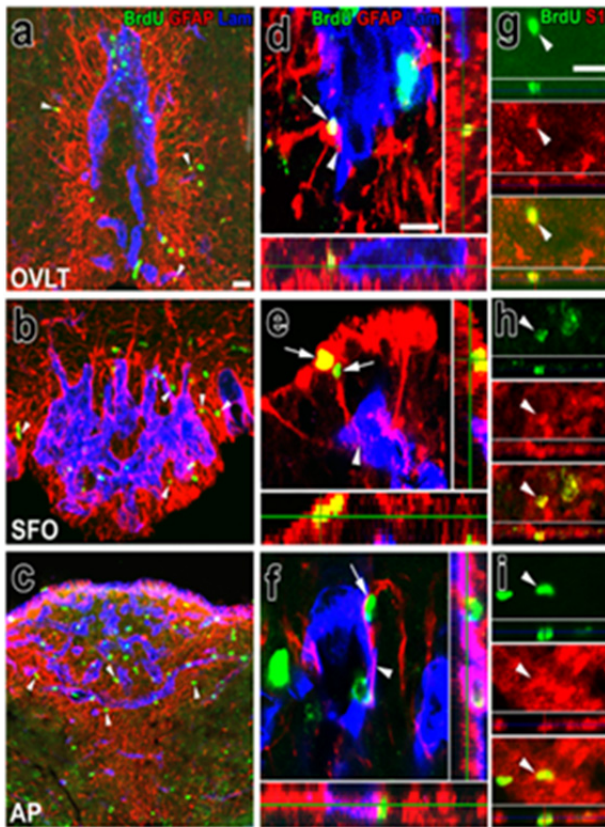


Fig. 6. BrdU 陽性細胞の運命。OVLT、SFO、AP における、定量的解析より、約半数の BrdU 陽性がアストログリアへ分化していた。

3. 考察

本研究で得られた結果を模式的にまとめたものが **Fig. 8** である。脳室周囲器官の血管系はタイトジャンクションがルーズで BBB を欠く。そのため、血液内の分子が透過する。ただし、高分子物質は透過せず、低分子物質のみが透過することが本研究より明らかになった。

しかし、低分子の物質の拡散は密なアストロサイトネットワークがバリアーとして機能するため、周辺脳部位への拡散が抑制されている。また、神経細胞体はアストロサイトの

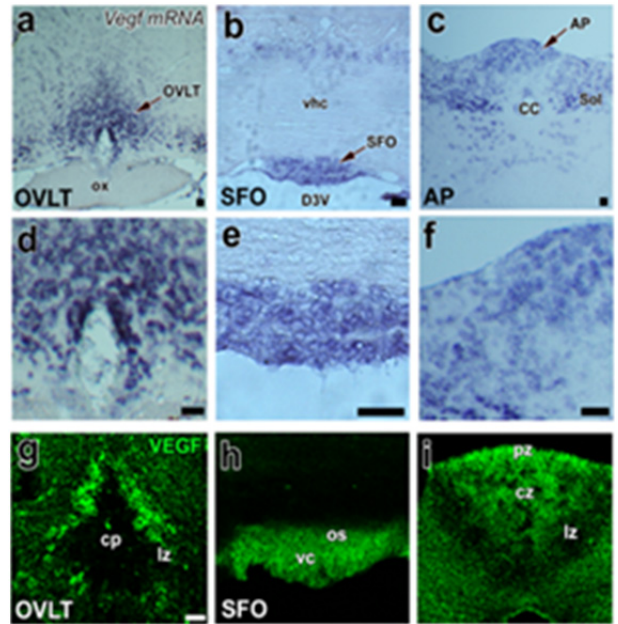


Fig. 7. 脳室周囲器官における VEGF の発現。OVLT (a, d, g)、SFO (b, e, h)、AP (c, f, i) において VEGF 発現細胞が強いのがわかる。

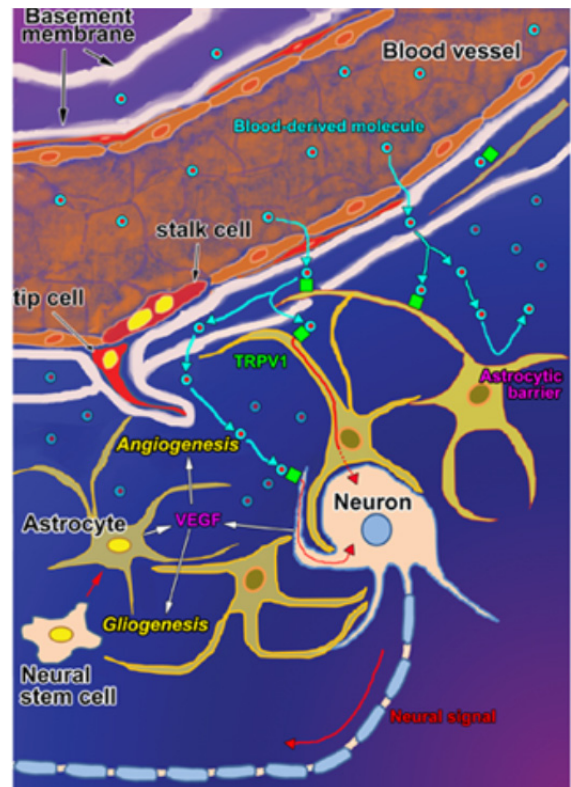


Fig. 8. 脳室周囲器官における血管透過性とアストログリアによるバリアー&センサー機能をまとめた模式図。

細胞質突起で覆われているので、血液由来分子の直接的な刺激がない。

密なアストロサイトのネットワークは、浸透圧、温度、酸、低分子物質などの広範な情報を認識するセンサータンパクであるTRPV1が発現している。この事実は、アストロサイトのネットワークがバリアーとして働くだけでなく、血液分子情報の感知にも関与していることを示している。さらに、血管内皮細胞とアストロサイトへ分化する神経幹細胞増殖は、血液分子情報の変化により変化する。よって、血管-センサーユニットの構築が可塑的に変化することで、感知系の脳室周囲器官では、浸透圧変化などの血液分子情報の検出を制御していると考えられる。

引用文献

- 1) **Miyata, S.**, Morita, S.
A new method for visualization of endothelial cells and extravascular leakage in adult mouse brain using fluorescein isothiocyanate. *Journal of Neuroscience Methods* 202: 9-16(2011)
- 2) Morita, S., **Miyata, S.**
Different vascular permeability of cerebral cortex, and hypothalamus. *Cell and Tissue Research* (印刷中)
- 3) Morita S., Hourai, A., **Miyata S.**
Structural vascular remodeling in the sensory circumventricular organs of adult mouse. *Journal of Comparative Neurology* (改訂中)
- 4) Morita S, Ukai, S., **Miyata S.**
VEGF-dependent continuous angiogenesis in the median eminence of adult mic. *European Journal of Neuroscience* (投稿中)

学会発表

- 1) 第 88 回日本生理学会大会第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、横浜(2011)
森田晶子・中島敏博・**宮田清司**. 脳室周囲器官では持続的に血管新生が起きている.
- 2) 第 34 回日本神経科学大会、横浜市、(2011)
森田晶子・萬成哲也・**宮田清司**. 成体脳室周囲器官における血管再構築機序の解析.
- 3) 第 34 回日本神経科学大会、横浜市、(2011)
鵜飼真璃・飯森菜月・森田晶子・**宮田清司**. 脳室周囲器官における神経ならびに血管新生の環境因子.)
- 4) 第 34 回日本神経科学大会、横浜(2011)
蓬萊敦・森田晶子・**宮田清司**. 末梢血液情報の変化による脳室周囲器官の血管再構築.
- 5) 第 38 回日本神経内分泌学会学術集会(内分泌学ウィーク 2011)、東京(2011)
森田晶子・**宮田清司**. 脳室周囲器官の血管新生は血液情報感知とペプチド分泌に関与する.
- 6) 第 87 回日本解剖学会近畿支部学術集会(2011)
森田晶子・蓬萊敦・鵜飼真璃・奥田 洋明・辰巳 晃子・和中明生・**宮田清司**. 浸透圧刺激による脳室周囲器官の血管構築変化.
- 7) Neurogenesis 2011, Kobe (2011)
Morita S, **Miyata S.** Continuous angiogenesis in the circumventricular organs of the adult brain.

Osmotic Control and Vascular-Glial Unit Formation in the Circumventricular Organs

Seiji Miyata

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology

Summary

The sensory circumventricular organs (CVOs), including the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT), subfornical organ (SFO), and area postrema (AP) allows parenchyma cells to sense a variety of blood-derived information, since they lack the blood-brain barrier (BBB) or endothelial tight junctions. In the present study, we examined dynamic gliovascular interaction for controlling osmotic homeostasis in the sensory CVOs of adult mice. The expression of TRPV1 was observed in the sensory CVOs such as the OVLT, SFO, and AP of adult mice by using reverse transcription-polymerase chain reaction and Western analyses. Confocal microscopic observation revealed that TRPV1 expression was observed at cellular processes of astrocytes close proximity to fenestrated vasculature to constitute dense networks, whereas such structural interaction was not observed between dendritic processes and fenestrated vasculature. Moreover, neuronal somata were often surrounded by TRPV1-positive cellular processes of astrocytes and dendrites. Thus, the present study demonstrates the direct brain sensing mechanism for blood-derived information through astrocytic TRPV1 in the sensory CVOs.