

下垂体後葉の血管可塑性によるバソプレッシン分泌調節機構に関する研究

宮田 清司

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

概要 脳室周囲器官は、他の脳部位と異なり血液脳関門を欠いています。脳室周囲器官には、神経分泌に関与する下垂体後葉と正中隆起、血液情報の感知機能を持つ終板器官、脳弓下器官、最後野があります。脳血管系は、成体脳では血管新生がほとんどおきないと考えられてきました。しかし、報告者らは下垂体後葉や正中隆起においては血管内皮細胞の増殖とアポトーシスが生じ、血管新生が起きていること、ならびに血管新生には *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) が必要であることを明らかにしました (Morita *et al.*, 2013; Furube *et al.*, 2014)。よって、血管新生は、神経分泌を行っている脳室周囲器官では共通した特徴であることが明らかになりました。さらに、報告者らは、VEGF シグナリングを阻害すると血管新生の阻害と同時に、血管密度と神経終末数の両方が減少することを見出しております (Furube *et al.*, 2014)。よって、血管新生は血管系ネットワークの再構築変化に関与しているのではないかと考えられます。

本研究では、成体マウスの下垂体後葉を用いて、血管系の可塑性がバソプレッシンとオキシトシンの神経分泌調節に重要な役割を果たしていることを明らかにすることを目的として研究を行いました。レーザー顕微鏡観察よりマウス下垂体後葉の血管外スペースには血管周皮細胞であるペリサイトが存在し、この細胞の細胞質突起が裏打ちすることで血管外スペースの複雑で波打つ構造が形成されることを証明しました。血管外スペースの突出した突起には比較的多くのバソプレッシンやオキシトシンの神経終末部が接していました。また、低分子の血管透過性トレーサーである FITC を用いた実験より、血管外スペースが低分子の通路であることも判明しました。これらの結果より、複雑な血管外スペースは表面積を増加させ、神経終末部との接触頻度を増やす機能的意義が考えられます。次に、2%食塩水を慢性的に飲ませ、バソプレッシン分泌が促進される高浸透圧負荷を与えた場合の血管系の変化を調べました。その結果、血管周皮細胞であるペリサイトの細胞質突起がさらに複雑になっていることが分かりました。ペリサイトの形状変化は、血管外スペースの表面積を著しく増加させバソプレッシンの接触面積を増加させました。また、高浸透圧負荷により血管トレーサーの透過性が増加しました。

以上の結果は、下垂体後葉の血管系は可塑的な性質を持ち、血管密度だけでなく、ホルモンの分泌増加時には、血管周皮細胞ペリサイトの形状変化により表面積を増加させ、血管透過性効率を促進していることが明らかになりました。

1. はじめに

脳のシナプスは、興奮性のグルタミン酸や抑制性の GABA に代表される神経伝達物質により制御されている。しかし、これらの神経伝達物質は食物にも多く含まれているため、血液中の分子が脳内に侵入しないように、血液脳関門と言われる物理的バリア機構がある。血液脳関門は、血管内皮細胞同士がタイトジャンクションを介して強固に結合することで、脳実質内への血液分子の浸潤を妨げて

いる (Zlokovic, 2014)。タイトジャンクションは Claudins, Occludins, JAMs によるホモフィリック結合を基盤として構築され、これら分子の細胞内領域がアクチン細胞骨格と結合することで、強固な細胞間密着構造が形成される。

一方、脳には血液脳関門が存在していない脳室周囲器官と総称される部位がある (Miyata, 2015)。脳は末梢に情報を伝えるために、視床下部の神経が血液中にホルモンを直接分泌する機構がある。この神経内分泌は、下垂

体前葉ホルモン分泌刺激ホルモンが放出される正中隆起とオキシトシンやバソプレッシンが放出される下垂体後葉で起きている。よって、正中隆起と下垂体後葉では、血液脳関門を欠いている。さらに、脳が血液情報を直接感知する機能を持つ終板器官、脳弓下器官、最後野がある。

バソプレッシンは、視床下部にある室傍核や視索上核で合成され軸索輸送により下垂体後葉の神経終末部まで運ばれ血管系へ放出される (Miyata *et al.*, 1999; Miyata & Hatton., 2004)。バソプレッシンは、高浸透圧や脱血などの刺激により終末部より放出され血液内へ入る。血液中のバソプレッシンは、腎臓に作用し水分の再吸収を促進することで、体内の塩分/水分バランスを保つ。

従来、成体の脳血管系は、血管新生がほとんどおきないと考えられてきた。しかし、申請者は、成体脳の正中隆起で血管新生が起きていることを報告した (Morita *et al.*, 2013)。さらに、下垂体後葉においても血管新生が起きていること並びに血管新生には Vascular endothelial growth factor (VEGF) が必要であることを明らかにした (Furube *et al.*, 2014)。よって、血管新生は、神経分泌を行っている脳室周囲器官では共通した特徴であることが明らかになった。さらに、VEGF シグナリングを阻害すると血管新生の阻害と同時に、血管密度と神経終末数の両方が減少することを見出している。よって、血管新生は、神経分泌を行っている脳室周囲器官では共通した特徴であることが明らかになっている。

血管新生は、VEGF 依存的に血管内皮細胞 (Tip 細胞) の突起伸長と同じく血管内皮細胞 (Stalk 細胞) の増殖により新しい血管系が構築される。一方、これらの VEGF シグナルが欠如すると血管系の退縮が起きる。血管新生がおきていることは、血管密度や構築が可塑的に変化している可能性を示すものであり、神経内分泌における新しい概念を示すものである。つまり、バソプレッシンを放出の場である血管自身に変化することは、神経内分泌の効率に影響を与える。しかし、神経内分泌状態の変化に伴う血管系ネットワークの再構築変化に関する研究はない。本研究では、成体マウス下垂体後葉を用いて、血管系の再構築がバソプレッシンなどの神経分泌調節に重要な役割を果たしていることを明らかにすることを目的としている。そのために、塩濃度が高くなっている高浸透圧刺激状態では、下垂体後葉の血管系の組織構築が変化しているこ

とを検討した。

2. 材料と方法

材料; C57B/6J 雄マウス (8-10 週齢)

免疫組織化学; 蛍光法, DAB 法

レーザー顕微鏡

電子顕微鏡

3. 結果と考察

脳の一般的な血管系は、血管内腔に血管内皮細胞が存在し、血管周皮細胞であるペリサイトと血管基底膜からなるタイトな血管外スペースがある。しかし、脳室周囲器官の血管系に共通の特徴として、広い血管外スペースが存在する。下垂体後葉の血管外スペースには血管基底膜とペリサイトが存在しているが (図 1 A, A'), ミクログリアは少ない (図 1 B, B')。血管系を拡大して観察すると、血管基底膜が波打ち、ところどころ突起を伸ばしている箇所があることが分かる (図 1 C-C'')。さらに、これらの血管外スペース

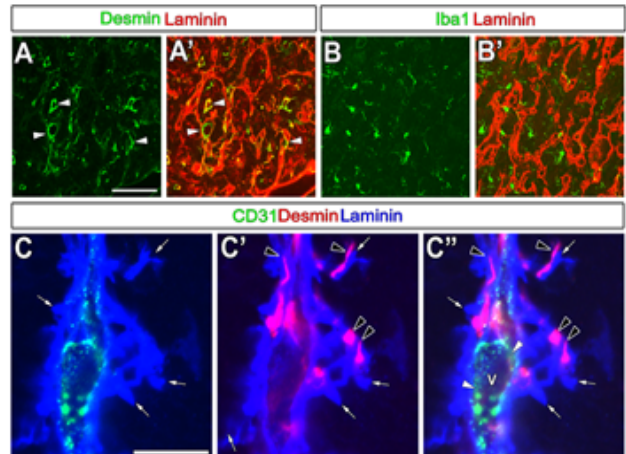


図 1. マウス下垂体後葉の血管系構築のレーザー顕微鏡による観察

Desmin (ペリサイトマーカー), 血管基底膜マーカー (ラミニン), Iba1 (ミクログリアマーカー), CD31 (血管内皮細胞マーカー)。A, A'; 血管外スペースにペリサイトが多数観察される。B, B'; 血管外スペースには、ミクログリアはわずかしか存在していない。C, C'; 血管の内腔には血管内皮細胞が存在しており、その外側に広い血管外スペースがある。血管外スペースは不規則に突起を伸ばしているおり、内部にペリサイトが存在している。

ースの突起構造内にはペリサイトの細胞質突起が存在していることがわかる。よって、一般的な脳の血管系と異なり下垂体後葉の血管系は、複雑で広い血管外スペースを有するのは、裏打ち構造としてペリサイトが重要であることが明らかになった。

次に、この特殊な下垂体後葉の血管外スペース構造を、電子顕微鏡にて観察した(図 2)。Desmin の免疫電子顕微鏡観察より、Desmin 陽性のペリサイトが内側と外側の血管基底膜に挟まれた血管外スペースに存在していることが分かる(図 2 A)。

通常、ペリサイトは内側の血管基底膜に接するように存在するが(図 2 B), 時々ペリサイトは細長い細胞質突起を伸長し、血管外スペースを拡張している場合がある(図 2 C, D)。

脳室周囲器官の血管系は例外なく、このような複雑で広い血管外スペースを有する。その生理的意義については不明であるが、下垂体後葉においては、このような複雑

で広いスペースが存在することは、神経終末部との接触面積を増加させ分泌効率を促進している可能性がある。

そこで、神経終末部と血管外スペースとの位置関係を解析した。オキシトシン(図 3 A, B, B')およびバソプレッシン(図 3 C, D, D')いずれの神経終末部も、平坦な血管構造より血管外スペースの突起に高い頻度で接触していることが分かる。

血管透過性を調べる方法として、一般に血管内へ蛍光トレーサーを注射する方法が用いられている。しかし、低分子の蛍光トレーサーは移動や拡散が生じ正確な透過性を評価することが難しい。最近、報告者らは固定可能な低分子トレーサーとして FITC を用いた方法を開発し報告した(Miyata & Morita, 2011; Morita *et al.*, 2012, 2013, 2016)。この FITC を用いて血管外スペースの血管透過性について調べたところ、血管に灌流した FITC は、下垂体後葉の有窓性血管のすべてから拡散するのではなく、ある特定部位つまり血管外スペースの突起部より選択的に

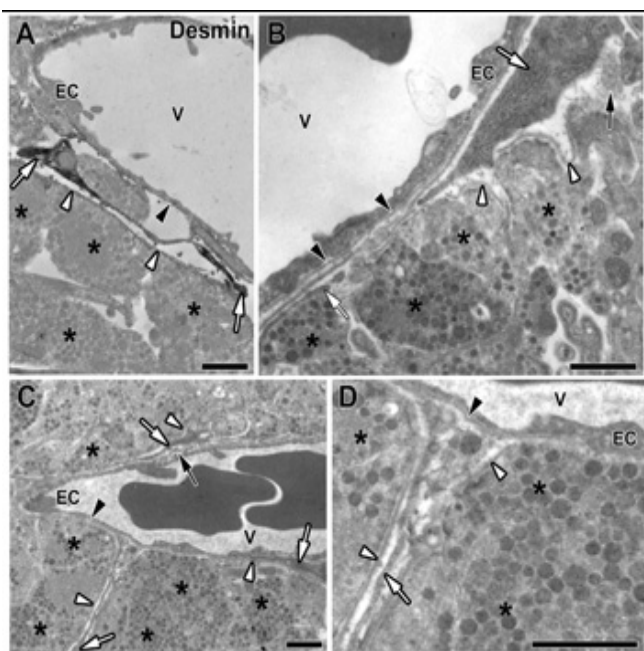


図 2. マウス下垂体後葉の血管系構築の電子顕微鏡観察
Desmin(ペリサイトマーカー)A; 血管外スペースに電子密度の高いDesmin 陽性ペリサイトが観察される。B; 血管外スペースにペリサイトが観察される C, D; まれであるが、ペリサイトの細胞質突起が顕著に伸長し、細長い血管外スペースを形成していることがわかる。

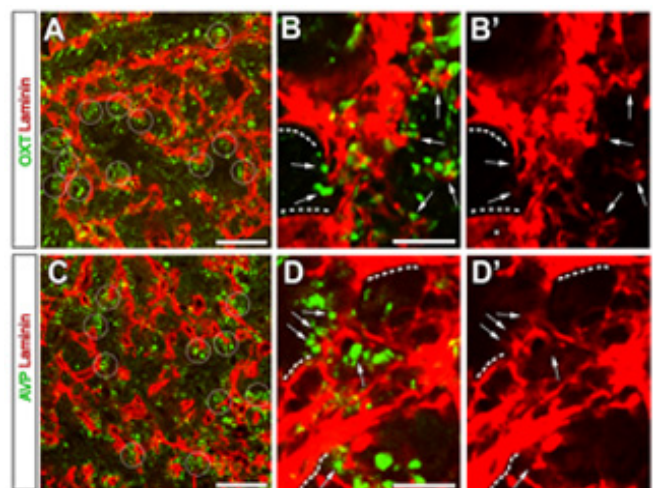


図 3. 血管外スペースの突起構造と神経終末部の位置関係
血管外スペースの突起にはオキシトシン(A, B, B')やバソプレッシン(C, D, D')の神経終末部が平坦な部位より高頻度で接触している。

拡散していることがわかった(図 4 A, B, C)。定量的解析の結果, 血管由来の FITC は下垂体後葉の血管外スペースの突起より有意に拡散していることが明らかになった(図 4 D)。

FITC の血管外スペースにおける透過性は, さらに FITC に対するモノクローナル抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察により調べた。その結果, レーザー顕微鏡観察と同様に血管外スペースの突起を通過していることが分かる(図 5)。この観察結果は, 下垂体後葉の血管外スペース突起は表面積を増やし, バソプレッシンやオキシトシンの神経終末部との接触頻度を増やすだけでなく, これらのペプチドの主たる拡散経路となっていることを示している。

次に, 高浸透圧負荷を与え慢性的にバソプレッシン分泌が増加する状態での下垂体後葉の血管系の構築を調べた。高浸透圧刺激は, マウスに 2% NaCl を 5 日間飲ませることで行った。2% NaCl を 5 日間飲ませ慢性的高浸透圧刺激を与えた場合, 血管外スペースの突起が細くなり, かつ数も増加し複雑になっていることがわかった(図 6 A)。高倍率で血管外スペースを観察すると, 細く長い血管外スペースの突起にはペリサイトの細胞質突起が存在していることがわかる。

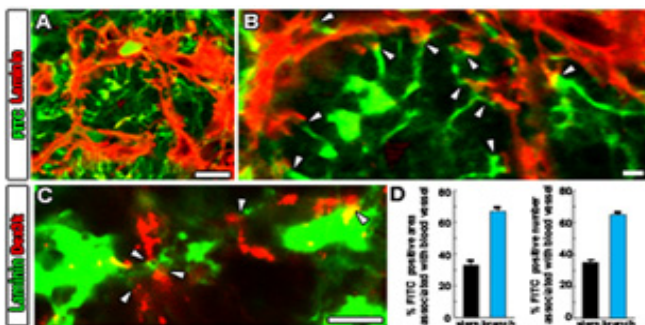


図 4. レーザー顕微鏡による血管外スペースの突起における血液由来 FITC の選択的血管透過性

麻酔科で心臓より PBS を灌流し血液成分を除いた後, 1 mg/ml の FITC を 5 分灌流し, 血管透過性を評価。FITC はタンパク質などのアミノ基に共有結合するので, 免疫組織化学の処理過程でも拡散や移動が生じない。血管外スペースの突起から血液由来の FITC がより選択的に透過していることがレーザー顕微鏡(A, B, C)とその定量からわかるバソプレッシン(D)。

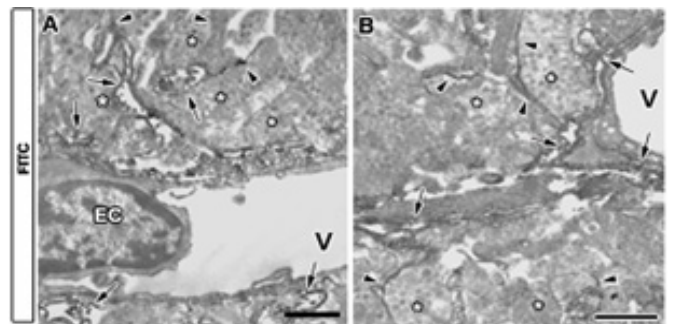


図 5. 電子顕微鏡を用いた血管外スペースの突起における血液由来 FITC の選択的血管透過性観察
血管外スペースの突起から血液由来の FITC (電子密度の高い) がより選択的に透過していることがわかる。

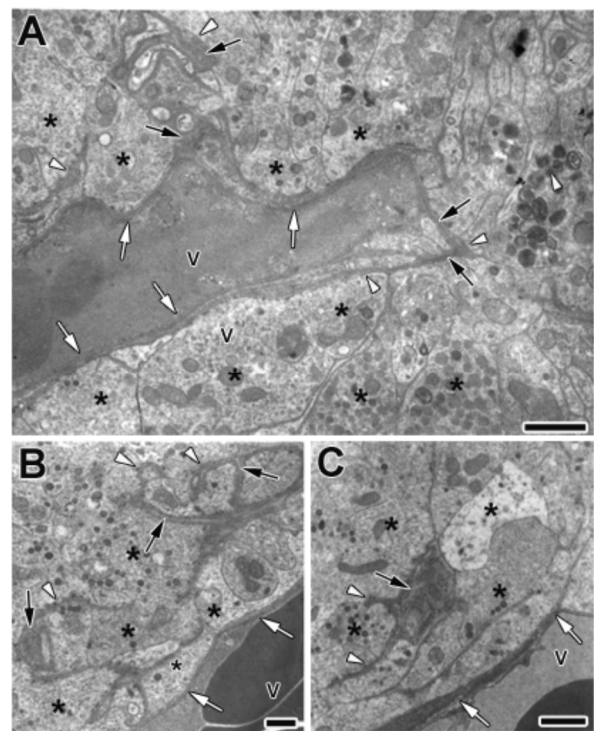


図 6. 慢性的 2% NaCl 負荷による高浸透圧刺激による下垂体後葉の血管系構造変化

マウスに 2% NaCl を 5 日間飲ませ慢性的高浸透圧負荷を与えると血管外スペースがより複雑になり, 突起も増加していることがわかる(A)。拡大図では, ペリサイトの細胞質突起が伸長することで血管外スペースが複雑になっていることを示している(B, C)。

電子顕微鏡画像を定量的に解析したところ、慢性の高浸透圧刺激を与えても血管径と内皮細胞の断面積には有意な変化が認められなかった(図 7 A)。一方、ペリサイトの断面積には変化が認められなかったが、基底膜の内膜と外膜の比率が有意に大きくなっていった(図 7 A)。このことは、血管外スペースの一番外側にある基底膜構造が複雑化していることを示している。慢性の高浸透圧刺激は、ペリサイトの断面積には影響しなかったが、マトリクスを減少させ、神経終末部の断面積を増加させた(図 7 B)。最も顕著な変化は、ペリサイトの断面積に対する周囲長の増加である(図 7 C)。ペリサイトの断面積は変化がない(図 7 B)、しかし周囲長との比率が大きくなることはペリサイトの大きさは変化していないが、突起が細くなり伸長、その結果血管外スペースが複雑化したことを示している。また、血管外スペースの突起数が増加していることから、ペリサイトの形態変化は突起伸長を伴うことを示している。

ペリサイトの形態変化は、光学顕微鏡を用いた観察でも認められた(図 8)。ペリサイトマーカーである Desmin の抗体を用いた DAB の免疫組織化学を行ったところ、ペリサイトの細胞質突起が細くなり、複雑化していた(図 8 A, B)。

定量的にペリサイトの細胞質突起数を計測したところ約 3 倍になっていることが分かった(図 8 C)。

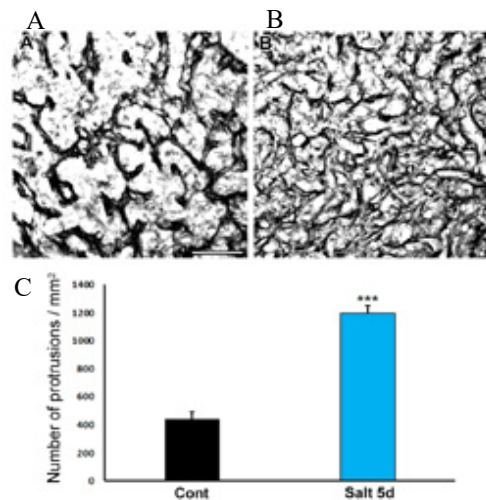


図 8. 慢性の 2% NaCl 負荷による高浸透圧刺激による下垂体後葉のペリサイトの形態変化

マウスに 2% NaCl を 5 日間飲ませ慢性の高浸透圧負荷を与えた場合の Desmin 陽性ペリサイトの形態(A, コントロール;B, 高浸透圧負荷)。定量的ペリサイトの細胞質突起数の計測(C)。

*** < 0.01 by student's t-test.

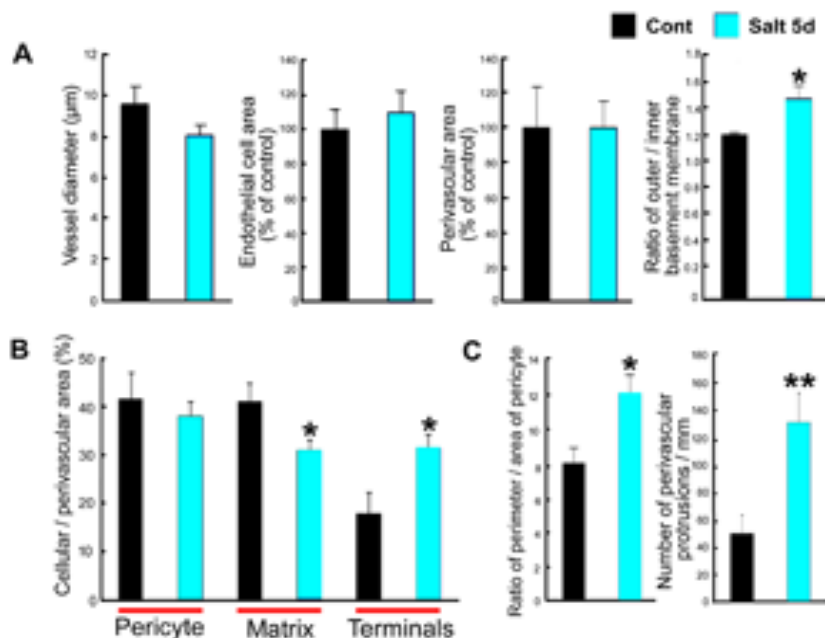


図 7. 慢性の 2% NaCl 負荷による高浸透圧刺激による下垂体後葉の血管系構造変化の定量

マウスに 2% NaCl を 5 日間飲ませ慢性の高浸透圧負荷を与えた場合の血管径(A)、内皮細胞断面積(A)、ペリサイト断面積(A)、基底膜の内膜と外膜の比率(A)、血管外スペース構成(B)、ペリサイトの周囲長さ/面積比率(C)、ペリサイト頻度(C)。

* < 0.05, ** < 0.01 by student's t-test.

最後に、このような下垂体後葉の血管系構造の変化は、血管透過性に反映しているかどうか調べた(図9)。2% NaCl 負荷を与え慢性的に高浸透圧刺激を与えるとコントロール群(図9A, A')に比べ3日(図9B, B')及び5日(図9C, C')で顕著な FITC の血管透過性の増加が観察された。定量的に、FITC の血管透過性を調べると有意な増加が認められた(図9D)。

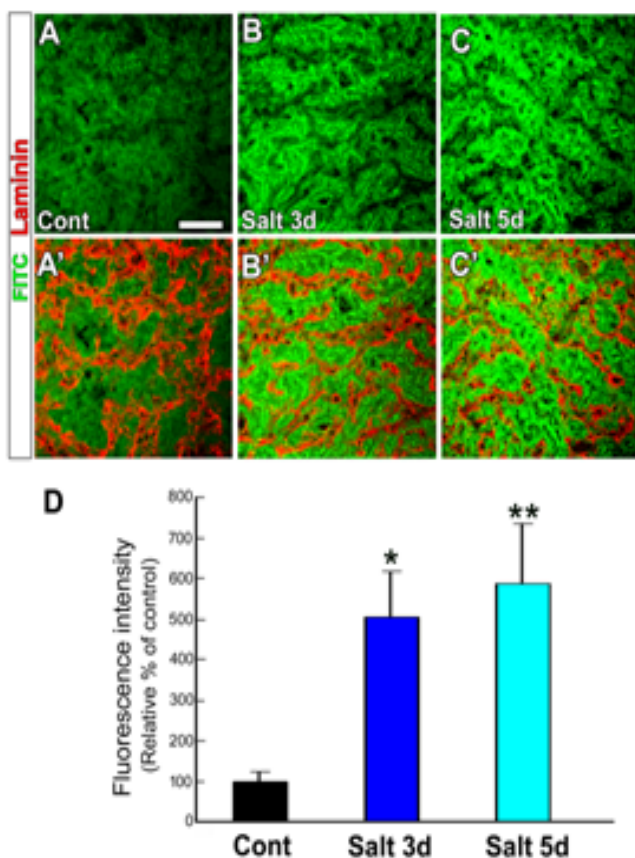


図9. 慢性的2% NaCl 負荷による高浸透圧刺激による血管透過性の変化

マウスに2% NaClを5日間飲ませ慢性的高浸透圧負荷を与えた場合のFITC血管透過性(A,A', コントロール;B,B', 高浸透圧負荷3日;C,C', 高浸透圧負荷5日)。定量的FITC血管透過性の計測(C)。* <0.05 , ** <0.01 by student's t-test.

4. 参考文献

- Miyata S, Takamatsu H, Maekawa S, Matsumoto N, Watanabe K, Kiyohara T, Hatton GI.(1999) Plasticity of neurohypophysial terminals with increased hormonal release during dehydration: ultrastructural and biochemical analyses. *J. Comp. Neurol.* 434:413-427.
- Miyata S, Hatton GI. (2002) Activity-related, dynamic neuron-glia interactions in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Microsc. Res. Tech.* 56:143-57.
- Miyata S, Morita S. (2011) A new method for visualization of endothelial cells and extravascular leakage in adult mouse brain using fluorescein isothiocyanate. *J. Neurosci. Meth.* 202:9-16.
- Miyata S. (2015) New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Front. Neurosci.* 9:390.
- Morita S, Miyata S. (2012) Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 349:589-603.
- Morita S, Miyata S. (2013) Accessibility of low-molecular-mass molecules to the median eminence and arcuate hypothalamic nucleus of adult mouse. *Cell Biochem. Funct.* 31:668-677.
- Morita S, Hourai A, Miyata S. (2014) Changes in pericytic expression of NG2 and PDGFRB and vascular permeability in the sensory circumventricular organs of adult mouse by osmotic stimulation. *Cell Biochem. Funct.* 32:51-61.
- Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, Miyata S. (2016) Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain.

Cell Tissue Res. 363:497-511.

Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K,
Wanaka A, Miyata S. (2015)

Vascular endothelial growth factor-dependent
angiogenesis and dynamic vascular plasticity in the
sensory circumventricular organs of adult mouse brain.

Cell Tissue Res. 2015 359:865-884.

Zlokovic BV. (2014)

Neurovascular pathways to neurodegeneration in
Alzheimer's disease and other disorders

Nat. Rev. Neurosci. 12:723-738.

Vascular Plasticity and Vasopressin Secretion in the Neurohypophysis

Seiji Miyata

Kyoto Institute of Technology

Summary

Hypothalamo-neurohypophysial system releases oxytocin (OXT) and vasopressin (AVP) from axonal terminals of the neurohypophysis into blood circulation for controlling body fluid homeostasis and lactation. The vasculature of the neurohypophysis (NH) has wider perivascular space as compared with that of the brains, but it is not completely unknown about functional significance of this wide perivascular space. In the present study, light and electron microscopic observation showed the presence of wide perivascular space between the inner and outer basement membrane and the profile of the outer basement membrane was complicated and rough. Interestingly, there observed perivascular protrusions that extended from perivascular space and accompanied with fine cellular processes of pericytes. OXT- and AVP-containing axonal terminals were likely to localize at these perivascular protrusions rather than smooth vascular surface. The fluorescence of blood-derived tracer molecule fluorescein isothiocyanate (FITC) was mostly seen around or within perivascular protrusion. Chronic salt loading with drinking of 2% NaCl significantly increased the number of perivascular protrusions and length of pericyte cellular processes. The salt loading increased vascular permeability of FITC and surface area of perivascular protrusion. Thus, the present study indicates that wide perivascular space acts as main diffusion route of OXT and AVP, contributes to increase of contact area between axonal terminals and the outer basement membrane of the vasculature, and is reconstructed in response to chronic physiological stimulation or demand of neuropeptide.