

体液シフトにおけるバゾプレッシンを主軸としたナトリウム・水バランス維持機構の解明

～新たな遺伝子改変ラットを用いた検討～

上田 陽一, 丸山 崇, 吉村 充弘

産業医科大学医学部第1生理学

概要 生体内のナトリウムおよび水分バランスは種々のホルモンや神経性の調節によって一定の範囲内に保持されている。本研究課題では、下垂体後葉ホルモンとして知られるバゾプレッシン (AVP) 分泌を主軸とした中枢性体液調節機構が腹腔内への体液シフトによってどのように駆動されるかを AVP-eGFP トランスジェニックラットを用いて明らかにすることを目的とした。

成熟雄性 AVP-eGFP トランスジェニックラットに 3%高張食塩水, ポリエチレングリコールおよび 0.9%生理食塩水(コントロール)を腹腔内に投与し, 直後(0 時間後), 3 時間後, 6 時間後, 12 時間後および 24 時間後の AVP-eGFP 緑色蛍光および Fos タンパクの発現を観察した。また, 各群の 3 時間後, 6 時間後の AVP mRNA, AVP hnRNA, eGFP mRNA および CRF mRNA の発現, 血中 AVP 濃度およびコルチコステロン濃度を測定した。

その結果, ポリエチレングリコール投与群で, 視床下部における AVP-eGFP の有意な増加が室傍核 (PVN) 大細胞群のみならず PVN 小細胞群でも見られた。Fos タンパクの発現を指標にポリエチレングリコール投与後長時間にわたり PVN 小細胞群の AVP-eGFP ニューロンが活性化していることを明らかにした。さらには, ポリエチレングリコール投与後の AVP hnRNA および eGFP mRNA の増加, CRF mRNA の増加も明らかにした。また, ポリエチレングリコール投与後に血漿 AVP 濃度のみならずコルチコステロン濃度も著増していることを確認した。

以上より, 長時間の腹腔内への体液シフトは, 視床下部 PVN 大細胞領域の AVP-eGFP ニューロンを活性化して血中 AVP 濃度の上昇を引き起こし, 同時に PVN 小細胞領域の AVP-eGFP ニューロンにおいて CRF とともに AVP 合成が亢進して視床下部—下垂体—副腎 (HPA) 軸の活性化により血漿コルチコステロン濃度を上昇させることが示唆された。

血漿浸透圧変化を伴わない腹腔内への体液シフトが視床下部 PVN 小細胞群の AVP ニューロンを活性化することにより HPA 軸を活性化した。一般に, この反応は慢性ストレスによる生理的反応であるが, 慢性的な腹腔内への体液シフトがなぜ HPA 軸を活性化して, 体液調節にどのような生理的な役割を担っているのかを明らかにすることが今後の課題である。

1. 研究目的

生体内のナトリウムおよび水分バランスは種々のホルモンや神経性の調節によって一定の範囲内に保持されている。

下垂体後葉ホルモンとして知られるバゾプレッシン (AVP) は, 視床下部室傍核 (PVN) および視索上核 (SON) に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され, 下垂体後葉に投射した軸索終末から活動

電位依存的に循環血液中に開口放出される。この AVP ニューロンの神経活動は, 血漿浸透圧・アンギオテンシン II などの循環関連ホルモンや末梢圧受容器による血圧・体液量の変化などの神経性情報によって調節されている。

血中 AVP は, V1a 受容体を介して血管収縮に作用し, V2 受容体およびアクアポリン 2 を介して腎臓からの水の再吸収を促進する。また, V1b 受容体を介して下垂体前

葉から AVP 分泌を引き起こすことも知られている。特に、慢性ストレス状態において PVN の小細胞性神経分泌ニューロンが CRF とともに AVP を産生し、正中隆起外層に投射した軸索終末から下垂体門脈に CRF および AVP を分泌し、下垂体前葉の ACTH 産生細胞に作用して ACTH 分泌を引き起こす。

臨床上用いられる腹膜透析は、高浸透圧物質である腹膜透析液を腹腔内に貯留し、その濃度勾配を使用して体内の不要な水分や老廃物を除去する腎代替療法である。AVP 分泌への影響が考えられるがその詳細は不明である。

本研究課題では、腹腔内への体液シフトによる AVP 分泌を主軸とした体液調節メカニズムについて、私たちが作出した AVP-eGFP トランスジェニックラット²⁾を用いて腹膜透析時の AVP を主軸とする中枢性体液調節を明らかにすることを目的とした。なお、AVP-eGFP トランスジェニックラットでは、脱水および食塩水の飲水負荷により AVP ニューロンの eGFP 緑色蛍光が著明に増加することから AVP 合成を敏感に捉えることができることを確認している^{2,3)}。

2. 研究方法

2.1 実験動物および血漿総タンパクおよびナトリウム濃度測定

実験には、AVP 遺伝子に eGFP 遺伝子を導入した融合遺伝子を用いて作出した雄性 AVP-eGFP トランスジェニックラット(7 週齢, 200~300 g)を用いた。AVP-eGFP トランスジェニックラットに、短時間除水効果のある透析液として 3%高張食塩水、長時間除水効果のある透析液としてポリエチレングリコールおよびコントロールとして 0.9%生理食塩水を腹腔内に投与した。それぞれのラットの採血した血液は、遠心分離後に総タンパク量および血漿ナトリウム濃度を測定した。

2.2 AVP ニューロンにおける AVP-eGFP 緑色蛍光の変化

3%食塩水、ポリエチレングリコールおよび 0.9%生理食塩水を腹腔内に投与後、直後(0 時間後)、3 時間後、6 時間後、12 時間後および 24 時間後(各群 6 匹)に深麻酔下にて採血および 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定し、脳を取り出し視床下部を含むブロックを作成した。後固定の後に、マイクロームを用いて視床下部を含む領域の脳切片(厚さ 30 μm)を作成した。蛍光顕微鏡を用いて、視床下部 PVN および SON の eGFP 蛍光を観察し、その蛍光強度を測定した。深麻酔下で開胸して 4%パラフォル

ムアルデヒド溶液で灌流固定を行い、脳および下垂体を取り出した。2 日間の後固定後、視床下部を含む薄切切片(30 μm)作成し、蛍光顕微鏡下で eGFP 緑色蛍光を観察した。

2.3 AVP ニューロンにおける Fos タンパクの発現

上述の SON および PVN を含む脳切片を用いて、Fos タンパクに対する抗体(ウサギポリクローナル抗体, sc-52, Santa Cruz Biotechnology)で蛍光免疫組織化学的染色法により Fos タンパクの発現を赤色蛍光(Alexa Fluor 546)を用いて可視化した。AVP-eGFP 緑色蛍光と Fos タンパク赤色蛍光を蛍光顕微鏡下でデジタル画像を撮影し、画像解析を行った。

2.4 AVP mRNA, AVP hnRNA, eGFP mRNA および CRF mRNA の発現の定量化

3%食塩水、ポリエチレングリコールおよび 0.9%生理食塩水を腹腔内に投与後、3 時間後、6 時間後(各群 6 匹)に断頭して脳を素早く取り出し、ドライアイス上で凍結後、クリオスタット(-20°C)にて凍結切片(12 μm)を作成し、スライドガラス上に貼り付けて、ホットプレート上で乾燥させた。デープフリーザー(-80°C)に保管した脳切片を用いて、脱水、脱脂等を行い、AVP mRNA, AVP hnRNA, eGFP mRNA および CRF mRNA 検出用の相補的合成オリゴ DNA プローブにて *in situ* hybridization histochemistry を行った。それぞれの mRNA 発現量をイメージング画像解析プログラムにより半定量化した。

2.5 血中 AVP およびコルチコステロン濃度

3%食塩水、ポリエチレングリコールおよび 0.9%生理食塩水を腹腔内に投与後、3 時間後、6 時間後(各群6匹)に断頭して体幹血を採取し、遠心分離後に血漿 AVP およびコルチコステロン濃度を測定した。AVP 濃度測定には RIA 法、コルチコステロン濃度測定には ELISA 法を用いた。

3. 研究結果

実験結果は以下の通りである。

3.1 漿総タンパクおよびナトリウム濃度の経時変化

3%食塩水、ポリエチレングリコールおよび 0.9%生理食塩水を腹腔内に投与後、直後(0 時間後)、3 時間後、6 時間後、12 時間後および 24 時間後における血中総タンパク濃度は、ポリエチレングリコール投与群で 3 時間後、6 時間後および 12 時間後で有意に上昇したが、その他の群では有意な変化は見られなかった(**Table 1**)。一方、血漿

ナトリウム濃度は、3%食塩水投与群で3時間後に有意に上昇したが、その他の群では有意な変化は見られなかった(**Table 1**)。

3. 2 AVP ニューロンにおける AVP-eGFP 緑色蛍光の変化

ポリエチレングリコール投与群で、3時間後には視床下部 PVN(大細胞群および小細胞群)および SON で AVP-eGFP 緑色蛍光が有意に増加し、PVN(大細胞群および小細胞群)では6時間後まで有意な増加が続いた。一方、その他の群では有意な変化は見られなかった(**Fig. 1**)。

3. 3 AVP ニューロンにおける Fos タンパクの発現

AVP-eGFP ニューロンへの Fos タンパクの発現は、ポリエチレングリコール投与群で3時間後および6時間後まで視床下部 PVN(大細胞群および小細胞群)および SON で有意に増加した。一方、3%食塩水投与群では3時間後に視床下部 PVN(大細胞群および小細胞群)および SON で有意に増加した。0.9%生理食塩水投与群では有意な変化は見られなかった(**Fig. 2**)。

3. 4 AVP mRNA, AVP hnRNA, eGFP mRNA および CRF mRNA の発現の定量化

AVP mRNA は、視床下部 PVN(大細胞群および小細胞群)および SON でいずれの群においても有意な変化はなかった(**Fig. 3**)。AVP hnRNA および eGFP mRNA は、3%食塩水、ポリエチレングリコール投与群で視床下部 PVN(大細胞群および小細胞群)および SON で有意に増加した(**Fig. 3**)。CRF mRNA は、3%食塩水、ポリエチレングリコール投与群で6時間後に視床下部 PVN(小細胞群)で有意に増加した(**Fig. 3**)。

Table 1. Plasma total protein and Na after intraperitoneal administration

Plasma total protein (g/dL)					
	0h	3h	6h	12h	24h
Saline i.p.	6.1 ± 0.12	6.0 ± 0.06	5.5 ± 0.06	5.9 ± 0.12	6.3 ± 0.11
HTN i.p.	6.3 ± 0.13	6.1 ± 0.23	5.8 ± 0.07	6.2 ± 0.07	6.2 ± 0.09
PEG i.p.	6.2 ± 0.15	7.3 ± 0.34**	7.4 ± 0.78*	6.8 ± 0.36*	6.0 ± 0.21
Plasma Na (mEq/L)					
	0h	3h	6h	12h	24h
Saline i.p.	149 ± 0.6	148 ± 0.6	148 ± 1.1	145 ± 1.1	146 ± 1.1
HTN i.p.	150 ± 1.0	154 ± 1.1**	149 ± 0.6	147 ± 1.1	145 ± 0.8
PEG i.p.	146 ± 0.8	150 ± 0.7	150 ± 0.8	148 ± 1.0	145 ± 0.7

Values are represented as means ± SE. HTN, hypertonic saline; PEG, polyethylene glycol. *P<0.05, **P<0.01 vs. saline

3. 5 血中 AVP およびコルチコステロン濃度

血漿 AVP 濃度は、ポリエチレングリコール投与後、3時間後および6時間後に有意に増加した(**Fig. 4**)。一方、血漿コルチコステロン濃度は、ポリエチレングリコール投与群で6時間後に著明に増加した(**Fig. 4**)。

4. 考察

腹腔内への体液シフトによる AVP 分泌を主軸とした体液調節メカニズムの一端を明らかにする目的で、AVP-eGFP トランスジェニックラットを用いて AVP ニューロンの動態を検討した。腹腔内への体液シフトには長時間除水効果のある透析液としてポリエチレングリコールを腹腔内に投与し、短時間除水効果のある透析液として3%食塩水を腹腔内に投与し、それらの動物モデルが作成できていることを血中総タンパク濃度およびナトリウム濃度の測定により確認した。

ポリエチレングリコール投与群で、視床下部における AVP-eGFP の有意な増加が PVN 大細胞群のみならず PVN 小細胞群でも見られた。Fos タンパクの発現を指標にポリエチレングリコール投与後長時間にわたり PVN 小細胞群の AVP-eGFP ニューロンが活性化していることを明らかにした。さらには、ポリエチレングリコール投与後の AVP hnRNA および eGFP mRNA の増加、CRF mRNA の増加も明らかにした。また、ポリエチレングリコール投与後に血漿 AVP 濃度のみならずコルチコステロン濃度も著増していることを確認した。

以上より、長時間の腹腔内への体液シフトは、視床下部 PVN 大細胞領域の AVP-eGFP ニューロンを活性化して血中 AVP 濃度の上昇を引き起こし、同時に PVN 小細胞領域の AVP-eGFP ニューロンにおいて CRF とともに AVP 合成が亢進して視床下部一下垂体—副腎(HPA)軸の活性化により血漿コルチコステロン濃度を上昇させることが示唆された⁵⁾。

5. 今後の課題

血漿浸透圧変化を伴わない腹腔内への体液シフトが視床下部 PVN 小細胞群の AVP ニューロンを活性化することにより HPA 軸を活性化することが示唆された。一般に、この反応は慢性ストレスによる生理的反応⁴⁾であるが、慢性的な腹腔内への体液シフトがなぜ HPS 軸を活性化して、体液調節にどのような生理的な役割を担っているのかを明らかにすることが今後の課題である。

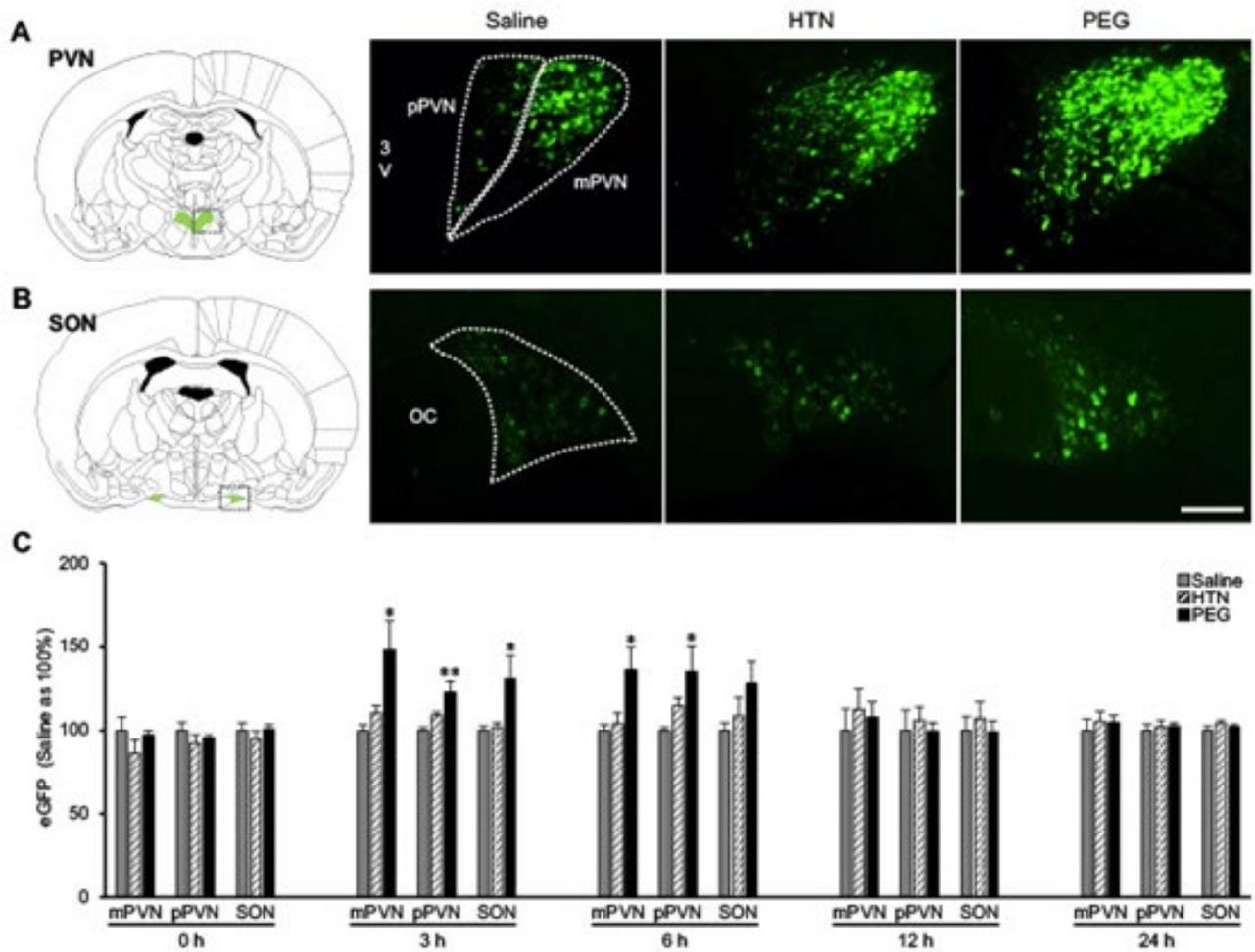


Fig. 1. AVP-eGFP fluorescent intensity after intraperitoneal administration

An AVP-eGFP in the PVN (A) and SON (B) at 6 h after i.p. administration of saline, HTN, and PEG in AVP-eGFP transgenic rats. AVP-eGFP intensities were analyzed in the mPVN, pPVN, and SON at 0, 3, 6, 12, or 24 h after i.p. administration of saline, HTN, or PEG (C). mPVN: magnocellular division of the paraventricular nucleus; pPVN: parvocellular division of the paraventricular nucleus; OC: optic chiasm; 3V: third ventricle. Scale bar, 100 μ m. Data are presented as mean \pm SEM (n = 6 each). *P<0.05, **P<0.01 vs. saline at the same time point.

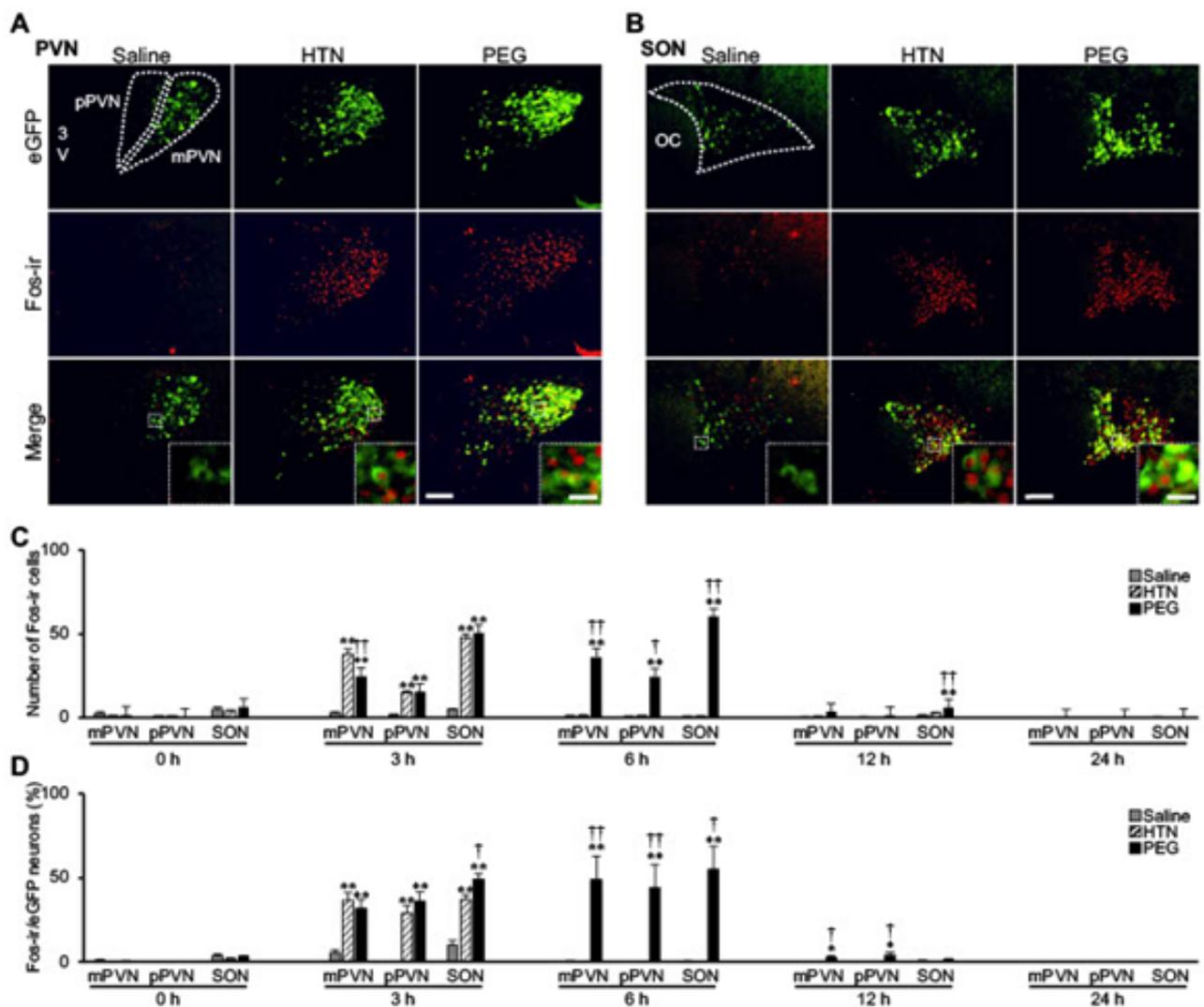


Fig. 2. Fos-ir in the AVP-eGFP neurons after intraperitoneal administration

Images of an AVP-eGFP and fluorescent immunohistochemistry for Fos in the PVN (A) and SON (B) in AVP-eGFP transgenic rats at 3 h after i.p. administration of saline, HTN, or PEG. Rectangles encompassed by white dotted line are enlarged in the merged images. Scale bars, 100 μ m and 20 μ m (in magnified images). The number of Fos-ir neurons in the mPVN, pPVN, and SON at 0, 3, 6, 12, and 24 h after i.p. administration of saline, HTN, and PEG (C). The percentages of eGFP neurons co-expressed with Fos-ir are also represented (D). Data are presented as mean \pm SEM (n = 6 each). *P<0.05, **P<0.01 vs. saline at the same time point. †P<0.05, ††P<0.01 vs. HTN at the same time point.

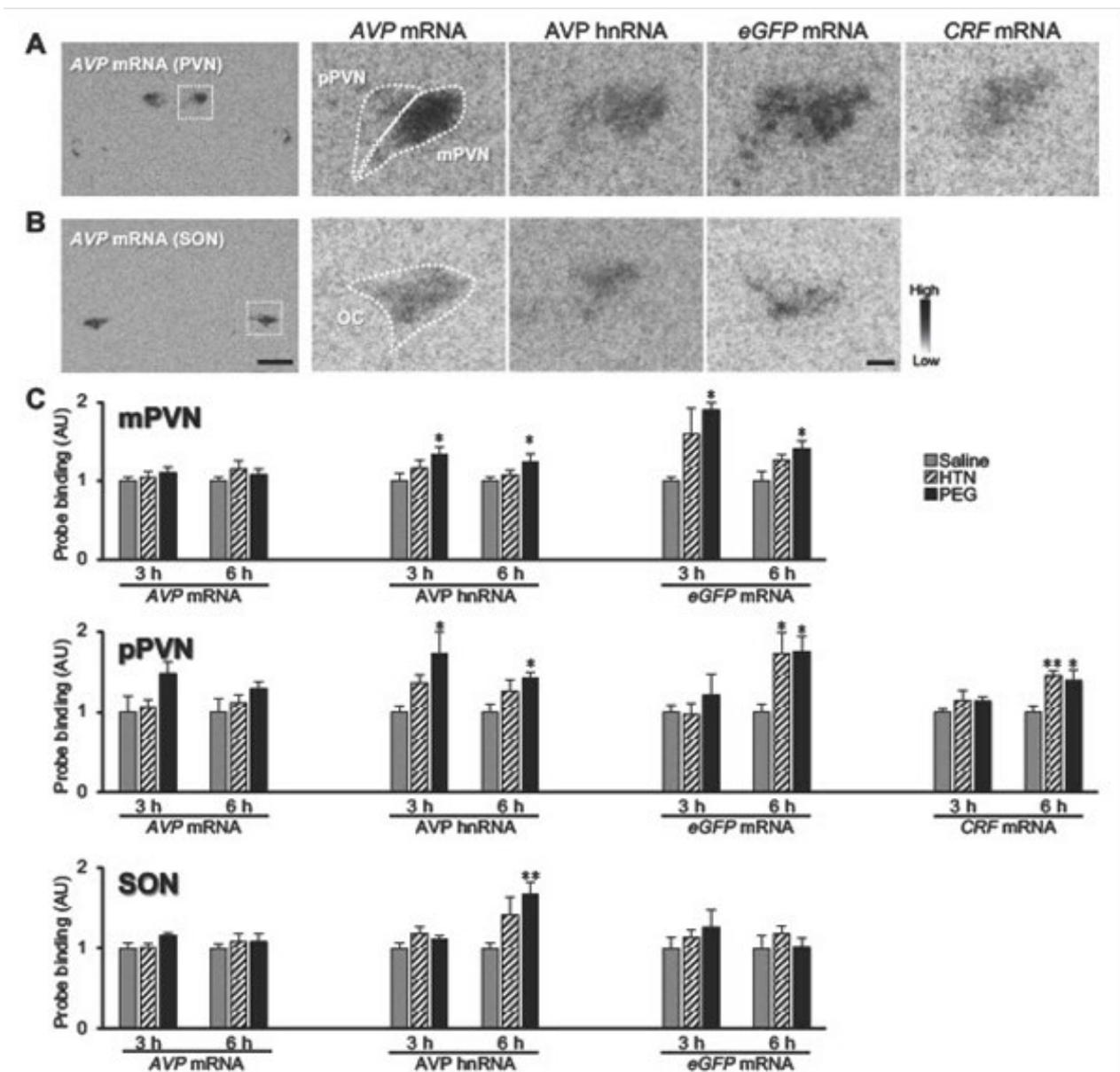


Fig. 3. Fos-ir in the AVP-eGFP neurons after intraperitoneal administration

Images of an AVP-eGFP and fluorescent immunohistochemistry for Fos in the PVN (A) and SON (B) in AVP-eGFP transgenic rats at 3 h after i.p. administration of saline, HTN, or PEG. Rectangles encompassed by white dotted line are enlarged in the merged images. Scale bars, 100 μ m and 20 μ m (in magnified images). The number of Fos-ir neurons in the mPVN, pPVN, and SON at 0, 3, 6, 12, and 24 h after i.p. administration of saline, HTN, and PEG (C). The percentages of eGFP neurons co-expressed with Fos-ir are also represented (D). Data are presented as mean \pm SEM (n = 6 each). *P<0.05, **P<0.01 vs. saline at the same time point. †P<0.05, ††P<0.01 vs. HTN at the same time point.

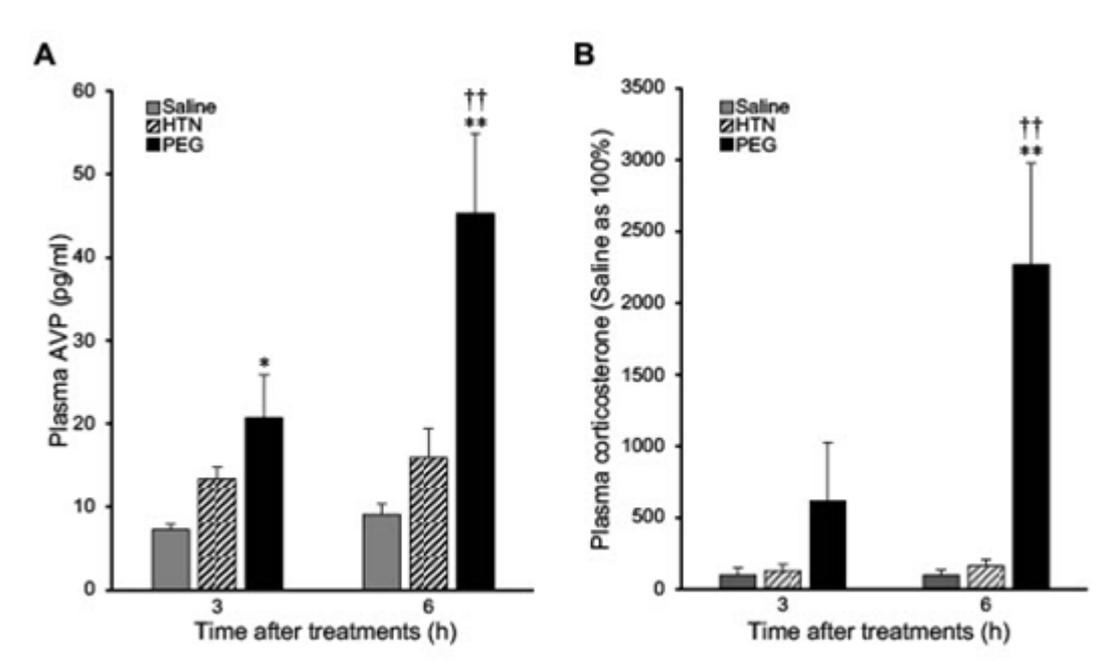


Fig. 4. Plasma AVP and corticosterone levels after intraperitoneal administration

Plasma AVP (A) and corticosterone (B) at 3 or 6 h after i.p. administration of saline, HTN, or PEG. Data are presented as mean \pm SEM (n = 6 each). *P<0.05, **P<0.01 vs. saline at the same time point. ††P<0.01 vs. HTN at the same time point.

6. 文献

- Rivier C, Vale W, Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo, *Endocrinology*. 113 (1983) 939-942.
- Ueta Y, Fujihara H, Serino R, Dayanithi G, Ozawa H, Matsuda K, Kawata M, Yamada J, Ueno S, Fukuda A, Murphy D, Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat, *Endocrinology*. 146 (2005) 406-413.
- Fujio T, Fujihara H, Shibata M, Yamada S, Onaka T, Tanaka K, Morita H, Dayanithi G, Kawata M, Murphy D, Ueta Y, Exaggerated response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene to salt loading without disturbance of body fluid homeostasis in rats, *J. Neuroendocrinol.* 18 (2006) 776-785.
- Itoi K, Helmreich DL, Lopez-Figueroa MO, Watson SJ, Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene transcription in the hypothalamus by norepinephrine, *J. Neurosci.* 19 (1999) 5464-5472.
- Sanada K, Ueno H, Miyamoto T, Baba K, Tanaka K, Nishimura H, Nishimura K, Sonoda S, Yoshimura M, Maruyama T, Onaka T, Otsuji Y, Kataoka M, Ueta Y, AVP-eGFP was significantly upregulated by hypovolemia in the parvocellular division of the paraventricular nucleus in the transgenic rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 322 (2022) R161-R169.

Effects of Body Fluid Shift on Sodium/Water Balance Homeostasis by Vasopressin System, Using a Novel Genetically Modified Rat

Yoichi Ueta, Takashi Maruyama and Mitsuhiro Yoshimura

Department of Physiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health

Summary

Sodium and water balance in the body is maintained within a certain range by various hormonal and neuronal regulations. In this study, we aimed to elucidate how the central body fluid homeostasis, which is mainly regulated by arginine vasopressin (AVP) that is known as a posterior pituitary hormone is driven by fluid shift into the peritoneal cavity, using AVP-eGFP transgenic rats.

Adult male AVP-eGFP transgenic rats were intraperitoneally administered with 3% hypertonic saline, polyethylene glycol and 0.9% saline as control. AVP-eGFP fluorescent intensities, Fos protein expression were measured quantitatively at 0, 3, 6, 12, and 24 hours after administration. AVP mRNA, AVP hnRNA, eGFP mRNA, and CRF mRNA in the hypothalamus, plasma AVP and corticosterone levels were also measured at 3 and 6 hours in each group.

The results showed that the polyethylene glycol-treated group showed a significant increase in AVP-eGFP in the hypothalamus, not only magnocellular division but also parvocellular division of the paraventricular nucleus (PVN). In particular, the parvocellular PVN neurons were activated for a long time after polyethylene glycol treatment. Furthermore, we also found an increase in AVP hnRNA, eGFP mRNA and CRF mRNA after polyethylene glycol administration. We also confirmed that not only plasma AVP but also corticosterone level was markedly increased after polyethylene glycol administration.

These results suggest that prolonged fluid shift into the abdominal cavity activates AVP-eGFP neurons in the magnocellular division of the PVN caused an increase in plasma AVP concentration, and that AVP synthesis as well CRF is simultaneously enhanced in the parvocellular division of the PVN. Fluid shift into the abdominal cavity without plasma osmotic changes activated the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis by activating the AVP neurons of the parvocellular division of the PVN. In general, this response is a physiological response to chronic stress, but it remains to be clarified why chronic fluid shift into the abdominal cavity activates the HPA axis and what physiological role it plays in fluid regulation.