

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18998

研究課題名(和文) 脳内ナトリウムセンサーを介した血圧調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of blood pressure control through brain sensor of sodium concentration in body fluids

研究代表者

野村 憲吾 (Nomura, Kengo)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：10734519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食塩の過剰摂取により体液中のナトリウム濃度が上昇すると血圧が上昇するが、その機序は不明である。研究代表者は、脳内ナトリウムセンサーNaxが脳脊髄液中のナトリウム濃度上昇を感知し、交感神経の活性化を介して血圧を上昇させている可能性を調べた。野生型マウスとNax遺伝子欠損マウスの体液中ナトリウム濃度を上昇させ、血圧を測定した。また、ナトリウムによる血圧上昇を担う脳内分子メカニズムの探索をおこなった。本研究は、食塩感受性高血圧の発症に関与する脳内Na<sup>+</sup>センサーの同定につながるものであり、新たな薬剤標的分子の提示などを通じて、食塩感受性高血圧の治療に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Salt-sensitive hypertension is characterized by exaggerated increment in blood pressure during high salt intake. Although increment of sodium concentration in body fluids during high salt intake could be involved in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension, the mechanism is unknown. I hypothesized that brain sodium sensor Nax senses increased sodium concentration in cerebrospinal fluid, and then elevates blood pressure via activation of sympathetic nervous system. To reveal that Nax is involved in blood pressure regulation, I induced elevation of sodium concentration in body fluids, and compared blood pressure of wild type mice and Nax-knockout mice. In addition, I tried to elucidate the brain mechanisms mediating salt-induced blood pressure elevation. This study could identify the central sodium sensor involved in salt-sensitive hypertension and contribute to the development of the therapeutics through the presentation of a novel drug target.

研究分野：神経科学

キーワード：食塩 血圧 交感神経

## 1. 研究開始当初の背景

食塩の過剰摂取が高血圧のリスク因子であることは古くから知られている。食塩と血圧の関係には個人差があり、食塩摂取により血圧が上昇しやすい体質を食塩感受性と呼ぶ。食塩感受性の高血圧に関する膨大な研究の成果から、食塩感受性体質のおもな要因が腎臓の  $\text{Na}^+$  排泄障害であることがわかり、体内への  $\text{Na}^+$  貯留が血圧上昇を引き起こしている、と考えられるようになった (Sanada et al., *Curr Hypertens Rep.* 2011)。その機序としては、 $\text{Na}^+$  が細胞外液の主要な浸透圧物質であるため、体内に貯留すると水分が細胞外へ引き込まれ、循環血液量が増加することで血圧が上昇している、と言われてきた。

これに加えて近年では、 $\text{Na}^+$  が交感神経系の活動を活性化させることで、ノルアドレナリンによる血管収縮を起こし、高血圧を引き起こしていることが明らかになってきた (Fujita et al., *Curr Hypertens Rep.* 2013)。これまでに、高張  $\text{Na}^+$  溶液を注入して血液中の  $\text{Na}^+$  濃度を強制的に上昇させると、交感神経系の活性化を介して血圧が上昇することが報告されている。また、高張  $\text{Na}^+$  溶液を脳室内に注入した場合にも、交感神経系の活性化を介して血圧が上昇することから、脳内に血圧制御のための  $\text{Na}^+$  濃度センシング機構が存在すると考えられる (Kawano et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1984)。しかし、 $\text{Na}^+$  濃度の上昇を感知して交感神経の活性化を誘発する脳内  $\text{Na}^+$  センサーの分子実体は明らかになっていない。センサーが判らないために、感知がおこなわれている神経核を同定できず、その下流で交感神経系を活性化する神経機構も不明のままである。

研究代表者の所属研究室では、脳に発現する  $\text{Na}^+$  チャンネルである  $\text{Na}_x$  が、細胞外  $\text{Na}^+$  濃度依存的に開口する  $\text{Na}^+$  濃度センサーであり、血液や脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度上昇を感知して塩分摂取行動を制御する機能を持つことを報告してきた (Watanabe et al., *J Neurosci.* 2000; Hiyama et al., *Nat Neurosci.* 2002)。現時点で、生理的な範囲の  $\text{Na}^+$  濃度変化を感知することがわかっている分子は  $\text{Na}_x$  以外にない。研究代表者の予備実験の結果、 $\text{Na}_x$  が血圧制御に関与している可能性が示唆された。しかし、 $\text{Na}_x$  による血圧調節が食塩の過剰摂取により起こる血圧上昇に関与しているかどうかはよくわかっておらず、 $\text{Na}_x$  による血圧調節メカニズムも不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、食塩感受性高血圧の病態に関与すると考えられる、脳内  $\text{Na}^+$  感知メカニズムの解明である。そのために、 $\text{Na}_x$  による血圧調節が食塩の過剰摂取により起こる血圧上昇に関与しているかどうかを明らかにするとともに、 $\text{Na}_x$  による血圧調節の分子メカニズムを解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

研究はおもに、野生型マウスと  $\text{Na}_x$  遺伝子欠損 ( $\text{Na}_x$ -KO) マウスを用いておこなった。まず、食塩の過剰摂取や高張  $\text{Na}^+$  溶液の注入をおこなってマウスの体液中  $\text{Na}^+$  濃度を上昇させ、血圧の変化を調べた。次に、 $\text{Na}_x$  の発現部位、および血圧制御に関与することが知られる神経核の中から、体液中  $\text{Na}^+$  濃度の上昇に応答して活性化するニューロンを探索した。活性化の指標として、ニューロンの活性化マーカーである c-Fos を用いた。さらに、活性化していたニューロンが血圧制御に実際に関与しているか、オプトジェネティクス的手法によるニューロンの選択的活性化実験で調べた。その後、 $\text{Na}_x$  がどのようにして血圧制御ニューロンを活性化させているのか調べた。 $\text{Na}_x$  はグリア細胞に発現しているため、ニューロンへ情報を伝達するために何らかの分泌因子を利用していると考えられた。そこで、 $\text{Na}_x$  発現細胞が、細胞外  $\text{Na}^+$  濃度の上昇に応答して放出する分子を探索し、ニューロンの活性化や血圧を制御する機能があるか調べた。以上の研究を通じて、 $\text{Na}_x$  による血圧調節の分子メカニズム解明を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) 体液中 $\text{Na}^+$ 濃度の上昇に応答した血圧上昇への $\text{Na}_x$ の関与

まず、マウスに対して食塩を強制的に過剰摂取させ、体液中の  $\text{Na}^+$  濃度を上昇させる実験をおこなった。マウスの飲み水を 2% の高張食塩水に交換して 7 日間飼育すると、血液、および脳脊髄液中の  $\text{Na}^+$  濃度は有意に上昇した。このときの血圧を、体内埋め込み式の血圧測定プローブを用いて測定した。この測定方法では、左総頸動脈内に留置した圧力センサーで取得した血圧データを、マウス皮下に埋め込んだ無線送信器を通じて解析装置に転送する。そのため、非拘束、無麻酔、自由行動下のマウスで持続的に血圧データを取得することが可能である。野生型マウスを用いて実験をおこない、食塩を強制的に過剰摂取させると血圧が上昇することを確認した。さらに、この血圧上昇が交感神経系の活性化によるものであるかどうか、自律神経節の神経伝達を阻害するクロリソングダミンを用いて調べた。クロリソングダミンを腹腔内に注入すると、全身の交感神経活動が著しく阻害されるため、顕著な血圧低下が起こる。この血圧低下の度合いが大きいほど、交感神経の活動が亢進していたと評価できる。この方法を用いて調べたところ、食塩の過剰摂取により、交感神経活動の活性化による血圧上昇が起こっていることがわかった。その後、 $\text{Na}_x$ -KO マウスを用いて同様の実験をおこない、野生型マウスと比較した。

次に、マウスの腹腔内に高張食塩水を注入し、体液中の  $\text{Na}^+$  濃度を急速に上昇させる実験をおこなった。野生型マウスの腹腔内に高

張食塩水を注入すると、血液、および脳脊髄液中の  $\text{Na}^+$  濃度が速やかに上昇した。このときの血圧変化を、麻酔下のマウスで測定した。マウスに麻酔導入後、頸部の外皮を切開して左総頸動脈を露出させ、動脈内に圧力センサーを留置したのち、速やかに皮膚を縫合した。保温パッドと白熱電球を用いてマウス直腸温を  $37.5$  に維持した状態で 30 分以上置いたのち、実験を開始した。野生型マウスでは、腹腔内への高張食塩水注入により血圧が顕著に上昇した。この血圧上昇は、クロリソングダミンの事前投与により抑制されたことから、交感神経系の活性化が関与していることがわかった。その後、 $\text{Na}_x$ -KO マウスを用いて同様の実験をおこない、野生型マウスと比較した。

さらに、マウスの脳室内に  $\text{Na}$  を高濃度を含む人工脳脊髄液を注入し、脳脊髄液中の  $\text{Na}^+$  濃度を急速に上昇させる実験をおこなった。脳室への溶液注入は、先端が側脳室に到達するように留置しておいたガイドカニューラを通じておこなった。野生型マウスの脳室に高張  $\text{Na}$  溶液を注入すると、脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度は、食塩の過剰摂取したとき、および高張食塩水を腹腔内に注入したときと同レベルまで上昇した。血圧は、高張  $\text{Na}$  溶液の脳室内注入にともなって速やかに上昇し、脳室内注入が持続しているあいだは高値が維持された。この血圧上昇は、クロリソングダミンの事前投与により抑制されたことから、交感神経系の活性化が関与していると考えられた。加えて、高張  $\text{Na}$  溶液の脳室内注入にともなって交感神経活動が活性化するか調べるため、交感神経線維の電気活動の直接記録をおこなった。この実験は、麻酔下のマウスを用いておこなった。マウスに麻酔導入後、後腹膜を切開して左の腰部交感神経線維を露出し、接触させた電極から電気活動を記録した。保温パッドと白熱電球を用いてマウス直腸温を  $37.5$  に維持した状態で 30 分以上置いたのち、実験を開始した。その結果、高張  $\text{Na}$  溶液の脳室内注入にともなって交感神経活動は亢進し、このタイムコースは血圧変化と一致していた。この実験から、脳内に  $\text{Na}^+$  濃度の感知機構が存在し、交感神経活動を活性化させることで血圧を上昇させていることが確認された。その後、 $\text{Na}_x$ -KO マウスを用いて同様の実験をおこない、野生型マウスと比較した。

## (2) 体液中 $\text{Na}^+$ 濃度の上昇に応答した血圧上昇を担う神経回路の探索

まず、血圧制御のための  $\text{Na}^+$  感知領域の特定をおこなった。 $\text{Na}_x$  は、脳内ではおもに脳弓下器官 (SFO) と終板脈管器官 (OVL) に発現している。SFO と OVL は両者とも、血液脳関門がなく、脳室に面している神経核であるため、体液中の  $\text{Na}^+$  濃度感知に適した領域である。加えて、交感神経活動の制御中枢に神経投射を持つことも知られており、 $\text{Na}^+$  に

応答した交感神経性の血圧上昇を担う領域であることが予想された。SFO あるいは OVL を電気的に破壊したマウスを作製して、高張  $\text{Na}$  溶液の脳室内注入実験をおこなったところ、OVL を破壊したマウスにおいて、交感神経性の血圧上昇が顕著に抑制された。したがって、血圧制御のための主要な  $\text{Na}^+$  感知領域は OVL であると考えられた。

次に、OVL の下流で  $\text{Na}^+$  に応答した血圧制御を担う神経回路の探索をおこなった。先行研究から、OVL の投射先のなかには、交感神経の制御中枢である視床下部室傍核 (PVN) があることが知られている。そこで、神経軸索の終末から取り込まれる性質を持つトレーサー (逆行性トレーサー) を PVN に局所注入し、PVN に投射している OVL ニューロン [OVL (PVN) ニューロン] を特異的に標識した。この標識をおこなったマウスに食塩を過剰摂取させ、標識ニューロンが活性化しているか調べた。ニューロンの活性化マーカーとして c-Fos を用いて調べたところ、食塩を過剰摂取させたマウスで c-Fos 陽性となる OVL (PVN) ニューロンが増加していた。このニューロンは、体液中  $\text{Na}^+$  濃度の上昇に応答して活性化すると考えられたので、急性脳スライスを用いた電気生理学的実験をおこない、細胞外  $\text{Na}^+$  濃度の上昇に応じて活性化するかを調べた。 $\text{Na}_x$ -KO マウスを用いて同様の実験をおこない、OVL (PVN) ニューロンの活性化に  $\text{Na}_x$  が関与するか調べた。さらに、OVL (PVN) ニューロンが実際に交感神経系の活性化を介した血圧上昇を引き起こすかどうか、オプトジェネティクスで検証した。神経軸索の終末から取り込まれる性質を持つウイルスベクター (HiRet) を PVN 局所注入し、OVL (PVN) ニューロンに光活性化チャンネル ChR2 を発現させた。このマウスの OVL に光ファイバーを用いて青色光を照射すると、OVL (PVN) ニューロンを活性化させることができる。この刺激をおこなったときの血圧変化を調べた。

さらに、PVN の下流の神経回路の検討もおこなった。PVN の投射先のなかには、心血管系の交感神経活動を制御する中枢神経核である延髄吻側腹外側野 (RVLM) があることが知られている。そこで、逆行性トレーサーを RVLM に局所注入し、RVLM に投射している PVN ニューロン [PVN (RVLM) ニューロン] を特異的に標識した。この標識をおこなったマウスに食塩を過剰摂取させ、c-Fos 陽性となる PVN (RVLM) ニューロンが増加しているか調べた。加えて、RVLM で c-Fos 陽性となるニューロンが増加しているかについても調べた。

## (3) $\text{Na}_x$ が血圧制御ニューロンを活性化させ

## るメカニズムの解明

OVLT において、 $\text{Na}_x$  はグリア細胞（上皮細胞およびアストロサイト）に発現している。したがって、なんらかのグリオトランスミッターが  $\text{Na}^+$  に応答した OVLT( PVN)ニューロンの活性化を仲介していると考えられた。そこで、 $\text{Na}_x$  発現細胞が、細胞外  $\text{Na}^+$  濃度の上昇に応答して放出する分子を探索した。マウスの脳から取り出した OVLT 組織を等張溶液あるいは高張 Na 溶液中で培養し、高張 Na 溶液中に増加してくる分子を調べた。いくつかの候補分子の中に、OVLT( PVN)ニューロンの活性化に関与するものがあるか、急性脳スライスを用いた電気生理学的実験で調べ、グリオトランスミッターを特定した。さらに、この分子に応答して活性化することが知られているタンパク質 X が OVLT( PVN)ニューロンに発現しているかどうか、免疫染色で調べた。その後、タンパク質 X の阻害剤を OVLT に局所注入し、 $\text{Na}^+$  に応答した血圧上昇が抑制されるかどうか調べるとともに、タンパク質 X の活性化剤を OVLT に局所注入し、血圧上昇が起こるか確認した。

本研究では、研究期間内に上記の実験を実施した。これは、血圧調節に関与する  $\text{Na}^+$  センサーの同定につながるものである。今後、脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度上昇に応答した血圧上昇や、食塩感受性高血圧の発症に関与する脳内  $\text{Na}^+$  センサーの分子実体を明らかにすることができれば、新たな治療標的分子の提示を通じて食塩感受性高血圧の治療に貢献できる可能性がある。加えて、体内  $\text{Na}^+$  貯留と交感神経系の活性化をつなぐ脳内メカニズムを包括的に解明することが可能になる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野村 憲吾 (NOMURA, Kengo)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：10734519

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし