

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14855

研究課題名(和文) 体液状態に応じて水分摂取を制御する神経機構の解明

研究課題名(英文) Neural mechanisms for the control of water intake in response to body fluid homeostasis

研究代表者

松田 隆志 (Matsuda, Takashi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任助教

研究者番号：90803065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでに、脳弓下器官(SFO)において、水分摂取を指令するニューロン(水ニューロン)および塩分摂取を指令するニューロン(塩ニューロン)を初めて同定した(Matsuda et al. Nat. Neurosci. 2017)。しかしながら、水ニューロンの神経活動を調節する機構および水ニューロンの下流神経回路の詳細は不明であった。これまでの研究から、コレシストキニン(CCK)が水ニューロンの神経活動を調節することが示唆されたため、本研究では、CCKの分泌制御機構および水ニューロンの下流神経回路の解明を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、研究代表者は、水分摂取を指令する水ニューロンの活動を抑制するコレシストキニン産生ニューロンを同定し、その調節機構を明らかにすることに成功した。ヒトを含む動物にとって水分摂取は生命維持に必須である。脳は様々な状況に応じて水分摂取行動を制御している。例えば、脱水などによる体液量の減少を感知し、水分摂取を誘導する。一方で、体液量が十分な場合は、水分摂取を抑制する。本研究成果はこういった水分摂取制御機構の一端を明らかにしたものである。この成果は神経科学だけでなく生理学などにも貢献するとともに、水分摂取の異常が原因となる疾患の理解および予防・治療法の開発に繋がるものと期待する。

研究成果の概要(英文)：Our group previously identified thirst-driving neurons (water neurons) and salt appetite-driving neurons (salt neurons) in the subfornical organ (SFO)(Matsuda et al. Nat. Neurosci. 2017). However, mechanisms by which the neuronal activities of water neurons are regulated and their downstream neural circuits have not been revealed. Since our study suggested that cholecystokinin (CCK) regulated neural activities of water neurons, we now investigated mechanisms for the control of CCK-secretion in the SFO and the downstream neural circuits of water neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：脳弓下器官、脳室周囲器官、コレシストキニン、飲水行動、オプトジェネティクス、in vivo、カルシウムイメージング

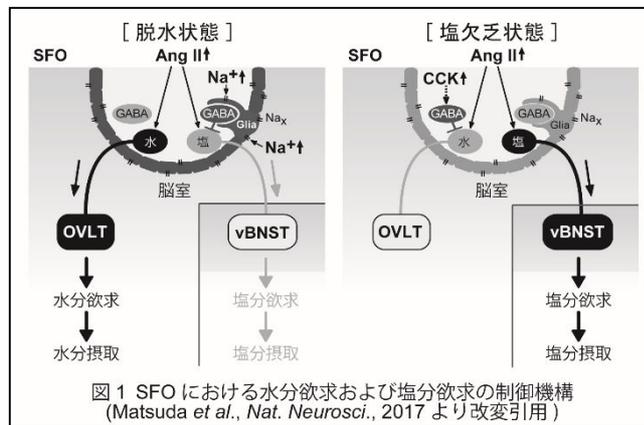
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む陸生動物にとって脱水あるいは塩欠乏は生命に危険を及ぼす。そのため、動物は、常に脳で体液状態をモニターしており、必要に応じて水分欲求と塩分欲求をコントロールしている。これまで、脳において、血液脳関門が欠損している脳室周囲器官の一つである脳弓下器官(SFO)が水分摂取および塩分摂取に関与していることは先行研究において示唆されていたものの (Fitzsimons, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1980)、詳細な神経機構の解明には至っていなかった。しかしながら、研究代表者は、数年前、SFO において水分摂取を指令する水ニューロンと塩分欲求を指令する塩ニューロンを同定するとともに、それらの 1 次神経投射先を世界に先駆けて明らかにすることに成功した(図 1, Matsuda *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2017)。これらのニューロンは SFO に混在しており、いずれも、水分欲求および塩分欲求の両方を誘導するペプチドホルモンである Ang II の受容体 AT1a を発現している興奮性ニューロンであった。したがって、塩欠乏時には、血中の Ang II が増加するため、水分摂取と塩分摂取の両方が生じると推定される。しかしながら、実際には塩分摂取のみが誘発され、水分摂取は起きなかった。研究代表者が解析を進めた結果、塩欠乏状態において、抑制性ニューロン(GABA ニューロン)が水ニューロンの神経活動を選択的に抑制することが明らかになった。さらに、この GABA ニューロンは CCK に応答して活性化した(図 1)。

研究代表者が得た知見は、SFO における CCK 受容体の発現(Ahmed *et al.*, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2014)や、CCK 受容体ノックアウトマウスにおける飲水量の増加(Noble and Roques, *Prog. Neurobiol.*, 1999)の報告からも支持されるものであった。しかしながら、塩欠乏状態がどのように感知されて、CCK の分泌が制御されるのかは不明である。本研究では第一に、SFO において CCK を分泌する細胞の同定および CCK の分泌制御機構の解明を目指した。また、先の研究代表者の研究から、水ニューロンは終板脈管器官(OVLT)に情報を伝えることで水分摂取行動を誘発していることが明らかになった(図 1)。しかし、OVLT から下流の伝達経路は全くわかっていない。そこで、本研究では第二に、水ニューロンからシグナルを受容する下流のニューロンを同定することで、どのような神経路を介して水分摂取行動が誘導されるのか検討した。



研究代表者が得た知見は、SFO における CCK 受容体の発現(Ahmed *et al.*, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2014)や、CCK 受容体ノックアウトマウスにおける飲水量の増加(Noble and Roques, *Prog. Neurobiol.*, 1999)の報告からも支持されるものであった。しかしながら、塩欠乏状態がどのように感知されて、CCK の分泌が制御されるのかは不明である。本研究では第一に、SFO において CCK を分泌する細胞の同定および CCK の分泌制御機構の解明を目指した。また、先の研究代表者の研究から、水ニューロンは終板脈管器官(OVLT)に情報を伝えることで水分摂取行動を誘発していることが明らかになった(図 1)。しかし、OVLT から下流の伝達経路は全くわかっていない。そこで、本研究では第二に、水ニューロンからシグナルを受容する下流のニューロンを同定することで、どのような神経路を介して水分摂取行動が誘導されるのか検討した。

2. 研究の目的

本研究では、Ang II シグナルにより誘導される水分摂取行動の詳細な調節機構および水分摂取を担う神経回路の全容解明を目指す。水分摂取の制御は生命を維持するために不可欠な脳機能であり、本研究成果は、神経生物学だけでなく生理学や内分泌学などの研究分野にも大きく貢献するものである。また、水分摂取の異常が原因となる様々な疾病の理解および予防・治療法の開発に繋がるものと期待される。水分摂取行動を制御する神経機構に対して、分子レベルの解析から行動を担う神経回路の解明まで統合的に研究を行っている例は世界的に見ても少ない。研究代表者は、これまでに習得したオプトジェネティクスや神経路選択的な遺伝子発現制御技術に加え、新たに、最先端技術であるトランスシナプス標識法(後述)を用いることで、本研究目的を達成する計画である。

3. 研究の方法

研究代表者が同定した水ニューロンに関する知見を基礎にして、

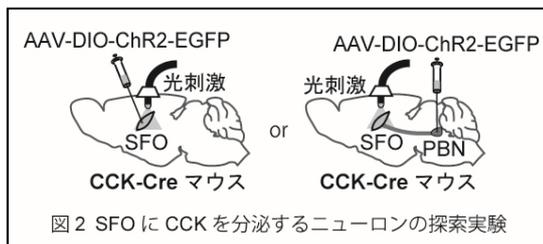
- ・水ニューロンの活動調節に関わる CCK 分泌制御機構の解明(計画 I)
- ・水ニューロンの下流神経回路の解明(計画 II)

を行う。

【計画 I】水ニューロンの活動調節に関わる CCK 分泌制御機構の解明

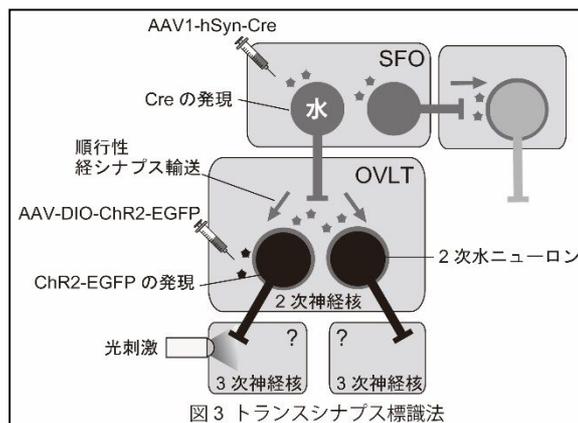
研究代表者は、CCK を SFO に直接注入することで、水分摂取が抑制されることを確認していた(未発表)。そこで、まず、SFO において CCK を分泌する細胞を同定するため、SFO に神経投射する CCK 産生ニューロンを同定する実験を行ったところ、傍小脳脚核(PBN)の CCK 産生ニューロンの一部が SFO に投射すること、並びに SFO 自体にも CCK 産生ニューロンが存在することが明らかになった(未発表)。そこで、CCK 産生細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウス(CCK-Cre マウス)の SFO あるいは PBN において、光感受性陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン 2 (ChR2)を Cre 依存的に発現させるウイルスベクター(AAV-DIO-ChR2-EGFP)を導入する。SFO において青色光を照射することで、ChR2 が発現した細胞の神経終末から CCK の放出を選択的に誘発する(図 2)。この手法を用いて、いずれの神経核

にある CCK 産生ニューロンが水分摂取行動の調節に関与しているのか検討する。次に、CCK の分泌制御機構を検討する。塩欠乏時には体液 Na⁺濃度が低下するが、CCK 産生ニューロンが実際にどのような生理的条件下で活動するのか不明である。そこで、カルシウム蛍光プローブ GCaMP を Cre 依存的に発現させるウイルスベクター (AAV-DIO-GCaMP) を用いて、CCK 産生ニューロン選択的に GCaMP を発現させる。GCaMP により神経活動に伴う細胞内 Ca²⁺濃度の変化を蛍光強度の変化として検出することができる。GCaMP を発現する CCK 産生ニューロンを小型蛍光顕微鏡により観察し、体液 Na⁺濃度を低下させた際に、CCK 産生ニューロンの活動が上昇するか観察する。



【計画II】水ニューロンの下流神経回路の解明

OVLT において水ニューロンのシグナルを受容するニューロンを同定し、さらに下流の神経回路を明らかにする。ごく最近、高タイトアの AAV1-hSyn-Cre と Cre 依存的な遺伝子発現法を組み合わせることで、ウイルスが感染した神経細胞からシナプス結合を介して下流の神経細胞に目的遺伝子を発現させることが可能であると報告された (トランスシナプス標識法; Zingg *et al.*, *Neuron*, 2017) (図3)。SFO に AAV1-hSyn-Cre を注入し、水ニューロンの投射先である OVLT に AAV-DIO-ChR2-EGFP を注入することで、水ニューロンがシナプス結合を形成しているニューロン (“2次”水ニューロン) 選択的に ChR2-EGFP を発現させることを試みる。“2次”水ニューロンの神経終末に発現した ChR2-EGFP の蛍光を観察することで、OVLT からさらに下流の神経回路を解明する (図3)。



4. 研究成果

【計画I】水ニューロンの活動調節に関わる CCK 分泌制御機構の解明

以前の研究において、研究代表者は、脳弓下器官(SFO)において水分摂取を指令するニューロン(水ニューロン)を同定するとともに、塩欠乏時において SFO に分泌されるコレシストキニン (CCK) が抑制性ニューロンを活性化することで、水ニューロンの活動を抑制することを明らかにした。本研究は、SFO において CCK を分泌する細胞の同定およびその分泌制御機構の解明を目的にした。

研究代表者は、これまでに傍小脳脚核(PBN)の CCK 産生ニューロンの一部が SFO に投射すること、並びに SFO 自体にも CCK 産生ニューロンが存在することを明らかにしていた(未発表)。そこで、CCK 産生細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウス(CCK-Cre マウス) の SFO あるいは PBN において、光感受性陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を Cre 依存的に発現させ、SFO において青色光を照射する実験を行った。その結果、SFO の CCK 産生ニューロンを活性化させたマウスにおいて脱水時の水分摂取行動が抑制された(未発表)。一方で、PBN の CCK 産生ニューロンを活性化させても水分摂取行動に影響は見られなかった。

次に、電気生理学的手法を用いて、この CCK 産生ニューロンが SFO の抑制性ニューロンを活性化するのか検討した。CCK-Cre マウスと抑制性ニューロンに GFP が発現する GAD-GFP マウスを掛け合わせ、それぞれのニューロンを標識した脳スライスを作成し、それぞれの神経活動を記録した。その結果、SFO のいくつかの抑制性ニューロンは CCK 産生ニューロンから CCK 受容体 B タイプを介して入力を受けていることが明らかとなった。これらの結果から、SFO において CCK を分泌する細胞が SFO 内に存在する CCK 産生ニューロンであることを明らかにした。

次に SFO の CCK 産生ニューロンがどのような生理的条件下で活動するのか検討するため、*in vivo* カルシウムイメージング法により観察した。CCK 産生ニューロンに GCaMP を発現させ、SFO の上方に GRIN レンズを挿入し、小型蛍光顕微鏡 nVoke を用いることで、神経活動に伴う細胞内 Ca²⁺濃度の変化を蛍光強度の変化として検出した。これにより、自由行動下のマウスにおいて CCK 産生ニューロンの神経活動を観察することに成功した。さらに、SFO の CCK 産生ニューロンにおいて塩欠乏時に活動するグループと飲水行動に反応して活動するグループが存在することを明らかにした。

本研究から、SFO の CCK 産生ニューロンは、水分摂取が必要でない体液情報(塩欠乏状態)や実際に飲水を行ったときにその情報がフィードバックされて活性化し、GABA ニューロンの活性化を介して水ニューロンの活動を抑制していることが明らかになった。このように SFO は 2 つ

のルートで水分摂取行動を抑える中枢であることが明らかとなった。現在、この結果を論文にまとめて、投稿中である。

【計画 II】水ニューロンの下流神経回路の解明

以前の研究成果から、研究代表者は、SF0 の水ニューロンが終板脈管器官(OVLT)に情報を伝達して水分摂取を誘導することを明らかにしている。しかし、OVLT から下流の伝達経路は全くわかっていないため、本研究計画では第二に、水ニューロンからシグナルを受容する下流のニューロン(二次水ニューロン)を同定することを目的とした。

この目的を達成するために、ウイルスが感染した神経細胞から下流の神経細胞に目的遺伝子を発現させるトランスシナプス標識法を確立した。これにより、SF0 の水ニューロンからシグナルを受容しているニューロンを同定することに成功し、その投射先を明らかにすることが出来た。しかしながら、いずれの神経核に投射しているニューロンが水分欲求を誘導するシグナルを伝えているのかは確認できていない。今後、光遺伝学的手法などを用いて詳細な解析を進める。

【その他】OVLT における新規 Na センサー分子の発見と水分摂取行動の機構解明

当初の研究計画にはなかったが、体液中の Na レベルの増加を検知する新規 Na センサー分子 SLC9A4 が OVLT に局在することを同定し、SLC9A4 が酸感受性イオンチャネルを介して水分摂取行動を誘導するメカニズムを解明した。その研究成果は既に論文発表されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakuta Hiraki, Lin Chia-Hao, Hiyama Takeshi Y., Matsuda Takashi, Yamaguchi Katsushi, Shigenobu Shuji, Kobayashi Kenta, Noda Masaharu	4. 巻 472
2. 論文標題 SLC9A4 in the organum vasculosum of the lamina terminalis is a [Na ⁺] sensor for the control of water intake	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 609 ~ 624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-020-02389-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田隆志
2. 発表標題 脳弓下器官において水分欲求および塩分欲求を制御する神経機構
3. 学会等名 日本神経科学学会 時実利彦記念神経科学優秀博士研究賞選考
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小林 憲太 (Kobayashi Kenta)	生理学研究所・ウイルスベクター開発室・准教授 (63905)	