

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15334

研究課題名（和文）脳弓下器官に発現する新規体液ナトリウムイオンセンサー候補分子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of a novel candidate molecule for a sodium level sensor of body fluids

研究代表者

星川 真理子 (Mariko, Hoshikawa)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：30898060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脳弓下器官は、体液Na⁺濃度を監視し、水分・塩分摂取行動を制御することで体液恒常性維持に関与している。我々は、チャンネルXが、常時開放型Na⁺チャンネルであり、脳弓下器官の興奮性ニューロンに発現していることを見出した。また、長時間絶水で体液Na⁺濃度が上昇したチャンネルXノックアウトマウスの飲水行動も減弱していた。これらの知見はチャンネルXが脳弓下器官における新規体液Na⁺センサーである可能性を示唆する。本研究の成果は、体液恒常性維持機構・高血圧発症機序の解明につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規体液Na⁺センサー分子の同定による、体液恒常性維持機構の解明は、生命の根源に関わる極めて重要な研究課題である。体液Na⁺濃度の上昇は、血液の浸透圧活性を上げることで高血圧を導くが、その他、脳弓下器官終板脈管器官（水分摂取行動）延髄吻側腹外側野（交感神経活動の中枢）へと情報が伝えられ、交感神経系が刺激されることでも血圧上昇に働く。チャンネルXの活性調整剤は、水分・塩分摂取行動と自律神経系の両者を制御する新しいタイプの高血圧治療薬になり得る。本研究は、体液恒常性の制御機構や高血圧の病態生理の解明に繋がるのみならず、そのような創薬の基盤となりうるものである。

研究成果の概要（英文）：The subfornical organ is involved in maintaining fluid balance by monitoring the sodium concentration of body fluids and controlling water and salt intake behaviours. We found that channel X is a constitutively open sodium channel that is expressed in excitatory neurons in the subfornical organ. In addition, the water intake behaviour of channel X knockout mice, in which the sodium concentration of body fluids increased due to acute water deprivation, was also reduced. These findings suggest that channel X may be a novel sodium level sensor of body fluids in the subfornical organ. The results of this study are expected to lead to an understanding of the mechanisms that maintain body fluid homeostasis and the mechanisms that cause hypertension.

研究分野：神経科学

キーワード：体液恒常性維持機構

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳弓下器官 (SF0) は血液脳関門を欠き、第三脳室前壁に接することから、血清や脳脊髄液の成分変化を鋭敏に感知し、水分・塩分摂取行動を統合的に制御して体液恒常性の維持に参与する。SF0 には、アンジオテンシン受容体 (AT1a や AT2) 陽性の水ニューロンと塩ニューロンとが存在し、水分あるいは塩分の欠乏により血中アンジオテンシン II 濃度が上昇すると、受容体の活性化を介して、興奮する。水ニューロンは終板脈管器官 (OVL) への投射を介して水分摂取行動の制御を、塩ニューロンは腹側分界条床核 (vBNST) への投射を介して塩分摂取行動の制御をしている。水分欠乏で血清や脳脊髄液中の Na^+ 濃度が上昇した場合は、特定のグリア細胞から、 Na^+ (Na⁺チャンネルの一種) の活性化を介して乳酸が放出され、これを受容した GABA (γ-アミノ酪酸) 作動性ニューロンが塩ニューロンの活動を抑制する。また、EET (エポキシエイコサトリエン酸: TRPV4 のリガンド) も放出され、TRPV4 陽イオンチャンネルの活性化を介して、水ニューロンの活動を増強する。塩分のみが欠乏した場合は、局所のコレシストキニン濃度が上昇し、受容体 (CCK-A/CCK-B) の活性化を介して興奮した特定の GABA 作動性ニューロンが、水ニューロンの活動を抑制する。この機構の中で、 Na^+ は血清・脳脊髄液 Na^+ センサーとして働いている。しかし、 Na^+ の活性化閾値は生理的条件 (135-145 mM) より高く、生体内で応答するにはエンドセリン 3 による閾値低下が必要であることや、塩分欠乏 (Na^+ 濃度低下) 時の、SF0 における Na^+ 濃度感知機構は明らかになっていないため、より鋭敏に体液 Na^+ 濃度変化 (上昇と低下) に反応する、未知のセンサー分子の存在が考えられる。

我々は、レポーターマウスを用いてチャンネル X の脳発現分布を解析し、SF0 に発現していることを見出した。また、 Zn^{2+} で阻害される常時開放型 Na^+ チャンネルであることも見出した。この特性より、チャンネル X が細胞外 Na^+ 濃度の変化 (上昇あるいは低下) を鋭敏に感知すると考えられる。また、48 時間絶水による脱水状態でも、チャンネル X コンベンショナルノックアウトマウスの SF0 ニューロンの活動は抑えられたままであり、24 時間絶水後の飲水量も減少していた。これらの知見は、チャンネル X が SF0 において、新規体液 Na^+ センサーとして機能していることを示唆する。

新規体液 Na^+ センサー分子の同定による、体液恒常性維持機構の解明は、生命の根源に関わる極めて重要な研究課題である。体液 Na^+ 濃度の上昇は、血液の浸透圧活性を上げることで高血圧を導く。SF0 OVL (水分摂取行動) 延髄吻側腹外側野 (交感神経活動の中核) へと情報が伝えられ、交感神経系が刺激されることでも血圧が上昇する。チャンネル X の活性調整剤は、水分・塩分摂取行動と自律神経系の両者を制御する新しいタイプの高血圧治療薬になり得る。本研究により、SF0 におけるチャンネル X の機能を解明することは、体液恒常性の制御機構や高血圧の病態生理の解明に繋がるのみならず、そのような創薬の基盤となりうるものである。

2. 研究の目的

我々がこれまでに得た知見から導かれた「チャンネル X が SF0 において新規体液 Na^+ センサーとして働き、体液恒常性維持に参与する」という仮説を免疫組織学的解析、生理学的解析、行動学的解析を用いて検証し、体液恒常性の制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学 (免疫電顕を含む) によるチャンネル X の分布解析 SF0 内のどの細胞 (水ニューロン、塩ニューロン、GABA 作動性ニューロン、アストロサイト、上衣細胞) に発現するか、また、細胞内局在を知るために、チャンネル X 特異的抗体の作製を試みたが、今のところ良質な抗体は得られていない。そこで、チャンネル X の C 末端にエピトープタグである AU1 を融合させたチャンネル X-AU1 蛋白質を発現するノックイン (KI) マウスを作出した。本研究では、抗 AU1 抗体を用いて、SF0 におけるチャンネル X 蛋白質の分布を解析する。各種細胞特異的マーカーとの蛍光多重免疫組織染色で、どの細胞に発現するか、確認する。水ニューロンと塩ニューロンをマーカー蛋白質のみで判別するのは困難であるため、両者の標識には、それぞれ OVL、vBNST への逆行性トレーサー (コレラ毒素 B サブユニット Alexa Fluor488 コンジュゲート) の注入を併用し、チャンネル X との関係調べ。

(2) チャンネル X 電流の記録とチャンネル X 陽性細胞の種類の確認 *Xenopus* oocytes を用いた電気生理学的解析により、細胞外 Na^+ 濃度の増減に応じてチャンネル X チャンネルの電流値も増減するか確認する。また、野生型・KO マウスの腹腔内に Evans blue を投与し、可視化 (血液脳関門がないので染まる) された SF0 を切り出し、分散培養する。蛍光 Na^+ 指示薬 (SBFI) を細胞内へ導入した後、 Na^+ 流入による蛍光強度の増強を観察する (Na^+ イメージング) (Na^+ の活性化を防ぐために、細胞外 Na^+ 濃度を 150 mM 未満に保つ)。 Zn^{2+} 、アミロライド誘導体などの阻害剤の影響も調べる。その後、ガラス電極を使って細胞内容物を抽出し、RT-PCR にて、各マーカー蛋白質の mRNA の発現を調べる。

(3) 行動解析 チャンネル X は SF0 以外の領域にも分布しているため、行動解析には SF0 のチャ

ネル X 遺伝子のみ欠損したマウスを使用するのが望ましい。前述のチャンネル X レポーターマウスは Cre/loxP システムによるコンディショナルノックアウト (cKO) も作製できるため、(1)と(2)で同定したチャンネル X 発現細胞の結果を踏まえ、適切なプロモーター制御下で Cre を発現するアデノ随伴ウイルスを SF0 に注入し、SF0 のチャンネル X 遺伝子のみ欠損させる。絶水、ループ利尿剤 (= 腎臓のヘンレループで NaCl の再吸収を抑制) 投与、ループ利尿剤投与 + 飲水にて、それぞれ、水分のみ、水分と塩分、塩分のみを欠乏させることができる (*Nat Neurosci* 20, 230-41 (2017))。これらの負荷をコントロールマウス・cKO マウスに加え、SF0 における神経細胞の活動の様子を、抗 c-Fos(神経活動マーカー)抗体を用いて評価する。さらに、純水と食塩水(0.3 M)とを用意し、負荷終了直後からの水分・塩分摂取行動を評価する。

4. 研究成果

実験計画ごとに結果の概要を記し、最後に総括した。

(1)免疫組織化学(免疫電顕を含む)によるチャンネル X の分布解析 チャンネル X-AU1 蛋白質を発現する KI マウスの脳切片を、抗 AU1 抗体を用いて蛍光免疫染色し、SF0 におけるチャンネル X 蛋白質の発現を解析した。その結果、SF0 の尾側にチャンネル X 陽性細胞を認めた。さらに各種細胞マーカーとの多重染色では、アストロサイト(GFAP+, Vimentin-)や上衣細胞(GFAP-, Vimentin+)、タニサイト(GFAP+, Vimentin+)、ペリサイト(CD13+, NG2+)、NG2 グリア(CD13-, NG2+)には発現せず、ニューロン(NeuN+)に発現していた。また、GABA 作動性ニューロン(GAD65/67+)には発現せず、水ニューロン(OVLT に投射して水分摂取行動を促すニューロン)を抑制する CCKRB 陽性ニューロンでの発現も認めなかった。これらの結果より、チャンネル X は SF0 の興奮性ニューロンに発現していると考えられる。チャンネル X-AU1 KI マウスの OVLT や vBNST に逆行性トレーサーを注入し、SF0 の水ニューロンと塩ニューロンの標識を試みたが、SF0 に標識細胞が殆ど検出されなかった。そこで、水ニューロンと塩ニューロンの識別方法として、チャンネル X 発現細胞全体に蛍光タンパク質が発現するマウスの脳を透明化し、ライトシート顕微鏡で 3 次元イメージングすることで SF0 のチャンネル X 発現ニューロンの投射先を確認する方法を試みることにした。そのため、チャンネル X-IRES-iCreERT2 マウス(チャンネル X プロモーター下に iCreERT2 を発現するマウス)を本研究期間中に新たに作出した。今後、R26-CAG-LoxP-tdTomato マウスと交配し、チャンネル X 発現ニューロンに赤色蛍光タンパク質 tdTomato が発現するマウスを作製する。

(2)チャンネル X 電流の記録とチャンネル X 陽性細胞の種類の確認 *Xenopus oocytes* を用いた電気生理学的解析により、細胞外 Na⁺濃度の増減に応じてチャンネル X チャンネルの電流値も増減する、すなわちチャンネル X は常時開口型・Na⁺透過性型の陽イオンチャンネルであることが明らかになった。このことは、チャンネル X 発現ニューロンの興奮性 (= 細胞膜電位) も体液 Na⁺濃度の増減に応じて変化しうることを意味し、チャンネル X が SF0 における新規体液 Na⁺センサーであるという我々の仮説を支持するものである。SF0 の分散培養を用いたチャンネル X 発現ニューロンの Na⁺イメージングでは、SF0 の全細胞中のチャンネル X 発現細胞の割合が少ないためか、細胞外 Na⁺濃度変化への応答を捉えられなかった。そこで、前述の脳透明化によるニューロン投射先の探索と同様に、チャンネル X 発現細胞全体に蛍光タンパク質が発現するマウスを使用し、確実にチャンネル X 発現細胞での応答を確認する方法に切り替えた。

(3)行動解析 研究開始当初は(1)と(2)で同定したチャンネル X 発現細胞の結果を踏まえ、適切なプロモーター制御下で Cre を発現するアデノ随伴ウイルスを SF0 に注入し、SF0 のチャンネル X 遺伝子のみ欠損させる予定であったが、本研究期間中に、チャンネル X 発現ニューロンの種類が特定できなかったため、CMV プロモーター下で eGFP と Cre を発現するアデノ随伴ウイルスをチャンネル X flox マウスの SF0 に局所注入し、SF0 のチャンネル X 遺伝子のみ欠損させたマウスを作製した。(AAV を SF0 に限局して投与できれば、ユビキタスプロモーターである CMV 制御下で Cre を発現する AAV で問題ない。)このマウスに絶水、ループ利尿剤投与 (= 腎臓のヘンレループで NaCl の再吸収を抑制) ループ利尿剤投与 + 飲水にて、それぞれ、水分のみ、水分と塩分、塩分のみを欠乏させ、水分・塩分摂取行動を評価した。個体差が大きいため今のところ有意差はついていないが、水分のみ欠乏、水分と塩分共に欠乏したマウスはコントロールマウスと比較して水分摂取行動が減弱傾向だった。

(総括)チャンネル X が SF0 尾側の興奮性ニューロンに発現していることが明らかになった。水ニューロン、塩ニューロンは興奮性ニューロンであるため、いずれかのニューロン、あるいは未知の機能を持ったニューロンに発現すると考えられる。*Xenopus oocytes* を用いた電気生理学的解析により、細胞外 Na⁺濃度の増減に応じてチャンネル X チャンネルの電流値も増減することが確認できたため、チャンネル X が SF0 において鋭敏に体液 Na⁺濃度変化(上昇と低下)に反応できる可能性が示唆された。また、SF0 特異的チャンネル X 欠損マウスの行動解析より、SF0 のチャンネル X が飲水行動の制御を介して体液恒常性維持に関わる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------