

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15223

研究課題名（和文）迷走神経による低浸透圧感知メカニズムの解明

研究課題名（英文）Representation and sensing mechanisms of gut osmolality in the peripheral sensory ganglia

研究代表者

市木 貴子 (Ichiki, Takako)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30778519

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）：飲水後に消化管内で浸透圧変化が感知されることで、飲水抑制が起こることが示唆されてきたが、そのメカニズムは長らく不明だった。我々は、消化管を制御する迷走神経の感覚神経節をリアルタイムに観察するイメージング実験系を確立し、消化管内の低浸透圧感知に肝門脈が主要な働きをしていることを明らかにした。本研究により、飲水後に腸管にて低浸透圧が感知された後、血管作動性腸管ペプチド(VIP)を含む消化管ホルモンが分泌され、VIP受容体(VIPR2)を介し肝門脈に作用することで、迷走神経を介して中枢に飲水抑制シグナルが送られている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飲水後に消化管内で浸透圧変化が感知されることで、飲水抑制が起こることが示唆されてきたが、そのメカニズムは長らく不明だった。我々は、消化管を制御する迷走神経の感覚神経節をリアルタイムに観察することで、腸管内の水による低浸透圧刺激に特異的に反応する神経群を見出した。さらに、この低浸透圧感知には、肝門脈が主要な働きをしていることを明らかにした。本研究により、長らく不明であった消化管における飲水抑制回路が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Emerging evidence suggests that gut osmolality sensing rapidly inhibits thirst neurons upon water intake. Nevertheless, it remains unclear the mechanisms of how visceral sensory neurons detect gut osmolality changes. We established in vivo optical recording to show that the vagal pathway mediates visceral osmolality responses. We demonstrate that hypotonic responses are mediated by vagal afferents innervating the hepatic portal area (HPA). Water stimuli to the intestine induce osmolality responses in vagal neurons which is mediated by sensory afferents from the HPA. This signal modulates thirst satiation and may recruit vasoactive intestinal peptide (VIP) - VIP receptor 2 (VIPR2) signaling. Together, our results revealed gut hypoosmolality as an important vagal sensory modality to regulate thirst circuit activity through the HPA pathway.

研究分野：神経科学

キーワード：飲水抑制機構 肝門脈 迷走神経

1. 研究開始当初の背景

適切な飲水欲求の調節は、体液恒常性の維持に必要不可欠である。神経系による飲水制御メカニズムとして、脳弓下器官(SFO, subfornical organ)に存在する神経群が飲水促進に寄与することが知られている(Oka, *et al.*, *Nature*, 2015)。この SFO の飲水促進ニューロンは、飲水後の体液浸透圧の変化以前に強く抑制されることから、神経系による飲水抑制機構が存在することが示唆されている。飲水後に起こる飲水抑制には、液体の嚥下反応による一次抑制と、消化管での浸透圧感知によって持続性に働く二次抑制があると考えられている。しかし、二次抑制のメカニズムには不明な点が多く残されており、消化管における飲水感知シグナルが中枢神経系に伝達される仕組みは未だ不明であった。これまでに、消化管の感覚受容には、迷走神経が重要な役割を果たすことが明らかになっている(Williams, *et al.*, *Cell.*, 2016)。そこで研究代表者は、迷走神経が腸管内の浸透圧変化を感知し、飲水後の飲水抑制に寄与するかどうかを調べた。

研究代表者は、単一細胞レベルでの神経応答の可視化を行うために、迷走神経の求心性感覚神経節である節状神経節の *in vivo* カルシウムイメージングの実験系を確立した。具体的には、感覚神経依存的に GCaMP6 を発現するマウスライン (Vglut2-Ai96) を用いて、飲水を模した腸管内への水灌流刺激を行うと同時に、節状神経節ニューロンの反応を観察した(図 1a)。その結果、水による低浸透圧刺激に特異的に応答する神経群が存在することを見出した(図 1b)。

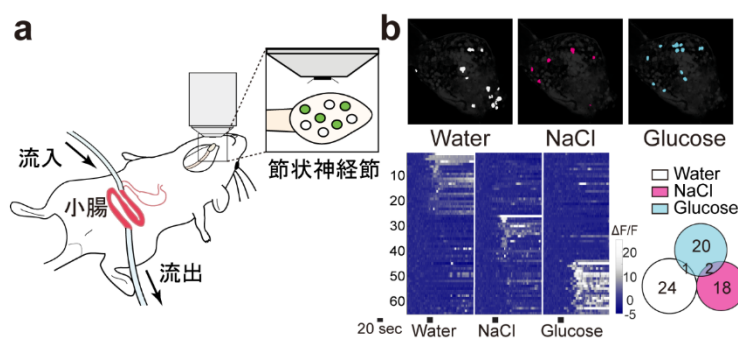


図 1. a, マウス節状神経節イメージング模式図. b, Water, 500 mM NaCl, 300 mM glucose をそれぞれ 20 秒間、腸管内に灌流した際の節状神経節ニューロンの反応。同一神経節内での反応ニューロン(上段)。個別ニューロンの応答を示した Heat map ($\Delta F/F$, $n = 3$, 下段左)。反応したニューロンの総数を示したベン図(下段右)。

しかし、低浸透圧刺激に特異的に反応する神経群が活性化するメカニズムは不明なままであった。腸管から吸収された水分や栄養素は、上腸間膜静脈を經由してすべて肝門脈へ集められる。このことから、肝門脈を支配する神経群は、水分や栄養素の感知に何らかの役割を果たすことが示唆されてきた。実際に、*in vitro* の実験系にて肝門脈が浸透圧変化を感知する可能性が示されている(Lechner, *et al.*, *Neuron*, 2011)。しかしながら、肝門脈の低浸透圧感知を *in vivo* 条件下において直接的に確かめた例はなく、肝門脈を支配する迷走神経の役割も明らかとなっていない。そこで研究代表者は、肝門脈とそれを支配する迷走神経が低浸透圧刺激の感知に寄与するかどうかを調べた。

迷走神経には分枝が存在し、代表的なものの一つとして、肝門脈を支配する肝枝がある。研究代表者は節状神経節の *in vivo* カルシウムイメージング法を用いて、肝枝を選択的に切除した後に、水による低浸透圧刺激に特異的に応答する神経群の反応変化を調べた。その結果、肝枝切除後に水による低浸透圧刺激への応答がほぼ消失することが確認された。よって、迷走神経による低浸透圧感知には、肝門脈が重要な役割を果たすことが示唆された。さらに研究代表者は、肝門脈が直に低浸透圧刺激を感知するかどうかを調べるために、肝門脈へカテーテルを挿入し、低張食塩水を注入した際に、迷走神経の応答が見られるか否かを調べた。その結果、肝門脈へ低張食塩水を注入しても、迷走神経の応答は認められなかった。では、肝門脈はどのようにして低浸透圧感知を行っているのか？これが本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。

2. 研究の目的

本研究では、肝門脈を支配する迷走神経の低浸透圧刺激の感知メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究1. 迷走神経の肝枝を選択的に切除し、その影響を確かめる

(i) 低浸透圧刺激に対する迷走神経応答が肝門脈特異的かどうかを確かめる

研究代表者はすでに、肝枝を選択的に切除すると水による低浸透圧刺激がほぼ消失することを、節状神経節の *in vivo* カルシウムイメージングを用いて確かめた。しかしながら、肝枝の切除による周辺臓器への非特異的な影響も確認する必要がある。そこで、研究代表者の研究成果の重要なコントロール実験として、腸管への機械的刺激（膨張刺激）に対する迷走神経応答の変化の有無を確かめる。さらに、肝枝は肝臓、門脈のみならず膵臓、十二指腸も支配していることから、肝門脈特異的な反応を確かめるために、膵臓、十二指腸部位のみの **denervation**（除神経）を85%フェノール塗布にて行い、反応に変化がないかどうかを調べる。

(ii) 肝枝の選択的切除後の飲水量の変化を調べる

肝門脈を支配する迷走神経が飲水行動に及ぼす影響を調べるために、マウス肝枝の選択的切除を行い、偽手術群（Sham オペ群）と比較して飲水量に変化があるかどうかを確かめた。

研究2. 肝門脈が低浸透圧刺激を感知するメカニズムを明らかにする

(i) 肝門脈への消化管ホルモン刺激が迷走神経応答に与える影響を確かめる

腸管内の水分吸収や感知に関与が示唆される各種ホルモンを肝門脈へ注入し、迷走神経の応答が見られるか否かを節状神経節の *in vivo* カルシウムイメージングを用いて確認する。応答が見られた場合、その神経群が、腸管の水灌流によって応答する神経群と同一であるかどうかを確認する。これにより、腸管から分泌されたホルモンを介して肝門脈に低浸透圧感知シグナルが送られているか否かを調べる。

(ii) 肝門脈における消化管ホルモンの感知メカニズムを検証する

同定した肝門脈の低浸透圧感知に寄与する消化管ホルモンが、どのようにして肝門脈に作用するのかを検証するために、以下の実験を行う。

a. 消化管ホルモン受容体のアンタゴニストの作用を確かめる

消化管ホルモンが肝門脈において各種受容体を介して作用しているのかどうかを調べるために、受容体のアンタゴニストを投与した際の迷走神経の応答を確認する。

b. 肝門脈における消化管ホルモン受容体の発現を確かめる

消化管ホルモンの肝門脈における受容体の発現を、免疫組織染色あるいはリアルタイム qPCR によって確かめる。

4. 研究成果

研究1. 迷走神経の肝枝を選択的に切除し、その影響を確かめる

(i) 低浸透圧刺激に対する迷走神経応答は肝門脈特異的である

研究代表者はすでに、肝枝を選択的に切除すると水による低浸透圧刺激がほぼ消失することを、節状神経節の *in vivo* カルシウムイメージングを用いて確かめた。しかしながら、肝枝の切除による周辺臓器への非特異的な影響も確認する必要がある。そこで、重要なコントロール実験として、腸管への機械的刺激（膨張刺激）に対する迷走神経応答の変化が無いこと

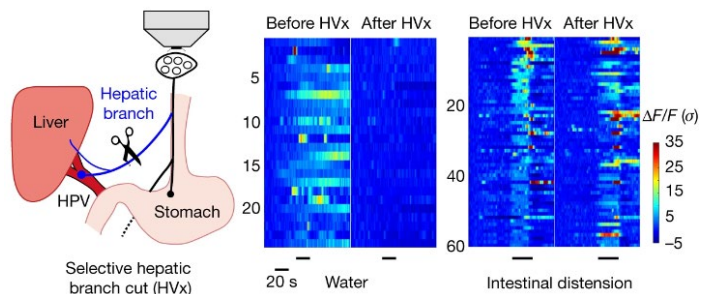


図2. 肝枝選択的切除後の迷走神経の低浸透圧刺激応答

を確かめた(図 2)。さらに、肝門脈特異的な反応を確かめるために、膵臓、十二指腸部位のみの denervation (除神経) を 85% フェノール塗布にて行い、反応に変化がないことを確認した(図 3)。

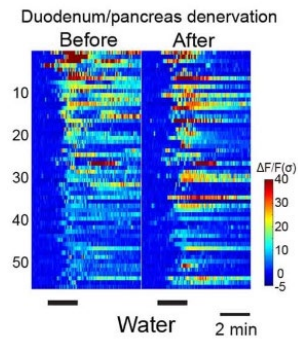


図 3. 膵臓、十二指腸部位のフェノール denervation

(ii) 肝枝の選択的切除後の飲水量の変化

肝門脈を支配する迷走神経が飲水行動に及ぼす影響を調べるために、マウス肝枝の選択的切除を行い、偽手術群 (Sham オペ群) と比較して飲水量に変化があるかどうかを確かめた。具体的には、24 時間脱水後の飲水量、もしくは定常状態での 1 日の飲水量に変化があるかどうかを調べた。その結果、定常状態での 1 日の飲水量に変化はない一方で、24 時間脱水後の飲水量が肝枝の選択的切除群で増加した(図 4、左)。それが飲水感知の低下によるものなのか、もしくは飲水欲求の上昇によるものなのかを調べるために、オペラント条件付け実験を行った。脱水後、レバー押しによって飲水ができることを学習させた後、Sham オペ群と肝枝の選択的切除群で、レバー押し回数に違いがあるかどうかを確かめたところ、回数に差が認められなかったため、飲水量の増加は飲水後の低浸透圧感知の障害によるものと考えられた(図 4、右)。

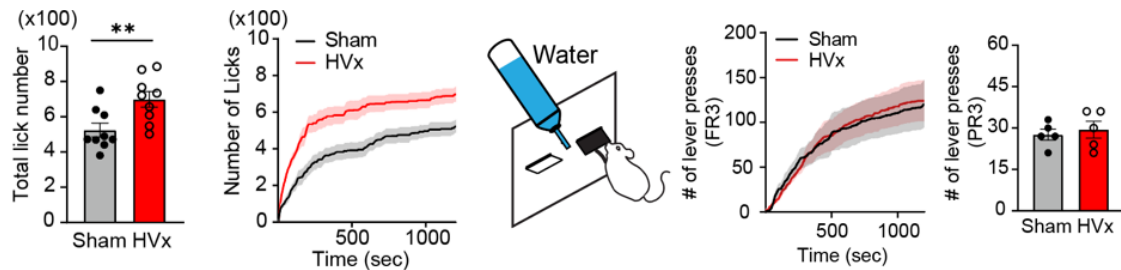


図 4. 肝枝選択的切除後の飲水行動の変化

研究 2. 肝門脈が低浸透圧刺激を感知するメカニズムを明らかにする

(i) 肝門脈への消化管ホルモン刺激が迷走神経応答に与える影響

研究代表者は、肝門脈へ低張食塩水を注入しても迷走神経の応答は見られないことを確認した。肝門脈は腸管から分泌された消化管ホルモンを集約する器官でもある。よって、肝門脈が直に低浸透圧感知を行っていない場合、消化管ホルモンの関与が想定された。すなわち、低浸透圧感知によって小腸から分泌された消化管ホルモンが肝門脈へ作用することで、迷走神経の応答が起きていると考えられた。この仮説を証明するために、まず腸管内の水分吸収や感知に関与が示唆される各種消化管ホルモンを肝門脈へ注入し、迷走神経の応答が見られるか否かを節状神経節の *in vivo* カルシウムイメージングを用いて確認した。その結果、ペプチド YY (PYY)、コレシストキニン (CCK)、Arginine vasopressin (AVP)、Vasoactive intestinal peptide (VIP) の肝門脈注入によって迷走神経応答が確認され、VIP の反応が選択的肝枝切除後に消失した(図 5)。よって、VIP が肝門脈の低浸透圧応答に寄与していると考えられた。

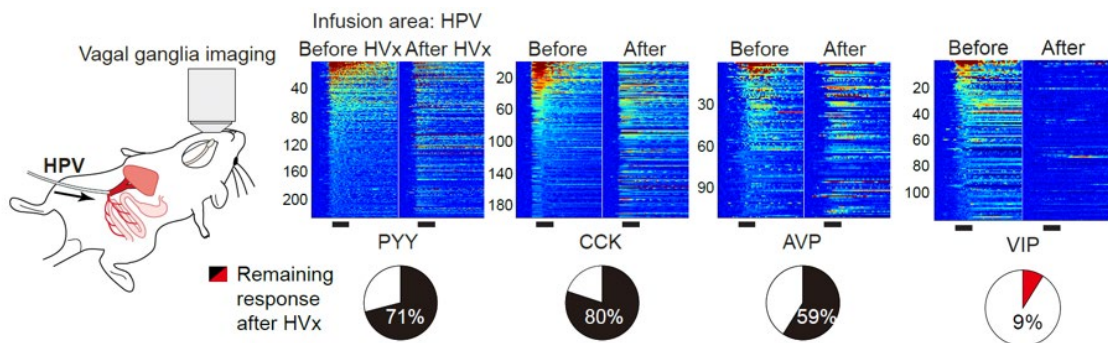


図 5. 主要な消化管ホルモンを肝門脈へ注入した際の迷走神経応答

実際に、VIP に応答する神経群は、腸管への塩やグルコース刺激に応答する神経群とは異なるのに対し、水に応答する神経群とオーバーラップすることを確認した(図 6)。

すなわち、VIP が腸管への水刺激によって分泌され、肝門脈における低浸透圧感知に寄与していることが示唆された。

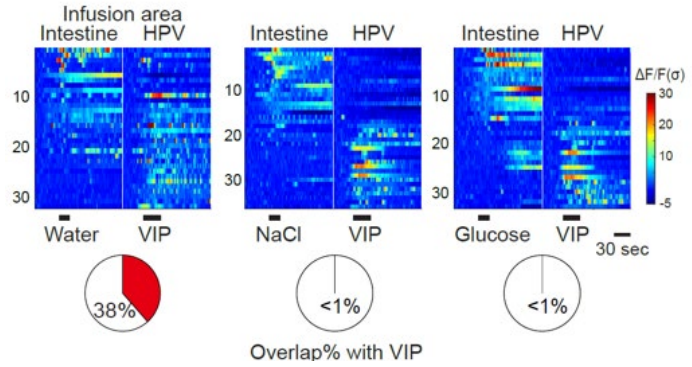


図 6. 迷走神経の VIP-肝門脈応答と、水、塩、グルコース-腸管応答の比較

(ii) 肝門脈における消化管ホルモンの感知メカニズム

同定した肝門脈の低浸透圧感知に寄与する消化管ホルモン VIP が、どのようにして肝門脈に作用するのかを検証するために、以下の実験を行った。

a. VIP 受容体アンタゴニストの作用

VIP が肝門脈において VIP 受容体を介して作用しているのかどうかを調べるために、VIP 受容体のアンタゴニスト [D-p-Cl-Phe6,Leu17]-VIP を投与した際の迷走神経の応答を確認した。節状神経節の *in vivo* カルシウムイメージングを用いて、肝門脈へ VIP 受容体アンタゴニストを投与した際に、腸管の水灌流刺激に対する迷走神経の応答が阻害されることを確認した(図 7)。

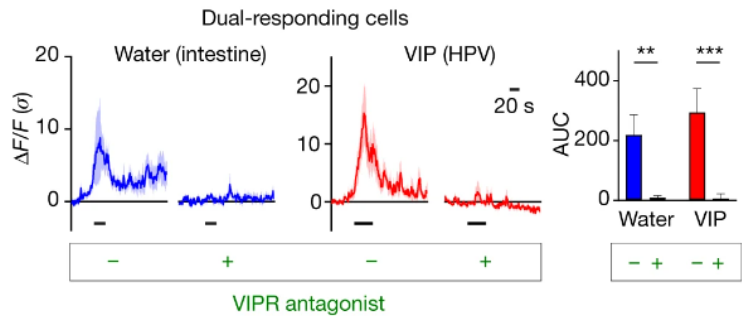


図 7. 腸管の水灌流刺激に対する迷走神経応答への VIP 受容体アンタゴニストの作用

b. 肝門脈における VIP 受容体の発現

肝門脈における VIP 受容体 (VIPR1, VIPR2) の発現を、リアルタイム qPCR、遺伝子改変マウス (*VIPR2-cre;Ai3*) の組織解析によって確かめた。その結果、VIPR2 が肝門脈に発現することを確認した。よって、VIP-VIPR2 シグナルが消化管の低浸透圧感知に寄与することが示唆された(図 8)。

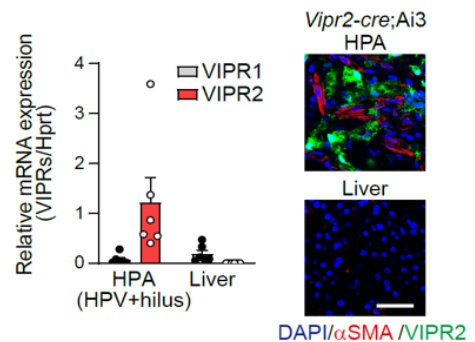


図 8. 肝門脈における VIP 受容体 (VIPR1, VIPR2) の発現

本研究により、水による低浸透圧刺激に対して VIP 等の消化管ホルモンが分泌され、迷走神経を介して肝門脈へ作用することで、中枢へと飲水抑制シグナルが送られることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichiki Takako, Wang Tongtong, Kennedy Ann, Pool Allan-Hermann, Ebisu Haruka, Anderson David J., Oka Yuki	4. 巻 602
2. 論文標題 Sensory representation and detection mechanisms of gut osmolality change	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 468 ~ 474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-021-04359-5	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 該当する

1. 著者名 市木貴子、岡勇輝	4. 巻 40
2. 論文標題 消化管における飲水感知メカニズムの解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1436 ~ 1439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18958/7011-00003-0000168-00	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市木貴子
2. 発表標題 消化管における低浸透圧感知メカニズム
3. 学会等名 第6回感覚フロンティア研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市木貴子
2. 発表標題 迷走神経による消化管内の浸透圧感知メカニズム
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市木貴子
2. 発表標題 消化管における飲水感知メカニズムの解明.
3. 学会等名 第70回実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市木貴子
2. 発表標題 消化管における飲水感知メカニズムの解明
3. 学会等名 第46回日本神経科学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市木貴子
2. 発表標題 神経系による体液恒常性維持メカニズム
3. 学会等名 第76回日本自律神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市木貴子
2. 発表標題 消化管支配神経のin vivo イメージングを用いた飲水感知機構の解明
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 市木貴子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 神経系による飲水制御～消化管における浸透圧センシング機構～ 実験医学 41(20(増刊))	

〔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
---------	---------