

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689013

研究課題名(和文)水分/塩分に対する欲求制御の脳内機構の解明

研究課題名(英文)Brain mechanisms for the regulation of water/salt appetite

研究代表者

檜山 武史(HIYAMA, Takeshi)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教

研究者番号：90360338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,500,000円

研究成果の概要(和文)：水分/塩分欲求制御の脳内機構は、まだ解明されていない。我々は、これまでに、塩分摂取の制御に関わるナトリウム(Na)レベルセンサーが脳弓下器官のグリア細胞に発現するNaxチャネルであることを報告してきた。本研究において、Naxの感度がエンドセリンシグナルにより制御されることを見出した。この機構は、塩分欲求制御のみならず、末梢の神経再生にも関与していた。また、Naxが扁桃体や大脳皮質の一部のニューロンに発現していることを確認した。ニューロンにおいて、Naxはグリア細胞とほぼ同等のNa感受性を示した。

研究成果の概要(英文)：Brain mechanisms for the water-/salt- appetite have not been fully elucidated. We have previously reported that Nax channel expressed in glial cells in the subfornical organs is the Na<sup>+</sup>-level sensor to control the salt intake. In this study, we found that the sensitivity of Nax channels to [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> is enhanced by endothelin signaling. This mechanism underlies not only the salt appetite but also peripheral nerve regeneration. We also verified the expression of Nax in some neurons in the amygdala and cortex. The sensitivity of Nax in neuronal cells was similar to that expressed in glial cells.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：生理学 神経科学 エンドセリン イオンチャネル 脳室周囲器官 神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

脳には血液脳関門が存在し、血中の物質が脳の実質に侵入しない仕組みになっている。その例外が、脳室周囲器官と呼ばれる、血液脳関門を欠いた一群の脳組織であり、その中でも神経細胞の細胞体が存在する神経核を特に「感覚性脳室周囲器官」と呼んでいる。感覚性脳室周囲器官は体液恒常性制御の中樞である。例えば、ヒトが脱水状態に陥ると、体液の  $\text{Na}^+$ 濃度と浸透圧の上昇が起きる。両者の上昇は、感覚性脳室周囲器官(脳弓下器官(SFO)と終板脈管器官(OVLT))で感知される。その情報に基づいて、水分に対する欲求が高まると共に、塩分に対する欲求が下がる。これらは、脱水後のマウスに水と食塩水を選択させる2瓶テストにおいて、水分摂取量の増加と食塩水選択性の低下として観察される。また、感覚性脳室周囲器官からの情報の一部は、室傍核(PVN)と視索上核(SON)に送られ、抗利尿ホルモンであるバソプレッシン(VP)の産生・分泌を促す。VPは腎臓に働きかけることによって尿量を減少させ、水分の喪失を防ぐ。感覚性脳室周囲器官の入出力経路については、古くから精力的に調べられてきたが、肝心の感覚性脳室周囲器官の内部構造が明らかになっていないために、感覚性脳室周囲器官のどのような情報がどこへ伝達されるのか、明らかになっていない。特に、水分や塩分に対する欲求の制御に関わる神経経路については、手がかりすら掴めていない状態であった。

我々は、脳内で感覚性脳室周囲器官のグリア細胞に特異的に発現する  $\text{Na}^+$ チャンネル分子  $\text{Na}_x$  について研究を行い、 $\text{Na}_x$ が  $\text{Na}^+$ レベルの上昇を感知して開口する  $\text{Na}^+$ レベルセンサーであることを明らかにするとともに、 $\text{Na}_x$ が活性化すると乳酸を介したグリア-ニューロン情報伝達が起こり、GABAニューロンの神経活動が制御されることなど、数多くの知見を見出してきた(Nature Neurosci. 2002, J. Neurosci. 2004, Neuron 2007など)。さらに原因不明の本態性高Na血症の原因が  $\text{Na}_x$ に対する自己抗体の産生であったことを突き止めた(Neuron 2010)。最近、侵害刺激センサーである TRPV1が浸透圧センサーとして機能し得ることを初めて明らかにした(Plos One 2011)。これらの新しい知見に加え、最近、アンジオテンシン II受容体発現細胞にガラクトシダーゼを発現する AT1a-lacZマウス、GABAニューロンに GFPを発現する GAD67-EGFPマウス、脱水などの刺激に応じて活性化したニューロンにおいてガラクトシダーゼを発現する TetTagマウスなど、感覚性脳室周囲器官の細胞の同定に有効な新しい遺伝子改変マウスの利用が可能となった。さらに、光活性化チャンネルを用いることによって生きた動物の中で細胞種特異的に神経活動を制御することが可能になり、神経回路と動物行動の関係を解析することが可能になった。こうした新しい

知見と新しい技術を融合することにより、感覚性脳室周囲器官の細胞を分類・同定し、水分/塩分に対する欲求の制御に関わる神経回路を解明することが、漸く実現可能となった。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、(1)感覚性脳室周囲器官の細胞の分類同定と構造解明に取り組む。そして、(2)水分/塩分に対する欲求の制御に至る神経経路を解明を進める。(3)浸透圧のセンシングと水分に対する欲求の制御について、行動学的解析を通じて解明を進める。この3つの課題について研究を発展させ、水分/塩分に対する欲求の制御を担っている神経回路網の解明を目指す。また、将来に向けた新しい技術開発として、(4)マウス個体の脳細胞に光活性化型チャンネルを発現させて光刺激時の行動を解析する。

## 3. 研究の方法

マウスを用いて、脳による水分や塩分の経口摂取の制御機構の解明を総合的に進める。まず、体液恒常性維持の中樞である感覚性脳室周囲器官の構造をマーカー分子の発現分布解析により明らかにする。次に、水分/塩分の摂取行動制御に至る神経経路を逆行性トレーサーと Fosの染色を用いた解析により明らかにする。さらに、光活性化型チャンネルを用いて  $\text{Na}_x$ の行動制御における役割の検証を試みる。水分の経口摂取制御機構の解明に向けて、脳内の浸透圧センサーと考えられる TRPV1の発現分布解析、TRPV1ノックアウトマウス(KO)の行動解析を通じて、体液浸透圧のセンシングと飲水行動の制御機構について解明を試みる。以上の解析を通じて、中枢において水分/塩分に対する欲求の制御に関わる神経経路の解明を目指す。

## 4. 研究成果

(1)  $\text{Na}^+$ レベルセンサー  $\text{Na}_x$ のエンドセリンによる感度調節機構の発見

哺乳類の体液の  $\text{Na}^+$ 濃度は厳密に維持されている。 $\text{Na}_x$ が *in vitro*では  $\text{Na}^+$ 濃度が 150 mMを越えて初めて開口するという事実は、 $\text{Na}_x$ が脳内体液  $\text{Na}^+$ 濃度センサーであれば、生理的  $\text{Na}^+$ 濃度範囲(135~145 mM)の  $\text{Na}^+$ 濃度の上昇を感知しているはず、という理論的要請と相容れない謎であった。本研究では、 $\text{Na}_x$ の活性化閾値が  $\text{Na}_x$ が発現する SFOにおいて共発現する血圧調節ホルモンの1つ ET-3によって調節されており、 $\text{Na}_x$ は *in vivo*では生理的範囲の  $\text{Na}^+$ 濃度上昇を感知する能力を有していることを明らかにした(図1)(Cell Metab., 2013)。SFOにおける ET-3の発現は脱水状態に応じて増加していたことから、 $\text{Na}_x$ の感受性はそれに依りて鋭敏になると推測される。本研究成果から、 $\text{Na}_x$ は ETの濃度上昇によって活性化すること明らかになった。

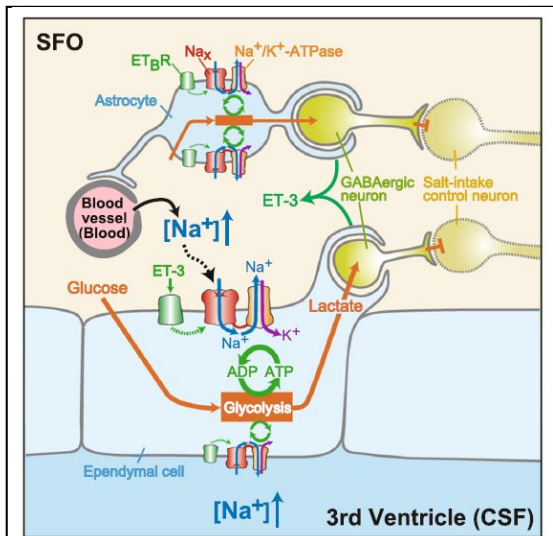


図1 エンドセリンによる調節機構を含めたNa<sub>x</sub>センシング機構の概略図

Noda and Hiyama, 2014 より転載

(2) Na<sub>x</sub>の新たな生理的役割の解明: 神経保護作用

Na<sub>x</sub>は、末梢神経系では非ミエリン化シュワン細胞に発現している。坐骨神経切断後の神経機能の回復過程を調べたところ、野生型マウスに比べ、Na<sub>x</sub>-KO マウスでは大幅に遅れていた(図2)。詳細な解析から、末梢神経切断後、非ミエリン化シュワン細胞のET<sub>B</sub>RがET-1により活性化され、Na<sub>x</sub>が開口して乳酸が供給されることにより、軸索の再伸長が促されていることが示唆された(Eur J Neurosci., 2014)。

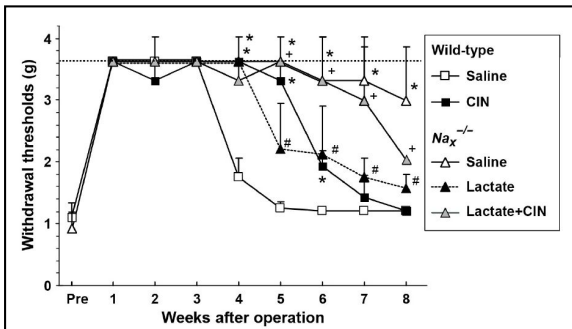


図2 末梢神経切断後の機能回復

足裏刺激に対する脚引き込み応答は、野生型マウスでは坐骨神経切断後 3~4 週間で回復するが( )、Na<sub>x</sub>-KO マウス(Na<sub>x</sub><sup>-/-</sup>)は 8 週目でも回復しなかった( )。野生型マウスの応答は、乳酸トランスポーター阻害剤(CIN)の投与により遅れ( ) 逆に Na<sub>x</sub><sup>-/-</sup>の回復は、切断部位への乳酸投与で改善した( )。

Unezaki et al., 2014 より転載

これは、Na<sub>x</sub>が神経回復過程に関与することを示す初めての成果である。中枢においても、癲癇発作の発生部位において Na<sub>x</sub>の発現が上昇することが報告されており、脳損傷部位において Na<sub>x</sub>が神経保護作用に関与することを

示唆するデータも既に得ている(未発表)。これは医学的にもインパクトのある発見である。

(3) Na<sub>x</sub>結合分子の解明と細胞膜での安定化機構の解明

Na<sub>x</sub>のC末端のPDZ結合モチーフに結合するPDZタンパク質を網羅的に探索し、多数の結合分子を見出した。SFOのグリア細胞においてNa<sub>x</sub>との共局在が確認されたSAP97について解析したところ、Na<sub>x</sub>の細胞膜上での安定化に寄与していることが明らかになった(図3; FEBS Lett., 2012)。さらに、大脳皮質及び扁桃体のニューロンにNa<sub>x</sub>の発現を確認し、ニューロンにおいてはPSD95がNa<sub>x</sub>細胞膜上での安定化に寄与していることを明らかにした(PLOS ONE, 2015)。本成果は、Na<sub>x</sub>がPSD95を介して特定のニューロンのシナプス後部存在していることを示す初めての報告である。

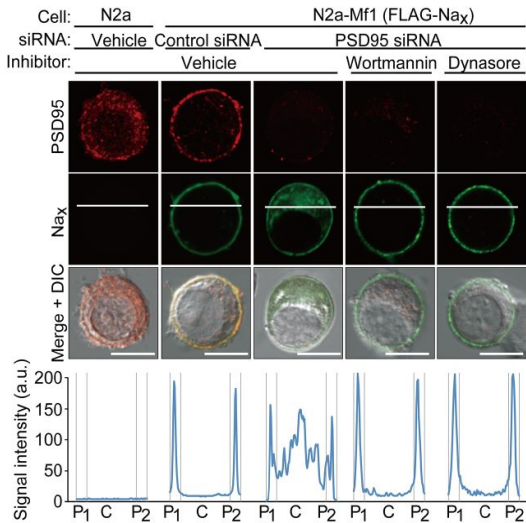


図3 PSD95によるニューロン細胞膜上でのNa<sub>x</sub>の安定化

siRNAを用いてPSD95の発現を抑制するとNa<sub>x</sub>の細胞膜に分布するNa<sub>x</sub>が減少する。

Matsumoto et al., 2015 より転載

(4) 塩分摂取の制御に関わる神経回路の同定

塩欠乏状態のマウスでは、食塩の摂取量が高まる。この時、SFO及びOVLTのアンジオテンシンII(AngII)受容体AT1a発現細胞が活性化していた。SFOのニューロンが投射する神経核の内、神経核Xを破壊すると塩欲求性が落ちた。そこで、当初の計画には無かったが、AT1a遺伝子をloxP配列で挟んだAT1a-floxedマウスを用い、神経核Xに投射するニューロン選択的にAT1a受容体を欠損させたところ、塩欠乏状態に起こる食塩欲求行動が失われた。さらに、光刺激時に神経活動

を抑える働きがある ArcT を SFO から神経核 X に投射する神経細胞に特異的に発現し、塩欠乏状態のマウスの脳内でこの細胞の活動だけを選択的に抑制すると、食塩欲求行動が抑えられた。これらの実験結果から、SFO の AT1a 陽性細胞から神経核 X に投射する神経回路が塩欠乏時の塩欲求行動に必要であることが明らかになった(未発表データ)。本成果は、体液状態に基づく塩の摂取行動を人為的に制御した世界で初めての成果であり、関連研究分野に及ぼす波及効果も極めて大きい。データが揃い次第、論文発表する予定である。

#### 5) 飲水行動に関わる脳内浸透圧センサーの一部を解明

飲水行動の誘発に関わる脳内浸透圧センサーの分子実体については、TRPV1 と TRPV4 が実体であるとするグループがある一方、それを否定するグループもあり、議論が続いている。この問題を決着させるべく、申請者らが開発した装置を用いて、高張 Na 液等を直接的に脳室内に微量注入する条件下で、候補分子の KO マウスの水の摂取行動を解析した。その結果、飲水行動には注入液の浸透圧よりも Na<sup>+</sup>レベルの上昇が重要であること、一部のセンサー候補分子が飲水行動の誘発に関与することが明らかになった。本成果は、論争に終止符を打つものであり、体液恒常性研究に及ぼすインパクトは極めて大きい。

#### 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 6 件)

Matsumoto M, Hiyama TY, Kuboyama K, Suzuki R, Fujikawa A, Noda M. (2015) Channel properties of Na<sub>x</sub> expressed in neurons. PLOS ONE. 10:e0126109. doi: 10.1371/journal.pone.0126109. (査読あり)

Noda M, Hiyama TY. (2015) Sodium sensing in the brain. Pflügers Archiv. 467, 465-474. doi: 10.1007/s00424-014-1662-4. (査読あり)

Noda M, Hiyama TY. (2014) The Na<sub>x</sub> Channel: What It Is and What It Does. Neuroscientist. Jun 24. pii: 1073858414541009. [Epub ahead of print] (査読あり)

Unezaki S, Katano T, Hiyama TY, Tu NH, Yoshii S, Noda M, Ito S. (2014) Involvement of Na<sub>x</sub> sodium channel in peripheral nerve regeneration via

lactate signaling. Eur J Neurosci. 39, 720-729. doi: 10.1111/ejn.12436 (査読あり)

Hiyama TY, Yoshida M, Matsumoto M, Suzuki R, Matsuda T, Watanabe E, Noda M. (2013) Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Na<sub>x</sub>, the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. Cell Metab. 17, 507-519. doi:10.1016/j.cmet.2013.02.018 (査読あり)

Matsumoto M, Fujikawa A, Suzuki R, Shimizu H, Kuboyama K, Hiyama TY, Hall RA, Noda M. (2012) SAP97 promotes the stability of Na<sub>x</sub> channels at the plasma membrane. FEBS Lett. 586, 3805-3812. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.018. (査読あり)

[学会発表](計 9 件)

檜山武史: "脳内センサーと摂取行動"、徳島大学ストレスと栄養クラスター・ミニリポート。徳島大学(徳島県徳島市)2015年1月20日

檜山武史: "体内環境を守る 脳内センサーの実体に迫る" 若手研究者による Rising Sun III 日本科学未来館(東京都江東区)2014年06月15日

檜山武史: "Na<sub>x</sub>チャネルの生理機能" 第9回トランスポーター研究会年会。名古屋市立大学(愛知県名古屋市)2014年06月14日

Hiyama TY: "Biosensing for body-fluid homeostasis." 岡崎総合バイオリポート。自然科学研究機構(愛知県岡崎市)2014年10月6日

清水翔一、森本哲司、奥野美佐子、片淵悠乃、森内優子、桑原怜未、青木政子、松本匡史、檜山武史、米沢龍太、齋藤宏、野田昌晴、高橋昌里: "口渇感の欠如による高Na血症と汎下垂体機能低下症を呈した鞍上部腫瘍の1例 高Na血症発症のメカニズムに対する考察" 第36回日本小児体液研究会。慶應義塾大学(東京都新宿区)2014年8月30日

松本匡史、藤川顕寛、鈴木亮子、清水秀忠、久保山和哉、檜山武史、Randy Hall、野田昌晴: "SAP97は細胞表面における Na<sub>x</sub>チャネルの安定性を促進する" 第85回日本生化学会大会。福岡国際会議

場（福岡県福岡市）2012年12月14日

宇都宮朱里、檜山武史、世羅康彦、早川誠一、香川礼子、原圭一、岡田賢、宮河真一郎、西美和、野田昌晴、小林正夫："脳弓下器官（subfornical organ：SFO）に対する自己抗体を認めた本態性高Na血症の一例" 第46回日本小児内分泌学会学術集会。広島大学（広島県広島市）2012年9月27日

Matsumoto M, Fujikawa A, Suzuki R, Shimizu H, Kuboyama K, Hiyama TY, Hall RA, Noda M: "SAP97 promotes surface expression of Na<sub>v</sub> channels." 第35回日本神経科学会。名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）2012年9月18日

檜山武史："Na イオンと脳：体液の調節機構" 第12回日本抗加齢医学会総会。パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2012年6月23日

〔その他〕

(1)ホームページ等

マイナビニュース、2013年4月4日  
「NIBB、ヒトの体液のナトリウム濃度を一定の値に維持する仕組みを発見」  
<http://news.mynavi.jp/news/2013/04/04/237/>

OPTRONICS ONLINE、2013年4月1日  
「基礎生物学研究所、体液Na濃度センサーの調節機構を解明」  
<http://optronics-media.com/news/20130401/3819/>

基礎生物学研究所プレスリリース、2013年3月29日「体液Na濃度センサーの調節機構の解明 ～脳内エンドセリン-3の役割が明らかに～」  
<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2013/03/29.html>

(2) 新聞掲載の新聞名、掲載年月日等

・科学新聞、2013年4月19日  
「体液Na濃度センサー 基生研 調節機構を解明」

(3) パンフレットの題名、発行年月、発行数等

・Annual Report2013 2014年8月20日1300部  
・基礎生物学研究所要覧2013 2014年3月4日2500部  
・Annual Report2012 2013年7月9日 1700部  
・基礎生物学研究所要覧2012 2012年9月7日2500部

(4) 公開行事の行事名、実施日、テーマ、参加者数等

基礎生物学研究所一般公開、2013年10月5日、体感！最先端バイオの世界、3000名

6. 研究組織

(1)研究代表者

檜山 武史 (HIYAMA, Takeshi)  
基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教  
研究者番号：90360338