

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293043

研究課題名(和文)水分/塩分欲求制御機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the regulatory mechanisms for 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) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳弓下器官のアンジオテンシンII受容体AT1a発現ニューロンの中に口渇感、塩欲求を制御する水ニューロン、塩ニューロンを見出した。前者はコレシストキニン、後者はNa<sup>+</sup>レベルセンサーNaxの下流で動くGABAニューロンにより抑制されていた。また、口渇感はNaxがエポキシエイコサトリエン酸を介してTRPV4を活性化することでも制御されていた。また自己免疫性の無飲症性高Na血症の発症機序を解明した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we investigated neural mechanisms underlying thirst and salt appetite. We identified neurons driving thirst and salt appetite in the subfornical organ and named them water neurons and salt neurons, respectively. Our results show that they are distinct groups of angiotensin II receptor type 1a-positive excitatory neurons. Water neurons were suppressed by cholecystokinin via GABAergic inhibitory neurons. On the other hand, salt neurons were suppressed by another GABAergic population, which are downstream of the glial Na<sup>+</sup>-level sensor (Nax) in the brain. In addition, Nax is also involved in thirst control: The Na<sup>+</sup> signals generated in Nax-positive cells lead to the activation of TRPV4-positive neurons by using epoxyeicosatrienoic acids as gliotransmitters, and stimulated water intake. Finally, our data indicate that the generation of autoantibodies targeting the subfornical organ elicit adipsic hypernatremia without structural anomalies in the hypothalamus.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：生理学 循環器・高血圧 行動学 生物物理 脳・神経 神経疾患 イオンチャネル 体液

### 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直接的には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核である。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、その情報に基づいて、水分に対する欲求(口渇感)が高まると共に、塩分に対する欲求が下がる。これは、マウスに水と食塩水を選択させる2瓶テストにおいて、脱水後に水と食塩水の摂取量比が変化することから明らかである。また、体液量減少時には腎臓から放出されたレニンによりアンジオテンシン I が合成され、アンジオテンシン II に変換されて感覚性脳室周囲器官に作用し、水分や塩分の摂取量を増加させる。一方、感覚性脳室周囲器官からの情報の一部は、室傍核と視索上核に送られ、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内部のどの情報がどこへ伝達されるのか、明らかになっていなかった。特に、口渇感や塩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してきた。また、 $\text{Na}_x$ 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によって、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)。また、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)。

これらの新知見に加え、近年、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、逆行性

遺伝子輸送発現ウイルスベクターと光活性化チャンネルや Cre/loxP システムを組み合わせることで、生きた動物の中で細胞種及び神経経路選択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。また、(2)水分/塩分に対する欲求の制御に至る神経経路の解明を進める。さらに(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つの課題を追求することによって、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。

### 3. 研究の方法

(1)体液恒常性のための  $\text{Na}^+$ レベルセンサーである  $\text{Na}_x$ の分子機能を調節する機構について解析するため、相互作用する分子の探索やイオンイメージング、電気生理学的解析による機能解析を行った。また、(2)口渇感や塩欲求の制御機構を解明するため、脱水や塩欠乏状態においたマウスにおいて水や食塩水の摂取量を測定した。また、特定のニューロンの活動を光遺伝学的に操作し、その影響を解析した。また、脳室に高張液を投与した際に誘発される飲水量について解析した。さらに、(3)脳の局所回路を解明するため、急性脳スライスを作成し、電気生理学的解析を行った。この他、(4)高Na血症の患者の血清を用いてウエスタンブロッティング及びマウス脳切片の染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)神経傷害部位における $\text{Na}_x$ の生理的役割の解明

$\text{Na}_x$ は、末梢神経系では非ミエリン化シュワン細胞(non-myelinating Schwann cells)に発現している。しかし、その機能は不明であった。坐骨神経切断後の  $\text{Na}_x$ の発現を切断部位の近位側と遠位側で調べたところ、切断後1週間以内に発現はいったん失われるが、その後2週間かけて近位側で回復してくることがわかった。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、 $\text{Na}_x$ -KOマウスでは大幅に遅れていた。しかし、切断部位へ乳酸を持続的に投与すると、 $\text{Na}_x$ -KOマウスでも野生型に近いレベルまで回復した。逆に、野生型マウスの切断部位において乳酸の放出/取り込みを阻害すると回復が遅れた。

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エンドセリン受容体

ET<sub>B</sub>R がエンドセリン(ET-1)により活性化され、Na<sub>x</sub>が開口すること、シュワン細胞から Na<sub>x</sub>を介した Na 流入に依存して乳酸放出が起こり、この乳酸が軸索に供給されることによって、軸索の再伸長が促されていることが示唆された。以上の成果は文献 に報告した。

#### (2) ニューロンに発現する Na<sub>x</sub>の特性解明

従来、Na<sub>x</sub>が脳室周囲器官のグリア細胞に発現していることがわかっていたが、新たに作成した抗体を用いて詳細に解析した結果、大脳皮質や扁桃体のニューロンにも発現していることが明らかになった。さらに、生化学的解析から、Na<sub>x</sub>がC末端のPDZ結合モチーフを介してPDZタンパク質の足場タンパク質 PSD95 と結合していることを見出した。Na<sub>x</sub>と PSD95 はシナプス後部に共局在していた。マウスニューロblastoma由来細胞 Neuro2A を用いた細胞内局在解析から、PSD95 は Na<sub>x</sub>の細胞膜における安定性に寄与していると考えられた。さらに、Neuro2A に発現させた Na<sub>x</sub>の特性を電気生理学的に解析し、ラットグリアblastoma由来細胞 C6 に発現した場合と同様の閾値で細胞外 Na 依存性に開口することを明らかにした。ホールセルパッチクランプにより、Na<sub>x</sub>を開口させる陽イオンのイオン選択性について解析し、Na<sup>+</sup> ≈ Li<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup>となっていることが明らかになった。以上の成果は文献 に報告した。

#### (3) Na<sub>x</sub>と TRPV4 による口渴感制御機構の解明

Na<sub>x</sub>が口渴感にも関与していることを見出した。これまで、口渴感形成のための浸透圧センサーとしてイオンチャネルの TRPV1 及び TRPV4 が提案されていた。そこで、TRPV1-KO マウス、TRPV4-KO マウス、Na<sub>x</sub>-KO マウス及び、これらのダブル KO マウスの脳室に高張食塩水を投与し、誘発される飲水行動を解析した。野生型(WT)マウスと TRPV1-KO マウスの飲水量に差は無かったが、TRPV4-KO や Na<sub>x</sub>-KO の飲水量は WT よりも少なかった。また、TRPV4 と Na<sub>x</sub>のダブル KO マウスは、それぞれの単独 KO マウスとほぼ同じ飲水量だったことから、Na<sub>x</sub>と TRPV4 が同じ機構を介していることが示唆された。さらに TRPV4 阻害剤 HC-067047 を投与すると WT の飲水量は減少したが、TRPV4-KO や Na<sub>x</sub>-KO の飲水量は変化なかった。内在性の TRPV4 活性化物質であるエポキシエイコサトリエン酸(EETs)のアラキドン酸からの生合成を阻害するミコナゾールも同様の効果を示した。高張食塩水と共にアラキドン酸や5,6-EETを投与すると Na<sub>x</sub>-KO の飲水量が回復した。しかし、TRPV4-KO には影響なかった。以上より、感覚性脳室周囲器官のグリア細胞の Na<sub>x</sub>が Na<sup>+</sup>レベル依存的に活性化すると EETs が産生され、これをグリオトランスミッターとした TRPV4 陽性ニューロンの活性化につながり、飲水行動を誘発することが示唆された(図 1)。一方、高張ソルビトール液を脳室に投与すると、少量だが飲水が誘発

された。この飲水量は野生型と各 KO マウスにおいて差がなかったことから、今回解析していない未知の浸透圧センサーの存在が示唆された。以上の成果は文献 に報告した。

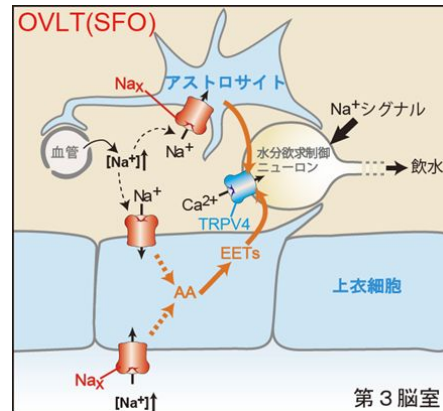


図 1 Na<sub>x</sub>と TRPV4 による口渴感制御機構

#### (4) 口渴感・塩欲求制御ニューロンの解明

SFO の口渴感と塩欲求を制御するニューロンを同定することに成功し、後者が体液 Na<sup>+</sup>レベルに応じて Na<sub>x</sub>からのシグナルを受け、制御されていることを明らかにした。口渴感と塩欲求を制御するニューロンをそれぞれ「水ニューロン」「塩ニューロン」と名付けたが、いずれもアンジオテンシン II 受容体 1a 型(AT1a)を発現する興奮性ニューロンであり、水ニューロンは感覚性脳室周囲器官の一つである OVLT に塩ニューロンは分界条床核腹側部(vBNST)に軸索を伸ばしていた。塩欠乏状態でも脱水状態でも血中アンジオテンシン II 濃度は上昇するので、AT1a を発現する水ニューロンや塩ニューロンは共に活性化するはずである。しかし実際には、動物に水と塩水を自由に摂取させると、塩欠乏状態では塩水を選択的に摂取し、脱水状態では主に水を選択する。このように、体液状態に応じて口渴感と塩欲求が独立に制御される仕組みを調べるため、SFO の内部において水ニューロンと塩ニューロンを制御する局所神経回路を解析した。その結果、塩欠乏(水過剰)状態では、SFO において神経ペプチドで

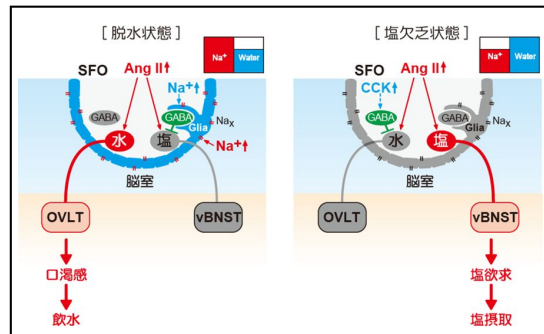


図 2 脱水状態(左)と塩欠乏状態(右)の動物の SFO における口渴感と塩欲求の制御機構

あるコレシストキニン(CCK)の濃度が上昇すること、CCKがGABAニューロンを介して水ニューロンを抑制することがわかった。一方、体液Na<sup>+</sup>レベルが上昇する脱水状態では、Na<sub>x</sub>が活性化し、乳酸を介して別のグループのGABAニューロンを活性化し、塩ニューロンを抑制していた。以上の結果から、口渇感と塩欲求が生じる仕組みと、その体液状態に応じた制御機構が明らかになった(図2)。以上の成果は文献に報告した。

#### (5)持続性高Na血症の発症機構の解明

中枢性尿崩症は視床下部や下垂体の傷害により、抗利尿ホルモンであるバソプレッシンの産生が低下する疾患であり、持続性の高Na血症の原因ともなる。しかし、MRI検査でも著名な脳傷害が見当たらず、しかも口渇感を訴えない Adipsic hypernatremia (無飲症性高Na血症)の患者が報告され、原因不明とされていた。我々は、2010年にNa<sub>x</sub>に対する自己抗体産生が病因と考えられる症例を報告したが、本研究において追加症例を検討した結果、SFOを認識する自己抗体の産生が共通していることを見出した。自己免疫性の炎症によってSFOが機能不全を起こし、SFOからの口渇感制御や塩欲求制御機能、さらにバソプレッシン分泌の制御機能が失われたことでAdipsic hypernatremiaが誘発される疾患であることが示唆された。以上の成果は文献に報告した。

#### 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11件)

檜山 武史. 本態性高ナトリウム血症と自己免疫. 最新医学 73:645-650, 2018. 査読無

Nakamura-Utsunomiya A, Hiyama TY, Okada S, Noda M, Kobayashi M. Characteristic clinical features of adipsic hypernatremia patients with subfornical organ-targeting antibody. Clin Pediatr Endocrinol 26: 197-205, 2017. 査読有  
DOI: 10.1297/cpe.26.197.

Hiyama TY, Utsunomiya AN, Matsumoto M, Fujikawa A, Lin CH, Hara K, Kagawa R, Okada S, Kobayashi M, Ishikawa M, Anzo M, Cho H, Takayasu S, Nigawara T, Daimon M, Sato T, Terui K, Ito E, Noda M. Adipsic hypernatremia without hypothalamic lesions accompanied by autoantibodies to subfornical organ. Brain Pathol 27: 323-331, 2017. 査読有  
DOI: 10.1111/bpa.12409.

Matsuda T, Hiyama TY, Niimura F, Matsusaka T, Fukamizu A, Kobayashi K, Kobayashi K, Noda M. Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. Nat Neurosci 20: 230-241, 2017. 査読有  
DOI: 10.1038/nn.4463.

Hiyama TY, Noda M. Sodium sensing in the subfornical organ and body-fluid homeostasis. Neurosci Res 113: 1-11, 2016. 査読有  
DOI: 10.1016/j.neures.2016.07.007.

Doura T, Kamiya M, Obata F, Yamaguchi Y, Hiyama TY, Matsuda T, Fukamizu A, Noda M, Miura M, Urano Y. Detection of lacZ-positive cells in living tissue with single-cell resolution. Angew Chem Int Ed Engl 55: 9620-9624, 2016. 査読有  
DOI: 10.1002/anie.201603328.

Sakuta H, Nishihara E, Hiyama TY, Lin CH, Noda M. Na<sub>x</sub> signaling evoked by an increase in [Na<sup>+</sup>] in CSF induces water intake via EET-mediated TRPV4 activation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 311: R299-R306, 2016. 査読有  
DOI: 10.1152/ajpregu.00352.2015.

Noda M, Hiyama TY. The Na<sub>x</sub> channel: What it is and what it does. Neuroscientist 21: 399-412, 2015. 査読有  
DOI: 10.1177/1073858414541009.

Noda M, Hiyama TY. Sodium sensing in the brain. Pflügers Archiv 467: 465-474, 2015. 査読有  
DOI: 10.1007/s00424-014-1662-4.

Matsumoto M, Hiyama TY, Kuboyama K, Suzuki R, Fujikawa A, Noda M. Channel properties of Na<sub>x</sub> expressed in neurons. PLoS One 10: e0126109, 2015. 査読有  
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.09.018.

Unezaki S, Katano T, Hiyama TY, Tu NH, Yoshii S, Noda M, Ito S. Involvement of Na<sub>x</sub> sodium channel in peripheral nerve regeneration via lactate signaling. Eur J Neurosci 39: 720-729, 2014. 査読有  
DOI: 10.1111/ejn.12436

〔学会発表〕(計 17 件)

檜山武史, 自己免疫性 adipsic hypernatremia と感覚性脳室周囲器官, 第 91 回日本内分泌学会学術総会, 2018 年

檜山武史, Physiological roles of Na<sup>+</sup> sensing channel Na<sub>x</sub>. 第 95 回生理学会大会 Sensible approaches for sensing channels: From physiology to pharmacology, 2018 年

檜山武史, 脳の体液センシングと細胞間情報伝達, 第 8 回生体界面研究会, 2018 年

Takeshi Hiyama, Emerging mechanisms for body-fluid homeostasis, Japan Society for Autonomic Neuroscience, 2017 年

檜山武史, 体液恒常性の脳内メカニズム: 体液状態に基づく口渇感と塩欲求の実体に迫る, 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) シンポジウム生体恒常性の脳内メカニズム: 生命維持の本質に迫る, 2017 年

檜山武史, 体液モニタリングの情報に基づいて口渇感や塩欲求を生じる神経機構, 第 14 回脳科学研究教育センターシンポジウム 脳機能へのアプローチ: 解剖・生理・薬理・分子生物から, 2017 年

檜山武史, 自己免疫性 adipsic hypernatremia の特徴と理解 ~ 感覚性脳室周囲器官の役割を中心に ~, 第 44 回日本神経内分泌学会学術集会, 2017 年

檜山武史, 水・Na 摂取の脳内調節機構 Adipsic hypernatremia 症例からわかったこと, Pfizer Endocrinology Forum, 2017 Growth & Metabolism, 2017 年

檜山武史, 体液状態に応じて口渇感や塩欲求が制御されるしくみ, 第十回香川脳心腎 G O C R 研究会, 2017 年

檜山武史, 塩の摂取量をコントロールすることは可能か: 口渇感と塩分欲求制御の脳内機構, Hypertension Expert Seminar in Fukuoka, 2017 年

檜山武史, 体液調節機構のメカニズム, 天然薬物研究方法論アカデミー第 19 回岡崎シンポジウム 生理学・生物学から学ぶ天然薬物研究 基礎研究から臨床へ, 2016 年

檜山武史, 体液 Na レベルの感知機構と生理機能, 名古屋市立大薬学部第 163 回薬学談話会, 2016 年

檜山武史 (22 名中 1 番), 感覚性脳室周囲器官を認識する自己抗体の産生と無飲症性高ナトリウム血症, 第 89 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム, 2016 年

檜山武史, エンドセリンシグナルを受けて乳酸を供給する, 第 3 回包括的神経グリア研究会, 2016 年

Takeshi Hiyama, Masaharu Noda, Sodium sensing in the brain, 岡崎統合バイオサイエンスセンターサマースクール 2015, 2015 年

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」ミニリポート研究報告会 特別講義, 2015 年

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, 2014 年

〔図書〕(計 2 件)

檜山武史 Na<sub>x</sub> 脳内環境辞典 高橋良輔, 山中宏二, 樋口真人, 漆谷真編. メディカル ドゥ: pp118-119, 2017.

檜山武史. 水 / 塩欲求制御に関わる神経機構. プレインサイエンス・レビュー 2017. 廣川信隆編. クバプロ: pp151-181, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

基礎生物学研究所プレスリリース(2016 年 12 月 20 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/press/2016/12/20.html>

基礎生物学研究所プレスリリース(2016 年 8 月 5 日) 脳室周囲器官を認識する自己抗体の産生による高ナトリウム血症: 3 症例の発見 <http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2016/08/05.html>

基礎生物学研究所プレスリリース(2016 年 7 月 27 日) 水分摂取行動制御の脳内機構の発見 ~ ナトリウム濃度上昇を検知する Na<sub>x</sub> チャネル分子の新たな役割が明らかに ~ <http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2016/07/27.html>

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