

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24220010

研究課題名(和文) 体液恒常性を司る脳内機構の研究

研究課題名(英文) Study of brain mechanisms controlling body-fluid homeostasis

研究代表者

野田 昌晴 (Noda, Masaharu)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・教授

研究者番号：60172798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 172,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳弓下器官(SFO)に、分界条床核腹側部(vBNST)へ投射して水欲求を制御する“水ニューロン”、あるいは終板脈管器官(OVLT)に投射して塩欲求を制御する“塩ニューロン”と呼ぶべき、AT1a陽性ニューロンの集団があることを見出した。前者はコレシストキニンの、後者はNa⁺の濃度上昇で活性化する、異なるGABA作動性ニューロンから、それぞれ抑制的制御を受けていた。また、脳内Na⁺センサー、NaxのNa⁺濃度感受性がエンドセリン-3によって調節されること、OVLTにおいて、Naxのシグナルがエポキシエイコサトリエン酸を介してTRPV4陽性ニューロンを活性化し、水摂取を制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Body-fluid conditions are continuously monitored in the brain to regulate thirst and salt appetite. We revealed that thirst and salt appetite are driven by two distinct groups of angiotensin II receptor type 1a(AT1a)-positive excitatory neurons in the SFO. We named them “water neurons” and “salt neurons”, respectively. Water neurons were cholecystokinin-dependently controlled by specific GABAergic inhibitory neurons, and projected to the vBNST. On the other hand, salt neurons were controlled by distinct population of GABAergic neurons through body-fluid [Na⁺], and projected to the OVLT. We also found that the sensitivity of Nax, the brain [Na⁺] sensor, was dose-dependently enhanced by endothelin-3. In addition, our investigation of water intake induced by intracerebroventricular administration of a hypertonic NaCl solution revealed that Nax-positive glial cells in the OVLT secreted epoxyeicosatrienoic acids as gliotransmitter to activate TRPV4-positive neurons to generate thirst.

研究分野：分子神経生物

キーワード：神経科学 脳・神経 体液恒常性 イオンチャネル シグナル伝達 水分摂取 塩分摂取 脳弓下器官

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、研究開始時まで、ナトリウム(Na)チャンネルの一種である Na_x が、平常時の体液 Na^+ レベル(~145mM)からの数 mM 程度の上昇を感知して開口する脳内 Na^+ レベルセンサーであることを明らかにするとともに、このセンサーを発現する細胞種、センシングを担う中枢部位、センサー分子によって感知された体液情報が神経活動に変換される機構等を明らかにしてきた (Nature Neurosci. 2002, Neuron 2007, 2010, J. Neurosci. 2000, 2004 など)。 Na_x 遺伝子欠損マウス (Na_x -KO マウス) は体液 Na^+ レベルの上昇を感知できず、脱水状態でも塩分摂取を抑制しないという行動異常を示す。 Na_x は、脳血液関門を欠いた脳室周囲器官の特殊なグリア細胞に発現しており、乳酸をトランスミッターとして塩分摂取の制御に関わる神経細胞を制御していた。この一連の研究成果は、体液センサー分子の実体を初めて明らかにしたものである。申請者らは、このように体液恒常性に関する脳研究において長く世界をリードしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、これらの成果に基づいて、(1) 体液情報の感知部位である感覚性脳室周囲器官の構造(細胞構成と相互関係の解析)、(2) 塩分・水分摂取行動制御に至る神経路の同定、(3) Na^+ レベルのセンシングに基づく塩分摂取行動の制御機構、(4) 浸透圧センシングに基づく飲水行動制御機構、の4つの課題を設定し、体液恒常性を司る脳内機構の全容の解明を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 体液恒常性のための Na^+ レベルセンサーである Na_x の分子機能を調節する機構について明らかにするため、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。
(2) 口渇感や塩欲求の脳内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と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行動について解析した。
(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。
(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による解析を行った。

4. 研究成果

(1) グリア細胞における Na_x の細胞膜局在の制御機構の解明

Na_x の C 末端配列にノン・カノニカル型の PDZ 結合モチーフがあることに着目し、 Na_x に結合する PDZ タンパク質を解析した。様々

な PDZ タンパク質の PDZ ドメインをメンブレン上にアレイ状に配置した PDZ アレイを用いて Na_x に結合する PDZ タンパク質を探索したところ、複数の結合候補分子が明らかになった。その中で SPA97 についてプルダウンアッセイと免疫沈降法によって Na_x との結合を確認した。SAP97 を内在性に発現するグリオブラストーマ由来細胞 C6 に、野生型 Na_x と PDZ モチーフ配列に変異導入した Na_x を発現させた。野生型は細胞膜に局在したのに対し、変異型は細胞膜への局在が有意に減少した。siRNA を用いて SAP97 の発現を減弱させると野生型 Na_x の膜への局在も減少した。イオンイメージング実験から、膜への局在減少が Na_x を介した Na 流入の速度減少に相関することを見出した。以上の成果は文献に報告した。

(2) エンドセリンによる Na_x 感度調節の発見と解析

Na_x が活性化する Na^+ 濃度の閾値は *in vitro* では約 150 mM であるが、体液の Na^+ 濃度は通常 135 ~ 145 mM 付近に保持されている。我々は *in vivo* ではなんらかの機構によって、 Na_x の感度が生理的範囲の Na^+ 濃度変化を感知できるように調節されていると推定した。

血液脳関門を持たない感覚性脳室周囲器官の一つであり、 Na_x による体液 Na^+ レベルセンシングの中枢である脳弓下器官(SFO)は、血圧調節ホルモンであるアンジオテンシン II やエンドセリン類の受容体が多く発現している場所でもある。そこで、これらのホルモンの中に Na_x の Na^+ 濃度感受性に影響を与えるものはないかと調べたところ、エンドセリン-3(ET-3) が用量依存的にこれを高めることが明らかになった。SFO には ET-3 が発現しており、この発現は脱水状態で高まることを見出した。

また、受容体である ET_B R が Na_x を発現するグリア細胞に共発現していることを確認した。 ET_B R は G タンパク質共役型受容体であり、その下流でタンパク質のリン酸化を介した信号伝達が行われる。薬理的解析の結果、ET-3 による Na_x の活性化には PKC (protein kinase C) および ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) の活性化が必要であることがわかった。

脱水状態の動物に水と食塩水を自由に摂取させると水を大量に摂取する一方、食塩水を回避するという行動を示すが、 Na_x -KO マウスはこれを回避しない。あらかじめ ET_B R の阻害剤を脳室内に投与したマウスについて、この脱水時の塩分摂取行動を解析したところ、 Na_x -KO に近い行動を示し、エンドセリンシグナルが脳内 Na^+ センシングに重要な役割を果たしていることが確認された。

以上の成果は、文献に発表したが、掲載誌(Cell Metabolism)の Issue Highlights として Web サイトにおいて紹介されるとともに、科学新聞に掲載された。

(3) 神経傷害部位における Na_x の生理的役割の解明

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 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ることがわかった。神経機能の回復過程を詳細に調べた結果、野生型マウスに比べ、 Na_x -KO マウスでは回復が大幅に遅れることがわかった。しかし、切断部位へ乳酸を持続的に投与したところ、 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、阻害剤を用いて乳酸の放出/取り込みを阻害すると回復が遅れることがわかった。

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 ET_B R が ET-1 により活性化され、 Na_x が開口する。シュワン細胞からは Na 流入に依存して乳酸の放出が起こり、この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。以上の成果は文献 に報告した。

(4) ニューロンに発現する Na_x の特性の解明

従来、 Na_x 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きたが、新たに作成した抗体を用いた詳細な解析の結果、大脳皮質や扁桃体においてニューロンに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_x 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_x と PSD95 はニューロンの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、上述の SAP97 と同様のメカニズムで、神経細胞の細胞膜における Na_x の発現と安定性に寄与していると推定された。

さらに、Neuro2A に発現させた Na_x の特性を電気生理学的に解析したところ、ラットグリオblastoma由来細胞 C6 に発現した場合と同様の閾値で、細胞外 Na^+ 濃度依存的に開口することがわかった。ホールセルパッチクランプにより、 Na_x を開口させる陽イオンのイオン選択性について解析し、 $Na^+ \approx Li^+ > Rb^+ > Cs^+$ 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。

(5) Na_x と TRPV4 による口渇感制御機構の解明

Na_x が口渇感にも関与していることを見出した。これまで、口渇感形成のための浸透圧センサーとして、イオンチャネルである TRPV1 及び TRPV4 が提唱されていた。そこで、 $TRPV1$ -KO マウス、 $TRPV4$ -KO マウス、 Na_x -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_x -KO の飲水量は WT よりも有意に少なかった。また、 $TRPV4$ と Na_x 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。

さらに $TRPV4$ 阻害剤 HC-067047 を投与すると、WT マウスの飲水量は減少したが、 $TRPV4$ -KO や Na_x -KO の飲水量は変化がなかった。この結果は Na_x のシグナルの下流に $TRPV4$ が位置することを示している。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。

また、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_x -KO の飲水量が回復した。しかし、 $TRPV4$ -KO には影響がなかった。以上から、感覚性脳室周囲器官のグリア細胞の Na_x が Na^+ レベル依存的に活性化すると EETs が産生され、これがグリオトランスミッターとして $TRPV4$ 陽性ニューロンの活性化を導き、飲水行動を誘発することが示唆された(図1)。

また、高張食塩水と同じ浸透圧である高張ソルビトール液を脳室に投与すると、少量ではあるが有意な飲水が誘発された。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、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。

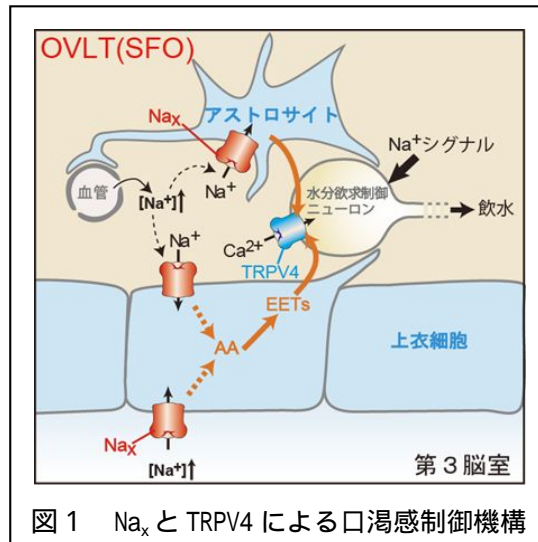


図1 Na_x と TRPV4 による口渇感制御機構

(6) 口渇感と塩欲求を制御するニューロンの解明

SFO において口渇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^+ レベルに応じて Na_x 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。口渇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(Ang 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終板脈管器官(OVLT)に、塩ニューロンは分界条床核腹側部(vBNST)に連絡していた。

塩欠乏状態や脱水状態では血中 Ang II 濃度が上昇し、AT1a を発現する水ニューロンと塩ニューロンは共に活性化されるはずである。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渇感と塩欲求が独立に制御される仕組みを明らかにするため、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⁺レベルが上昇する脱水状態では、Na_x 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、明らかになった口渇感と塩欲求が生じる脳内の仕組みと、その体液状態に応じた制御機構を図で示す(図2)。この成果は文献に報告した。本論文の成果は Nat. Neurosci. 誌の News and Views に取り上げられ、科学新聞にも掲載された。

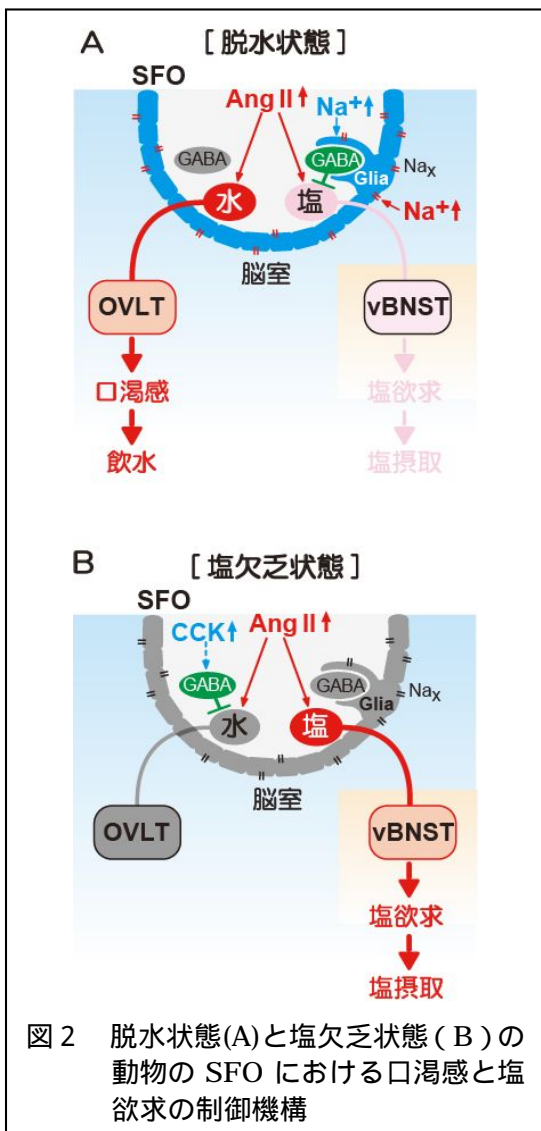


図2 脱水状態(A)と塩欠乏状態(B)の動物のSFOにおける口渇感と塩欲求の制御機構

(7)新規の高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、腹部腫瘍発生に伴うNa_xに対する自己抗体の産生が病因と考えられる症例を報告した。本研究において同様の症状を示す患者、数名について追加検討した結果、SFOを認識する自己抗体の産生が共通することを見出した。自己免疫性の炎症によってSFOが機能不全を起こし、SFO正常な口渇感制御や塩欲求制御、バソプレッシン分泌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13件)

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. 査読無
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_x signaling evoked by an increase in [Na⁺] 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_x 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_x 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_x sodium channel in peripheral nerve regeneration via lactate signaling. *Eur J Neurosci* 39: 720-729, 2014. 査読有
DOI: 10.1111/ejn.12436

Noda M, Sakuta H. Central regulation of body-fluid homeostasis. *Trends Neurosci.* 36: 661-73, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.tins.2013.08.004.

Hiyama TY, Yoshida M, Matsumoto M, Suzuki R, Matsuda T, Watanabe E, Noda M. Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Na_x, the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. *Cell Metab* 17: 507-519, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.cmet.2013.02.018

Matsumoto M, Fujikawa A, Suzuki R,

Shimizu H, Kuboyama K, Hiyama TY, Hall RA, Noda M. SAP97 promotes the stability of Na_x channels at the plasma membrane. *FEBS Lett* 586: 3805-3812, 2012. 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.09.018.

〔学会発表〕(計 4 件)

Hiyama TY, Utsunomiya AN, Matsumoto M, Fujikawa A, Lin CH, Matsuda S, Watanabe E, Kajiwaru H, Niimura F, 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 hypothalamus-pituitary lesions accompanied by autoantibodies to the subfornical organ”. 第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20 日(神戸)

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”. 第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20 日(神戸)

檀山 武史、藤川 顕寛、松本 匡史、渡辺 英治、松田 晋一、梶原 博、新村 文男、宇都宮 朱里、香川 礼子、原 圭一、岡田 賢、小林 正夫、石川 真由美、安蔵 慎、長 秀男、高安 忍、二川原 健、大門 眞、佐藤 知彦、照井 君典、伊藤 悦朗、野田 昌晴 「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、2016 年 4 月 21 日(京都)
Tu NH, Katano T, Hiyama TY, Noda M, Ito S. “Energy coupling of axon-Schwann cells by Na_x and endothelin in nerve regeneration”. *Asian Pain Symposium* 2013, 2013 年 12 月 18-20 日(岡崎)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

門・助教
研究者番号：40343743

(4)研究協力者
なし

〔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>

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

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_xチャン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>

基礎生物学研究所プレスリリース(2013年3月29日)水ニューロンと塩ニューロンの発見～口渇感と塩分欲求が生じる脳機構の解明
<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2013/03/29.html>

科学新聞 2017年1月20日付 4面掲載
「水分・塩分摂取を誘導 2種のニューロン発見 基生研」

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 昌晴 (NODA, Masaharu)
基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部
門・教授
研究者番号：60172798

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

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

作田 拓 (SAKUTA, Hiraki)
基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部