

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K13108

研究課題名(和文)食塩欲求と情動の関係に関する研究

研究課題名(英文)Research on salt appetite and emotion

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳弓下器官(SFO)において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、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。いずれもAng II受容体1a型(AT1a)を発現する興奮性ニューロンであり、塩ニューロンは情動に関する扁桃体延長部の分界床核腹側部(vBNST)に軸索を伸ばしていた。さらに、体液[Na<sup>+</sup>]が上昇する脱水状態では、Naxが活性化し、乳酸を介してSFO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。古くから知られる塩欠乏と情動の関係について、解剖学的に裏付ける神経経路の存在が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In the subfornical organ (SFO), we here found distinct groups of excitatory neurons driving thirst and salt appetite, respectively. We refer to them as 'water neurons' and 'salt neurons', respectively. Salt neurons innervated the ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis (vBNST). BNST is a center of integration for limbic information and valence monitoring, and is important in psychiatric disease such as: the stress response, extended duration fear states and social behavior. We found that signals of Nax channels, sensing [Na<sup>+</sup>] in body fluids, controlled the activity of salt neurons through a group of GABAergic neurons; the GABAergic neurons were activated by lactate from glial cells expressing Nax channel. The natriorexigenic effects of Ang II thus appeared to be controlled based on the [Na<sup>+</sup>] in body fluids through the brain Na<sup>+</sup>-level sensor Nax.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：Naセンサー 体液恒常性 グリア細胞 神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、体内塩濃度と情動に関連のあることが指摘されるようになってきた。例えば、塩欠乏状態に陥ると快感消失症に陥ることが知られている(Hurley et al., Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol. 467, 445-456, 2015)。さらに、塩欠乏状態が繰り返されることによって塩に対する飢餓感が増していく塩渴望(塩中毒)は、麻薬依存と同じ状態であることが報告され(Morris et al., Physiol Behav. 94, 709-21, 2008)、NHK スペシャルでも取り上げられるなど話題となっている。しかし、それぞれ別々の生理現象として報告されていたに過ぎず、その原理を解明し、体系的に理解する試みは全くなされてこなかった。それは、塩分と情動というかけ離れた事象の間に関連を見出すことが困難であったことに加えて、塩欠乏時に活性化される脳神経回路がまったくわかっておらず、研究に手をつける糸口さえ見つからなかったことが大きな要因である。

(2) 研究代表者らは、体液  $\text{Na}^+$  レベルのモニタリング機構と、それに基づく塩分欲求の制御機構について研究を進めてきた。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。

(3) 研究代表者らは、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(Hiyama et al. Nature Neurosci. 2002; Hiyama et al. J. Neurosci. 2004; Shimizu, Watanabe, Hiyama et al., Neuron 2007; Hiyama et al., Cell Metab. 2013 など)。特に、行動実験の結果から、SFO の  $\text{Na}_x$  が塩分欲求の制御に関与していることを突き止めた。さらに原因不明の本態性高  $\text{Na}^+$  血症の原因が  $\text{Na}_x$  に対する自己抗体の産生によって SFO や OVLT が機能不全に陥ったことにあったことを突き止めた(Hiyama et al., Neuron 2010)。

## 2. 研究の目的

研究代表者らの体液  $\text{Na}^+$  レベルのモニタリング機構に関する知見から、塩分欲求を制御する起始神経核は SFO と推定される。そこで、本研究では、光により神経活動を制御するオプトジェネティクスや逆行性ウイルスなどの技術を駆使し、

(1) SFO において塩分欲求を担うニューロンの同定を試みる。

(2) 塩分欲求を担うニューロンの投射先を、特に情動との関係に着目して解析する。

(3) 塩分欲求を担うニューロンを制御する SFO 内部の局所神経回路を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 特定の神経回路に遺伝子を導入することを可能にする逆行性ウイルスを用いて神経経路選択的に遺伝子を発現する。

(2) 興奮性神経細胞や抑制性神経細胞に特異的に Cre リコンビナーゼ遺伝子を発現するマウスに loxP 配列を含むウイルスベクターを導入し、Cre/loxP システムを利用して、神経細胞種特異的に遺伝子を発現する。

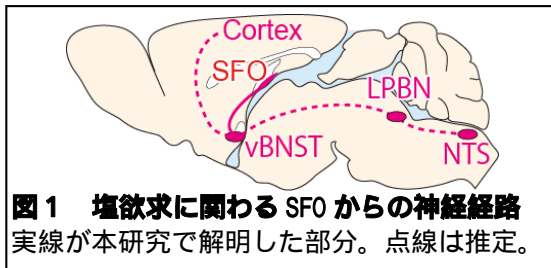
(3) 1,2 の技術を用いて解析対象のニューロンに光感受性タンパク質を発現させ光により活動制御をするオプトジェネティクスを実施する。

(4) オプトジェネティクスによる細胞特異的な活動制御と古典的な行動学実験技術を組み合わせることによって、自由行動中のマウスの特定の神経回路を制御し、飲水行動や塩分摂取行動を解析する。

(5) 1,2 の技術を用いて、解析対象の細胞に蛍光タンパク質を発現したマウスから急性脳スライスを作成し、電気生理学的解析によ

って、局所神経回路を解明する。

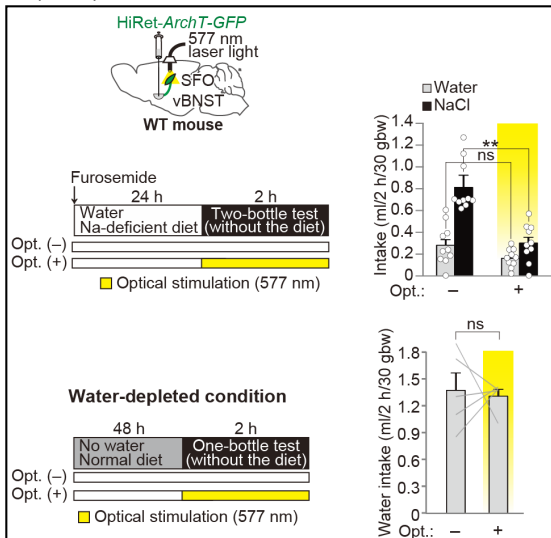
#### 4. 研究成果



**図1 塩欲求に関わるSFOからの神経経路**  
実線が本研究で解明した部分。点線は推定。

(1) オプトジェネティクス（神経活動の光操作技術）や電気生理学的解析により、脳弓下器官(SFO)の口渴感と塩欲求を担うニューロンを同定した。それぞれを水ニューロン、塩ニューロンと命名した。いずれも、アンジオテンシン II 受容体(AT1a)を発現する興奮性ニューロンであった。

(2) 塩ニューロンがストレス応答や不快情動を司る扁桃体延長部の一部である分界条床核腹側部(vBNST)に軸索を投射していることを明らかにした(図1)。さらに、vBNSTに投射する興奮性ニューロンの活動をオプトジェネティクスにより抑えると、塩欠乏状態のマウスの塩欲求が抑制されることを示した(図2)。



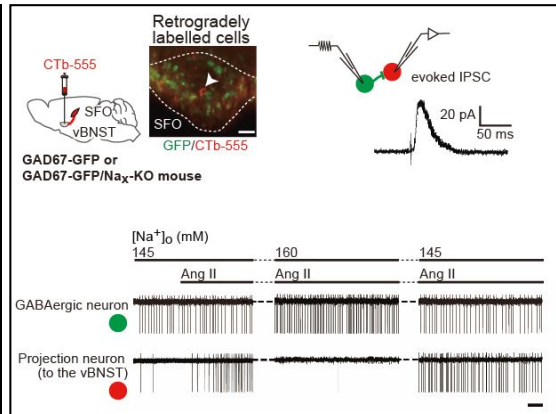
**図2 vBNSTに投射するニューロンの光抑制と摂取行動**

上段：vBNSTに投射するニューロンの活動を光学的に抑制すると(Opt+), 塩欠乏状態のマウスの塩分摂取量が抑えられた。

下段：同様にvBNSTに投射するニューロンの活動を抑制しても、脱水状態のマウスの飲水量には影響なかった。このことから、SFOからvBNSTに投射するニューロンの働きは、塩分選択的であることが明らかになった。

Matsuda et al., 2017 より改変・転載

(3) 急性脳スライスを用いた電気生理学的解析から、SFOに塩ニューロンを抑制する抑

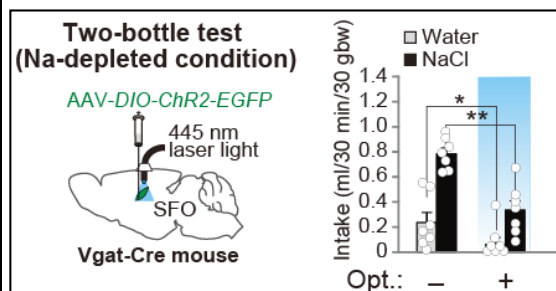


**図3 vBNSTに投射するSFOニューロンのNa依存的なGABAニューロンによる抑制**

vBNSTに投射している塩ニューロン(赤)と、それにシナプス結合を有するGABAニューロン(緑)のペアについて解析した。塩ニューロンは、Ang IIにより活性化した。細胞外[Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub>の増加により、GABAニューロンが活性化し、塩ニューロンの発火活動が抑えられた。GABAニューロンの[Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub>依存的な活性化と、それによる塩ニューロンの抑制は、Na<sub>x</sub>-KOマウスでは観察されなかった。

Matsuda et al., 2017 より改変・転載

制性GABAニューロンが存在し、脱水時には、Na<sub>x</sub>を発現するグリア細胞から放出される乳酸によって、このGABAニューロンが活性化され、塩ニューロンの活動を抑えていることが明らかになった(図3)。この結果を行動レベルで確認するため、SFOのGABAニューロンの活動を光学的に活性化したところ、塩欠乏状態のマウスの塩分摂取量が抑えられ、脳スライスにおいて得られた結果が裏付けられた(図4)。



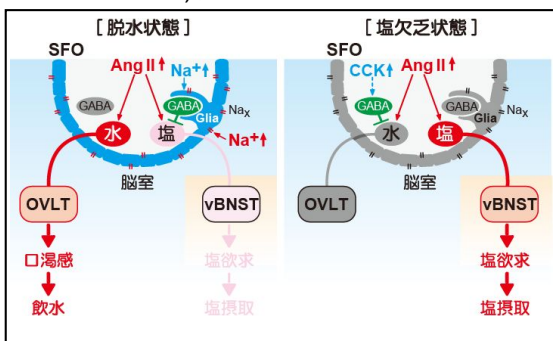
**図4 SFOのGABAニューロンの活性化により塩欠乏状態のマウスの塩分摂取量が抑制される。**

SFOのGABAニューロンに特異的に青色光で活性化するChR2を発現し、塩欠乏時の水と0.3M食塩水の摂取量を調べた。光刺激なしの時(-)に比べ、光刺激(+ )によってGABAニューロンを活性化すると食塩摂取量が抑制された。

Matsuda et al., 2017 より改変・転載

背景に述べたとおり、塩欲求と不安情動の関係については、古くから報告されていたが、そのメカニズムは全くわかっていなかった。

(1) ~ (3) の成果によって塩欲求の制御に vBNST が重要な役割を果たしていることが明らかになり、塩欲求と情動を結ぶ神経機構が初めて明らかになった。図 5 に結果をまとめて示す(以上、Matsuda et al., Nature Neurosci. 2017)。



**図 5 SFO における口渇感/塩欲求の制御機構**  
 脱水状態でも塩欠乏状態でも血中 AngII 濃度は上昇する。脱水状態(左)では、水ニューロンは AngII 依存的に活動するが、塩ニューロンは、 $Na_x$  の下流で駆動される GABA ニューロン(抑制性)により抑制される。一方、塩欠乏状態(右)では、塩ニューロンは AngII 依存的に活性化されるが、水ニューロンの活動は CCK 依存的な GABA ニューロンにより抑えられる。  
 Matsuda et al., 2017 より改変・転載

(4) 塩欲求制御のセンサーである  $Na_x$  の下流で EET が産生されて TRPV4 が活性化し、飲水行動を活性化するという新しい機構の存在が明らかになった (Am J Physiol, 2016)。

(5) 新しい高 Na 血症発症機構を見出した。原因不明の持続性高 Na 血症患者を多数解析し、その中に SFO を認識する自己抗体が体内で産生されている患者を複数見出した。患者血清を用いた動物実験から、SFO の炎症により口渇感や高利尿ホルモンの調節機構が失われ高 Na 血症になる新しい疾患として報告した(Brain. Pathol. 2016)。

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 5 件)  
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, 2017, 323-331. 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. Nature Neurosci. 20, 2017, 230-241. 査読有  
 doi: 10.1038/nn.4463.

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, 2016, 9620-9624. 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, 2016, R299-R306. 査読有  
 doi: 10.1152/ajpregu.00352.2015.

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

〔学会発表〕(計 5 件)  
檜山武史, 体液の Na モニタリングと水分・塩分欲求制御の脳内機構, 口頭発表, 第 12 回環境生理プレコングレス, サラシティ浜松(静岡県浜松市)2017 年 3 月 27 日  
檜山武史, 水分・塩分欲求制御の脳内機構と adipsic hypernatremia, 口頭発表, バゾプレシン研究会, TKP 有楽町会議室(東京都中央区)2017 年 1 月 7 日  
檜山武史, 体液調節機構のメカニズム, 招待講演, 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, 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)2016 年 10 月 14 日  
檜山武史 体液 Na レベルの感知機構と生理機能, 招待講演, 第 163 回薬学談話会 名古屋市立大薬学部(愛知県名古屋市)2016 年 9 月 7 日  
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, 招待講演, 第 89 回日本内分泌学会学術総会, 国立京都国際会館(京都府京都市) 2016 年 04 月 22 日(4 月 21 日~23 日)

〔図書〕(計 2 件)  
檜山武史 他、メディカル ドゥ、脳内環境辞典、2017、156 頁  
檜山武史 他、クバプロ、ブレインサイエンス・レビュー2017、2017、308 頁

〔その他〕

(1) 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「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/press/2016/12/20.html>

基礎生物学研究所プレスリリース、2016年08月05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/press/2016/08/05.html>

基礎生物学研究所プレスリリース、2016年07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> チャンネル分子の新たな役割が明らかに～」

<http://www.nibb.ac.jp/press/2016/07/27.html>

日経バイオテク ONLINE、2016年8月8日「大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所、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」

<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/release/16/08/08/02391/>

(2) 新聞掲載の新聞名、掲載年月日等

科学新聞、2017年1月20日「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

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