

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06534

研究課題名(和文) 飲水行動制御のためのNa<sup>+</sup>濃度感知の脳内機構

研究課題名(英文) Central mechanisms of sodium sensing for water-intake control

研究代表者

作田 拓 (Sakuta, Hiraki)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：40343743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は、NaxからのシグナルがTRPV4を介して飲水行動制御に関与することを明らかにしていたが、これ以外に未知のNa<sup>+</sup>シグナルの飲水行動制御に寄与していることも判明していた。本研究ではOVLN特異的に発現する分子を次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析によって同定し、それらの中からNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体ファミリーのSLC9A4が水分摂取行動制御に関わるNa<sup>+</sup>濃度センサーであることを明らかにすることに成功した。また、そのシグナル経路はNax/TRPV4経路とは独立したものであり、SLC9A4陽性神経細胞がASIC1aを介してpH依存的に活性化されることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、我々の研究グループが明らかにしたNa<sup>+</sup>濃度センサーNaxによる塩分摂取行動制御の脳内機構に関する研究と対を成すものである。したがって、これらの成果と本研究を合わせることで、体液のNa<sup>+</sup>濃度感知とその情報に基づく行動制御機構の全体像が明らかとなり、その学術的意義は極めて高いといえる。体液恒常性の異常は重篤な全身状態の悪化をもたらす。また、体液恒常性維持機構と血圧調節機構の間には強い繋がりがある。本研究の成果は、これらの関連疾患の発症メカニズムの解明、並びにその治療の基礎となる知見を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that another unknown [Na<sup>+</sup>]-dependent pathway besides the Nax/TRPV4 pathway contributes to water intake. In the present study, we screened for novel [Na<sup>+</sup>] sensors involved in water intake control, and identified SLC9A4. Sodium imaging experiments using cultured cells transfected with slc9a4 revealed that SLC9A4 was activated by increases in extracellular [Na<sup>+</sup>] ([Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub>), but not osmolality. Moreover, the firing activity of SLC9A4-positive neurons was enhanced by increases in [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. slc9a4 knockdown in the OVLN reduced water intake induced by increases in [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub>, but not osmolality, in the cerebrospinal fluid. ICV injection experiments of a specific inhibitor suggested that the increase in extracellular [H<sup>+</sup>] caused by SLC9A4 activation next stimulates ASIC1a to induce water intake. Our results thus indicate that SLC9A4 in the OVLN functions as a [Na<sup>+</sup>] sensor for the control of water intake, and that the SLC9A4 signal is independent of the Nax/TRPV4 pathway.

研究分野：神経発生学

キーワード：体液恒常性 飲水行動制御 Na<sup>+</sup>濃度センサー Nax SCL9A4

## 1. 研究開始当初の背景

体液(血液や脳脊髄液等の細胞外液)には生命を維持するために必要な様々な物質が含まれており、それらを一定に保つことが生命維持に不可欠である。体液中の Na<sup>+</sup>濃度や浸透圧の変動は、脳内の sCVOs (脳弓下器官(SFO)や終板脈管器官(OVLT)) と呼ばれる領域において、それぞれ独立にモニターされていると考えられている(Noda and Sakuta, Trends Neurosci., 2013)。sCVOs は脳脊髄液に接しているだけでなく、血液脳関門を欠失していることから、血液を含む体液状態の監視に適している。ここでは Na<sup>+</sup>濃度や浸透圧のセンサーをはじめ、体液成分のモニタリングに関わる分子が特異的に発現し、体液恒常性制御の根幹を担っていると考えられている。動物が脱水状態に陥ると、体液の Na<sup>+</sup>濃度と浸透圧の上昇が起きる。このとき動物は、水分摂取行動を取るとともに、塩分摂取を避けようとする。塩分や水分の摂取行動は sCVOs で感知した情報により制御されると考えられるが、これらに関わる神経回路の詳細は明らかになっていない。脳内の Na<sup>+</sup>濃度や浸透圧のセンサーの実体も長らく不明のままであったが、申請者のグループは、SFO 及び OVLT のグリア細胞において発現する Na<sup>+</sup>チャンネル分子 Na<sub>x</sub> が塩分摂取行動制御を担う Na<sup>+</sup>濃度センサーであることを、一連の研究を通して明らかにしてきた(Noda and Sakuta, Trends Neurosci., 2013)。一方、Na<sub>x</sub> が飲水行動制御に関与するかについては不明であった。また浸透圧センサーに関しては、TRP チャンネルファミリー分子である TRPV1 と TRPV4 がその候補分子として報告されていたが、その後否定する論文が現れ、長く議論が続いていた。申請者らは、混乱状態を整理するには、全身の脱水シグナルを賦活してしまう脱水ではなく、脳の中だけに浸透圧刺激を加える必要があると考えた。そこで、高張液(食塩水またはソルビトール液)を脳室に微量注入した時の、水分摂取行動の解析を行い、野生型マウスとこれらのノックアウトマウスとの比較を行った。その結果、Na<sub>x</sub> が飲水行動を担う Na<sup>+</sup>濃度センサーあることが明らかとなった (Sakuta et al., Am. J. Physiol., 2016; 図 1)。さらに TRPV1 は飲水行動誘発に関係しないこと、TRPV4 もそれ自体はセンサーではなく、Na<sub>x</sub> の活性化によってグリア細胞から放出されるエポキシエイコサトリエン酸 (EETs) を介して活性化することが明らかとなった。つまり、従来の説に反し、TRPV1 と TRPV4 は、いずれも飲水行動の制御に関わる脳内浸透圧センサーではなく、これら以外の未知の浸透圧センサー分子が存在することが示唆された。さらに、この解析から Na<sup>+</sup>濃度上昇による飲水行動誘発には、Na<sub>x</sub> からのシグナルに加えて未知の Na<sup>+</sup>シグナルが必須であることが新たに判明した。

## 2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本研究では、申請者らの独自の研究からその存在が示唆された未知の Na<sup>+</sup>濃度センサー分子の実体を明らかにするとともに、Na<sup>+</sup>濃度上昇時の飲水行動制御の神経回路を明らかにすることを目的としており、これまでの成果と合わせて Na<sup>+</sup>濃度上昇時の飲水行動制御の脳内機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### 実験動物

野生型マウス (C57BL/6J)、Na<sub>x</sub> ノックアウトマウス (Watanabe et al., 2000)、Agtr1a-lacZ マウス (Sugaya et al., 1995)、Slc9a4tm1a(EUCOMM)Wtsi マウス (European Mouse Mutant Archive) は 10-12 週齢で使用した。ウイスターラットは 9-10 週齢で使用した。

### 脳弓下器官(SFO)や終板脈管器官(OVLT)の電氣的破壊

マウスを麻酔後、SFO (anteroposterior, -0.6 mm; lateral, ±0.0 mm; ventral, 2.5 mm; relative to the bregma) や OVLT (anteroposterior, +0.7 mm; lateral, ±0.0 mm; ventral, 5.0 mm; relative to the bregma) にタングステン製単極電極を挿入し、電氣的に破壊した。その後、後述のように脳室内注入用のガイドカニューレを取り付けた。

### 水分摂取量の測定

直接脳内センサーを刺激するために、高浸透圧食塩水(1.0 M)、高浸透圧ソルビトール溶液(1.71 M)や等張溶液の脳室内への注入を前述のように行った(Sakuta et al., 2016)。脳室内注入のために、ガイドカニューレ(26 gauge)を側脳室(anteroposterior, -0.4 mm; lateral, +1.0 mm; ventral, -2.3 mm; relative to the bregma)へ挿入した。

日々の水分摂取量をモニターし、実験前にその値が正常であることを確認した。脳室内注入の最低 1 時間前には餌水を取り除いた。脳室内注入はハミルトンシリンジに 31 gauge の注射針を取り付けたものを用いて行った。注入量は、水分摂取量測定時には 4 μl、5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA) や Psalmitoxin-1 (Pctx1) といった阻害剤投与時は 2 μl であった。

### ウイルス注入

マウスを麻酔後、ウイルス液を定位固装置用いて OVLT (anteroposterior, +0.7 mm; ventral, -5.0 mm; relative to the bregma) へ注入した。注入したウイルス液は 500 nL。

OVLT 内のエポキシエイコサトリエン酸 (EETs) の定量

正常状態のマウスや脱水 48 時間後のマウスから脳を素早く取り出した後、OVLT を切り出し、5 つを集めて 1 つのサンプルとした。サンプル中の EETs 量は、Nexera UHPLC と LCMS-8060 マススペクトロメーターを用いて前述のように行った (Yamada et al., 2015)。

#### 細胞内 Na<sup>+</sup>濃度の測定

マウス神経芽細胞腫細胞株 Neuro2a 細胞をポリエチレンアミンでコートしたカバーガラスに接着させ、SBFI/AM を細胞内に取り込ませた。これを用いて、細胞内 Na<sup>+</sup>濃度の測定を前述のように行った (Hiyama et al., 2002)。

#### 電気生理学的記録

Slc9a4tm1a(EUCOMM)Wtsi マウスを用いた電気生理学的実験は前述のとおり行った (Nomura et al., 2019)。SLC9A4 陽性の神経細胞を可視化するために、Slc9a4tm1a(EUCOMM)Wtsi マウスの脳スライス標本を 20 μM SPIDER-Gal で染色した。

#### RNA-seq

ラットの OVLT と大脳皮質 (コントロール組織) から全 RNA を抽出した。TruSeq™ RNA Sample Preparation Kits for Illumina HiSeq 2000 を用いて、それぞれの RNA サンプルから RNA-seq 用のライブラリー構築を行った。ライブラリーの配列決定は Illumina HiSeq2000 を用いて行った。

### 4. 研究成果

これまでの研究で、Na<sup>+</sup>濃度上昇により sCVOs において Na<sub>x</sub> 陽性のグリア細胞から放出される EETs を介して TRPV4 陽性の神経細胞が活性化され、これによって水分摂取行動が惹起されるというメカニズムを提唱していた。まず sCVOs の SFO と OVLT のうち、どちらが Na<sup>+</sup>濃度感知部位であるかについて検討した。次に、その部位において、薬理学的実験により予想された Na<sup>+</sup>濃度上昇による EETs 産生が実際に起きているか調べた。

SFO と OVLT の破壊実験 (図 1A) を行った結果、OVLT を破壊したマウスでは高張の食塩水や同じ浸透圧のソルビトール溶液を脳室内に注入した時の水分摂取がほとんど消失することが判明した (図 1B)。これに対して SFO を破壊したマウスでは水分摂取行動に影響は見られなかった。この結果は OVLT が水分摂取行動制御に関わる Na<sup>+</sup>濃度あるいは浸透圧の感知部位であることを示している。さらにアデノウイルスを用いて Na<sub>x</sub> ノックアウトマウスの OVLT において Na<sub>x</sub> を発現させると、Na<sub>x</sub> ノックアウトマウスの水分摂取量が野生型マウスレベルまで回復したことから (図 1C)、Na<sub>x</sub> が OVLT において水分摂取行動制御に関わる Na センサーとして機能していることが明らかとなった。

以上の結果に基づき、脱水状態のマウスの OVLT を採取し、その EETs 量を測定した (図 2)。その結果、野生型マウスでは EETs 量が約 2 倍に増加していたのに対して、Na<sub>x</sub> ノックアウトマウスでは、この EETs 量の増加は観察できなかった。以上の結果から、Na<sup>+</sup>濃度上昇により OVLT 内で EETs 産生が起きること、そしてこの EETs 産生は Na<sub>x</sub> 依存的であることが明らかになった。また等量の EETs を OVLT 内に注入すると水分摂取を誘導できることが示された。これらの結果をまとめて、論文として発表した。

次に水分摂取行動制御に関わる Na<sup>+</sup>濃度あるいは浸透圧の感知部位が OVLT であるという実験結果に基づき、ラットの OVLT とコントロール組織として大脳皮質から mRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った。この結果、OVLT に発現が濃縮している分子を多数同定することに成功した。これらの内センサーとして機能し得るイオンチャネルやトランスポーターといったものを、口渇感の制御に関わる新規 Na センサーの候補分子とし

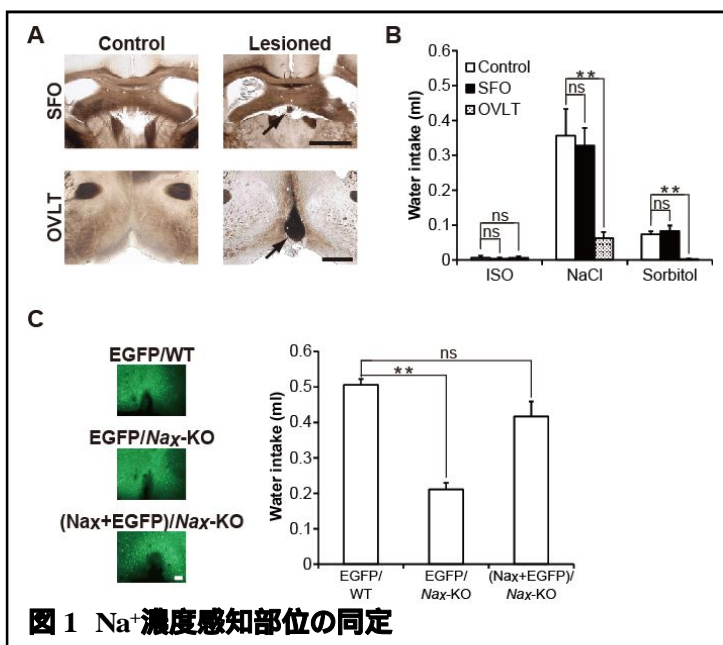


図 1 Na<sup>+</sup>濃度感知部位の同定

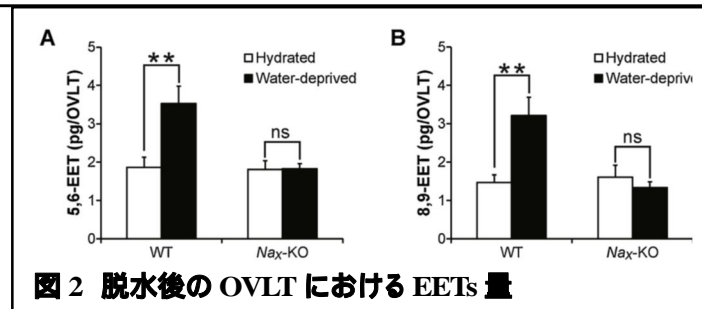


図 2 脱水後の OVLT における EETs 量

た。これらの分子の内 SLC9A4 は、Na<sup>+</sup>のトランスポーターであり、Na<sup>+</sup>濃度上昇により活性化されると報告されていることから、SLC9A4 に着目して以降の解析を行った。SLC9A4 は、トランスクリプトーム解析の結果と一致して、OVLT に多く発現していたが、それは脱水状態のマウス OVLT において、神経活動のマーカーである c-Fos の発現とよく一致していた。さらに SLC9A4 が、水分摂取行動惹起に關与するアンジオテンシン II 1a 型受容体陽性の神経細胞で発現していることも明らかにした。以上の結果は、OVLT 内の SLC9A4 陽性神経細胞が水分摂取行動制御に關与していること示唆している。

SLC9A4 が Na<sup>+</sup>濃度や浸透圧の上昇により活性化されるか確かめるために、SLC9A4 を Neuro2a 細胞に発現させ Na イメージングで検討した。その結果、SLC9A4 発現細胞は細胞外 Na<sup>+</sup>濃度上昇により細胞内の Na<sup>+</sup>濃度が徐々に上昇したが(図 3A)、マンニトールで同じだけ浸透圧を上昇させても細胞内の Na<sup>+</sup>濃度は上昇しなかった(図 3B)。以上のことから SLC9A4 は Na<sup>+</sup>濃度上昇によって活性化するが、浸透圧の上昇では活性化しないことが判明した。

さらに OVLT 内の SLC9A4 陽性神経細胞の性質を調べるために、OVLT の急性スライス標本を用いて電気生理学的解析を行った(図 4)。SLC9A4 陽性神経細胞は通常状態では 1 Hz 程度の自発発火活動をしているが、Na<sup>+</sup>濃度が上昇すると発火頻度が約 3 Hz に上昇した。さらに、この発火頻度の上昇は SLC9A4 ファミリー分子の阻害剤である EIPA の添加により可逆的に阻害されることが判明した。以上の結果から、SLC9A4 陽性神経細胞は Na<sup>+</sup>濃度の上昇により SLC9A4 依存的に活性化することが明らかとなった。

次に SLC9A4 の生体内での機能を調べるために、Slc9a4 特異的 microRNA を発現するアデノ随伴ウイルスを OVLT へ注入して、OVLT 内での Slc9a4 遺伝子の発現を抑制する実験を行った。その結果、SLC9A4 の発現抑制によって、高浸透圧食塩水の脳室内注入時の水分摂取量が減少することが判明した(図 5; NaCl)。これに対して、SLC9A4 の発現抑制は高浸透圧ソルビトール溶液の脳室内注入時の水分摂取量行動に影響を与えなかった(図 5; Sorbitol)。以上の結果は、OVLT 内の SLC9A4 が水分摂取行動制御を担う Na センサーとして機能していることを示している。

SLC9A4 と Na<sub>x</sub> の水分摂取行動制御における関係を調べるために、野生型マウスや Na<sub>x</sub> ノックアウトマウスの OVLT における SLC9A4 の発現を抑制して、高浸透圧食塩水の脳室内注入時の水分摂取量の比較を行った。その結果、SLC9A4 の発現抑制を行った Na<sub>x</sub> ノックアウトマウスの水分摂取量は、SLC9A4 の発現抑制を行った野生型マウスや Na<sub>x</sub> ノックアウトマウスの水分摂取量より有意に少ないことが判明した(図 6A 左)。このように 2 つの制御機構が相互に依存しないものであることが示唆された。さらに面白いことに、この水分摂取量は、高浸透圧ソルビトール溶液の脳室内注入時の水分摂取量と同程度であった。この結果は、SLC9A4 の発現抑制を行った Na<sub>x</sub> ノックアウトマウスでは、Na<sup>+</sup>濃度上昇による水分摂取行動が起こらず、残りの水分摂取量は浸透圧検知の結果引き起こさ

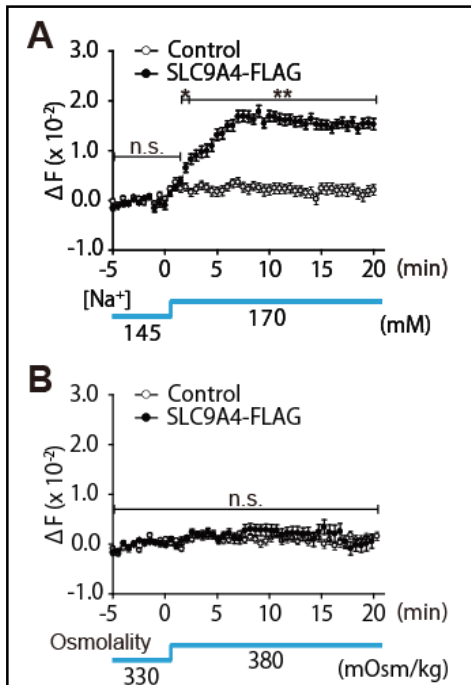


図 3 SLC9A4 は浸透圧ではなく Na<sup>+</sup>濃度の上昇により活性化する

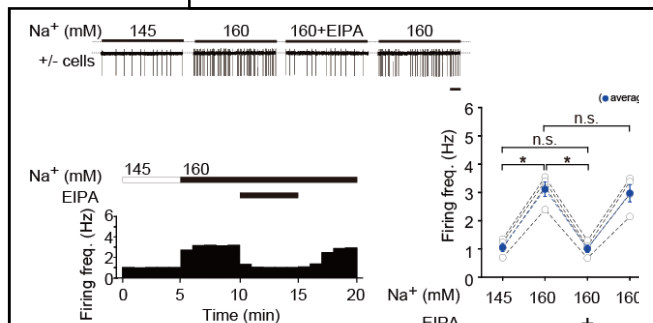


図 4 SLC9A4 陽性神経細胞の Na<sup>+</sup>濃度上昇による活性化

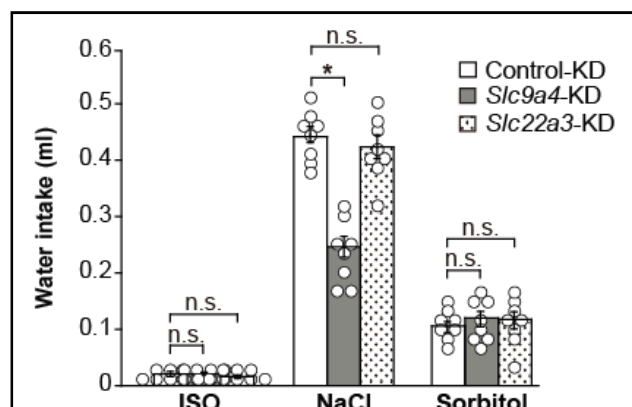


図 5 SLC9A4 の OVLT 内発現抑制(KD)の高浸透圧溶液脳室内注入時の水分摂取量への効果

れたものであることを示唆している。

我々は、以前の研究で、5,6-EETが高浸透圧食塩水の脳室内注入時の  $\text{Na}_x$  ノックアウトマウスの水分摂取量を野生型マウスレベルまで回復させることを報告している。そこで、SLC9A4 シグナルの  $\text{Na}_x$  シグナルへの関与を確かめるために、SLC9A4 の発現抑制を行った  $\text{Na}_x$  ノックアウトマウスの水分摂取に対する 5,6-EET の効果を検討した(図 6A 右)。以前の報告と一致して 5,6-EET は、 $\text{Na}_x$  ノックアウトマウスの水分摂取量を野生型マウスレベルまで回復させたが(図 6A 左右を比較)、同様に SLC9A4 の発現抑制を行った  $\text{Na}_x$  ノックアウトマウスの水分摂取量を SLC9A4 の発現抑制を行った野生型マウスレベルまで回復させた(図 6A 左右を比較)。以上の結果は、SLC9A4 が、EETs による水分摂取行動誘発には関与せず、SLC9A4 シグナルは  $\text{Na}_x$  シグナルとは独立した水分摂取制御機構であることを示唆している。

SLC9A4 は  $\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  を 1 対 1 に交換し、したがって膜電位変化を生じないトランスポーターであり、SLC9A4 の活性化がそのまま SLC9A4 陽性の神経細胞の活性化につながる。SLC9A4 が活性化すると、 $\text{H}^+$  が細胞外へ排出され、細胞外は酸性化することになるが、最近、我々は acid-sensitive ion channel 1a (ASIC1a) が OVLT 内の神経細胞に発現しており、細胞外の pH 減少が ASIC1a を介して、この神経細胞の活性化を引き起こすことを報告している(Nomura et al., 2019)。そこで SLC9A4 陽性の神経細胞の活性化に ASIC1a が関与している可能性を検証するために、高浸透圧食塩水の脳室内注入時の水分摂取に対する ASIC1a 特異的阻害剤 Pctx1 の効果を検討したところ、Pctx1 によって水分摂取量が有意に減少することが判明した(図 6B)。この結果は、水分摂取行動を惹起する OVLT 内の SLC9A4 陽性の神経細胞の活性化に ASIC1a が関与していることを示唆している。

以上をまとめると、本研究で OVLT に発現する SLC9A4 が水分摂取行動制御に関わる  $\text{Na}$  センサーとして機能しており、そのシグナル経路は以前報告した  $\text{Na}_x$  /TRPV4 経路とは独立したものであることが明らかとなった(図 7)。また SLC9A4 陽性神経細胞が、ASIC1a を介した pH 依存的メカニズムによって活性化されることが示唆される。SLC9A4 の発現抑制した  $\text{Na}_x$  ノックアウトマウスでは、 $\text{Na}^+$  濃度上昇による水分摂取行動が完全に失われていることから、 $\text{Na}^+$  濃度上昇による水分摂取行動は、SLC9A4/ASIC1a 経路と  $\text{Na}_x$  /TRPV4 経路の 2 つのシグナル経路で説明できる。さらに、SLC9A4 の発現抑制した  $\text{Na}_x$  ノックアウトマウスでも、浸透圧上昇によって野生型マウスと同様に水分摂取行動が引き起こされることから、これらの 2 つの経路とは独立して浸透圧センサーからのシグナル経路が存在していることが示唆される。この残された浸透圧検知機構を明らかにすることで、水分摂取行動制御機構全体の理解となる。SLC9A4 についての研究結果をまとめて、論文として発表した。

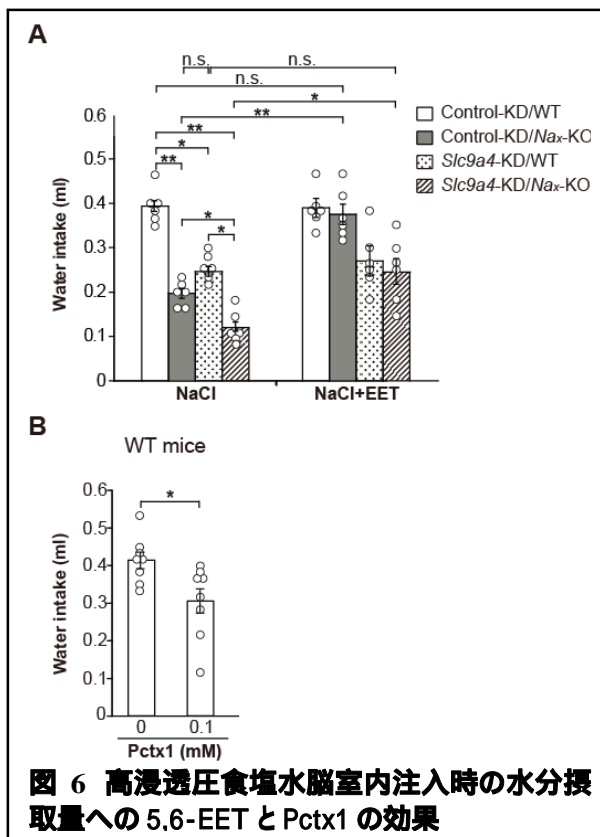


図 6 高浸透圧食塩水脳室内注入時の水分摂取量への 5,6-EET と Pctx1 の効果

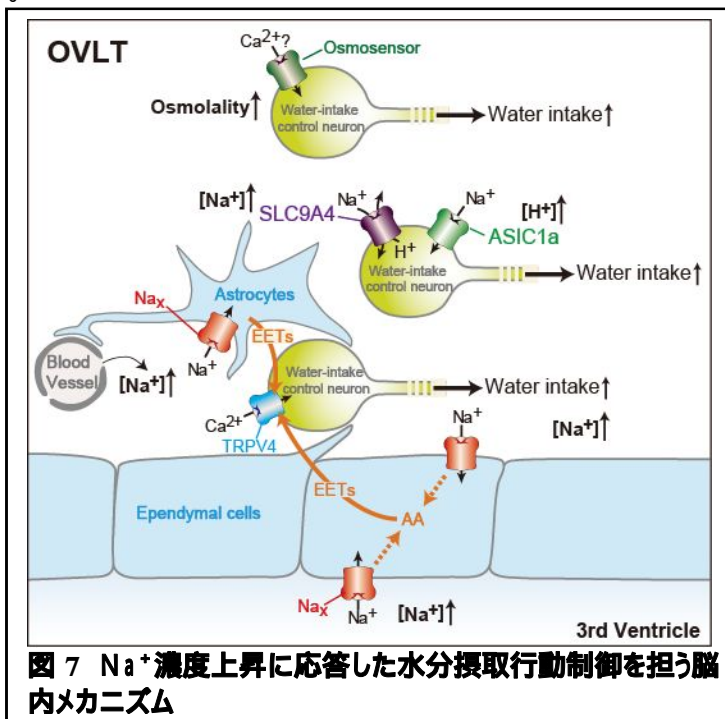


図 7  $\text{Na}^+$  濃度上昇に応答した水分摂取行動制御を担う脳内メカニズム

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakuta Hiraki, Lin Chia-Hao, Yamada Masaki, Kita Yoshihiro, Tokuoka Suzumi M., Shimizu Takao, Noda Masaharu	4. 巻 154
2. 論文標題 Nax-positive glial cells in the organum vasculosum laminae terminalis produce epoxyeicosatrienoic acids to induce water intake in response to increases in [Na <sup>+</sup> ] in body fluids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 45 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.05.006	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 -
1. 著者名 Nomura, K., Hiyama, T.Y., Sakuta, H., Matsuda, T., Lin, C.H., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Kuwaki, T., Takahashi, K., Matsui, S., and Noda, M.	4. 巻 101
2. 論文標題 [Na <sup>+</sup> ] increases in body fluids sensed by central Nax induce sympathetically mediated blood pressure elevations via H <sup>+</sup> -dependent activation of ASIC1a.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 60-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2018.11.017	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 -
1. 著者名 Sakuta Hiraki, Lin Chia-Hao, Hiyama Takeshi Y., Matsuda Takashi, Yamaguchi Katsushi, Shigenobu Shuji, Kobayashi Kenta, Noda Masaharu	4. 巻 472
2. 論文標題 SLC9A4 in the organum vasculosum of the lamina terminalis is a [Na <sup>+</sup> ] sensor for the control of water intake	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 609 ~ 624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-020-02389-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Winkelman Beerend H. J., Howlett Marcus H. C., H?lzel Maj-Britt, Joling Coen, Fransen Kathryn H., Pangei Gobinda, Kamermans Sander, Sakuta Hiraki, Noda Masaharu, Simonsz Huibert J., McCall Maureen A., De Zeeuw Chris I., Kamermans Maarten	4. 巻 17
2. 論文標題 Nystagmus in patients with congenital stationary night blindness (CSNB) originates from synchronously firing retinal ganglion cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------