

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06446

研究課題名（和文）水分摂取行動制御のための浸透圧感知の脳内機構

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

研究代表者

作田 拓 (Sakuta, Hiraki)

基礎生物学研究所・超階層生物学センター・助教

研究者番号：40343743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまで我々は、血液脳関門を欠いた感覚性脳室周囲器官の一つである終板脈管器官(OVLT)のNaxとSLC9A4が水分摂取行動制御を担う脳内Na⁺濃度センサーであることを明らかにしたが、これ以外に未知の浸透圧センサーからシグナルが水分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、我々が同定したOVLT特異的に発現する分子群の中から、未知の浸透圧センサー分子の実体を明らかにすることを目指した。しかしながら一部有力な候補分子を同定できたものの、脳内浸透圧センサー分子の実体を明らかにするには至っていない。

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⁺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より体液のNa⁺濃度および浸透圧の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になるものと考えられ、本研究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）：To date, we have elucidated that Nax and SLC9A4 in the organum vasculosum lamina terminalis (OVLT), a sensory circumventricular organ devoid of the blood-brain barrier, function as [Na⁺] sensors in the brain responsible for water-intake behavior. However, it has also been revealed that signals from unknown osmosensors contribute to the control of water-intake behavior. In this study, we aimed to identify the unknown osmosensor molecules among the molecules specifically expressed in the OVLT, which we have identified. Despite identifying several promising candidate molecules, we have not yet elucidated the precise nature of the brain's osmosensor molecules.

研究分野：神経発生学

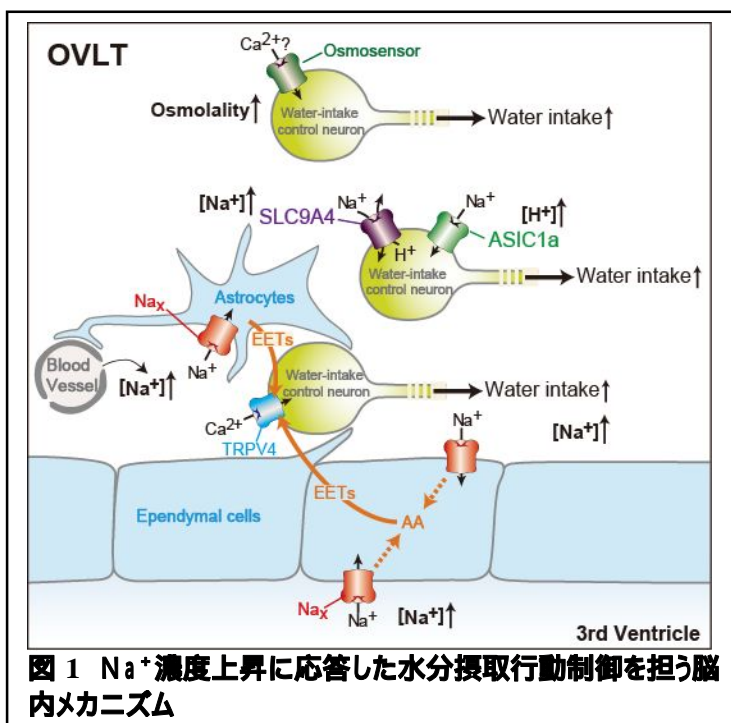
キーワード：体液恒常性 飲水行動制御 浸透圧センサー Nax SLC9A4

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。体液中の浸透圧の変動は、脳内の sCVOs (脳弓下器官(SFO)や OVLT)と呼ばれる領域においてモニターされていると考えられている。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、各種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。さらに浸透圧変動をモニターするために、浸透圧センサーと体液の主要な電解質である Na^+ の濃度を感知する Na^+ 濃度センサーの 2 種類が存在すると考えられている (Noda and Sakuta, Trends Neurosci., 2013)。

動物が脱水状態に陥ると、体液の Na^+ 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。行動制御に関わる脳内の Na^+ 濃度や浸透圧のセンサーの実体は長らく不明のままであったが、研究代表者のグループは、SFO のグリア細胞において発現する Na^+ チャネル分子 Na_x が塩分摂取行動制御を担う Na^+ 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た(Noda and Sakuta, Trends Neurosci., 2013)。一方、 Na_x が水分摂取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。研究代表者らは、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、OVLT の Na_x が水分摂取行動を担う Na^+ 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; Sakuta et al., Neurosci. Res., 2020; 図 1)。さらに TRPV1 は水分摂取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_x 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、いずれも水分摂取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^+ 濃度上昇による水分摂取行動誘発には、 Na_x からのシグナルに加えて未知の Na^+ 濃度センサーからのシグナルが必須であることが新たに判明した。そこで OVLT 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^+/H^+ 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^+ 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 (Sakuta et al., Pflugers. Arch.-Eur. J. Physiol., 2020; 図 1)。また、そのシグナル経路は Na_x /TRPV4 経路とは独立したものであり、SLC9A4 陽性神経細胞が酸感受性イオンチャンネル 1a (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。

このように、研究代表者らの研究によって、水分摂取行動制御に関わる脳内 Na^+ 濃度センサーは明らかとなったが、依然として浸透圧センサーの分子の実体は不明のままである。



2. 研究の目的

研究代表者らは、SFO ではなく OVLT を破壊したマウスにおいて、体液中の浸透圧上昇による水分摂取行動が消失することを報告している (Sakuta et al., Neurosci. Res., 2020)。したがって水分摂取行動に関わる浸透圧センサーも OVLT に特異的に発現していると考えられる。本研究では、研究代表者らがすでに同定している OVLT 特異的分子群の中から、その存在が示唆

された未知の浸透圧センサー分子の実体を明らかにすることを目的としている。研究代表者の研究グループが明らかにした Na^+ 濃度センサー-Nax と SLC9A4 による水分摂取行動制御の脳内機構に関する研究成果と合わせて、浸透圧 (Na^+ 濃度を含む) 上昇時の水分摂取行動制御の脳内機構の全容解明を目指した。

3. 研究の方法

実験動物

野生型マウス (C57BL/6J) は 10-12 週齢で使用した。ウィスターラットは 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。

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。

細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

マウス神経芽細胞腫細胞株 Neuro2a 細胞に解析対象遺伝子を組み込んだ発現ベクターまたはネガティブコントロール用の空ベクターをリポフェクトアミンを用いて導入した。24 時間後、トリプシンを用いて細胞浮遊液を調整し、1 穴あたり 40000 cells/100 μl となるように 96 穴プレートに分注し、37 °C で 24 時間培養した後、Fluo-4 AM を取り込ませた。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は、蛍光プレートリーダーを用いて行い、ポジティブコントロールとしてイオノマイシンを用いた。

4. 研究成果

研究代表者らは、SFO ではなく OVLT を破壊したマウスにおいて、体液中の Na^+ 濃度ばかりではなく浸透圧上昇によっても水分摂取行動が消失することを報告している (Sakuta et al., *Neurosci. Res.*, 2020; 図 2)。したがって水分摂取行動に関わる Na^+ 濃度センサーおよび浸透圧センサーは OVLT に特異的に発現していると考えられた。この実験結果に基づき、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 (Sakuta et al., *Pflugers. Arch.-Eur. J. Physiol.*, 2020; 図 3)。これらの内センサーとして直接機能し得るイオンチャンネルやトランスポーターといったもの

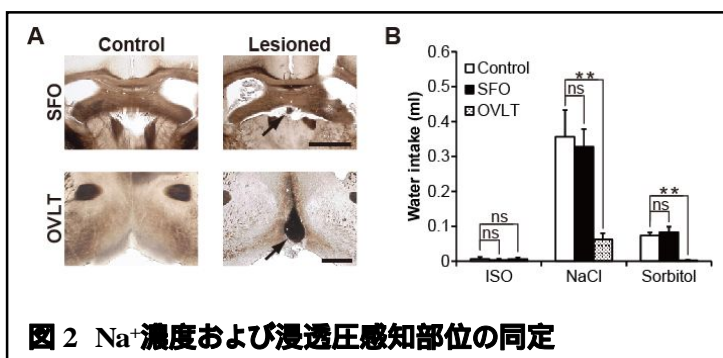


図 2 Na^+ 濃度および浸透圧感知部位の同定

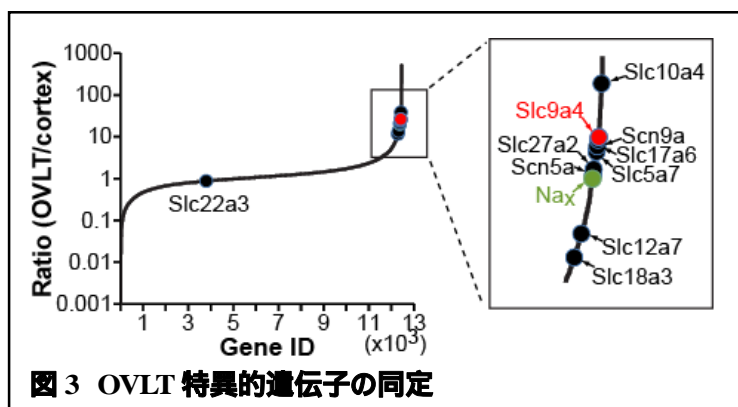


図 3 OVLT 特異的遺伝子の同定

を、口渇感の制御に関わる新規センサーの候補分子とし、それらの機能解析を行った結果、 Na^+/H^+ 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^+ 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 (Sakuta et al., Pflugers. Arch.-Eur. J. Physiol., 2020; 図 1)。しかしながら、これらの中には浸透圧センサーとして機能するものがなく、依然として、その実体は不明のままである。

そこで OVLT に発現が濃縮している分子のうちチャンネルやトランスポーター以外のものへ浸透圧センサーの探索を広げることにした。まず細胞膜の変形によってその活性が変化すると報告されている G タンパク質共役受容体群について注目することにした。神経細胞やグリア細胞が活性化する際には、細胞内 Na^+ イオンや Ca^{2+} イオンの増加を伴う。そこで神経芽細胞腫細胞株 Neuro 2a に脳内浸透圧センサーの候補分子を発現させ、浸透圧の上昇に反応して細胞内 Ca^{2+} イオン濃度が増加するかを Ca^{2+} イメージングによって検討した。現在まで浸透圧変化によって活性が変化すると報告がある G タンパク質共役受容体群を中心

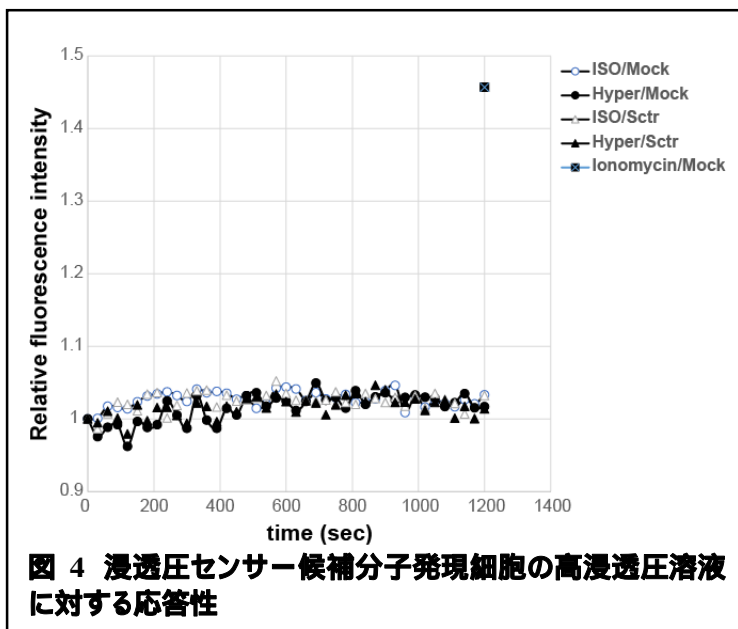


図 4 浸透圧センサー候補分子発現細胞の高浸透圧溶液に対する応答性

に多数の分子について実験を行った。その一例を示すが (図 4) 現在までのところ、浸透圧の上昇に対して応答する分子は発見できていない。したがって、本研究では発現パターン等から一部有力な候補分子を同定できたものの、脳内浸透圧センサー分子の実体を明らかにするには至っていない。これまでの経験から、こういった分子の探索は淡々とこなすのしかないと考えており、今後も地道に浸透圧に反応する分子を探索していく予定である。ただ闇雲に実験を進めるのではなく、過去の文献から候補分子に優先順位をつけ、少しでも早く目的とする分子に行き当たるように工夫していく。

また水分摂取行動制御の脳内機構解明のために、マウス脳における熱負荷による遺伝子発現誘導系の構築を進め、IR-LEGO 法によってマウス脳において外来遺伝子の発現を誘導できることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------