

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893324

研究課題名(和文) 血圧を規定する脳内ナトリウムセンサーの分子実体解明

研究課題名(英文) Identification of the central sodium sensor involved in blood pressure regulation

研究代表者

野村 憲吾 (NOMURA, Kengo)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・NIBBリサーチフェロー

研究者番号：10734519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：食塩感受性高血圧の発症には、食塩過剰摂取による脳脊髄液中のナトリウム濃度上昇が関与すると考えられているが、その機序は不明である。研究代表者は、脳内ナトリウムセンサーNaxが脳脊髄液中のナトリウム濃度上昇を感知し、交感神経の活性化を介して血圧を上昇させている可能性を調べた。野生型マウスとNax遺伝子欠損マウスに対して、脳脊髄液へのナトリウム注入実験と、食塩感受性高血圧の誘導実験をおこない、血圧を測定した。本研究は、食塩感受性高血圧の発症に関与する脳内Na<sup>+</sup>センサーの同定につながるものであり、新たな薬剤標的分子の提示などを通じて、食塩感受性高血圧の治療に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Salt-sensitive hypertension is characterized by exaggerated increment in BP during high salt intake. Although increment of sodium concentration in cerebrospinal fluid during high salt intake could be involved in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension, the mechanism is unknown. I hypothesized that brain sodium sensor Nax senses increased sodium concentration in cerebrospinal fluid, and then elevates BP via activation of sympathetic nervous system. To reveal that Nax is involved in BP regulation, I measured BP of wild type mice and Nax-knockout mice during infusion of hypertonic sodium solution into their cerebral ventricle, or induction of salt-sensitive hypertension. This study could identify the central sodium sensor involved in salt-sensitive hypertension and contribute to the development of the therapeutics through the presentation of a novel drug target.

研究分野：神経科学

キーワード：食塩感受性高血圧 脳・神経 ナトリウム 血圧 交感神経

## 1. 研究開始当初の背景

食塩の過剰摂取が高血圧のリスク因子であることは古くから知られている。食塩と血圧の関係には個人差があり、食塩摂取により血圧が上昇しやすい体質を食塩感受性と呼ぶ。食塩感受性の高血圧に関する膨大な研究の成果から、食塩感受性体質の要因の一部が腎臓の  $\text{Na}^+$  排泄障害であり、食塩過剰摂取時に体内に  $\text{Na}^+$  が貯留してしまうことで血圧が上昇していることがわかってきた (Sanada et al., *Curr Hypertens Rep.* 2011)。さらに、貯留した  $\text{Na}^+$  が血圧を上昇させる機序として、古くから知られている循環血液量の増加に加えて、交感神経系の活性化が関与することが明らかになってきた (Fujita et al., *Curr Hypertens Rep.* 2013)。しかし、 $\text{Na}^+$  貯留と交感神経の活性化をつなぐメカニズムの解明はほとんど進んでいない。

先行研究から、食塩感受性の高血圧患者に食塩負荷をおこなうと、顕著な血圧上昇とともに脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度上昇が観察され、両者間に正の相関があることが報告されている。このとき、血中  $\text{Na}^+$  濃度は、対照群である非感受性患者と同程度であった (Gotoh et al., *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* 1982)。食塩負荷による脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度上昇は、食塩感受性高血圧のモデル動物として頻繁に使用される Dahl の食塩感受性ラットや SHR ラットにおいても報告されている (Huang et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004)。さらに、正常血圧動物の脳室に高張  $\text{Na}^+$  溶液を注入して脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度を上げると、交感神経系を介して血圧が上昇することが報告された (Kawano et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1984)。こうしたことから、食塩過剰摂取時の  $\text{Na}^+$  貯留に伴って脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度が上昇し、それにより交感神経系が活性化して血圧が上昇するという機構が、食塩感受性高血圧の発症に関与する可能性が考えられる。しかし、 $\text{Na}^+$  濃度の上昇を感知して交感神経の活性化を誘発する脳内  $\text{Na}^+$  センサーの分子実体は明らかになっていない。センサーが判らないために、感知がおこなわれている神経核を同定できず、その下流で交感神経系を活性化する神経機構も不明のままである。

研究代表者の所属研究室では、脳に発現する  $\text{Na}^+$  チャンネルである  $\text{Na}_x$  が、細胞外  $\text{Na}^+$  濃度依存的に開口する  $\text{Na}^+$  濃度センサーであり、血液や脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度上昇を感知して塩分摂取行動を制御する機能を持つことを報告してきた (Watanabe et al., *J Neurosci.* 2000; Hiyama et al., *Nat Neurosci.* 2002)。現時点で、生理的な範囲の  $\text{Na}^+$  濃度変化を感知することがわかっている分子は  $\text{Na}_x$  以外にない。研究代表者は、 $\text{Na}_x$  が脳脊髄液中の  $\text{Na}^+$  濃度上昇を感知して血圧上昇を誘発する  $\text{Na}^+$  センサー分子ではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、食塩感受性高血圧に関与

すると考えられる、脳内  $\text{Na}^+$  感知機構の解明である。そのために、 $\text{Na}_x$  による脳内  $\text{Na}^+$  センシングが血圧調節に關与する可能性を明らかにすることを旨とした。

## 3. 研究の方法

次の2点を調べることで、 $\text{Na}_x$  による脳内  $\text{Na}^+$  センシングが血圧調節に關与する可能性を検証した。

- (1) 脳脊髄液中の  $\text{Na}^+$  濃度上昇にตอบสนองした血圧上昇における  $\text{Na}_x$  の関与
- (2) 食塩感受性高血圧モデルの血圧上昇における  $\text{Na}_x$  の関与

- (1) 脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度上昇にตอบสนองした血圧上昇への  $\text{Na}_x$  の関与

これまでの知見から、脳室に高張  $\text{Na}^+$  溶液を注入することで脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度を上昇させると、血圧が上昇することが知られている。そこで、野生型マウスと  $\text{Na}_x$  遺伝子欠損 ( $\text{Na}_x$ -KO) マウスの脳室へ高張  $\text{Na}^+$  溶液を注入したときの血圧変化を測定することで、脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度上昇にตอบสนองした血圧上昇への  $\text{Na}_x$  の関与を調べた。

- (2) 食塩感受性高血圧モデルの血圧上昇への  $\text{Na}_x$  の関与

食塩感受性高血圧モデルの血圧上昇に、 $\text{Na}_x$  が関与するかを調べた。使用するモデルは、マウスで食塩感受性高血圧を誘導するために一般的に使用されている「DOCA-salt モデル」とした。DOCA-salt モデルは、鉍質コルチコイド受容体 (MR) のアゴニストであるデオキシコルチコステロン酢酸塩 (DOCA) の慢性投与をおこなった状態で、飲用水として 0.9% 生理食塩水を与えることで、著しい高血圧を誘導するモデルである。野生型マウスと  $\text{Na}_x$ -KO マウスを用いて DOCA-salt モデルを作製し、両者の血圧を比較した。

また、先行研究から、DOCA-salt モデルの血圧上昇に交感神経系が関与することが報告されているので、野生型マウスと  $\text{Na}_x$ -KO マウスを用いて DOCA-salt モデルを誘導し、交感神経活動の変化を調べた。

## 4. 研究成果

- (1) 脳脊髄液の  $\text{Na}^+$  濃度上昇にตอบสนองした血圧上昇への  $\text{Na}_x$  の関与

脳室への溶液注入は、先端が側脳室に到達するように留置しておいたガイドカニューラを通じておこなった。血圧の測定は、自由行動下のマウスで持続的に血圧測定をおこなうことのできるテレメトリーシステムを用いた。これは、左総頸動脈に留置した圧力センサーで血圧を測定し、マウス体内に埋め込んだ送信機から無線送信することで、体外の解析装置で血圧データを取得するシステムである。野生型マウスを用いて実験をおこない、脳室へ高張  $\text{Na}^+$  溶液を注入したときの血圧上昇をテレメトリーシステムで検出で

きることを確認した。その後、 $Na_x$ -KO マウスの脳室へ同様に高張  $Na^+$  溶液を注入し、血圧を測定した。

また、先行研究の結果から、脳室に高張  $Na^+$  溶液注入したときの血圧上昇には、交感神経の他に血中 AVP 濃度の上昇も関与すると考えられた。そこで、交感神経活動の阻害剤を末梢に投与した条件下、または AVP 受容体の特異的な阻害剤を末梢に投与した条件下で同様の脳室注入実験をおこなった。野生型マウスを用いて、交感神経活動の阻害剤と AVP 受容体阻害剤はどちらも、脳室への高張  $Na^+$  溶液注入による血圧上昇を減弱する作用を持っていることを確認した。さらに、両阻害剤の存在下では、脳室への高張  $Na^+$  溶液注入による血圧上昇は完全に消失し、したがって、交感神経活動の阻害剤の存在下では、AVP の作用による血圧上昇だけを観察することができ、AVP 受容体の特異的阻害剤の存在下では、交感神経活動による血圧上昇だけを観察することができるといえる。そこで、 $Na_x$ -KO マウスを用いて同様の阻害実験をおこない、脳脊髄液の  $Na^+$  濃度上昇による  $Na_x$  の活性化と交感神経活動や AVP 分泌の関連について調べた。

## (2) 食塩感受性高血圧モデルの血圧上昇への $Na_x$ の関与

$Na_x$  が食塩感受性高血圧モデルの血圧上昇に関与しているかを調べるため、野生型マウスと  $Na_x$ -KO マウスを用いて DOCA-salt モデルを作製し、血圧を測定した。DOCA の投与には、慢性投与用に開発されたペレット状の DOCA を用いた。この DOCA ペレットを皮下に埋め込むと、21 日の間 DOCA を安定的に投与することができる。DOCA ペレットの埋め込み手術をおこなったのち、飲料水を水から 0.9% 生理食塩水に交換することで DOCA-salt モデルの誘導をおこなった。血圧測定は、テイルカフ法とテレメトリーシステムでおこなった。テイルカフ法は、拘束・加温状態のマウスで非侵襲的に尾動脈の収縮期血圧を測定する方法である。短時間での血圧変化を測定するには不向きであるが、毎日決められた時間に測定すれば、長期間にわたる血圧変化のデータを多数のマウスで簡便に得ることができる。この特徴から、慢性的な高血圧実験において、治療薬のスクリーニングなどに用いられる手法である。一方、テレメトリーシステムは自由行動下のマウスで持続的に血圧を測定するため、正確な血圧データが取得できる。そこで、テイルカフ法で血圧の変化を確認したのち、テレメトリー法での正確な血圧測定をおこなった。

まず、テイルカフ法での血圧測定を実施した。10 日間以上の予備的な血圧測定により、マウスを測定操作に馴化させたのち、DOCA-salt モデルの誘導を開始した。野生型

マウスを用いて実験をおこなった結果、DOCA-salt 8 日目から顕著に血圧が上昇し、持続的な高血圧となることが確認できた。その後、 $Na_x$ -KO マウスで同様の実験をおこない、DOCA-salt モデルの血圧上昇における  $Na_x$  の関与を調べた。

次に、DOCA-salt モデルの血圧上昇における交感神経系の関与を調べた。野生型マウスの偽手術群と DOCA-salt モデル群に交感神経活動の阻害剤を投与し、血圧低下の度合いを比較すると、DOCA-salt モデルで大きく血圧が低下した。このことから、DOCA-salt モデルの血圧上昇に交感神経系が関与することが確認された。

この実験に加えて、交感神経活動の指標として、末梢臓器（腎臓・心臓）におけるノルエピネフリン含有量の測定をおこなった。ノルエピネフリンは交感神経の神経終末から標的臓器へと放出される神経伝達物質である。先行研究の結果から、DOCA-salt モデルでは、交感神経活動が持続的に活性化したせいでノルエピネフリンが消費され、心臓と腎臓でノルエピネフリン含有量が減少することが報告されている。そこで、野生型マウスで誘導した DOCA-salt モデルにおいて、心臓と腎臓のノルエピネフリン含有量を測定した結果、偽手術群よりも少なくなっており、交感神経活動の亢進が示唆された。

さらに、交感神経活動制御の中核である延髄吻側腹外側野 (RVLM) の神経活動レベルについて検討した。神経活動レベルの評価のために、神経活動の指標である c-Fos タンパクの免疫染色をおこない、RVLM のニューロンのうち c-Fos タンパク陽性となった細胞の数を計測した。野生型マウスにおいて DOCA-salt モデル群と偽手術群を比較すると、c-Fos タンパク陽性ニューロンの数が DOCA-salt 群で増加していた。このことから、DOCA-salt モデルでは、RVLM の神経活動レベルの上昇を介して交感神経活動が亢進している可能性があった。

その後、交感神経活動阻害実験、ノルエピネフリン含有量測定、c-Fos の免疫染色を  $Na_x$ -KO マウスを用いておこない、DOCA-salt モデルの交感神経活動の変化における  $Na_x$  の関与を調べた。

最終的に、テレメトリーシステムでの正確な血圧測定を実施した。テレメトリーシステムの埋め込み手術から十分に回復させ、平常時の血圧データを 3 日間記録したのち、DOCA-salt モデルの誘導をおこなった。野生型マウスを用いて実験をおこない、DOCA-salt モデルを誘導したときの正確な血圧の変化を取得できたため、 $Na_x$ -KO マウスにも DOCA-salt モデルの誘導をおこない、正確な血圧データの取得をおこなった。

本研究では、研究期間内に上記の実験を実施した。これは、血圧調節に関与する  $Na^+$  センサーの同定につながるものである。今後、

脳脊髄液の  $\text{Na}^+$ 濃度上昇に応答した血圧上昇や、食塩感受性高血圧の発症に關与する脳内  $\text{Na}^+$ センサーの分子実体を明らかにすることができれば、新たな治療標的分子の提示を通じて食塩感受性高血圧の治療に貢献できる可能性がある。加えて、血圧調節のための  $\text{Na}^+$ 感知がおこなわれる神経核の同定にもつながるため、 $\text{Na}_x$ シグナルがどのようにして交感神経系に伝達されるのかを調べていくことで、体内  $\text{Na}^+$ 貯留と交感神経系の活性化をつなぐ脳内メカニズムを包括的に解明することが可能になる。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

野村憲吾 (NOMURA, Kengo)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部

門・NIBB リサーチフェロー

研究者番号：10734519

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし