

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 脳内浸透圧/ Na^+ レベルセンサーの動作機序と生理機能の解明
(英語) Studies on the mechanics and physiological functions of brain osmosensors and Na^+ -level sensors

研究開発担当者 (日本語) 基礎生物学研究所 助教 檜山武史
所属 役職 氏名： (英語) National Institute for Basic Biology, Assistant Professor
Takeshi Hiyama

実施期間： 平成28年10月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

体液状態は感覚性脳室周囲器官(sCVOs)において常に監視されている。sCVOsは、脳弓下器官(SFO)、終板脈管器官(OVLT)、最後野の総称であるが、この3つの神経核には、ニューロンの細胞体があるにも関わらず血液脳関門がないという共通の特徴がある。また、sCVOsには、アンジオテンシン II(Ang II)受容体が高密度に発現していることも知られている。これまでの檜山らの研究から、SFOとOVLTのグリア細胞(上皮細胞とアストロサイト)には、ナトリウム(Na)チャネル Na_x が発現しており、 Na_x が体液 Na^+ レベル($[Na^+]$)の生理的範囲の上昇を感知するセンサーであること、 Na_x は Na^+/K^+ -ATPase と安定的に結合しており、それにより $[Na^+]$ 依存的にグリア細胞の嫌氣的糖代謝を活性化し、乳酸放出を促すこと、乳酸はSFOのGABA作動性抑制性ニューロン(GABAニューロン)を活性化するグリオトランスミッターとして機能することがわかっている。

本年度、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 $[Na^+]$ 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 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OVLTに塩ニューロンは分界条床核腹側部(vBNST)に軸索を伸ばしていた。塩欠乏状態や脱水状態では血中 Ang II 濃度が上昇することから、AT1aを発現する水ニューロンや塩ニューロンも活動するものと想定される。しかし、実際には、動物に水と塩水を提示すると、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調べるため、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)の濃度が上昇し、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 $[Na^+]$ 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。以上の結果から、 $[Na^+]$ センサー Na_x の情報に基づいて、体内状態に応じた摂取行動の制御が行われる神経機構が明らかになった。

また、 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のTRPV1及びTRPV4が提案されていた。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)マウスに比べ、TRPV1-KOマウスの飲水量に異常はなかったが、TRPV4-KOや Na_x -KOの飲水量はWTよりも少なかった。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の飲水量は変化なかった。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類(EETs)のアラキドン酸からの生合成を阻害しても同様の効果が観察された。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には影響なかった。以上より、 Na_x 陽性のグリア細胞の $[Na^+]$ 依存的な活性化がEETsの放出につながり、EETsがグリオトランスミッターとしてTRPV4を活性化することによって、TRPV4陽性ニューロンが活性化し、飲水行動が誘発されることが示唆された。また、浸透圧を合わせた高張ソルビトール液を脳室に投与すると、ごく少量の飲水が誘発された。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。

Body-fluid condition is continuously monitored in the sensory circumventricular organs (sCVOs), brain regions that lack a blood–brain barrier but harbor neuronal cell bodies. sCVOs consist of the subfornical organ (SFO), organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) and area postrema. sCVOs are known to extensively express angiotensin II (Ang II) receptors. We previously demonstrated that Na_x channels are mainly expressed in the glial cells (ependymal cells and astrocytes) of the SFO and OVLT as a brain Na^+ -level ($[\text{Na}^+]$) sensor that detects $[\text{Na}^+]$ elevations in body fluids within the physiological range. Na_x stably interacts with Na^+/K^+ -ATPase whereby $[\text{Na}^+]$ dependently activate anaerobic glucose metabolism of the glial cells, leading to the cellular release of lactate, which functions as a gliotransmitter that activates GABAergic inhibitory neurons in the SFO.

In the SFO, we here found distinct groups of excitatory neurons driving thirst and salt appetite, respectively. They both express Ang II receptor type 1a (AT1a) and separately drive thirst and salt appetites based on body fluid conditions. We refer to them as ‘water neurons’ and ‘salt neurons’, respectively. In mice under water- and/or Na-depleted conditions, the Ang II levels in blood increased to similar levels in all of these conditions. However, the resultant intake behaviors were different among them; The Na-depleted condition induced salt intake but not water intake in mice, whereas the water-depleted condition increased water intake, but salt intake was evidently less than water intake, reflecting salt avoidance due to high $[\text{Na}^+]$ in body fluids. To examine the neural mechanisms by which thirst and salt-appetite were differently controlled, we examined local circuits in the SFO. Water neurons innervated the OVLT, whereas salt neurons did the vBNST. We found that cholecystokinin (CCK) level was increased in the SFO under Na-depleted (water satiated) conditions and that CCK controlled the activity of water neurons via GABAergic neurons. On the other hand, signals of Na_x channels sensing $[\text{Na}^+]$ in body fluids controlled the activity of salt neurons through distinct GABAergic neurons; the GABAergic neurons were activated by lactate from glial cells expressing Na_x channel. The balance between the dipsogenic and natriorexigenic effects of Ang II thus appeared to be controlled based on the $[\text{Na}^+]$ in body fluids through the brain Na^+ -level sensor Na_x .

We also found that Na_x is also involved in thirst generation. It was proposed that transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels TRPV1 and TRPV4 are the osmosensor for thirst responses. To test this idea, we investigated voluntary water intake immediately induced after an intracerebroventricular administration of a hypertonic NaCl solution in *TRPV1*⁻, *TRPV4*⁻, *Na_x*⁻, and their doublegene knockout (KO) mice. The induction of water intake by *TRPV1*-KO mice was normal, whereas intake by *TRPV4*-KO and *Na_x*-KO mice was significantly less than that by WT mice. Water intake by *Na_x/TRPV4*-double KO mice was similar to that by the respective single KO mice. When TRPV4 activity was blocked with a specific antagonist, water intake by WT mice was significantly reduced, whereas intake by *TRPV4*-KO and *Na_x*-KO mice was not. Similar results were obtained with the administration of miconazole, which inhibits the biosynthesis of epoxyeicosatrienoic acids (EETs), endogenous agonists for TRPV4, from arachidonic acid (AA). Intracerebroventricular injection of hypertonic NaCl with AA or 5,6-EET restored water intake by *Na_x*-KO mice to the wild-type level but not that by *TRPV4*-KO mice. These results suggest that $[\text{Na}^+]$ -dependent activation of Na_x -positive glial cells leads to the activation of TRPV4-positive neurons in sCVOs to stimulate water intake by using EETs as gliotransmitters. Intracerebroventricular injection of equiosmolar hypertonic sorbitol solution induced small but significant water intake equally in all the genotypes, suggesting the presence of an unknown osmosensor in the brain.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 4 件）

1. Hiyama TY, Noda M. Sodium sensing in the subfornical organ and body-fluid homeostasis. *Neurosci Res.* 2016, 113, 1–11,.
2. Sakuta H, Nishihara E, Hiyama TY, Lin CH, Noda M. Nax signaling evoked by an increase in [Na⁺] in CSF induces water intake via EET-mediated TRPV4 activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016, 311, R299–R306.
3. 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.* 2016, 55, 9620–9624.
4. 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.* 2017, 20, 230–241.

著書

5. 檜山武史. Nax. *脳内環境辞典 2017*. メディカル ドゥ（共著）
6. 檜山武史. 水／塩欲求制御に関わる神経機構. *ブレインサイエンス・レビュー2017*. 2017. クバプロ（共著）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 体液調節機構のメカニズム, 口頭, 檜山武史, 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, 2016/10/14, 国内.
2. 水分・塩分欲求制御の脳内機構と adipsic hypernatremia, 口頭, 檜山武史, バズプレシン研究会, 2017/1/7, 国内.
3. 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, 檜山武史, 第 12 回環境生理プレコングレス, 2017/3/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 塩の摂取量をコントロールすることは可能か: 口渇感と塩分欲求制御の脳内機構, 檜山武史, *Hypertension Expert Seminar in Fukuoka*, 2017/2/3, 国内.

(4) 特許出願

なし