

Nesfatin-1 ニューロンによる Na⁺ センシングと血圧制御機構の解明

矢田 俊彦

自治医科大学医学部

概要 脳の Na⁺感受性は血漿 Na⁺濃度と血圧の制御に中心的役割を果たすと考えられる。申請者は、摂食・代謝の統合中枢である視床下部室傍核(PVN)のニューロンが Na⁺濃度上昇に細胞内 Ca²⁺増加応答を示すことを予備的に見出している。視床下部神経ペプチド Nesfatin-1 は前駆体 NUCB2 から作られ、摂食・代謝を制御するが、その脳室内投与が血圧上昇をもたらすことが内外から報告されている。さらに PVN Nesfatin-1 が概日リズム振動を示すことを申請者は報告している。申請者は本研究で、「PVN Nesfatin-1 ニューロンが Na⁺センサーとして機能し、Na⁺濃度増加を感知して血圧上昇に抑制をかける」役割を仮説し検証することを目的とした。

本研究では、PVN には Na⁺応答ニューロンが存在すること、その多くが Nesfatin-1 ニューロンであることを発見した。PVN ニューロンの Na⁺応答の機序には Na⁺濃度増加そのものの感知が関与することが明らかとなり、一方浸透圧変化の受容も一部関与する可能性が示唆される。Na⁺応答ニューロンの全てがアンジオテンシン II に応答し、約 40%がαMSH に応答したことから、PVN ニューロンの Na⁺応答は主として血圧調節に関与している可能性が示唆されるが、摂食抑制への関与も否定できない。循環中枢の延髄孤束核による PVN の調節に関し、NTS の GLP-1 ニューロンが PVN へ神経投射すること、GLP-1 が PVN Nesfatin-1 ニューロンを活性化することが明らかとなった。

1. 研究目的

本態性高血圧の成因として、塩分(Na⁺)感受性の亢進が深く関与すると考えられているが、Na⁺感受性の機序には不明な部分が多い。種々の臓器が Na⁺感受性を示すが、脳の Na⁺感受性は血漿 Na⁺濃度と血圧の制御に中心的役割を果たすと考えられる。申請者は、摂食・代謝の統合中枢である視床下部室傍核(PVN)のニューロンが 5 mM の Na⁺濃度上昇に細胞内 Ca²⁺増加応答を示すことを予備的に見出している。Nesfatin-1 (Nesf)は前駆体 NUCB2 から作られ、摂食・代謝を制御する神経ペプチドであるが、その脳室内投与が血圧上昇をもたらすことが内外から報告されている。さらに PVN Nesf が概日リズム振動を示すことも報告している。申請者は本研究で、「PVN Nesf ニューロンが Na⁺センサーとして機能し、Na⁺濃度増加を感知して血圧上昇に抑制をかける」役割を仮説し、検証する。Na⁺感受の責任分子および血圧調節に至る神経経路の解明を目指す。

2. 研究方法

PVN Nesf ニューロンの Na⁺応答

1. マウスの視床下部 PVN からニューロンを単離し、fura-2 蛍光画像解析により細胞内 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)を測定し、灌流液の Na⁺濃度の増加に対する応答を調べる。その後、抗 Nesf 抗体を用いた免疫組織化学により細胞を同定する。
2. この Na⁺応答が、Na⁺センサー分子候補である上皮性 Na⁺チャネル (ENAC)、Na⁺-glucose 共輸送担体 (SGLUT)などの阻害剤により抑制されるかを調べる。
3. Na⁺応答による[Ca²⁺]_i 増加と細胞活性化を仲介するシグナル伝達、Ca²⁺チャネルを薬理学的実験により同定する。

PVN Nesf ニューロンと延髄循環中枢の神経伝達経路

1. PVN Nesf ニューロンと循環中枢の延髄孤束核 (NTS) の間の神経連絡を、逆行性トレーサー局所投与により

検討する。

Na⁺感受性 Nesf ニューロンによる血圧制御

1. AAV を用いた shRNA 処理により PVN Nesf/NUCB2 発現をノックダウンし、tail-cuff 法により血圧に対する影響を検討する。

3. 研究結果

PVN Nesf ニューロンの Na⁺応答

マウスの視床下部 PVN からニューロンを単離し、fura-2

蛍光画像解析により細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) を測定し、灌流液 KRB の Na⁺濃度を 134 mM から 139 mM に増加 ($\Delta\text{Na}^+=10$ mM) すると [Ca²⁺]_i 増加が誘導された (図 1A)。46 個の単離 PVN ニューロンのうち 13 個が [Ca²⁺]_i 増加応答を示した (図 1C)。灌流液 KRB の Na⁺濃度を 134 mM から 144 mM に増加 ($\Delta\text{Na}^+=5$ mM) すると、39 個の PVN ニューロンのうち 15 個が [Ca²⁺]_i 増加応答を示した (図 1B, C)。図 1 に示す細胞は [Ca²⁺]_i 測定後、抗 Nesfatin-1 抗体を用いた免疫組織化学により Nesfatin-1 ニューロンと同定

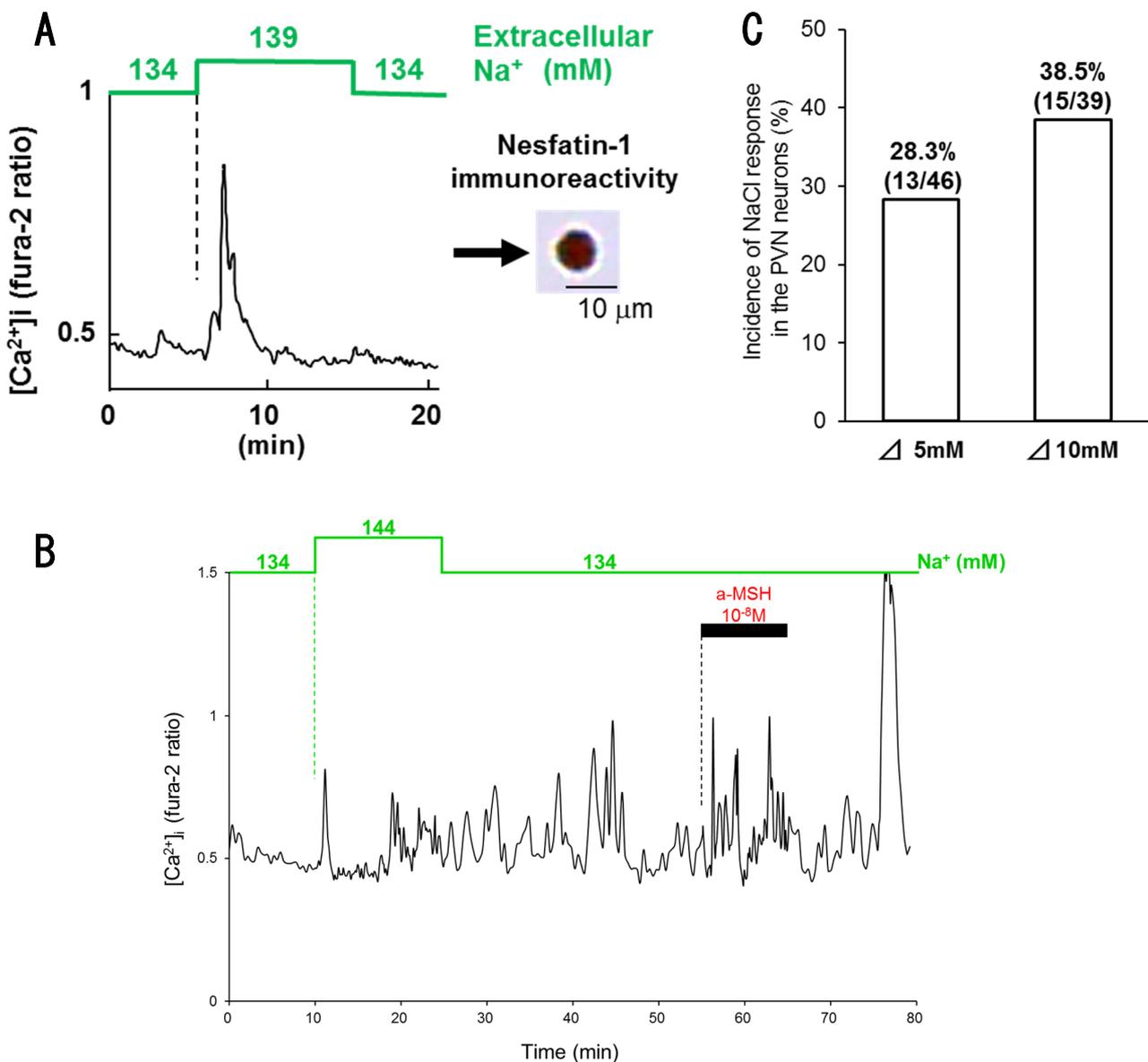


Fig. 1. *A*, Rise of extracellular Na⁺ concentration from 134 mM to 139 mM increased [Ca²⁺]_i in a PVN neuron. *B*, Rise of extracellular Na⁺ concentration from 134 mM to 144 mM increased [Ca²⁺]_i in a PVN neuron. *C*, Rise of extracellular Na⁺ concentration by 5 mM increased [Ca²⁺]_i in 13 of 46 PVN neurons and that by 10 mM in 15 of 39 PVN neurons

された(図 1A)。Na⁺濃度増加に対して[Ca²⁺]_i 増加応答を示した細胞のうち 38.5-55.6%が Nesfatin-1 陽性細胞と特定された(図 2A)。反対に、Nesfatin-1 陽性細胞のうち 41.7%が Na⁺応答を示した(図 2B)。Na⁺応答細胞群と Nesfatin-1 陽性細胞群は良く重なっていることから、PVN の Na⁺応答が Nesfatin-1 ニューロン活性化につながる事が明らかとなった。

循環血中および脳脊髄液中の Na⁺濃度の増加のソースは食事による食塩摂取であり、一方、Na⁺濃度と密接に関係する機能は血圧である。そこで、PVN の Na⁺応答ニューロンが摂食および血圧と関連するかの手がかりを探る実験を行った。アンジオテンシン II は代表的な血圧調節物質(昇圧ホルモン)、aMSH (alpha-melanocyte-stimulating hormone) は代表的な摂食調節物質(満腹ホルモン)である。そこで、Na⁺応答ニューロンがアンジオテンシン II または aMSH に応答するかを調べた。Na⁺応答ニューロンはアンジオテンシン II に応答して[Ca²⁺]_i 増加を示した(図 3A)。また、Na⁺応答ニューロンは aMSH に応答して[Ca²⁺]_i 増加を示した(図 3B)。全ての Na⁺応答ニューロンがアンジオテンシン II に応答したのに対し、Na⁺応答ニューロンの約 40%が aMSH に応答した(図 4)。この結果は、PVN ニューロンの Na⁺応答は主として血圧調節に関与している可能性を示唆するが、摂食抑制への関与も否定できない。上記の実験で用いた高 Na⁺灌流液は浸透圧も高いため、[Ca²⁺]_i 増加を引き起こしたのが Na⁺濃度増加ではなくは浸

透圧増加である可能性がある。そこで、浸透圧を一定に保ち Na⁺濃度だけを増加させる操作、および、Na⁺濃度を一定に保ち浸透圧だけを増加させる操作の効果を調べた。図 4A に例を示す細胞は、134 mM から 144 mM への Na⁺濃度増加(ΔNa⁺=10 mM)に対して[Ca²⁺]_i 増加応答を示したが、ΔNa⁺=10 mM に相当する浸透圧変化である 269 mOsm から 281 mOsm への浸透圧増加に対しては[Ca²⁺]_i 応答を示さず、Na⁺のみに応答する細胞であった。一方、図 4B に例を示す細胞は、はじめに 269 mOsm から 281 mOsm への浸透圧増加に[Ca²⁺]_i 増加応答を示し、次いで 134 mM から 144 mM への Na⁺濃度増加に対しても[Ca²⁺]_i 増加応答を示し、Na⁺のみおよび浸透圧の両方に応答する細胞であった。以上の結果は、PVN ニューロンの Na⁺応答の機序には Na⁺濃度増加そのものの感知が関与することが明らかとなり、一方浸透圧変化の需要も一部関与する可能性が考えられる。

PVN と循環中枢延髄孤束核との神経連絡

ニューロンレベルの実験結果から、PVN ニューロンの多くが Na⁺応答を示し、その機序として Na⁺濃度の変化そのものを感知していること、また Na⁺応答ニューロンのすべてがアンジオテンシン II に応答し、Na⁺応答ニューロンの半数が新規血圧調節物質 Nesfatin-1 を含有することが明らかとなった。これらの結果は、PVN ニューロンの Na⁺応答が血圧調節に関与することを強く示唆している。そこで循環中枢として重要な延髄孤束核(NTS)と PVN の神経

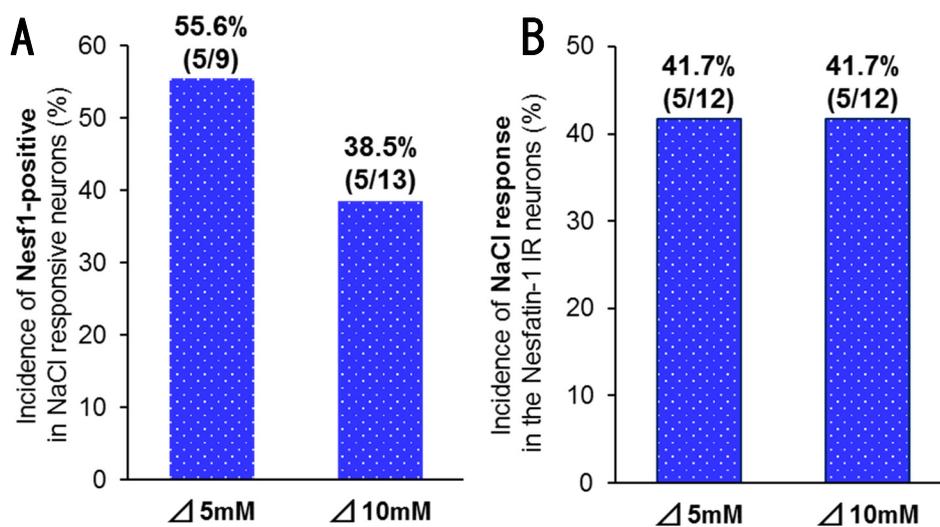


Fig. 2. Incidence of Nesfatin-1 neurons among Na⁺-responsive neurons (A) and that of Na⁺-responsive neurons among Nesfatin-1 neurons in PVN (B)

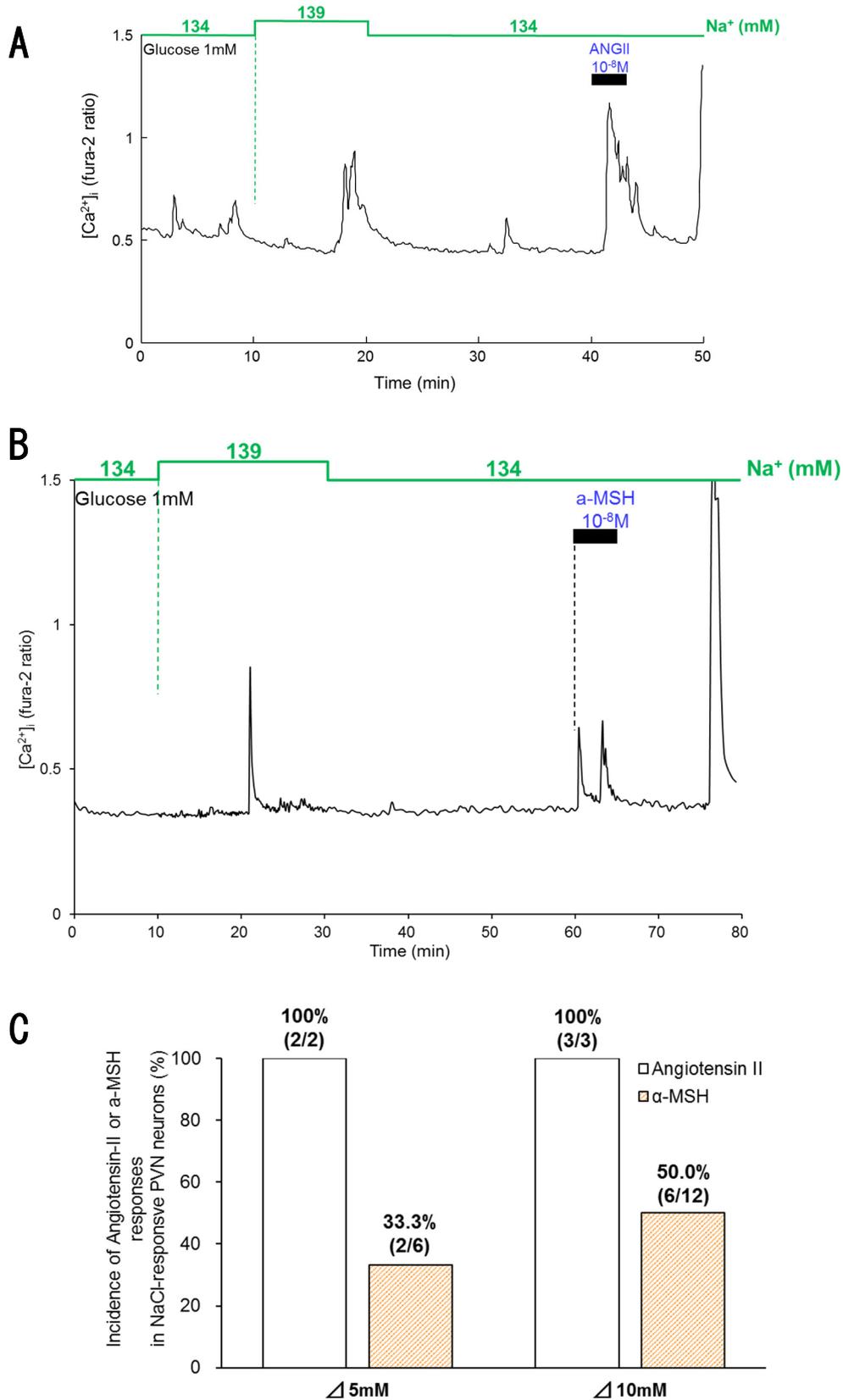


Fig. 3. *A*, Na⁺-responsive neurons responded to Angiotensin-II with [Ca²⁺]_i increases. *B*, Na⁺-responsive neurons responded to α-MSH with [Ca²⁺]_i increases. *C*, Incidence of Angiotensin-II-responsive and α-MSH-responsive neurons among Na⁺-responsive neurons in PVN

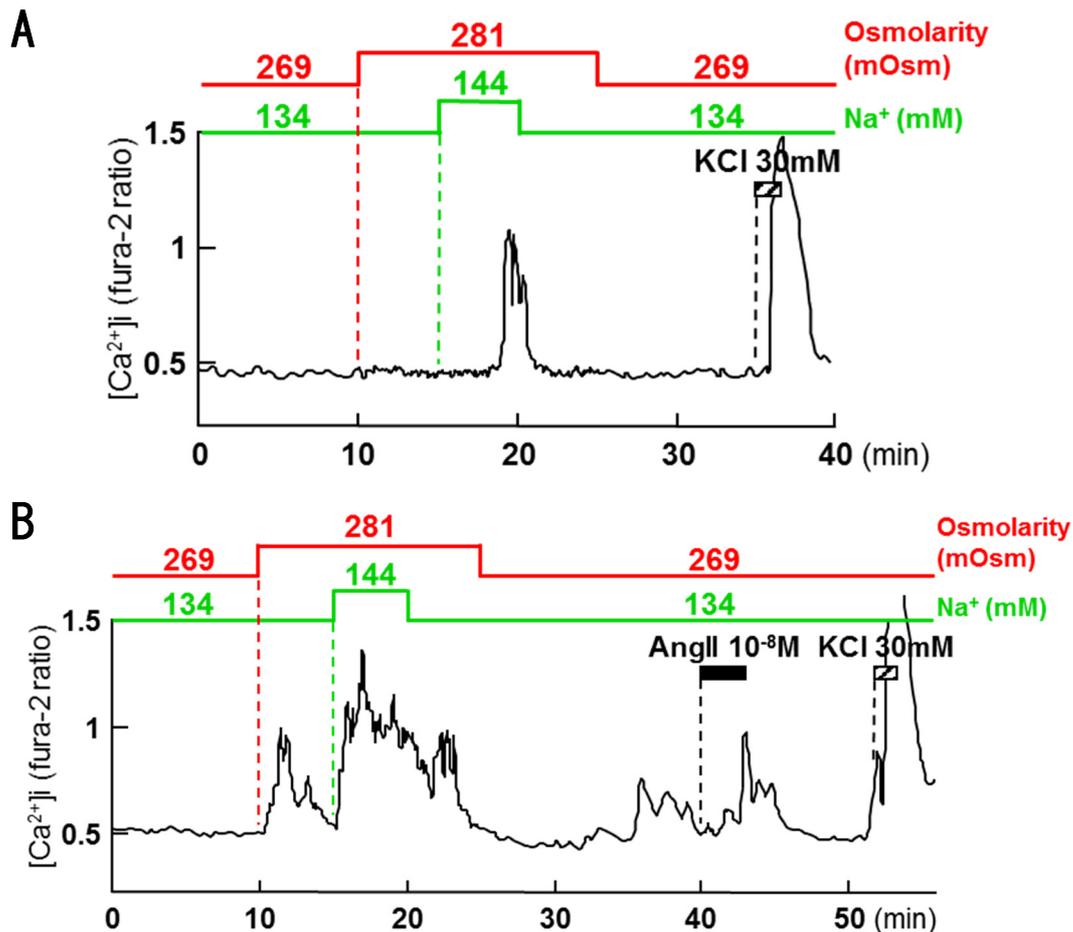


Fig. 4. *A*, A PVN neuron that exhibited $[Ca^{2+}]_i$ response to the change of Na^+ but not osmolality. *B*, A PVN neuron that exhibited $[Ca^{2+}]_i$ responses to changes of Na^+ and osmolality

連絡の解析が重要となった。その手始めとして、孤束核からPVNへの神経投射を解析する方法の確立を目指した。逆行性トレーサーとして経口ラベル CTB (cholera toxin subunit B) を PVN に局所投与し、数日後 NTS を観察し CTB と NTS 神経物質の共局在を調べた。その結果、少なくとも NTS の GLP-1 ニューロンが PVN へ神経投射すること、さらに、GLP-1 が PVN Nesfatin-1 ニューロンを活性化することを明らかにした^[1]。

Na⁺感受性 Nesf ニューロンによる血圧制御

正常 B6 マウスにおいて室傍核 Nesfatin-1/NUCB2 ノックダウンにより高食塩負荷(3週間)による血圧上昇が出現することを見出した(図5)。

4. 考察

本研究では、PVN には Na^+ 応答ニューロンが存在すること、その多くが Nesfatin-1 ニューロンであることを発見し

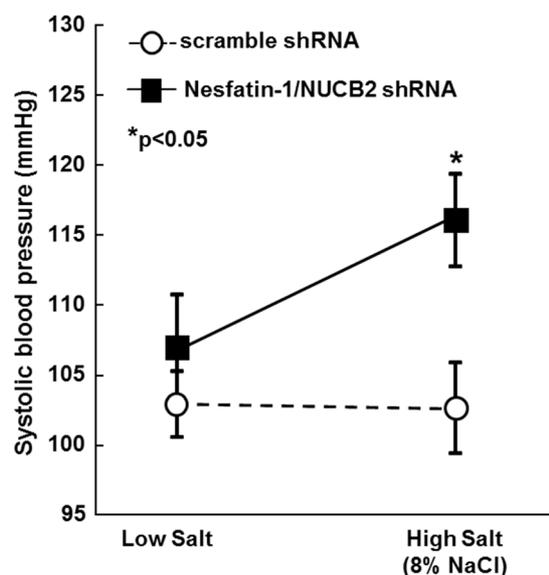


Fig. 5. High Na^+ -load increased systolic blood pressure in mice treated with PVN-specific Nesfatin-1/NUCB2 shRNA but not in scramble shRNA-treated control mice

た。PVN ニューロンの Na⁺応答の機序には Na⁺濃度増加そのものの感知が関与することが明らかとなり、一方浸透圧変化の受容も一部関与することが示唆される。Na⁺応答ニューロンの全てがアンジオテンシン II に応答し、約 40% が aMSH に応答したことから、PVN ニューロンの Na⁺応答は主として血圧調節に関与している可能性が示唆されるが、摂食抑制への関与の可能性も考えられる。循環中枢の延髄孤束核による PVN の調節に関し、NTS の GLP-1 ニューロンが PVN へ神経投射すること、GLP-1 が PVN Nesfatin-1 ニューロンを活性化することが明らかとなった。

5. 今後の課題

PVN の Na⁺応答の機構の解明には、Na⁺センサー分子の解析が重要である。候補である上皮性 Na⁺チャネル

(ENAC)、Na⁺-glucose 共輸送担体(SGLUT PVN の Na⁺応答のニューロンの生理的役割の解明には、PVN と NTS などの循環中枢の双方向性の神経連絡の解析が重要である。さらに、PVN Nesf/NUCB2 発現のノックダウンおよび KO マウスの機能解析が重要である。

6. 文献等

[1] Katsurada K, Maejima Y, Nakata M, Kodaira M, Suyama S, Iwasaki Y, Kario K, Yada T: Endogenous GLP-1 acts on paraventricular nucleus to suppress feeding: Projection from nucleus tractus solitarius and activation of corticotropin-releasing hormone, nesfatin-1 and oxytocin neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 451(2):276-281, 2014.

Na⁺ Sensing and Blood Pressure Regulation by Nesfatin-1 Neurons and Underlying Mechanism

Toshihiko Yada

Department of Physiology, Division of Integrative Physiology,
Jichi Medical University School of Medicine

Summary

In this study, I asked whether the neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) sense Na⁺ to regulate blood pressure. I found that 30% of PVN neurons sense as small as 5 mM change of Na⁺, and that 40% of these Na⁺-sensing neurons are Nesfatin-1-immunoreactive neurons. The neurons principally sense the change of Na⁺ itself but additionally that of osmolality. The Na⁺-sensing neurons also respond to angiotensin 2, suggesting their role in regulation of blood pressure.