

塩分欲求から塩分摂取行動に至る神経機構の解析

檜山 武史

自然科学研究機構基礎生物学研究所統合神経生物学研究部門

概要 脳弓下器官の口渴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、それぞれ「水ニューロン」「塩ニューロン」と名付けた。いずれもアンジオテンシン II (AngII) 受容体 1a 型 (AT1a) を発現する興奮性ニューロンであり、水ニューロンは終板脈管器官 (OVLT) に、塩ニューロンは境界条床核腹側部 (vBNST) に情報を伝達していた。AngII の血中濃度を調べると、塩欠乏状態でも脱水状態でも上昇しており、AT1a が活性化していると考えられる。しかし、動物に水と塩水を選択させる実験を行うと、塩欠乏状態では塩水を選択的に摂取し、脱水状態では主に水を選択する。このように、体液状態に応じて口渴感と塩欲求が独立に制御される仕組みを調べるため、SFO 内部の局所神経回路を解析した。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) の濃度が上昇しており、CCK が GABA ニューロン (抑制性) を制御して水ニューロンの活動を抑制していることがわかった。一方、体液 Na^+ レベルが上昇する脱水状態では、グリア細胞の Na^+ レベルセンサー Na_x が活性化して乳酸が放出され、それが別のグループの GABA ニューロンを活性化することで、塩ニューロンの活動を抑制していた。このように、口渴感と塩欲求が生じ、体液状態に応じて飲水や塩分摂取行動が制御されるまでの機構が明らかになった⁽¹⁾。

中枢性尿崩症は視床下部や下垂体の傷害により、抗利尿ホルモンであるバソプレッシンの産生が低下する疾患であり、持続性の高 Na 血症の原因ともなる。しかし、MRI 検査でも著名な脳傷害が見当たらず、しかも口渴感を訴えない Adipsic hypernatremia (無飲症性高 Na 血症) の患者が報告され、原因不明とされていた。我々は、2010 年に Na_x に対する自己抗体産生が病因と考えられる症例を報告したが、本研究において追加症例を検討した結果、SFO を認識する自己抗体の産生が共通することを見出した。自己免疫性の炎症によって SFO が機能不全を起し、SFO からの口渴感制御や塩欲求制御、バソプレッシン分泌制御が失われたことで Adipsic hypernatremia が誘発される新しい自己免疫性の疾患であることが示唆された^(2, 3)。

1. 研究目的

ヒトを含む哺乳動物において、体液のナトリウム (Na^+) レベルは 135~145 mM に保たれている。こうした Na 恒常性を維持するために、脳は体液の Na^+ レベルや浸透圧を監視するとともに、アンジオテンシン II などの血中ホルモンを介して末梢からの情報を受け取り、水分/塩分の経口摂取行動の制御と腎臓における排泄/再吸収の制御を統合的に行っている。例えば、脱水状態において体液の Na^+ レベルが上昇すると、口渴感が生じると共に、脳の Na^+ レベルセンサーが活性化して塩分摂取を避ける行動をとるようになる。この時に体液 Na^+ レベルの上昇を感知

する脳内の Na^+ レベルセンサーについては、我々の研究から、脳弓下器官 (Subformical organ, SFO) に発現する Na_x チャネルがセンサー分子の実体であることが明らかになった⁽¹⁻⁵⁾。 Na_x は SFO を始めとする感覚性脳室周囲器官 (Sensory Circumventricular Organs, sCVOs) のグリア細胞に主に発現している⁽⁶⁾。sCVOs は血液脳関門を持たない領域であり、血液中の物質をモニターするのに適した脳領域であるため、センサーである Na_x が機能するのに適した場所と言える。しかし、口渴感や塩欲求が生じる仕組みについては、これまでよくわかっていなかった。また、体液状態に応じて口渴感と塩欲求が選択される仕組みや、そ

うした欲求制御とNa_xチャネルを介した脱水時の塩分摂取回避機構の関係についてもよくわかっていなかった。本研究は、こうした神経機構について明らかにすることを目的として実施した⁽⁷⁾。また、血中Na⁺レベルが高い状態が持続しているにも関わらず、抗利尿ホルモンが正常に分泌されず口渇感を感じることもない無飲症性高Na血症(Adipsic hypernatremia)の一部の症例について、その原因を解明するため、解析を行った^(8,9)。

2. 研究方法

2.1 使用マウス

野生型マウス(C57BL/6J, CLEA Japan), *Agtr1a-lacZ* (*AT1a*-ノックアウト(KO))⁽¹⁰⁾, loxP-flanked *Agtr1a* (*AT1a*^{loxP/loxP})⁽¹¹⁾, *Slc17a6-ires-Cre* (*Vglut2-Cre*)⁽¹²⁾ (Jackson Labs stock 016963), *Gad1-GFP* (Δ neo, *GAD67-GFP*)⁽¹³⁾, *Slc32a1-ires-Cre* (*Vgat-Cre*)⁽¹²⁾ (Jackson Labs stock 016962), *Scn7a-lacZ* (*Na_x-lacZ* または *Na_x-KO*)⁽¹⁴⁾を使用した。興奮性ニューロンや抑制性ニューロンに特異的に分子を発現する実験では、それぞれ *Vglut2-Cre* 及び *Vgat-Cre* マウスにDIO(2.5 ウィルスベクターの項を参照)タイプのウィルスを導入した。

2.2 血液Na⁺, 血漿AngII, SFO組織CCKレベルの測定

マウスを断頭し血液を採取した。血液Na⁺レベルはi-STAT(アボット)を使用した。血漿AngII及びSFO組織CCKレベルの測定には、ラジオイムノアッセイ(RIA)キット(Peninsula Laboratories)を使用した。

2.3 免疫組織染色

20%ホルマリンで灌流固定後、ビブラトーム(VT-1000S, Leica)またはクライオスタット(CM 3050S, Leica)を使用し、50 μ m厚の切片を作成した。1次抗体で4°Cで2日間染色した。1次抗体として、ウサギ抗 β ガラクトシダーゼ抗体(1:1,000, 55976, Cappel), ヤギ抗Fos抗体(1:500, sc-52G, Santa Cruz Biotechnology), マウス抗Cre recombinase抗体(1:1,000, MAB3120, Millipore), ラット抗GFP抗体(1:1,000, 04404-84, ナカライテスク), ウサギ抗RFP抗体(1:500, 600-401-379, Rockland), ヤギ抗nNOS抗体(1:1,000, ab1376, Abcam)を使用した。

2.4 *in situ* ハイブリダイゼーション

4%ホルムアルデヒドで灌流固定後、上述の方法で抗

Cre抗体によって染色後に浮遊切片をProteinase Kによって部分消化し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。プローブには *Agtr1a* 遺伝子配列(1485–2242; GenBank accession number NM_177322)を使用した。

2.5 ウィルスベクター

アデノ随伴ウィルス(AAV)と逆行性輸送ウィルス(HiRet(狂犬病ウィルス糖タンパク質を持たせたレンチウィルス))⁽¹⁵⁾を使用した。AAV5-CAGGS-NLS-Cre, HiRet-MSCV-NLS-Cre-WPRE, AAVDJ-CAGGS-DIO-EGFP, HiRet-MSCV-EGFP-WPRE, HiRet-MSCV-mCherry-WPRE, AAVDJ-CAGGS-DIO-ChR2(H134R)-EGFP, HiRet-MSCV-ArchT-GFP-WPRE, HiRet-MSCV-DIO-ChR2(H134R)-EGFP-WPRE, FCK-ArchT-GFPを使用した(CAGGS, cytomegalovirus (CMV) early enhancer element and chicken β -actin promoter; MSCV, murine stem cell virus promoter; NLS, nuclear localization signal; DIO, double-loxP-flanked inverted orientation; WPRE, woodchuck hepatitis virus response element)。

2.6 実験動物手術

マウスを麻酔後、脳定位固定装置にセットした。脳室内持続投与実験では、30G ステンレスカニューラ(330OP, Plastics One)を(前後軸, -0.2 mm; 横軸, +1.0 mm; 腹側, +2.5 mm)を狙って設置し、皮下に設置した浸透圧ポンプ(1002, ALZET)を接続した。losartan(40 mg/mL)または溶媒(改変 Ringer 液(mM): 140 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 グルコース, 5 NaOH(pH 7.3))を0.25 μ L/hで投与した。ウィルス及び標識薬は、マイクロシリンジポンプ(Ultra Micro Pump III, World Precision Instruments)またはイオン泳動装置(Digital Midgard, Stoelting Co.; 7 μ A, 7 s オン/オフ 15 min)を用いてガラス細管を介して投与した。脳の部分破壊実験には、タングステン単極電極(80–100 kOhm, 先端径約 5 μ m; Unique Medical)を刺入し、電源(53500, Ugo Basile)を用いて直流電流(0.5 mA, 20 s)を流した。

2.7 行動解析

水及び食塩水(0.3 M)の摂取量測定は既述(2)の自動測定装置を用いて行った。脱水状態にするため、2日間絶水にした(餌は供給)。塩欠乏状態にするため、フロセミド(ループ利尿剤; 10 mg/体重 25 g)投与後3時間水餌無しにし、その後、Na欠乏餌(CLEA Diet No. 010, Clea

Japan)と水を 24 時間与えた。両方が欠乏した状態にするため、フロセミドを投与後、3 時間、水も餌も与えない状態においた。光遺伝学的実験には光学シーベル (COME2-UFC, Lucir)を用い、黄色光レーザー (577 nm, 3,000 mW, CW; Genesis Taipan 577, Coherent)または青色光レーザー (445 nm, 1,000 mW, CW; KaLaser)の光をマウス頭蓋内の局所領域に照射した(標的部位における光強度の推定値は 1.20-3.64 mW/mm²)。

2. 8 SFO スライス of 電気生理学的解析

GAD67-GFP 及び GAD67-GFP;*Na_x*-KO マウスの終板脈管器官(OVLT)または vBNST に逆行性色素 CTb-555 を投与し、一週間後に急性スライスを作成した。抑制性シナプス後部電流(IPSCs)の記録には、CTb-555 で標識された SFO ニューロンからホールセル電流を記録した。発火頻度解析には、CTb-555 標識ニューロン及び GFP 陽性ニューロンにおいてセル・アタッチド・モードで記録を行った。記録はすべて改変 Ringer 液中で 33-36°C で行った。電極内液は(in mM): 140 K グルコン酸, 10 KCl, 2 MgCl₂, 0.2 EGTA, 2 Na₂ATP, 10 HEPES and 0.1 スペルミン(pH 7.3 with HCl)。アンプ Axopatch 200B 及び Axopatch 1D を用い、pCLAMP により取得し Clampfit で解析した(以上, Axon Instruments)。

3. 研究結果

3. 1 口渇感と塩分欲求における AT1a の役割

マウスを水分、塩分、あるいは両方が欠乏した状態にしたところ、すべての条件において、血液中のアンジオテンシン II(AngII)は同程度に上昇した。野生型マウスを用いて各状態における水と食塩水(0.3 M)の摂取量を調べると、脱水後には水を大量に摂取する一方、食塩水の摂取量は少なかった。塩欠乏状態では、水をほとんど摂取せずに食塩水を大量に摂取した。両方を欠乏した状態では、水と食塩水の摂取量が共に増加した。一方、同様の実験を AngII 受容体(AT1a)の遺伝子欠損マウス(AT1a-KO マウス)を用いて実施すると、どの状態でも、食塩水の摂取量がほぼ完全に消失していた。一方、水分の摂取はフロセミドによって誘発された飲水量のみが約半分になった。

3. 2 口渇感及び塩分欲求の制御における SFO 及び OVLT の AT1a の役割

塩欠乏状態のマウスにおいて、SFO および OVLT のニ

ューロンの活動を Fos の発現を指標に調べた。いずれの神経核においても Fos 陽性のニューロンの数が有意に増加し、そのほぼすべてが AT1a 陽性であった。脳室に AT1 の阻害剤であるロサルタンを投与したマウスや AT1a-KO マウスでは、塩欠乏状態においても SFO や OVLT の Fos の発現が消失し、塩分摂取量の減少と対応していた。脱水状態では塩欠乏時よりさらに Fos 陽性ニューロンの数が増加したが、そこに占める AT1a 陽性のニューロンの割合は塩欠乏時よりも少なかった。また、AT1a-KO マウスにおいても、脱水による Fos の発現は消失しなかった。こうした口渇感や塩分欲求制御における AT1a の役割を担っている神経核を調べるため、AT1a^{loxP/loxP} マウスの脳の局所領域にアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて Cre リコンビナーゼを発現し、部位特異的に AT1a を欠損させたマウスを作成した。SFO において選択的に AT1a を欠損させると飲水量と塩分摂取量が共に減少した。一方、OVLT において選択的に欠損させると飲水量は同様に減少したが塩分摂取量は変化無かった。これらの結果から、SFO の AT1a が口渇感と塩分欲求の両方に関与するのに対し、OVLT の AT1a は口渇感だけに関与することが示唆された。

3. 3 SFO から OVLT に投射するニューロンは口渇感を制御する

SFO の AT1a 陽性のニューロンは Vglut2 陽性であったことから、グルタミン酸作動性の興奮性ニューロンであることがわかった。その投射先を調べたところ、主に OVLT、正中視索前核、vBNST、室傍核、視索上核に投射していた。このうち、正中視索前核は、SFO から OVLT に投射する神経の経路上にあり、室傍核及び視索上核は内分泌系に関与する神経核である。そこで、OVLT 及び vBNST に投射するニューロンを重点的に解析した。投射した神経の末端からニューロンに取り込まれて細胞体まで運ばれる性質がある逆行性標識薬を用いて調べたところ、SFO から OVLT に投射するニューロン(以下、SFO(→OVLT)ニューロンと呼ぶ)の約半分が AT1a 陽性のニューロンであった。さらに、脱水時に Fos を発現するニューロンは SFO(→OVLT)ニューロンとよく一致した。さらに、Cre リコンビナーゼを発現する逆行性ウイルスを AT1a^{loxP/loxP} マウスの OVLT に局所的に感染させ、SFO(→OVLT)ニューロンの AT1a を欠損したところ、欠損の程度に応じてフロセミドにより誘発される飲水量が減少した。そこで、光遺伝学的な

手法により SFO(→OVLT)ニューロンを抑制することにした。黄色光照射により神経の発火活動を抑える性質のある ArchT を、逆行性ウイルスを用いて SFO(→OVLT)ニューロンに発現した。SFO に黄色光を照射して SFO(→OVLT)ニューロンの活動を抑えると脱水やフロセミド処理によって誘発された飲水量が半減した。対照的に、塩欲求には影響なかった。逆に、青色光照射により神経活動を賦活できる ChR2 を SFO(→OVLT)ニューロンに発現し、光制御すると、水分を十分に摂取している平常状態でも急速に飲水行動が誘発された。一方、塩分摂取には影響なかった。以上より、SFO(→OVLT)ニューロンが口渴感を制御していると結論し、水ニューロンと命名した (Fig. 1)。

3. 4 SFO から vBNST に投射するニューロンは塩欲求を制御する

グルタミン酸作動性の SFO のニューロンの一部は vBNST に投射していたが、これらはほとんどすべてが AT1a 陽性であり、塩欠乏時に Fos を発現した。さらに、両側の vBNST を破壊すると、塩欠乏により誘発される食塩水摂取量が著しく減少した。また、SFO から vBNST に投射するニューロン (SFO(→vBNST)ニューロン)において選択的に AT1a を欠失させたところ、欠失の程度に応じて塩分の摂取が減少した。同様の実験を SFO から OVLT や室傍核、視索上核に投射するニューロンについても行ったが、影響なかった。光遺伝学的な手法により SFO(→vBNST)ニューロンの活動を抑制したところ、塩欠乏によって誘発される食塩水摂取量が大幅に減少した。反対に、SFO(→vBNST)ニューロンを光遺伝学的に活性化したところ、本来ならば塩分摂取が抑えられるはずの脱水状態においても塩分の摂取が増加した。このとき、NaCl に代えて KCl を用いた場合には塩分の摂取の増加は認められなかったことから、Na 選択的な制御であることが示唆された。以上より、SFO(→vBNST)ニューロンが塩欲求を選択的に制御していると結論し、塩ニューロンと命名した (Fig. 1)。異なる色の逆行性色素を OVLT と vBNST に投与し、SFO(→OVLT)ニューロンと SFO(→vBNST)ニューロンを異なる色で染色したところ、SFO の中で両者が重なるものはなく、まったく異なる集団であることが確認された。

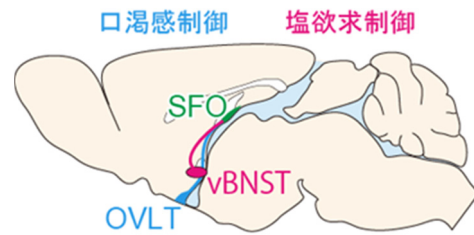


Fig. 1. 水分および塩分への欲求をつかさどる異なるニューロン SFO は第3脳室に面しており、血液脳関門を欠くことから血液および脳脊髄液の Na^+ のレベルや浸透圧を同時にモニターするのに適した場所である。SFO から OVLT へ投射する興奮性ニューロンが口渴感を、一方、vBNST へ投射する興奮性ニューロンが塩欲求を担っていた。

3. 5 脱水時には Na_x の下流で SFO(→vBNST)ニューロンが制御される

以上のように、口渴感と塩欲求を担うニューロンが明らかになったが、冒頭に述べたように脱水時や塩欠乏時に口渴感や塩欲求が選択的に制御される仕組みは明らかになっていなかった。我々の過去の知見から、SFO のグリア細胞に発現する Na^+ レベルセンサー Na_x が脱水時に塩欲求を抑える働きを持っていることがわかってきたことから、 Na_x と塩ニューロンの関係について解析することにした。脱水状態のマウスにおいて水と食塩水 (0.3 M) の摂取量を解析すると、野生型マウスは水を摂取する一方、塩分摂取は回避するのに対し、 Na_x -KO マウスは塩分を回避せず水と同程度に摂取する^(2,14)。一方、既述の通り、*AT1a*-KO マウスの食塩水摂取量は野生型マウスよりさらに少ない。そこで、 Na_x と *AT1a* のダブルノックアウトマウスの脱水状態の摂取量行動を解析したところ、 Na_x -KO マウスと *AT1a*-KO マウスの中間の行動にはならず、*AT1a*-KO マウスとほぼ同じ行動を示した。この結果は、*AT1a* を介した塩分欲求の制御が Na_x による制御よりも下流に位置することを示唆する。そこで Na_x -KO マウスにおいて SFO(→vBNST)ニューロンの神経活動を調べたところ、脱水時に Fos を発現する活性化したニューロンの数が野生型マウスよりもさらに増加していた。以上より、SFO(→vBNST)ニューロンは脱水時に活性化するが、同時に Na_x からのシグナルにより抑制されていることが示唆された (Fig. 2)。

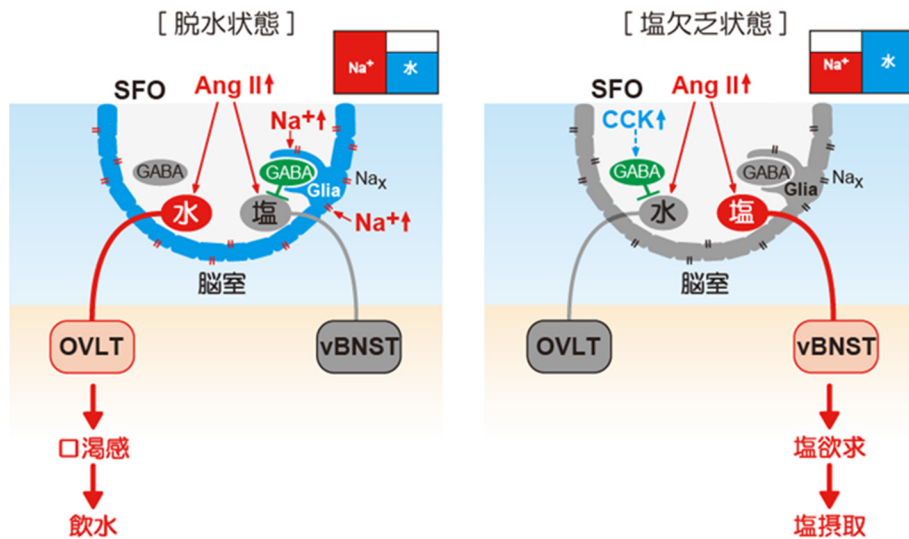


Fig. 2. 体液状態に応じて水分および塩分の摂取を制御する機構

左右の図の右上の四角は、体液の Na^+ と水のバランスを示した模式図。赤色は活性化、緑色は抑制、灰色は不活性化状態を示す。脱水状態では、SFO表面に並ぶ上皮細胞(青色のグリア細胞)及びSFO内部のアストロサイト(図では省略)において体液 Na^+ レベル上昇に应答して Na_x が活性化している。

3. 6 Na_x シグナルがSFO(\rightarrow vBNST)ニューロンを抑制する機構

我々の過去の知見から、 Na_x はグリア細胞において Na^+/K^+ -ATPaseの活性制御を通じて嫌氣的糖代謝を制御しており、それによってグリア細胞における乳酸産生が制御されることがわかっている。 Na^+ レベルの上昇によって Na_x が活性化すると、グリア細胞から放出された乳酸によって隣接するGABAニューロン(抑制性ニューロン)の活動が高まる。そこで、脱水時には、 Na_x シグナルによって活性化したGABAニューロンがSFO(\rightarrow vBNST)ニューロンの活動を抑えている可能性を考えた。この仮説を、SFOの急性スライスを用いて電気生理学的に検証した。GABAニューロンにおいて蛍光タンパク質GFPを発現するGAD-GFPマウスを用い、vBNSTから逆行性標識により同定されたSFO(\rightarrow vBNST)ニューロンとシナプス結合を形成しているGABAニューロンの活動を調べた。平常時の体液に相当する Na^+ 濃度(145 mM)においてAngIIを投与すると、SFO(\rightarrow vBNST)ニューロンが活性化した。AngIIの投与を継続したまま脱水時の体液に相当する Na^+ 濃度(160 mM)に切り替えると、GABAニューロンの活動が高まり、それに応じてSFO(\rightarrow vBNST)ニューロンの活動が抑えられた。 Na_x -KOマウスにおいて同様の実験を行ったが、 Na^+ 濃度依存的なGABAニューロンの活性化

は起きず、SFO(\rightarrow vBNST)ニューロンの活動抑制も起きなかった。この結果を行動レベルで検証するため、SFOのGABAニューロンの活動を光遺伝学的に活性化したところ、塩欠乏時の塩分の摂取量が減少し、GABAニューロンを介した塩欲求の抑制機構の存在が確認された。

3. 7 塩欠乏時にはコレシストキニンを介してSFO(\rightarrow OVLT)ニューロンの活動が抑制される

GABAニューロンの光遺伝学的な活性化は僅かながら飲水量も減少させた。そこで、SFO(\rightarrow OVLT)ニューロンがGABAニューロンによって抑制される可能性を検討した。急性脳スライスにおいて、逆行性標識によって同定したSFO(\rightarrow OVLT)ニューロンにシナプス結合を形成するGABAニューロンの活動を調べた。AngIIの投与によりSFO(\rightarrow OVLT)ニューロンの活動が高まるが、コレシストキニン(CCK)を投与するとGABAニューロンが活性化すると共にSFO(\rightarrow OVLT)ニューロンの活動が抑えられた。SFOの組織に含まれるコレシストキニン量を調べたところ、塩欠乏時に約9倍に増加していた。一方、CCKはSFO(\rightarrow vBNST)ニューロンと結合するGABAニューロンの活動には影響しなかったことから、両者が別のグループのGABAニューロンであると結論した⁷⁾(Fig. 2)。

3. 8 Adipsic hypernatremiaの解析

血中 Na レベルが高い値のままであるにも関わらず、口

渴感を示さない Adipsic hypernatremia の患者について解析した⁽⁸⁾。これらの患者はバソプレッシンの分泌も血中 Na レベルから算定される正常値よりも低かった。しかし、MRI による検査では、視床下部-下垂体領域の異常は認められなかった。我々は、これまでに Na_x を認識する自己抗体の産生により同様の症状を示した症例を報告している⁽¹⁶⁾。しかし、今回解析した症例の中に Na_x を認識する自己抗体の産生はみられなかった。ただし、マウス脳切片の組織染色で SFO が特異的に染色される症例が 3 例見つかった(1 例は OVLT も染色された)。1 例についてその Ig をマウスに投与したところ、飲水量の低下と脱水時のバソプレッシン分泌応答の低下が起き、高 Na 血症が再現された。さらに、SFO 特異的に細胞死の増加が確認された。SFO から視索上核、室傍核のバソプレッシン産生細胞に神経投射があり、脱水に伴うバソプレッシン分泌の制御に関与していることから、SFO の機能が自己免疫反応により不可逆的に損なわれれば、脱水に伴う飲水や Na 摂取の回避、ADH の分泌制御が正常にできなくなり、高 Na 血症を呈すると考えられる。以上の知見は、脳内に著明な損傷が見られず発症機構が不明であった高 Na 血症の少なくとも一部の症例に関して、その発症機構を説明すると考えている。

4. 考察

体液の主成分は水とナトリウムであり、両者の摂取を適切に制御して体液の恒常性を維持することが生体にとって非常に重要である。本研究では、これまで医学の教科書等において「口渴中枢」と呼ばれていた機構の実体を明らかにすると共に、「塩欲求中枢」も明らかにすることに成功した。AngII を脳に投与すると飲水と塩分摂取の両方が惹起されることは古くから知られていたが⁽¹⁷⁾、そのメカニズムはわかっていなかった。本研究により、AngII が受容体 AT1a を介して我々が命名した「水ニューロン」と「塩ニューロン」を活性化するためであったことが明らかになった。但し、口渴感の制御については、AT1a だけでは説明できないことも明らかになった。AngII の別の受容体である AT2 による作用、浸透圧や Na⁺ 上昇によるセンサー分子の活性化、末梢組織からの神経情報の入力等が補完的に水ニューロンを活性化するものと考えている。我々は、既に Na_x が TRPV4 を介して口渴感を制御していることを見出し⁽¹⁸⁾。その他のシグナルについては、今後の検討課

題である。一方、塩欲求の制御については、AT1a を介した SFO (→vBNST) ニューロンの活動制御でほぼ説明されると考えている。最近、傍小脳脚核 (LPBN) でアルドステロンを受容するニューロンから vBNST に入力があり、AngII による塩欲求を補完的に調節していることが報告された⁽¹⁹⁾。塩の味覚との関係も含め、SFO (→vBNST) ニューロンの下流における塩欲求調節機構の解析が今後の課題である。

冒頭に記載したとおり、AngII は脱水時と塩欠乏時のいずれにおいても血中で増加するのに対し、水と塩水の摂取は、体内に欠乏している方を選択し過剰な方を避けるように現れる。この研究において水ニューロンと塩ニューロンをそれぞれ体液状態に応じて個別に制御する仕組みが明らかになり、体内状態に応じて水と塩のうち必要な方の欲求が高まる神経機構の実体が明らかになった。この内、水ニューロンの制御に関わる CCK が、どのような制御によって分泌されているのか、まだわかっていない。また、AngII は SFO の内部でも産生されている可能性があるが、循環血中の AngII との関係は明らかになっていない。さらに、水、塩の恒常性には腎臓における水や塩の排出・再吸収が重要であるが、腎臓制御に関わるホルモンと我々が見出した神経機構の関係も不明のままである。こうした内分泌系の制御機構も含めた体液恒常性の神経機構の総合的な解析が今後の課題である。

5. 謝辞

本研究の実施にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

6. 文献等

1. Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, et al. Na_x channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci*. 2002; 5: 511–512.
2. Hiyama TY, Watanabe E, Okada H, Noda M. The subfornical organ is the primary locus of sodium level sensing by Na_x sodium channels for the control of salt-intake behavior. *J Neurosci*. 2004; 24: 9276–9281.
3. Hiyama TY, Yoshida M, Matsumoto M, Suzuki R,

- Matsuda T, Watanabe E, et al. Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Na_x , the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. **Cell Metab.** 2013; 17: 507–519.
4. Shimizu H, Watanabe E, Hiyama TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, et al. Glial Na_x channels control lactate signaling to neurons for brain $[\text{Na}^+]$ sensing. **Neuron.** 2007; 54: 59–72.
 5. Noda M, Hiyama TY. Sodium sensing in the brain. **Pflügers Arch.** 2015; 467: 465–474.
 6. Watanabe E, Hiyama TY, Shimizu H, Kodama R, Hayashi N, Miyata S, et al. Sodium-level-sensitive sodium channel Na_x is expressed in glial laminar processes in the sensory circumventricular organs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2006; 290: 568–576.
 7. 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. **Nat Neurosci.** 2017; 20: 230–241.
 8. Hiyama TY, Utsunomiya AN, Matsumoto M, Fujikawa A, Lin CH, Hara K, Kagawa R, Okada S, Kobayashi M, Ishikawa M, Anzo M, Cho H, Takayasu S, Nigawara T, Daimon M, Sato T, Terui K, Ito E, Noda M. Adipsic hypernatremia without hypothalamic lesions accompanied by autoantibodies to subfornical organ. **Brain Pathol.** 2017; 27: 323–331.
 9. Nakamura-Utsunomiya A, Hiyama TY, Okada S, Noda M, Kobayashi M. Characteristic clinical features of adipsic hypernatremia patients with subfornical organ-targeting antibody. **Clin Pediatr Endocrinol.** 2017; 26: 197–205.
 10. Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Imaizumi K, Hisada Y, Otsuka A, Uchida H, Sugiura M, Fukuta K, Fukamizu A, Murakami K. Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. **J Biol Chem.** 1995; 270: 18719–18722.
 11. Matsusaka T, Asano T, Niimura F, Kinomura M, Shimizu A, Shintani A, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I. Angiotensin receptor blocker protection against podocyte-induced sclerosis is podocyte angiotensin II type 1 receptor-independent. **Hypertension.** 2010; 55: 967–973.
 12. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S Jr, Lowell BB. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. **Neuron.** 2011; 71: 142–154.
 13. Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. **J Comp Neurol.** 2003; 467: 60–79.
 14. Watanabe E, Fujikawa A, Matsunaga H, Yasoshima Y, Sako N, Yamamoto T, Saegusa C, Noda M. Nav2/ Na_x channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **J Neurosci.** 2000; 20: 7743–7751.
 15. Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Kuramochi M, Okada T, Yaginuma H, Morimoto K, Shimada T, Takada M, Kobayashi K. A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. **Hum Gene Ther.** 2011; 22: 197–206.
 16. Hiyama TY, Matsuda S, Fujikawa A, Matsumoto M, Watanabe E, Kajiwara H, Niimura F, Noda M. Autoimmunity to the sodium-level sensor in the brain causes essential hypernatremia. **Neuron.** 2010; 66: 508–522.
 17. Buggy J, Fisher AE. Evidence for a dual central role for angiotensin in water and sodium intake. **Nature.** 1974; 250: 733–735.
 18. Sakuta H, Nishihara E, Hiyama TY, Lin CH, Noda M. Na_x signaling evoked by an increase in $[\text{Na}^+]$ in CSF induces water intake via EET-mediated TRPV4 activation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2016; 311: R299–R306.
 19. Ryan PJ, Ross SI, Campos CA, Derkach VA, Palmiter RD. Oxytocin-receptor-expressing neurons in the

parabrachial nucleus regulate fluid intake. **Nat Neurosci.** 2017; 20: 1722-1733.

Analyses of Neural Mechanism Underlying Salt-Intake Control Based on Appetite

Takeshi Y. Hiyama

National Institutes of Natural Sciences, National Institute for Basic Biology, Dept. Molecular Neurobiology

Summary

Body fluid conditions are continuously monitored in the brain to regulate thirst and salt-appetite. Angiotensin II drives both thirst and salt appetite; however, the neural mechanisms underlying the generation of thirst and salt-appetite, and selective controls of thirst and salt-appetite remain unknown. We previously identified Na_x channels as a brain $[\text{Na}^+]$ sensor that detects $[\text{Na}^+]$ elevations in body fluids within the physiological range. Na_x channels are specifically expressed in the glial cells (ependymal cells and astrocytes) of the subfornical organ (SFO) and organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT), brain regions that lack a blood–brain barrier but harbor neuronal cell bodies. In this study, we investigated neural mechanisms underlying thirst and salt appetite. We visualized Ang II receptor type 1a (AT1a)-positive neurons in sCVOs using $\text{AT1a}^{\text{lacZ/+}}$ mice and characterized their functions using optogenetic and electrophysiological techniques. We identified neurons driving thirst and salt appetite in the SFO and named them water neurons and salt neurons, respectively. Our results show that they are distinct groups of angiotensin II receptor type 1a-positive excitatory neurons. Water neurons were suppressed by cholecystokinin via GABAergic inhibitory neurons. On the other hand, salt neurons were suppressed by another population of GABAergic neurons, downstream of Na_x . In addition, Na_x is also involved in thirst control: The Na^+ signals generated in Na_x -positive glial cells lead to the activation of TRPV4-positive neurons by using epoxyeicosatrienoic acids as gliotransmitters, and stimulated water intake. Finally, our data indicate that the generation of autoantibodies targeting to the subfornical organ elicit adipic hypernatremia without causing any structural anomaly in the hypothalamus.