

## 塩分過剰摂取による弓状核ニューロン機能変調の分子病態の解明

中田 正範, 張 博洋

和歌山県立医科大学医学部第二生理学

### 概要

本研究は視床下部弓状核のニューロンが新規の細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度感知ニューロンである事を示し、さらに過剰な塩分摂取が弓状核ニューロン機能変調を惹起する分子病態を明らかにする事を目的とした。

視床下部は生体恒常性の維持には重要であり、特に、摂食・エネルギー代謝調節において弓状核の果たす役割は大きい。弓状核には摂食亢進系の Agouti-related peptide (AgRP)ニューロンと摂食抑制系の Proopiomelanocortin (POMC)ニューロンが存在する。近年、メタボリックシンドロームの主な病態の肥満、耐糖能異常、脂質代謝異常の中枢性成因の一つとして、弓状核ニューロンの機能異常が明らかになってきている。しかしながら、メタボリックシンドロームに併発する高血圧における病理的意義は確立されていなかった。我々は、弓状核 AgRPニューロン特異的にインスリンシグナルに重要な Phosphoinositide-dependent kinase-1 をノックアウトしたマウスが、高食塩食摂取時に交感神経系の活動亢進を介した高血圧を呈する事を明らかにした。この結果から、AgRPニューロンが過剰な塩分摂取時の血圧調節に重大な役割を果たす事が示唆された。そこで、本研究では細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度の感知能が AgRPニューロンに存在するかどうか、高食塩食摂取でこの感知機能が障害されるか否かを検討した。5 ~ 7 週齢の雄 C57B6 マウスより弓状核の単離ニューロンを調整し、Fura-2 を用いた蛍光画像解析により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の測定を行った。134 mM から 144 mM に細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度を増加した時に、AgRPニューロンの約 10% で  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の増加反応が観察された。また細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度増加とアンジオテンシン II の両方の刺激に反応する AgRPニューロンを観察した。4 週齢の雄 C57B6 マウスに、高食塩食 (8% NaCl 含有) を 3 週間摂取させたマウスでは AgRP mRNA の発現が有意に増加していた。一方、POMC の発現は変化が認められなかった。この結果から、過剰な塩分摂取による  $\text{Na}^+$ 濃度の増加は AgRPニューロンを活性化することが示唆された。本研究により、弓状核 AgRPニューロンに  $\text{Na}^+$ 感知機構が存在する事、さらに  $\text{Na}^+$ 感知機構は慢性的な塩分過剰摂取により増強され、AgRPニューロンの活性化が起こる事が明らかになった。しかし、本助成期間に AgRPニューロンの  $\text{Na}^+$ 感知機構の分子メカニズムの解明には至らず、今後の更なる研究が必要である。

AgRPニューロンのインスリンシグナルが血圧調節に重要であることから、我々はインスリン抵抗性責任分子として Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F (PTPRF) に着目し、その関与を検討した。8 週齢の C57BL/6J マウスの弓状核に PTPRF shRNA 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを局所投与後、3 週間高食塩食摂取を行なった。3 週後の収縮期血圧は、PTPRF shRNA 発現 AAV ベクター投与群では有意に低下していた。高食塩食摂取による血圧上昇に対して、PTPRF は促進的に働く事が示唆されたことから、弓状核の PTPRF がメタボリックシンドローム併発高血圧の中枢性成因としての可能性が示唆される。

ヒトが一日に摂取する  $\text{Na}^+$ の量は、一日に糸球体で濾過される量の 1% 以下である。つまり、ヒトは進化する過程で  $\text{Na}^+$ の喪失を防ぐ、細微な調節機構を構築してきた。そしてその調節において、中枢神経系の  $\text{Na}^+$ 感知機構は重要な役割を果たしている。本研究で、摂食・エネルギー代謝の一次中枢である弓状核 AgRPニューロンが、新たな脳内  $\text{Na}^+$ 感知ニューロンである事を明らかにした。この事は、メタボリックシンドロームの肥満、耐糖能異常、脂質異常、高血圧のすべての病

態に、弓状核 AgRP ニューロンの機能異常が関与している可能性を示しており、本研究の発展的な継続は臨床的にも大いに意義があると言える。

## 1. 研究目的

本研究の目的は、視床下部弓状核のニューロンが新規の細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度感知ニューロンである事、さらに過剰な塩分摂取が弓状核ニューロン機能変調を誘発する事を示す事である。

生体恒常性の維持には内分泌系と神経系による調節が重要であり、視床下部は両調節系の制御を司る。そして、視床下部ニューロンの機能異常が、メタボリックシンドロームの中枢性成因になっている事が実証されてきている。視床下部の数ある神経核の中で、摂食・エネルギー代謝調節において、弓状核と室傍核の果たす役割は大きい。弓状核は、血糖やホルモン、アディポカイン等の末梢代謝情報を感知する一次中枢である。そして、弓状核からの神経投射を受けて情報を統合する二次中枢が室傍核である。一次中枢の弓状核には摂食亢進系の Agouti-related peptide (AgRP) ニューロンと摂食抑制系の Proopiomelanocortin (POMC) ニューロンが存在する。弓状核の両ニューロンの機能異常による摂食・エネルギー代謝調節の変調が、メタボリックシンドロームにおける肥満、耐糖能異常、脂質代謝異常の病因として大きな位置を占めている事はこれまでに数多くの研究成果が報告されてきている。しかしながら、メタボリックシンドロームの高血圧における病理的意義は確立されていなかった。我々は、室傍核 Nesfatin-1 ニューロンは摂食抑制機能に加え、高食塩食摂取時に血圧に対し降圧的に機能する事を明らかにした<sup>(1)</sup>。さらに、弓状核 AgRP ニューロン特異的にインスリンシグナルに重要な Phosphoinositide-dependent kinase-1 をノックアウトしたマウスを解析し、高食塩食摂取時にノックアウトマウスは交感神経系の活動亢進に依存した高血圧を呈する事を明らかにした<sup>(2)</sup>。さらに、ノックアウトマウスの高血圧は室傍核の Nesfatin-1 をノックダウンする事で消失した。我々のこれまでの研究結果から、AgRP ニューロンから室傍核 Nesfatin-1 ニューロンへの神経回路が高食塩食摂取時の血圧制御に重要であり、AgRP ニューロンのインスリンシグナル異常が食塩感受性高血圧を引き起こす可能性が示唆される。しかしながら、高食塩食摂取による  $\text{Na}^+$  負荷が AgRP ニューロンの機能を調節するメカ

ニズムは不明である。我々はこれまでに単離した AgRP ニューロンを用いた解析で、グルコースやアディポカインを AgRP ニューロンが直接感知する事を実証してきた<sup>(3,4)</sup>。そこで、本研究では細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度の感知能が AgRP ニューロンに存在するかどうか、高食塩食摂取でこの感知機能が障害されるか否かを検討した。また、AgRP ニューロンのインスリンシグナルが血圧調節に重要であることから、我々が肝臓のインスリン抵抗性責任分子として見出した Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F (PTPRF) の関与を検討した<sup>(5)</sup>。

## 2. 研究方法

### 2.1 AgRP ニューロンの $\text{Na}^+$ 感受機構の解析

5 ~ 7 週齢の雄 C57B6 マウスより弓状核を含む冠状断脳スライスを作成し、顕微鏡視下に弓状核を採取し、酵素処理にて単離ニューロンを調整した。その後、Fura-2 を用いた蛍光画像解析により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の測定を還流下に行った。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の測定後に、抗 AgRP 抗体を用いた免疫染色を行い、AgRP ニューロンを同定した。

### 2.2 高食塩食摂取マウスの解析

4 または 10 週齢の雄 C57B6 マウスに、高食塩食 (8% NaCl 含有) を 3 週間摂取させた後に弓状核を採取した。その後 mRNA の発現をリアルタイム PCR により検討した。対照には低食塩食 (0.3% NaCl) を摂取させたマウスを用いた。5 週齢のマウスに 2 週間高食塩食を摂取させた後、単離 AgRP ニューロンを調整し  $\text{Na}^+$  感受機構を 2.1 の方法により検討した。

### 2.3 高食塩食誘発血圧上昇における PTPRF の役割の検討

8 週齢の C57BL/6J マウスに対し、麻酔下に脳定位手術により PTPRF shRNA 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター局所投与を行なった。第 3 脳室下部に位置する正中隆起を確認し投与を行なった。投与した正中隆起の部位は AgRP ニューロンが局在する弓状核の内側部に隣接する。予備の実験で、同部位に GFP 発現 AAV ベクターを投与すると弓状核内側に GFP の発現を確認している。1 週間のマウスの回復を待って、3 週間高食塩食摂取を行

なった。その後、血圧を非観血的にテールカフ法により測定した。対照には scramble shRNA 発現 AAV ベクターを投与したマウスを用いた。

### 3. 研究結果

#### 3.1 細胞外 Na<sup>+</sup>濃度変化による AgRP の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化

134 mM から 144 mM に細胞外 Na<sup>+</sup>濃度を増加した時に、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が増加した単離弓状核ニューロンを観察した (Fig. 1A)。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>測定後のこのニューロンは免疫染色で AgRP 陽性であった。測定した AgRP ニューロン 91 個中 10 個で[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇を観察した (Fig. 1B)。また、細胞外

Na 濃度の増加により[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が増加した弓状核ニューロンの約 60%が AgRP ニューロンであった。

体液浸透圧の上昇は、第三脳室前壁に存在する脳弓下器官と終板脈管器官で感知され、その部位からアンジオテンシン II が脳脊髄液に放出される事が知られている。つまりアンジオテンシン II は浸透圧の変化を伝達する一つの因子である。そこで、AgRP ニューロンに対するアンジオテンシン II の作用を検討した。細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の増加により[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が増加した AgRP ニューロンは、アンジオテンシン II の添加でも[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が増加した (Fig. 2)。このことから、AgRP ニューロンの中には細胞外 Na<sup>+</sup>濃度とアンジオテンシン II を感知するニューロンが存在する事が示唆された。

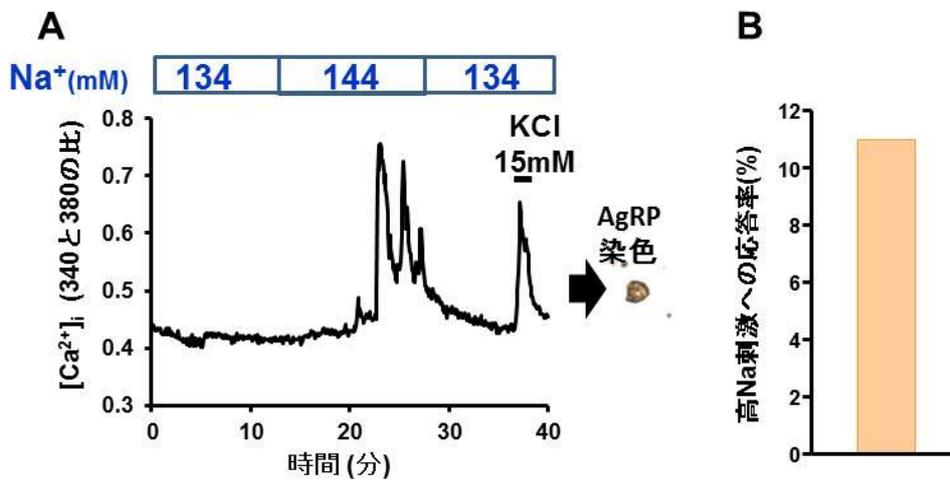


Fig. 1 A. 細胞外 Na<sup>+</sup>濃度増加(134から144mM)時の、単離弓状核 AgRP ニューロンの細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度結果の典型例。B. 細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の増加により活性化される AgRP ニューロンの割合。

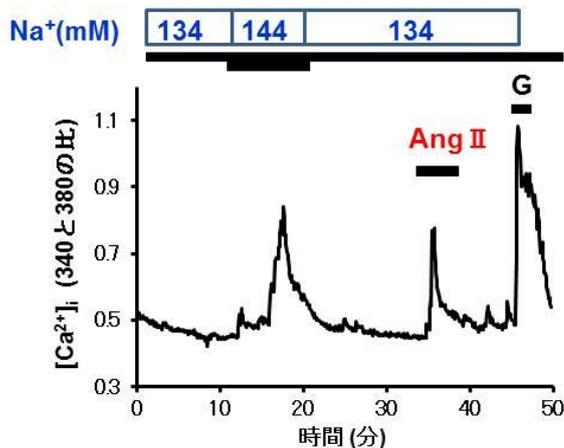


Fig.2 細胞外 Na<sup>+</sup>濃度増加とアンジオテンシンII(AngII)添加に反応した AgRP ニューロンの典型例。G はグルタミン酸添加。

### 3. 2 高食塩食摂餌マウスの解析

4 週齢から 3 週間高食塩食を摂餌させたマウスの弓状核における神経ペプチドの mRNA 発現を検討したところ、AgRP の発現が有意に増加していた。一方、POMC の発現は変化が認められなかった (Fig. 3)。同様の結果は、10 週齢から 3 週間高食塩食を摂餌させたマウスの弓状核でも観察された。この結果から、弓状核においては高食塩食摂餌により、AgRP ニューロンが優位に活性化される事が示唆された。

次に、高食塩食摂餌マウスと低食塩食摂餌マウスの単離 AgRP ニューロンの Na<sup>+</sup> 感知能を検討した。細胞外 Na<sup>+</sup>

濃度の増加により [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が増加した AgRP ニューロンの割合は、高食塩食摂餌マウスで増加した (Fig. 4)。

### 3. 3 高食塩食誘発血圧上昇における PTPRF の役割の検討

3 週間の高食塩食摂餌後の体重および随時血糖に関して、scramble shRNA 発現 AAV ベクター投与群と PTPRF shRNA 発現 AAV ベクター投与群の間に有意な差は認められなかった。一方、収縮期血圧は PTPRF shRNA 発現 AAV ベクター投与群で有意に低下していた (Fig. 5)。

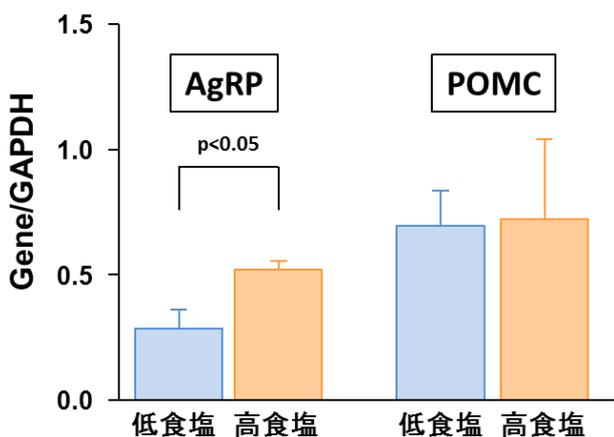


Fig. 3 弓状核の遺伝子発現の結果

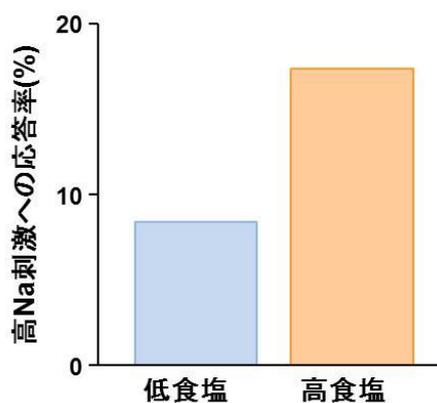


Fig. 4 AgRP ニューロンの Na 刺激応答性

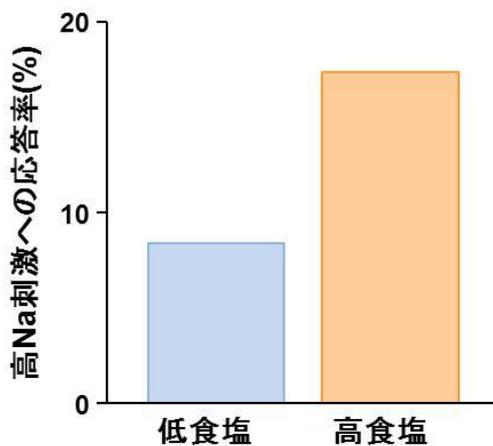


Fig. 5 3 週間高食塩食摂餌後の血圧測定の結果

#### 4. 考 察

2019年度の当研究財団の研究助成により、弓状核 AgRP ニューロンに  $\text{Na}^+$  感知機構が存在する事、さらに  $\text{Na}^+$  感知機構は慢性的な塩分過剰摂取により増強され、AgRP ニューロンの活性化が起こる事が明らかになった。次に、 $\text{Na}^+$  感知能をもつ AgRP ニューロンが脳内浸透圧感知に重要なアンジオテンシン II によっても活性化されることも明らかになった。AgRP ニューロンはこれまでにグルコースやグレリン、レプチン等の末梢代謝情報のシグナルを感知する摂食・エネルギー代謝調節の一次中枢である事が知られていたが<sup>(3, 4, 6)</sup>、これらに加え  $\text{Na}^+$  濃度を感知する事が示唆された。この事は、食塩の過剰摂取時の血圧・体液調節においても弓状核 AgRP ニューロンは一次中枢として機能していると示唆される。メタボリックシンドロームに併発する高血圧の特徴が食塩感受性高血圧である事が報告されている。今回の研究成果から、弓状核 AgRP ニューロンの一次中枢としての機能異常がメタボリックシンドロームの肥満、耐糖能異常、脂質代謝異常に加えて高血圧の中枢性成因である可能性がある。しかしながら、本助成期間に AgRP ニューロンの  $\text{Na}^+$  感知機構の分子メカニズムの解明には至る事は出来なかった。研究計画当初に標的候補と考えた Na チャネルの関与が否定されたことから、現在は浸透圧感知に関連する Transient receptor potential (TRP) チャネルに焦点を移行し検討している。弓状核には数種類の TRP チャネルが発現している<sup>(7)</sup>。既に候補となるチャネルを選定し、他研究室との共同研究を開始しており、ノックアウトマウスを用いて AgRP ニューロンの  $\text{Na}^+$  感知能を検討する予定である。

弓状核には AgRP ニューロン以外に摂食抑制系の POMC ニューロンも局在している。POMC ニューロンは摂食抑制以外に交感神経の活性化を介して昇圧的に働く<sup>(8)</sup>。一方、AgRP ニューロンは直接的に POMC ニューロンの神経活動を抑制する<sup>(9)</sup>。今回の研究で、高食塩食摂餌マウスの弓状核では AgRP 遺伝子発現のみが増加していた。また、高食塩食摂餌で、AgRP ニューロンの  $\text{Na}^+$  感知能が亢進していた。このことは、過剰な塩分摂取の状況では、AgRP ニューロンの細胞外  $\text{Na}^+$  濃度増加への応答性の増強は、それ自身の神経活動を亢進し、POMC ニューロンによる交感神経系の活動亢進作用を抑制する事で血圧の正常化に寄与していると推察される。

PTPRF はインスリンシグナルに拮抗し、インスリン抵抗性の病因候補分子である<sup>(5, 10)</sup>。今回、高食塩食摂餌による血圧上昇に対して、PTPRF は促進的に働く事が示唆された。弓状核の PTPRF がメタボリックシンドローム併発高血圧の中枢性成因としての可能性が示唆される。しかしながら、高食塩食摂餌による耐糖能異常は非常に軽症であるがゆえに、耐糖能への関与は確認されなかった。我々は高脂肪食摂餌マウスでも PTPRF の発現が弓状核で増強している事を確認しており、今後このモデルでの解析が必要であると考えられる。

#### 5. 今後の課題

本研究で、弓状核 AgRP ニューロンが摂食・エネルギー代謝のみならず血圧調節の一次ニューロンである事が示唆された。この事は、メタボリックシンドロームの肥満、耐糖能異常、脂質異常、高血圧のすべての病態に、弓状核 AgRP ニューロンの機能異常が関与している可能性を示しており、本研究の発展的な継続は臨床的にも大いに意義があると言える。本研究期間内には、AgRP ニューロンの  $\text{Na}^+$  感知機構の分子メカニズムの解明は達成できなかった。しかしながら、他研究室との共同研究でその突破口を見出しており、今後も解明に向けて継続して努力していく。

AgRP ニューロンから、室傍核 Nesfatin-1 ニューロンの神経回路が血圧調節に重要である事を我々は報告してきた。Nesfatin-1 ニューロンの神経活動には概日リズムがある。概日リズムは自治津神経系や内分泌系を介して血圧調節に関与し、概日リズムの破綻は循環器疾患を増悪させる事が分かっている。我々も、時計遺伝子 Dec1 が心機能を関連する事を報告している<sup>(11)</sup>。今後は、本研究と有機的に連動し、AgRP ニューロン—Nesfatin-1 ニューロン軸の概日リズムと血圧調節さらには循環器疾患との関連についても解明していく予定である。

ヒトが一日に摂取する  $\text{Na}^+$  の量は、一日に糸球体で濾過される量の 1% 以下である。つまり、ヒトは進化する過程で  $\text{Na}^+$  の喪失を防ぐ、細微な調節機構を構築してきた。そしてその調節において、中枢神経系の  $\text{Na}^+$  感知機構は重要な役割を果たしている。本研究では新たな脳内  $\text{Na}^+$  感知機構の解明への扉を開いたが、今後の更なる研究の継続が必要である。

## 6. 文献

1. Zhang B, Nakata M, Lu M et al. Protective role of AgRP neuron's PDK1 against salt-induced hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 500: 910-916, 2018.
2. Nakata M, Gantulga D, Santoso P et al. Paraventricular NUCB2/Nesfatin-1 Supports Oxytocin and Vasopressin Neurons to Control Feeding Behavior and Fluid Balance in Male Mice. *Endocrinology.* 157: 2322-2332, 2016.
3. Kurita H, Xu KY, Maejima Y, Nakata M et al. Arcuate Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase senses systemic energy states and regulates feeding behavior through glucose-inhibited neurons. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 309: E320-333, 2015.
4. Cao Y, Nakata M, Okamoto S et al. PDK1-Foxo1 in agouti-related peptide neurons regulates energy homeostasis by modulating food intake and energy expenditure. *PLoS One.* 6: e18324, 2011.
5. Nakata M, Zhang B, Yang Y et al. High-Fat Diet Augments VPAC1 Receptor-Mediated PACAP Action on the Liver, Inducing LAR Expression and Insulin Resistance. *J Diabetes Res.* 2016: 9321395, 2016.
6. Kohno D, Nakata M, Maekawa F et al. Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology.* 148: 2251-2263, 2007.
7. Kumar S, Singh U, Singh O et al. Transient receptor potential vanilloid 6 (TRPV6) in the mouse brain: Distribution and estrous cycle-related changes in the hypothalamus. *Neuroscience.* 344: 204-216, 2017.
8. do Carmo JM, da Silva AA, Wang Z et al. Role of the brain melanocortins in blood pressure regulation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1863: 2508-2514, 2017.
9. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 411: 480-484, 2001.
10. Zabolotny JM, Kim YB, Peroni OD et al. Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 5187-5192, 2001.
11. Le HT, Sato F, Kohsaka A et al. Dec1 Deficiency Suppresses Cardiac Perivascular Fibrosis Induced by Transverse Aortic Constriction. *Int J Mol Sci.* 20: 4967, 2019.

## The Role of Arcuate Nucleus Neurons in Salt-Induced Hypertension.

Masanori Nakata, Boyang Zhang

Department of Physiology, Wakayama Medical University School of Medicine

### Summary

The arcuate nucleus in hypothalamus plays a main role in regulating food intake and energy metabolism. In the arcuate nucleus, there are orexigenic Agouti-related peptide (AgRP) neurons and anorexigenic Proopiomelanocortin (POMC) neurons. Recently, dysfunction of both neurons has been clarified as one of the neuronal pathogenesis of obesity, impaired glucose tolerance, and dyslipidemia of metabolic syndrome. However, in hypertension associated with metabolic syndrome, the role of both neurons has not been established. We previously have shown that mice that have knocked out of an insulin signaling molecule PDK1 in AgRP neurons, exhibit hypertension via the hyper-activation of sympathetic nervous system after fed of high salt diet. It was suggested that AgRP neurons play a crucial role in blood pressure regulation during excessive salt intake.

We clarified whether AgRP neurons sense the extracellular  $\text{Na}^+$  concentration and whether high salt diet feeding impairs this sensing function. The isolated neurons of the arcuate nucleus were prepared from male C57B6 mice, and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) was measured by fluorescence imaging. When the extracellular  $\text{Na}^+$  concentration was increased from 134 to 144 mM, the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was observed in about 10% of AgRP neurons. Expression of AgRP mRNA was significantly increased in arcuate of mice fed a high salt diet for 2 weeks. On the other hand, the expression of POMC was not altered. These results suggested that the increase of extracellular  $\text{Na}^+$  concentration by excessive salt intake directly activated AgRP neurons.

In this study, we revealed that the AgRP neuron in arcuate nucleus, which is the primary sensing neurons of peripheral metabolic signal, is a new  $\text{Na}^+$ -sensing neuron. This suggests that dysfunction of a AgRP neurons may be involved in the pathologies of obesity, impaired glucose tolerance, dyslipidemia, and hypertension in metabolic syndrome.