

塩味センサーとしての消化管自律神経求心路の発掘と分子経路の解析

谷田 守

金沢医科大学医学部生理学Ⅱ講座

概要

(目的) 自律神経系は、脳と末梢をつなぐ神経系として遠心路と求心路に分類されており、消化管から脳への情報伝達経路である求心路自律神経系は栄養情報感知や末梢のホルモン感知という観点から代謝や循環などのホメオスタシスと非常に関連深いことが分かっている。高食塩水をラットの消化管に投与すると代謝が亢進することがわかっている為、消化管で NaCl を刺激物質として認識する機構が存在することが考えられる。そこで本研究では、動物の自律神経活動を測定するための電気生理学的計測法を駆使することで、NaCl センサーとしての消化管の自律神経求心路が存在するか確認して、その作用機序を明確にすることを目的とした。

(方法) 麻酔下の ICR 系雄マウスを用いて、胃、腹腔、又は肝臓を支配する迷走神経求心路活動を電気生理学的に計測した。さらに、遠心路自律神経活動として腎臓交感神経活動も計測した。胃、十二指腸又は門脈内にカテーテルを留置して、vehicle(生理食塩水)又は高食塩水(1M NaCl)を投与した際の神経活動反応を観察した。

(結果) 高食塩水を胃内に投与すると、胃迷走神経求心路活動は亢進した。さらに、十二指腸への高食塩水投与は、腹腔迷走神経求心路活動を濃度依存的に興奮させ、門脈内への高食塩水投与も肝臓迷走神経求心路活動を亢進させた。阻害薬を用いた実験から、高食塩水による胃又は腹腔迷走神経求心路活動亢進作用には、迷走神経の TRPV1 チャネルが関与しないことがわかった。一方、高食塩水投与による遠心路自律神経作用について解析を行ったところ、高食塩水の胃内投与は、腎臓交感神経活動を抑制したが、血圧や心拍数には影響しなかった。また、高食塩水による腎臓交感神経活動抑制反応は、内臓迷走神経切断マウスで消失した。

(考察と今後の課題) 本研究では、高食塩水が迷走神経求心路に作用して、脳を介して遠心路交感神経系に影響するといった「自律神経反射」を惹起することを世界で初めて発見した。急性実験であった為、高食塩水の消化管内投与が循環機能に作用しなかったが、慢性実験で高食塩水を摂取した際に起こる高血圧などの疾患発症に、本研究で新たに発見した「自律神経反射」が関与するか否かについては今後詳細に解析を行う必要がある。さらに、高食塩水による「自律神経反射」が代謝や摂食調節などに関与している可能性もあることも含めて今後詳細な実験を行うことが期待される。

1. 研究目的

食事後、消化された栄養成分が消化管で吸収された後に細胞でのエネルギー基質になる一方で、余分な栄養素はエネルギー源として貯蔵される。従って、栄養素が直接標的細胞に運搬されることが代謝調節で重要である。一方で、我々の先行研究は、乳酸菌やアミノ酸を消化管で感知するセンサーとして求心性自律神経系が存在する可

能性を示唆してきた^{1), 2)}。例えば、うま味成分であるグルタミン酸を飢餓状態でラット消化管内に投与すると、消化管迷走神経求心路を介して、脂肪組織交感神経を活性化することから¹⁾、うま味成分を感知するセンサーとしての求心性自律神経経路の存在が示唆されている。一方で、高張液をラットの小腸に投与した際に熱産生が亢進することが明らかにされており³⁾、エネルギー代謝調節に関与する

消化管のNaClセンサーが存在する可能性が考えられる。しかしながらそのセンサーの実体や詳細なメカニズムについてはよくわかっていない。

そこで、本研究では、独自で確立したマウス自律神経活動を測定するための電気生理学的計測法を駆使して、消化管でのNaClセンサーとしての自律神経求心路の存在の有無を確認して、その作用機序の解明を目的とした。

2. 研究方法

1. 実験動物

ICR系雄マウスを用いて、飼料と水は自由に摂取させた。また動物は12時間毎の明暗周期(07:00 ~ 19:00が明期)下で、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件のもと飼育された。本研究で実施する動物実験は、必要性和動物福祉への配慮を考慮し、実験計画を十分に検証して、金沢医科大学動物実験委員会による審査、金沢医科大学長からの承認を得て行った。(動物実験許可書番号;2018-5)。

2. 電気生理実験

12時間絶食させたマウスを麻酔薬の腹腔内投与により麻酔し、体温の低下を防ぐために、直腸温をモニターし、サーモスタット・コントローラにより直腸温が $35.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ になるように保って、これまでの*in vivo*電気生理実験法を用いて手術と計測を行った¹⁾。麻酔薬の影響を検討する為に、以下の3種類の麻酔薬を用いた。

- ① ウレタン(1.2 g/kg 体重)
- ② 塩酸ケタミン(91 mg/kg)と塩酸キシラジン(901 mg/kg)の混合溶液
- ③ 三種混合麻酔薬(塩酸メドミジン;0.75 mg/kg, ミタゾラム;4 mg/kg, 酒石酸ブトルファンール;5 mg/kg)

右の大腿部も切開し、薬物投与用カニューレと動脈圧測定カニューレを大腿静脈と大腿動脈へそれぞれ挿入した。求心性迷走神経活動を測定するために、実体顕微鏡下で腹部を正中切開し、食道に沿っている胃を支配する胃迷走神経と肝臓に分岐している肝臓迷走神経を剥離した。さらに、小腸を支配する腹腔枝の神経を同定する為に、食道の背部迷走神経から分岐した迷走神経腹腔枝を剥離した。求心性神経活動を計測する為に、神経の中核側を外科的にカットして、剥離した神経を銀線双極電極

にのせ、電気的絶縁のためシリコンジェルでコーティングした。

遠心路の腎臓交感神経活動を測定するために、後腹膜に切開して腎動脈に沿っている腎交感神経を同定して、遠心性神経活動を計測する為に、神経の末梢側を外科的にカットして、剥離した神経を銀線双極電極にのせ、電気的絶縁のためシリコンジェルでコーティングした。

得られた電気信号は、アンプで増幅し、ウインドウ・ディスプレイミネーターを通してパルスカウンターで時間当たりのパルス数を算出して、波形とともにコンピューターに記録した。動脈圧と動脈圧から得られる心拍数の信号もコンピューターに記録する為にPower-Lab(model 4sp, AD instruments)を用いた。胃内又は十二指腸内投与のために、コントロール液の水(vehicle, 0.1 mL/10g 体重)又は高食塩水(1 M NaCl)の2溶液について、ポリエチレンカテーテルを用いて投与し、30分間の反応を観察した。実験終了後、安楽死させて、神経活動とは別の電気雑音(ノイズレベル)を計測した。

3. 実験試薬

TRPV1阻害物質;TRPVチャネルの役割を解析する目的で、TRPV1チャネル阻害剤のcapsazepineを静脈に留置したカテーテルへ投与する実験を行った。投与量は麻酔下マウスへの先行研究を参考にした^{4),5)}。

CCK-8;先行研究において、CCK-8(8 $\mu\text{g}/\text{kg}$)をラット腹腔内に投与すると、摂食が抑制されることが分かっている⁶⁾。さらにラットの静脈内投与で迷走神経求心路を活性化させることから⁷⁾、本研究では、静脈内に8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与した。

3. 研究結果

3. 1. マウス胃迷走神経活動求心路への麻酔薬の影響

本研究では、マウス求心性神経活動が麻酔薬によって影響をうけるか否か解析を行う為に、3種類の麻酔下それぞれで、CCK-8の静脈内投与による胃迷走神経活動反応差があるか解析を行った。その結果、①ウレタン群、②塩酸ケタミン+塩酸キシラジン群、③三種混合麻酔薬群、いずれでも、CCK-8によって胃迷走神経活動が活性化した(図1)。

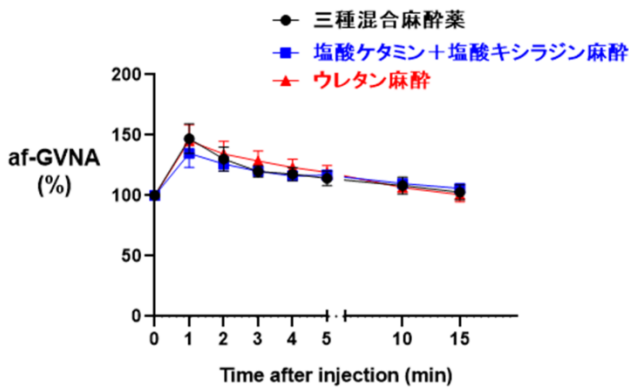


図 1. CCK-8 投与によるマウス胃迷走神経求心路活動 (af-GVNA) 変化における麻酔薬の影響

3. 2. マウス迷走神経求心路への高食塩水投与効果

実験1から、ウレタン麻酔下で実験を行ったところ、高食塩水 (1 M NaCl) の胃内投与は、コントロールの vehicle 投

与と比べて有意に胃迷走神経求心路活動を増大させた (図 2&3)。さらに、小腸を支配する腹腔迷走神経求心路は、高食塩水の十二指腸内投与により活性化して、その反応が容量依存性で引き起った。さらに、肝門脈内に高食塩水を投与すると、投与直後に肝臓迷走神経求心路が活性化した。一方、TRPV1 阻害剤である capsazepine を静脈内に投与しても、高食塩水による胃及び腹腔を支配する迷走神経求心路活動の活性化反応は残存した。

3. 3. マウス交感神経遠心路と循環機能への高食塩水投与効果

腎臓交感神経神経遠心路への高食塩水 (1 M NaCl) の胃内投与効果を検討した結果、高食塩水は、交感神経を抑制した (図 4)。この高食塩水による交感神経抑制反応は、寧臓迷走神経遮断マウスで消失した。また高食塩水の胃内投与は平均血圧と心拍数には影響しなかった。

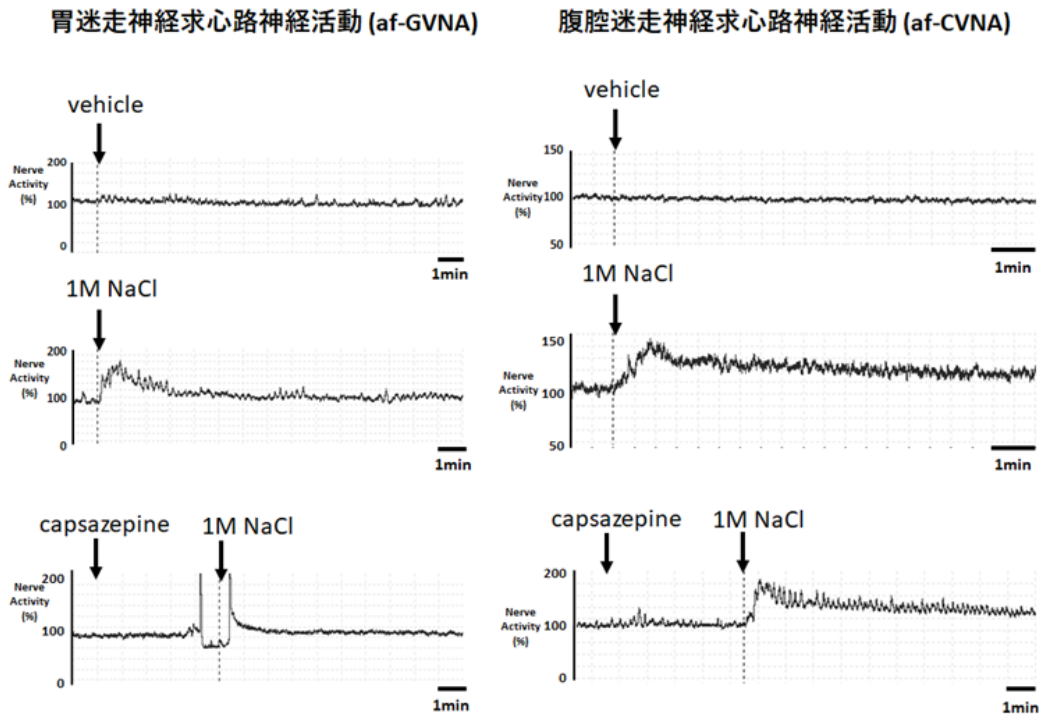


図 2. 高食塩水 (1M NaCl) の胃内投与による胃迷走神経求心路活動 (af-GVNA) 変化と十二指腸内投与による腹腔迷走神経求心路活動 (af-CVNA) 変化。Capsazepine (TRPV1 チャンネル阻害剤) の静脈内投与が高食塩水による求心路反応へ与える影響。

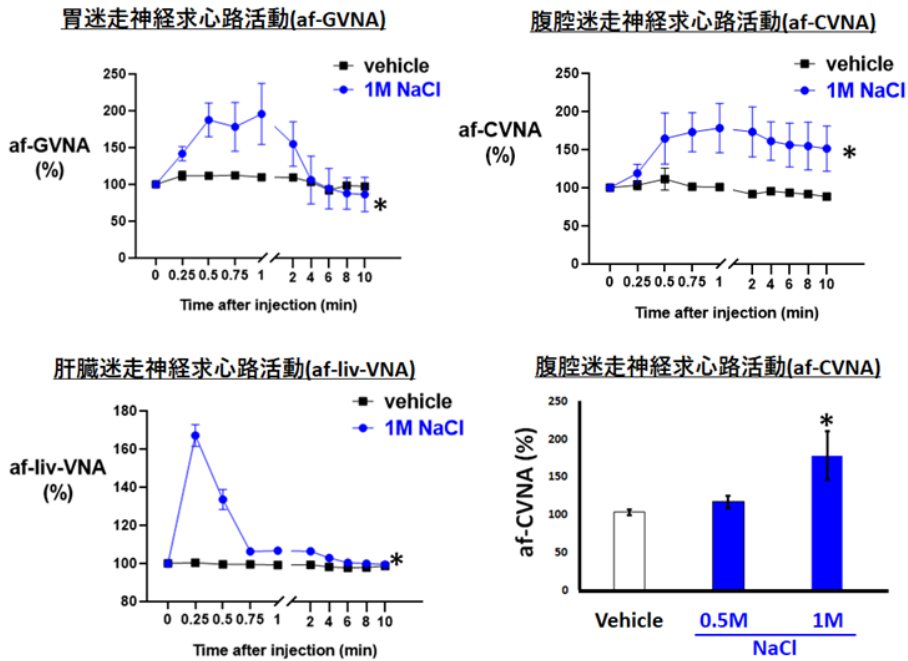


図 3. 高食塩水(1 M NaCl)の胃内投与による胃迷走神経求心路活動(af-GVNA)、十二指腸内投与による腹腔迷走神経求心路活動(af-CVNA)、肝門脈内投与による肝臓迷走神経求心路活動(af-liv-VNA)の変化。*P < 0.05; v.s vehicle

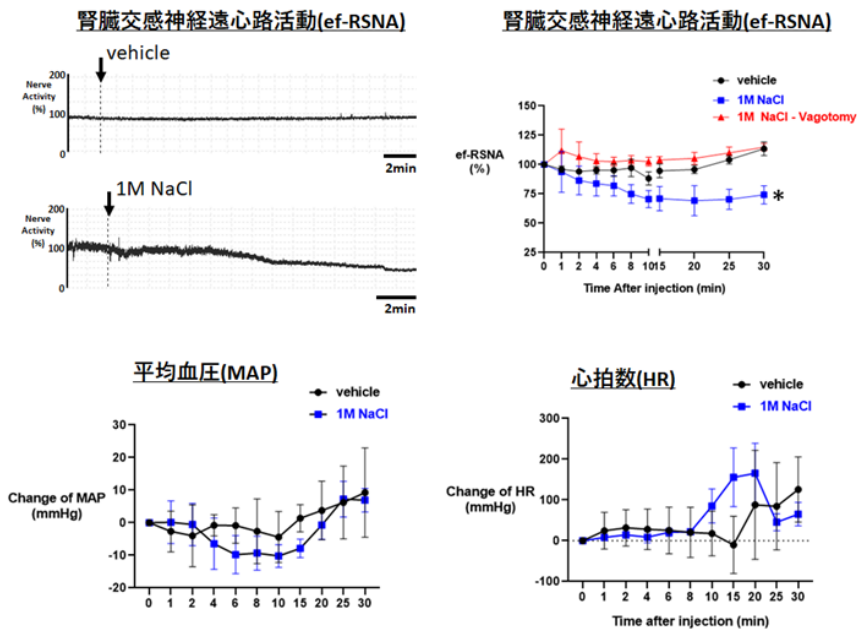


図 4. 高食塩水(1 M NaCl)の胃内投与による腎臓交感神経遠心路活動(ef-RSNA)、平均血圧(MAP)、及び心拍数(HR)の変化。Vagotomy;内臓迷走神経切断マウス、*P < 0.05 v.s vehicle

4. 考 察

本研究では、自律神経求心路に食塩を感じるセンサー機能があるか否か検討するためにマウス消化管を支配する迷走神経求心路の神経活動を計測して、高食塩水投与に反応するか否か解析を行った。その結果、胃、小腸及

び肝臓を支配する迷走神経活動は高食塩水に興奮反応を示した。さらに、高食塩水投与は、脳から末梢への遠心路活動にも影響して、腎臓交感神経活動を抑制した。この反応は内臓迷走神経切除マウスで消失したことから、高食塩水による遠心路自律神経調節作用には、消化管迷

走神経求心路から脳への伝達経路が関与している可能性が考えられる。しかしながら急性実験であった為、高食塩水投与は、血圧や心拍数に影響しなかったことから、今後は慢性的に高食塩水を摂取させて高血圧を発症させた際に、今回新たに発見した「消化管迷走神経求心路」がどのように関与するかについて解析を行う必要がある。

本研究では、高食塩水による消化管迷走神経求心路活性化作用の調節機序を解析する目的として、高浸透圧に反応するカプサイシン受容体である TRPV1 チャンネルに着目した^{8),9)}。しかしながら TRPV1 阻害剤を投与しても、高食塩水による迷走神経求心路活性化作用は抑制されなかった。従って、TRPV1 チャンネル以外のシグナル経路が関与している可能性が考えられる。近年、脳内における Na⁺センサーの局在が報告されており、血中などで増えた Na⁺が Nax と呼ばれるチャンネルが開いて Na⁺ 流入が起こることが示唆されている¹⁰⁾。今後は、Nax チャンネルが迷走神経求心路である no dose ganglion で発現しているか否か検討する必要がある。

5. 今後の課題

本研究によって、高食塩水に反応する自律神経求心路の存在を新たに確認して、この経路が、脳を介して遠心路の交感神経を調節していることも見出した。今後は、消化管でどのような機序で食塩が迷走神経求心路に作用しているかについて、より詳細な分子経路を明確にする必要がある。さらに、高食塩の慢性摂取で発症する高血圧に本研究で発見した「迷走神経—脳—交感神経;自律神経反射経路」が関与するか否か検討する必要がある。

6. 文献

- 1, Tanida M, Satomi J. Effects of intragastric injection of glutamate on efferent sympathetic nerve activity in rats. *Neurosci Lett.* 491 (3):211-5. 2011
- 2, Konishi Y, Koosaka Y, Maruyama R, Imanishi K, Kasahara K, Matsuda A, Akiduki S, Hishida Y, Kurata Y, Shibamoto T, Satomi J, Tanida M. L-Ornithine intake affects sympathetic nerve outflows and reduces body weight and food intake in rats. *Brain Res Bull.* 48-52. 2015
- 3, Osaka T, Kobayashi A, Inoue S. Thermogenesis induced by osmotic stimulation of the intestines in the rat. *J Physiol.* 532 (Pt 1):261-9. 2001
- 4, Zhang T, Tanida M, Uchida K, Suzuki Y, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Tominaga M, Shibamoto T. Biphasic Renal Sympathetic Response to Hemorrhagic Hypotension in Mice. *Shock.* 48 (5):576-582. 2017
- 5, Zhang T, Tanida M, Uchida K, Suzuki Y, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Tominaga M, Shibamoto T. Mouse Anaphylactic Hypotension Is Characterized by Initial Baroreflex Independent Renal Sympathoinhibition Followed by Sustained Renal Sympathoexcitation. *Front Physiol.* 8:669. 2017
- 6, Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R, Simansky KJ. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science.* 213(4511):1036-7. 1981
- 7, Habara H, Hayashi Y, Inomata N, Niijima A, Kangawa K. Organ-specific activation of the gastric branch of the efferent vagus nerve by ghrelin in urethane-anesthetized rats. *J Pharmacol Sci.* 124 (1):31-9. 2014
- 8, Caterina M, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824. 1997
- 9, Nishihara E, Hiyama TY, Noda M. Osmosensitivity of transient receptor potential vanilloid 1 is synergistically enhanced by distinct activating stimuli such as temperature and protons. *PLoS One.* 6 (7):e22246. 2011
- 10, Nomura K, Hiyama TY, Sakuta H, Matsuda T, Lin CH, Kobayashi K, Kobayashi K, Kuwaki T, Takahashi K, Matsui S, Noda M. [Na⁺] Increases in Body Fluids Sensed by Central Nax Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H⁺-Dependent Activation of ASIC1a. *Neuron.* 101 (1):60-75. 2019

Discovery of Gastro-Intestinal Autonomic Afferent Pathway as Salty Sensor

Mamoru Tanida

Department of Physiology II, Kanazawa Medical University

Summary

Previously, it has been shown that intraduodenal injection of hypertonic solution stimulated thermogenesis in rat, suggesting the existence of the NaCl sensor in the gastro-intestinal organs. Thus, we performed electro-physiological experiment whether gastro-intestinal injection of high NaCl solution affects afferent vagal nerve outflows supplying the stomach, intestine, or liver in anesthetized mice. In the present study, we firstly showed that intragastric injection of 1M NaCl solution activated afferents of vagal nerves in the stomach, and that intraduodenal or intraportal injection of 1M NaCl solution also stimulated celiac or hepatic afferents of vagal nerves, respectively. These results suggest that vagal afferent pathway responds to NaCl stimulation. In addition, intragastric injection of 1M NaCl solution suppressed efferent renal sympathetic nerve activity without changes of blood pressure and heart rate, and abdominal vagotomy did not affect NaCl-induced renal sympatho-inhibition. Thus, these lines of evidence suggest that NaCl-induced stimulation of gastrointestinal organs may affect vagal afferents and regulate efferent sympathetic outflows through the central nervous system. However, TRPV1 channel blocking of abdominal organs did not affect NaCl-induced vagal afferent excitation, indicating that signal pathways except of TRPV channel may be involved in the NaCl-induced afferent autonomic nerve regulation in the gastro-intestinal organs. To determine this mechanism, it will be needed to perform further studies in the future.