

塩分摂食による満腹感増強作用とその機構の解析

岩崎 有作, 輿水 崇鏡

京都府立大学大学院生命環境科学研究科, 自治医科大学医学部分子薬理学部門

概要 食塩は、生体恒常性に必須なミネラルであり、且つ食品に塩味を付与する重要な因子である。一方、食塩過剰摂取は高血圧などの循環器疾患のリスク因子であるため、WHO をはじめ全世界的に減塩が推奨されている。しかし、日本人の塩分摂取量は多く、減塩を実行することも容易では無く、より良い栄養指導法の開発なども求められている。減塩することが容易で無い理由として、食塩には塩味による美味しさや、満足感・満腹感創出作用が関与すると推察される。しかし、塩分摂取に伴う満腹・満足感増幅作用の作用機序について不明な点が多い。食塩摂取による体液浸透圧の上昇は、下垂体後葉ホルモンのオキシトシンやバソプレシンの分泌を促進する。オキシトシンやバソプレシンは摂食抑制作用がある。しかし、これらホルモンは血液脳関門の通過率が極めて低く、食欲中枢の視床下部へ血行を介して直接作用することは困難である。これまでに助成研究者は、末梢オキシトシンが内臓感覚神経の求心性迷走神経を介して脳へ作用し、摂食量を抑制することを明らかとした。一方、バソプレシンの求心性迷走神経への作用は不明であった。本研究では、バソプレシンの求心性迷走神経を介した摂食抑制作用を解析した。バソプレシンは、求心性迷走神経に発現する V1a 受容体に作用し、求心性迷走神経細胞を直接活性化することを明らかにした。バソプレシンに応答する求心性迷走神経は約 15%で、その半数がオキシトシン応答神経であった。バソプレシンの腹腔内投与は、投与直後から短期的に摂食量を抑制した。この作用は横隔膜下迷走神経切断によって完全に消失した。そして、V1a 受容体全身欠損マウスへバソプレシンを腹腔内投与しても、摂食抑制は誘導されなかった。一方、V1a 受容体阻害剤の脳室内投与は、バソプレシンによる摂食抑制作用に全く影響を与えず、末梢・末梢神経における V1a 受容体が末梢バソプレシンの摂食抑制作用に関与することが示唆された。以上より、末梢バソプレシン投与は、求心性迷走神経の一部サブクラスを活性化し、その神経情報が脳へ伝達され、摂食量を低下させることが示された。本機序が、塩分摂取に伴う満足感・摂食抑制作用に寄与するものであるか、今後検討する必要がある。

1. 研究目的

食塩は、生体恒常性に必須なミネラルであり、且つ食品に塩味を付与する重要な因子である。食塩の過剰摂取は高血圧などの循環器疾患を惹起するため、近年ではその摂食量を控えるように指導されている。一方、塩味の少ない食事は味気なく、食べた気がしなく、満腹・満足感が得られにくいことも事実である。これは、おにぎりや汁物(味噌汁, 吸い物)と一緒に食べると満足感が得られることから想像される。しかし、塩分摂取に伴う満腹・満足感増幅作用の作用機序について不明な点が多い。

脳の視床下部は、摂食中枢(恒常性摂食中枢)として機能し、全身の代謝・栄養情報を感知して摂食行動を制御している。我々は、食後 30 分程度で満腹感を得て、摂食行動を停止する。摂取した食物は消化・吸収され、これらによって変化した末梢因子(栄養素・代謝物・ホルモンなど)が視床下部に作用し、摂食抑制行動へと繋がる。末梢因子が脳視床下部へ作用する経路として、(1)末梢因子が血行を介して脳神経に直接作用する「液性経路」と、(2)脳と末梢臓器を繋いでいる内臓感覚神経(主に求心性迷走神経)を介した「神経経路」に大別される。摂食行動が

停止する食後 30 分においては、摂取した食物の多くはまだ消化されず胃内に留まっている。この状況下で視床下部に働きかけて摂食行動を抑制している機序として、消化管と脳を繋いでいる求心性迷走神経の役割が重要だと考えられている。

助成研究者はこれまでに、食後に分泌亢進されるホルモンの摂食抑制作用と求心性迷走神経の役割について研究を進めてきた。食後に分泌される消化管ホルモン(コレシストキニン:CCK, グルカゴン様ペプチド-1:GLP-1, ペプチド YY), 膵ホルモン(インスリン, 膵ポリペプチド), 下垂体後葉ホルモン(オキシトシン)は、求心性迷走神経の一部サブクラスを活性化し、その情報が脳に伝達され、摂食抑制が誘導されることを明らかとしてきた⁽¹⁻⁷⁾。さらに、末梢オキシトシン投与によるこの求心性迷走神経サブクラスの活性化は、摂食調節機能を有する視床下部のオキシトシンニューロンを活性化し、中枢オキシトシンシグナリングを介して摂食量を抑制することを、近年見出した⁽¹⁾。

バソプレシンとオキシトシンは共に、代表的な下垂体後葉ホルモンであり、9 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンである。塩分摂取や脱水に伴う体液浸透圧上昇はバソプレシンとオキシトシン分泌を亢進させ、体液恒常性維持のための生理機能を誘導する⁽⁸⁾。先行研究にて、ラットに高食塩水を投与すると、投与直後に一過的に血中バソプレシン濃度が上昇し、摂食量が低下することが報告されている⁽⁹⁾。末梢バソプレシンの摂食抑制作用に関しては、バソプレシンの腹腔内投与(ip)は、ラットの摂食量を一時的に抑制し、この作用は V1 受容体阻害剤によって減弱した⁽¹⁰⁾。末梢のバソプレシンは、末梢オキシトシンと同様、血液脳関門の透過率は極めて低い⁽¹¹⁾。従って、末梢バソプレシンも、末梢オキシトシン^(1, 6)と同様に、求心性迷走神経を介して摂食量を抑制している可能性が高い。

本研究では、「食塩摂取は、その後分泌亢進されるバソプレシンが求心性迷走神経を介して満腹・満足感を増強する」と仮説立て、実証を試みる(図 2)。薬理的なバソプレシンの求心性迷走神経に対する活性化機構、及び、求心性迷走神経を介した摂食抑制作用について検討した。

2. 研究方法

2.1 試薬

オキシトシン(4084-v)とアルギニンバソプレシン(4085-v)は、ペプチド研究所(大阪)より購入した。バソプレシン

V1a 受容体阻害剤の SR49059(17972)は、Cayman 社(米国)より購入した。オキシトシンとバソプレシンは、1 mM 水溶液とし、実験当日まで-80 度保存した。SR49059 は DMSO を用いて 100 mM 溶液を調製し、実験当日まで-80 度保存した。

2.2 動物

実験には全て雄性マウスを用いた。C57BL/6J マウス、バソプレシン V1a 受容体欠損マウス、バソプレシン V1b 受容体欠損マウス、遺伝子改変マウスのコントロールマウス(C57BL/6-129/Sv マウス)は、個別ケージにて、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル(明期 7:30~19:30)、自由摂取飲水環境下(動物飼料 CE-2, 日本クレア)で飼育した。少なくとも実験開始 1 週間前より当大学の動物飼育室環境下で順化飼育した。動物実験は京都府立大学、または、自治医科大学の動物実験委員会のガイドラインに従い、承認を得て実施した。

2.3 求心性迷走神経の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 測定⁽⁶⁾

求心性迷走神経の細胞体が集合する nodose ganglion (NG)は左右の頸静脈孔直下に存在する。麻酔下のマウスからの左右の NG を摘出し、collagenase/dispase/DNase 混合酵素溶液にて処理することで単一 NG ニューロンを調製し、最小必須培地を用いて一晚培養した。 Ca^{2+} 感受性蛍光色素の fura-2 AM を NG ニューロンに取り込ませ、蛍光顕微鏡ステージ上の灌流チャンバーにセットし、蛍光画像解析法により経時的に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定した。

2.5 求心性迷走神経の RT-PCR

麻酔下の C57BL/6J マウスからの左右の NG を摘出し、NG の Total RNA を、TRIzol(Thermo Fisher Scientific)を用いて抽出し、Verso cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA を合成した。バソプレシン V1a 受容体と V1b 受容体の発現は、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version(RR006A)を用いた PCR 法(98°C 10 秒- 55°C 30 秒- 72°C 60 秒を 35 サイクル)にて検証した。内部標準として 36b4 の発現量を検証した。PCR 産物は 2%アガロースゲルにて電気泳動をし、PCR 産物のサイズを検証した。プライマー配列は以下の通りである。36b4, sense, 5'-TGT TTT ACA ACG GCA GCA TTT -3', antisense, 5'-CTT TGG CGG GAT TAG TCG AAG -3', 391 bp; V1a receptor, sense, 5'-CGT GGT ACC CGT GAT CAT CT -3',

antisense, 5'-TGG CGA ATT TCT GCG CTA TG-3', 458 pb; V1b receptor, sense, 5'-AAG TCC TCA TCT TCT GCC GC-3', antisense, 5'-CTT GCA TGG AGG CTG AGG T -3', 456 pb.

V1a 受容体と V1b 受容体の PCR 反応のポジティブコントロールとして, V1a 受容体は視床下部の, V1b 受容体は下垂体の cDNA サンプルを用いて検証した。上記 PCR 反応条件にて, V1a 受容体と V1b 受容体の PCR 産物は検出された (data not shown)。

2. 4 迷走神経切断術⁽⁶⁾

麻酔下にて C57BL/6J マウスを正中切開し, 食道と並走する腹側及び背側の迷走神経束を露出させた。横隔膜の直下に位置する腹側及び背側迷走神経束をマイクロ剪刀にて切断し, 閉腹した。偽手術の場合は, 迷走神経束の露出まで行い, 閉腹した。術後は育児用粉ミルク (液体食) にて飼育した。1 週間の回復期間をとり, その後の実験を実施した。

2. 5 脳室内カニューレ挿入手術⁽¹⁾

麻酔下の C57BL/6J マウスに対して, 脳定位固定装置を用いた脳カニューレの挿入留置術を行った。マウス脳アトラスに基づき Bregma から後方 0.3 mm, 右方 1.0 mm, 深度 2.5 mm に位置する側脳室にカニューレを挿入・留置した。術後 10 日間以上の回復期の後, 摂食行動試験を実施した。無麻酔での脳室内投与によるマウスへのストレスを極力小さくするために, 実験当日までの間はマウスのハンドリングを毎日に行った。

2. 6 摂食行動試験⁽⁶⁾

実験前日の 18:00 よりマウスを絶食させた (16 時間絶食)。翌日 9:45 よりバソプレシン (18 nmol/kg, 10 ml/kg), または生理食塩水 (10 ml/kg) を, 腹腔内投与した。10:00 に動物飼料 (CE-2 もしくは液体食) を与えた。経時的に給餌器の重量を測定し, 摂食量を算出した。脳室内へ V1a 受容体阻害剤を投与する場合, 8:45 より Vehicle 溶液 (0.1% DMSO in saline, 2 μ l) または SR49059 (100 pmol, 2 μ l) を脳室内へ投与した。

3. 研究結果

3. 1 バソプレシンの求心性迷走神経への直接作用

バソプレシンの求心性迷走神経への直接作用を評価するために, 求心性迷走神経の細胞体が集合する nodose ganglion (NG) から単一ニューロンを調製し, バソプレシン

を単一 NG ニューロンに添加し, 添加前後の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化を, fura-2 を用いて画像解析した。

バソプレシン (10^{-9} M \sim 10^{-7} M) は, 一部の NG ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇応答を示す NG ニューロンの割合はバソプレシン濃度依存的に増加し, バソプレシン 10^{-8} M で最大活性となり, この時応答した NG ニューロンの割合は約 15% であった。他方, オキシトシンが求心性迷走神経へ最大活性を誘導する濃度は 10^{-7} M で, 約 15% の NG ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。

次に, バソプレシンに応答する NG ニューロンに対するオキシトシンの応答性を調べた。実験方法としては, オキシトシン (10^{-7} M, 4 分) を添加し, その後 20 分以上の十分な洗浄をし, バソプレシン (10^{-7} M, 4 分) を添加した。171 の単一 NG ニューロンの内, 24 ニューロン (14%) がバソプレシン (10^{-7} M) によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が誘導され, 24 個 (14%) がオキシトシン (10^{-7} M) に応答した (図 1C)。バソプレシンに応答した 24 のニューロンの内, 13 ニューロンがオキシトシンに反応し (図 1A), 11 ニューロンがオキシトシンに無反応であった (図 1B)。

以上より, バソプレシンは, 約 15% の求心性迷走神経に直接作用し, 活性化することが示された。さらに, バソプレシン応答迷走神経の半数はオキシトシン応答性神経, 半数はオキシトシン非応答性神経であることが分かった。

3. 2 バソプレシンの求心性迷走神経活性化作用を仲介するバソプレシン受容体の検証

バソプレシンによる摂食抑制作用にはバソプレシン V1 受容体の関与が報告されている⁽¹⁰⁾。V1 受容体には V1a 受容体と V1b 受容体が存在する。本研究では, まず, nodose ganglion に発現するバソプレシン受容体を RT-PCR 法にて検証した。その結果, nodose ganglion において, バソプレシン V1a 受容体の PCR 産物が検出され, V1b 受容体の PCR 産物は検出されなかった (図 2)。従って, 求心性迷走神経には主にバソプレシン V1a 受容体が発現していることが示唆された。

次に, バソプレシンの求心性迷走神経に対する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を仲介するバソプレシン受容体の関与を検証するために, バソプレシン V1a 受容体欠損マウス, 及び, バソプレシン V1b 受容体欠損マウスの単一 NG ニューロンを用いて, 検証した。バソプレシン (10^{-7} M) は, 128 の野生型マウス由来の単一 NG ニューロンの内, 16 ニューロン

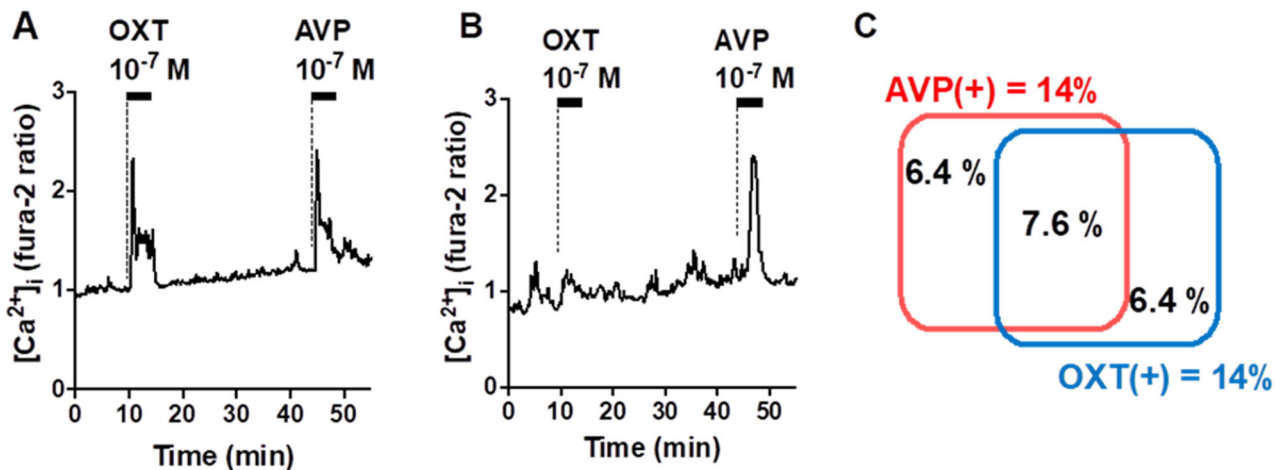


図1 バソプレシン(AVP)とオキシトシン(OXT)の添加による単一求心性迷走神経細胞(NGニューロン)の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度変化 A: OXT(10^{-7} M)とAVP(10^{-7} M)の添加によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が誘導された単一 NG ニューロンの代表的な $[Ca^{2+}]_i$ トレース。B: AVP(10^{-7} M)のみで $[Ca^{2+}]_i$ 上昇応答を示した NG ニューロンの代表的な $[Ca^{2+}]_i$ トレース。C: 検証した 171 の単一 NG ニューロンの AVP と OXT に対する応答性を図示した。

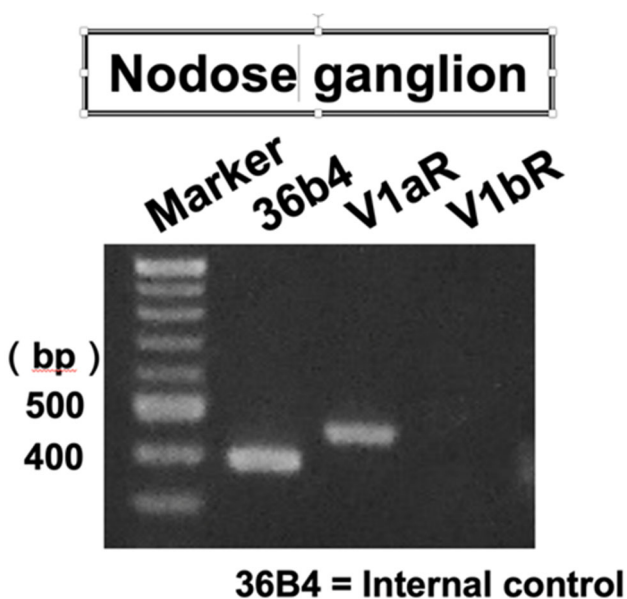


図2 求心性迷走神経の神経節(nodose ganglion)におけるバソプレシン受容体 mRNA の RT-PCR 産物 nodose ganglion において、バソプレシン V1a 受容体(V1aR)の PCR 産物が検出された。

(12.5%)の神経の $[Ca^{2+}]_i$ を強く上昇させた(図 3A, D)。また、バソプレシン V1b 受容体欠損マウス由来の NG ニューロンにバソプレシン(10^{-7} M)を添加したところ、163 ニューロン中、28(17.2%)の NG ニューロンが著明な $[Ca^{2+}]_i$ 応答を示した(図 3C, D)。一方、バソプレシン V1a 受容体欠損

マウスの単一 NG ニューロンにおいては、ほとんどがバソプレシン(10^{-7} M)に $[Ca^{2+}]_i$ 応答を示さなかった(図 3B)。そして、131 ニューロン中、1 ニューロンのみがバソプレシン(10^{-7} M)による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められた(0.76%, 図 3D)。この値(1/131, 0.76%)は、野生型マウスにおける値(16/128, 12.5%)と比較すると有意に低値であった(図 3D)。従って、バソプレシンは求心性迷走神経に発現する V1a 受容体を介して $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させることが示唆された。

3.3 バソプレシンの迷走神経を介した摂食抑制作用

バソプレシン腹腔内投与の摂食抑制作用における求心性迷走神経の関与を検証するために、横隔膜下で迷走神経を切断したマウス⁽⁶⁾を用いて検証した。バソプレシン(20 μ g/kg = 18 nmol/kg, 摂食抑制作用を誘導する最小投与量)を迷走神経切断術の偽手術を施したマウスへ腹腔内投与すると、投与後 0.5 時間から 3 時間まで有意に累積摂食量を低下させた(図 4A)。そして、投与後 6 時間では、バソプレシン投与群の累積摂食量は、生理食塩水投与群と等しくなった(図 4A)。従って、バソプレシンの短期的な摂食抑制作用が認められた。このバソプレシンの短期的な摂食抑制作用は、迷走神経の切断によって完全に消失した(図 4B)。従って、バソプレシンは、求心性迷走神経を介し

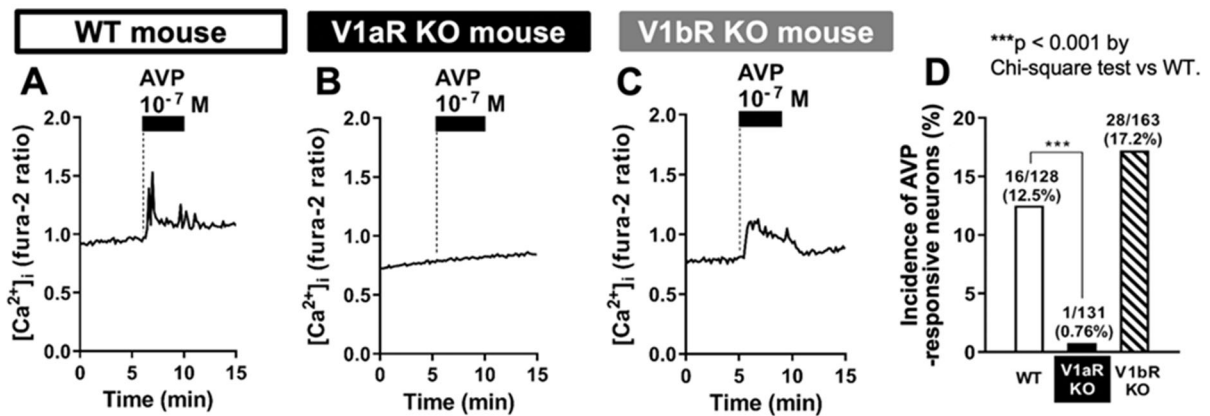


図3 野生型マウス, バソプレシン V1a 受容体欠損マウス, バソプレシン V1b 受容体欠損マウス由来の単一 NG ニューロンにおける, バソプレシンによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用 A~C: 野生型マウス(A), V1a 受容体欠損マウス(B, V1aR KO), V1b 受容体欠損マウス(C, V1bR KO) 由来の単一 NG ニューロンにおける, バソプレシン(AVP, 10^{-7} M) 添加前後の代表的な $[Ca^{2+}]_i$ トレースを示した。D: AVP に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇応答を示した割合を示した。角棒グラフの上部の数値は, 応答神経数/総神経数(応答頻度, %)を示した。*** $p < 0.001$ by Chi-square test.

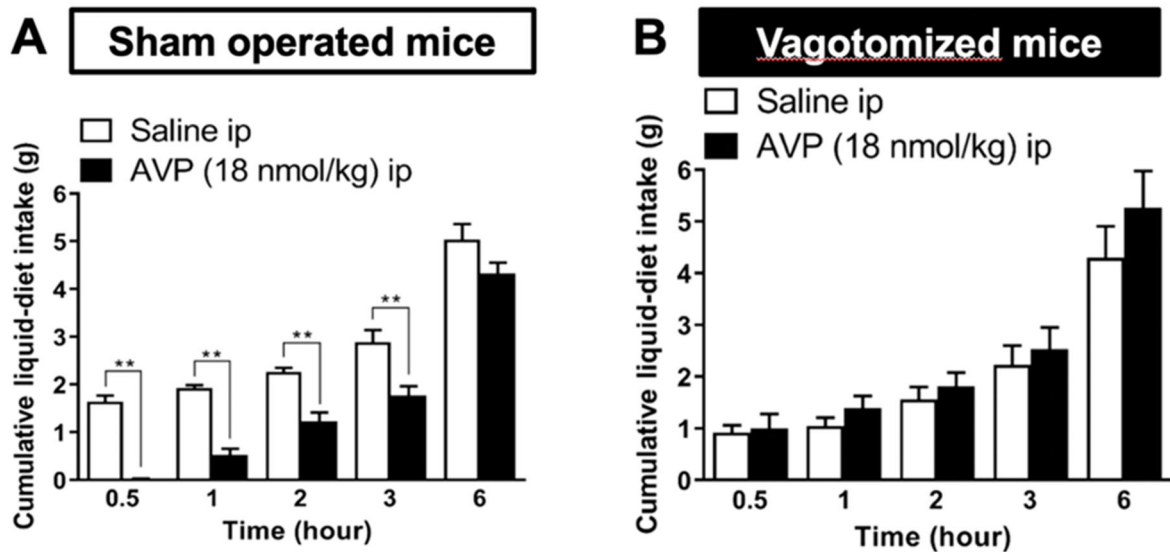


図4 横隔膜下迷走神経切断マウス(B)とその偽手術マウス(A)におけるバソプレシン(AVP, 18 nmol/kg) 腹腔内投与後の累積摂食量 ** $p < 0.01$ by unpaired t-test.

て脳へ作用し, 摂食量を低下させることが示された。

単離迷走神経の解析から, バソプレシンは求心性迷走神経に発現する V1a 受容体に直接作用することで神経を活性化することを見出した。さらに, バソプレシンの摂食抑制作用には求心性迷走神経への作用が必須であることを, 摂食行動試験により明らかにした。最後に, バソプレシンが求心性迷走神経の V1a 受容体を介して摂食量を抑制

しているのか, 検証した。本研究では, バソプレシン V1a 受容体欠損マウス, バソプレシン V1b 受容体欠損マウス, 及び, これらの野生型対照マウスを用いて, バソプレシン腹腔内投与後の摂食抑制作用を評価した。対照マウスへのバソプレシン(18 nmol/kg)の腹腔内投与は, 投与後 0.5~6 時間まで有意に累積摂食量を低下させた(図 5A)。投与後 24 時間の累積摂食量は, バソプレシン投与群と生理

食塩水投与群で差異は認められなかった (Data not shown)。このバソプレシンの摂食抑制作用は、バソプレシン V1b 受容体欠損マウスにおいては同様に観察され (図 5C)、バソプレシン V1a 受容体欠損マウスで完全に消失した (図 5B)。一方、バソプレシンの摂食抑制作用は、V1a 受容体阻害剤 (SR49059) を脳室内へ投与しても影響を受けなかった (図 6)。

以上の結果より、末梢バソプレシンは、求心性迷走神経の V1a 受容体を介して求心性迷走神経の一部サブクラスを活性化し、その神経情報を脳へ伝達することで摂食抑制が誘導されることが示唆された。さらに、この摂食抑制作用の中核機序には、バソプレシン V1a 及び V1b 受容体シグナリング以外の機序が関与することも示唆された。

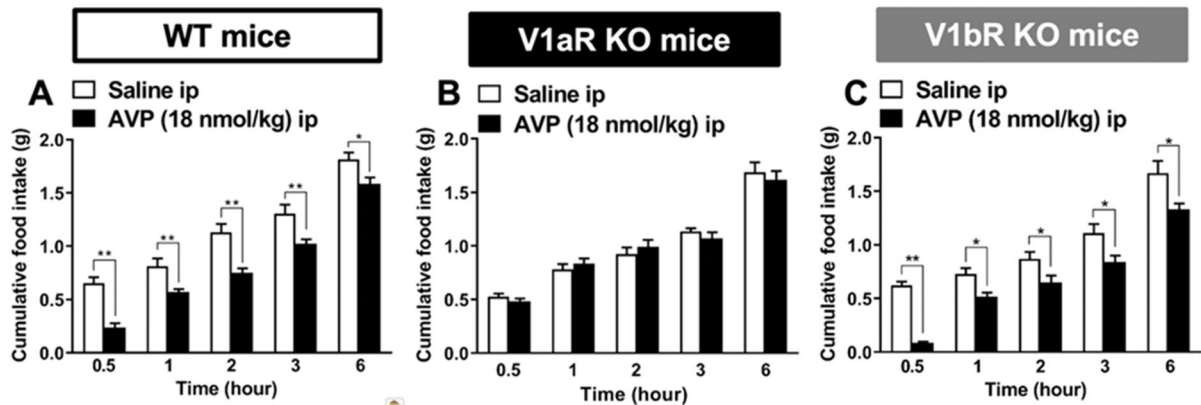


図 5 野生型対照マウス (A)、バソプレシン V1a 受容体欠損マウス (B)、V1a 受容体欠損マウス (C) におけるバソプレシン (AVP, 18 nmol/kg) 腹腔内投与後の累積摂食量 *p < 0.05, **p < 0.01 by unpaired t-test.

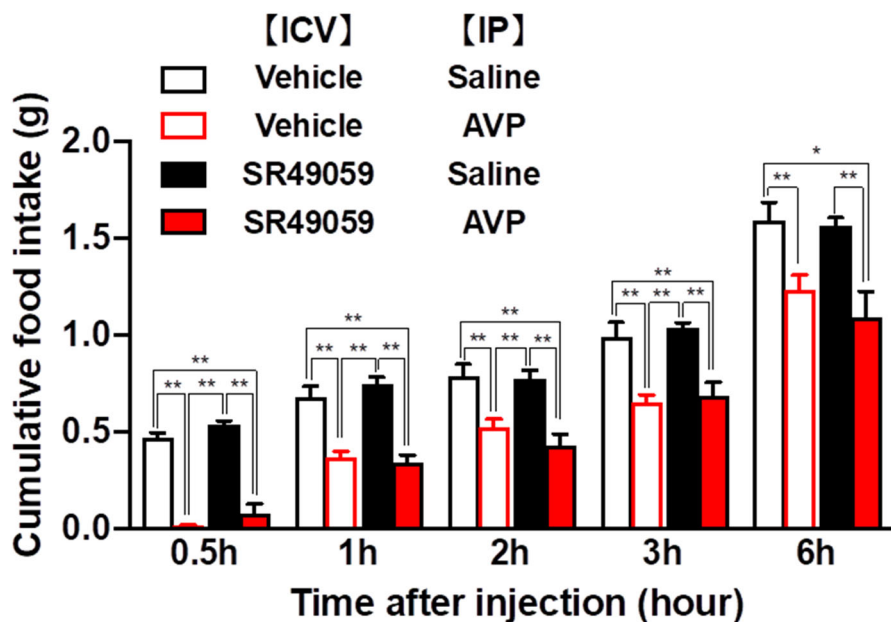


図 6 バソプレシン腹腔内投与による摂食抑制作用に対するバソプレシン V1a 受容体阻害剤脳室内投与の影響 生理食塩水 (saline, 10 ml/kg) またはバソプレシン (AVP, 20 nmol/kg) を腹腔内投与する前に、側脳室内に Vehicle (0.1% DMSO を含む生理食塩水, 2 μ L) もしくは V1a 受容体阻害剤 SR49059 (100 pmol, 2 μ L) を投与した。*p < 0.05, **p < 0.01 by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

4. 考 察

本研究では、末梢バソプレシンの求心性迷走神経を介した摂食抑制作用を見出した。まず、バソプレシンが求心性迷走神経に発現する V1a 受容体を作用点として $[Ca^{2+}]_i$ 上昇させ、神経活性化を誘導することを見出した。バソプレシンによって活性化される求心性迷走神経の割合は約 15%であった。このバソプレシン応答迷走神経の約半数がオキシトシン応答神経であった。そして、末梢バソプレシン投与による求心性迷走神経の活性化は摂食抑制を誘導した。

バソプレシンは、食塩の摂取などによる体液浸透圧の上昇によって分泌が亢進するホルモンである。動物実験において、ラットへの高食塩水負荷(20%食塩水を 2 ml/kg で腹腔内投与)は、一過的に血中バソプレシン濃度を上昇させ、摂食量を低下させることが報告されている⁽⁹⁾。当研究室においても、一晩絶食した C57BL/6J マウスに、5.4%食塩水を 10 ml/kg で経口投与すると、投与直後に有意に摂食量を抑制した(data not shown)。これら食塩による摂食抑制作用に、バソプレシンの求心性迷走神経活性化が関与しているのかもしれない。

バソプレシンに応答する約 15%の求心性迷走神経の約半数がオキシトシン応答神経であった。末梢オキシトシン投与による求心性迷走神経の活性化は、視床下部室傍核のオキシトシン神経を活性化し、摂食量を抑制する⁽¹⁾。従って、末梢バソプレシンによる求心性迷走神経を介した摂食抑制作用の中枢機序として、視床下部オキシトシン神経が関与するかもしれない。

視床下部で合成されるバソプレシンは、下垂体後葉ホルモンとして血行へ分泌される他、脳内の神経伝達物質/神経修飾物質として中枢神経系にも作用する。これまでに、中枢のバソプレシンの摂食抑制作用について報告されている^(12, 13)。一方、本研究において、末梢バソプレシンによる摂食抑制作用には、中枢バソプレシン受容体シグナリングの関与は少ないと考えられる。バソプレシン V1b 受容体欠損マウスへのバソプレシン腹腔内投与は、野生型マウスと同様、有意な摂食抑制作用がみられた。また、V1a 受容体阻害剤を脳室内へ投与しても、末梢バソプレシンの摂食抑制作用は影響を受けなかった。従って、中枢バソプレシンと末梢バソプレシンは異なる中枢機序で摂食抑制作用を駆動していることが示唆された。

5. 今後の課題

本研究は、食塩摂取による満腹・満足感増進作用を生理学的に理解するため、食塩摂取によって分泌されるバソプレシンに焦点を当て、バソプレシンの摂食抑制作用とその作用機序について解析をした。今後は、この末梢バソプレシンの摂食抑制作用及び作用機序が、食塩摂取による満腹・満足感増進作用に関与するかを検証する必要がある。今後の継続研究は、食塩による満腹・満足感増進作用の生理学的意義と病態生理学的意義(食塩中毒:濃い味好き)を明らかにするために必須であり、そして、これら成果は食塩中毒に対する予防・治療法を開発するための基盤研究となる。

6. 文 献

- 1 Iwasaki, Y., Kumari, P., Wang, L., Hidema, S., Nishimori, K. and Yada, T.: Relay of peripheral oxytocin to central oxytocin neurons via vagal afferents for regulating feeding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 519:553-558 (2019)
- 2 Goswami, C., Iwasaki, Y. and Yada, T. : Short chain fatty acids suppress food intake by activating vagal afferent neurons. *J. Nutr. Biochem.*, 57:130-135 (2018)
- 3 Iwasaki, Y., Sendo, M., Dezaki, K., Hira, T., Sato, T., Nakata, M., Goswami, G., Aoki, R., Arai, T., Kumari, P., Hayakawa, M., Masuda, C., Okada, T., Hara, H., Drucker, D.J., Yamada, Y., Tokuda, M. and Yada, T.: GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nat. Commun.* 9:113 (2018)
- 4 Iwasaki, Y., Goswami, C., and Yada, T.: Glucagon-like peptide-1 and insulin synergistically activate vagal afferent neurons. *Neuropeptide*, 65:77-82 (2017)
- 5 Iwasaki, Y., Dezaki, K., Kumari, P., Kakei, M., and Yada, T.: Ghrelin counteracts insulin-induced activation of vagal afferent neurons via growth hormone secretagogue receptor. *Neuropeptide*, 52:55-60 (2015)

- 6 Iwasaki, Y., Majima, Y., Suyama, S., Yoshida, M., Arai, T., Katsurada, K., Kumari, P., Nakabayashi, H., Kakei, M., and Yada, T.: Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: A route for ameliorating hyperphagia and obesity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 308:R360-R369 (2015)
- 7 Ayush, E., Iwasaki, Y., Iwamoto, S., Nakabayashi, H., Kakei, M., and Yada, T.: Glucagon directly interacts with vagal afferent nodose ganglion neurons to induce Ca²⁺ signaling via glucagon receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 456:727-732 (2015)
- 8 Antunes-Rodrigues, J., de Castro, M., Elias, L.L., Valenca, M.M. and McCann, S.M.: Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol. Rev.*, 84:169-208 (2004)
- 9 Ikemura, R., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K. and Nishihara, M.: Involvement of endogenous vasopressin in high plasma osmolality-induced anorexia via V1 receptor-mediated mechanism. *J. Vet. Med. Sci.*, 66(8):951-955 (2004)
- 10 Langhans, W., Delprete, E., Scharrer, E.: Mechanisms of vasopressin's anorectic effect. *Physiol. Behav.* 49:169-176 (1991)
- 11 Mens, W.B., Witter, A., van Wimersma Greidanus, T.B.: Penetration of neurohypophyseal hormones from plasma into cerebrospinal fluid (CSF): half-times of disappearance of these neuropeptides from CSF. *Brain Res* 262:143-149 (1983)
- 12 Pei, H., Sutton, A.K., Burnett, K.H., Fuller, P.M., Olson, D.P.: AVP neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus regulate feeding. *Mol Metab* 3:209-215 (2014)
- 13 Yoshimura, M., Nishimura, K., Nishimura, H., Sonoda, S., Ueno, H., Motojima, Y., Saito, R., Maruyama, T., Nonaka, Y., Ueta, Y.: Activation of endogenous arginine vasopressin neurons inhibit food intake: by using a novel transgenic rat line with DREADDs system. *Sci Rep* 7:15728 (2017)

Effect of Salt Intake on Satiety and its Mechanism

Yusaku Iwasaki¹, Taka-aki Koshimizu²

¹Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

²Department of Pharmacology, Jichi Medical University

Summary

Salt is an essential mineral for homeostasis and is an important ingredient to induce salt taste. Furthermore, salt may induce satiety and fulfilment, however, the underlying mechanisms remain unproved. Salt intake increases the extracellular fluid osmolarity, thereby promoting the release of the posterior pituitary hormones oxytocin and arginine-vasopressin (AVP). Peripheral oxytocin and AVP reportedly reduce food intake, and oxytocin-induced anorexigenic effect involves vagal afferent nerves. On the other hand, the mechanism of AVP-induced suppressing food intake is unclear. In the present study, we examined whether AVP directly acts on vagal afferent neurons through AVP receptor, and whether this action on vagal afferents suppress food intake.

We examined effects of AVP on cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) using ratiometric fura-2 microfluorometry in the neurons isolated from the vagal afferent nodose ganglion of C57BL/6J mice. AVP increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in single nodose ganglion neurons (NGNs). The incidence of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses to AVP showed a concentration-dependency, with a maximal value around 15% at 10^{-8} and 10^{-7} M. AVP failed to increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in NGNs from vasopressin V1a receptor knockout (V1aR KO) mice. Intraperitoneal administration of AVP decreased food intake in wild-type mice, but not V1aR KO mice. AVP-induced anorexigenic effect was blunted by subdiaphragmatic vagotomy. In contrast, when intracerebroventricular injected V1aR antagonist (SR49059) did not affect the AVP-induced anorexigenic effects. In conclusion, AVP directly activates vagal afferents via V1aR, thereby suppressing food intake. This vagal afferent-mediated effect of AVP might be involved in salt-induced satiety.