

食塩の過剰摂取に伴う血圧上昇における Na⁺および Ang II シグナルの統合に関わる神経機構の解明

松田 隆志

東京工業大学科学技術創成研究院生体恒常性研究ユニット

概要 体液中のナトリウムイオン(Na⁺)濃度を常に一定に保つ「Na 恒常性」はヒトを含む陸生動物の生命を維持するために必須である。脳は体液 Na⁺濃度の微妙な変化を感知するとともに、アンジオテンシン II(Ang 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・塩分摂取行動の制御や血圧制御を統合的に行っている。脳において、血液脳関門が欠損している感覚性脳室周囲器官(sCVOs)は、体液情報を感知する脳領域として知られている。最近、申請者の所属する研究室では、過剰な塩分摂取によって体液 Na⁺濃度が上昇し、そのために血圧上昇が起きる食塩感受性高血圧のメカニズムとして、sCVOs の一つである終板脈管器官(OVLT)において、脳内 Na レベルセンサーである Na_xを発現しているグリア細胞が体液 Na⁺濃度の増加を感知し、交感神経の活性化を通じて、血圧を上昇させる仕組みを明らかにした。一方、体液 Na⁺濃度上昇時には血中の AngII 量が増加することが知られている。Ang II も Na⁺濃度と同様に脳に直接作用することによって血圧制御に関与していることが示唆されているが、その詳細な神経機構は不明である。また、この2つの血圧制御シグナルがどこでどのように情報統合されているのかも分かっていない。

本研究では、血圧上昇におけるNa⁺シグナルとAng IIシグナルの相関を明らかにするため、まず、脳内におけるAng IIによる血圧上昇の仕組みについて解析した。その結果、脳室内にAng IIを投与すると、sCVOsである脳弓下器官(SFO)およびOVLTが活性化し、それに伴って~12 mmHgの血圧上昇が確認された。また、SFOから視床下部に投射しているAng II受容体(AT1a)陽性ニューロンを同定した。さらに、光遺伝学的手法を用いてこのニューロンを活性化させたところ、~10 mmHgの血圧上昇が確認された。現在、Na⁺シグナルおよびAng IIシグナルの相互作用機構の解析を進めている。

このようにAng IIによるSFOを介した血圧制御機構の詳細を解析し、食塩感受性高血圧との関りを明らかにすることで、高血圧症の発症原因のより深い理解と治療法の改善に寄与することができると考える。

1. 研究目的

ヒトを含む陸生動物の体液中のナトリウムイオン(Na⁺)濃度は常に135~145 mMに保たれており、この「Naの恒常性」は生命活動を維持するために必須である。そのため、脳は常に体液のNa⁺濃度や浸透圧を監視するとともに、アンジオテンシン II (Ang 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・塩分摂取行動の制御や血圧制御、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、体液中のNa⁺濃度が上昇すると、水分摂取欲求が亢進すると共に塩分欲求は抑制される。

また、交感神経の活性化を介して血圧を上昇させ、腎臓から尿中へのNaの排泄を高める。我々の研究室では、このNa⁺濃度の上昇を検知する脳内Naレベルセンサー分子であるNa_xチャネルやSLC9a4を同定し、その生理的役割について長年研究してきた⁽¹⁻⁵⁾。これまでに、脳内のNa_xが体液Na⁺濃度の上昇に応答して口渴感が誘導される仕組み⁽⁶⁻⁹⁾や脱水状態において塩分摂取欲求を抑制する仕組み^(2-5, 10)、Na_xに対する自己免疫が無飲症性高Na血症を引き起こすことなどを明らかにしてきた^(11, 12)。

脳において、血液脳関門が欠損している感覚性脳室周囲器官 (sCVOs) は、体液情報を感知している脳領域として知られている。最近、申請者の所属する研究室では、過剰な塩分摂取によって血圧上昇が起きる食塩感受性高血圧のメカニズムとして、sCVOs の一つである終板脈管器官 (OVLT) において Na_x を発現しているグリア細胞が体液 Na^+ 濃度の増加を感知し、交感神経制御中枢の活性化を通して、血圧を上昇させる仕組みを世界で初めて明らかにした (Fig. 1) ⁽¹³⁾。高血圧の主要な原因として食塩の過剰摂取があることは良く知られている。その要因は、腎臓による尿中への Na^+ の排泄が追いつかず体内に貯留し、体液中の Na^+ 濃度が上昇することにある。野生型マウスに食塩を過剰に与える実験を行い、体液中の Na^+ 濃度が $\sim 10 \text{ mM}$ 上昇することに伴って血圧が $\sim 10 \text{ mmHg}$ 上昇することを確認した。驚いたことに、 Na_x の遺伝子が欠損したマウス ($\text{Na}_x\text{-KO}$ マウス) では、体液の Na^+ 濃度が野生型マウスと同程度上昇しているにもかかわらず、血圧の上昇が全く起こらなかった。さらに、高濃度の NaCl を含む水溶液 (高張 Na^+ 溶液) をマウスの脳室内に注入し、脳脊髄液の Na^+ 濃度を上昇させる実験を行ったところ、野生型マウスでは交感神経の活性化と血圧上昇が起こったのに対し、 $\text{Na}_x\text{-KO}$ マウスでは交感神経の活性化と血圧上昇のどちらも起こらなかった。 Na_x が発現している脳内器官のうち OVLT を破壊したマウスでは、この高張 Na^+ 溶液による血圧上昇が起こらなかったため、 Na^+ 濃度を感知している領域は OVLT であると考えられた。 Na_x はニューロンではなくグリア細胞に発現しているため、グリア細胞からニューロン

への情報伝達の仕組みが必要となる。解析の結果、 Na_x 発現グリア細胞の活性化の結果、嫌氣的解糖の産物である乳酸が H^+ とともにモノカルボン酸トランスポーターによって細胞外に放出され、その後、細胞外の酸性化に応答する酸感受性イオンチャンネル ASIC1a を有する神経細胞が活性化し、OVLT から血圧制御中枢にシグナルが伝達されることが明らかになった (Fig. 1 参照) ⁽¹³⁾

この研究成果は、体液 Na^+ 濃度上昇と血圧上昇をつなぐ脳内機構を詳細に明らかにしたものであり、原因不明である本態性高血圧症の発症機構の理解にも役立つものと期待される。一方で、体液 Na^+ 濃度上昇時には血中の Ang II 量が増加することが知られており、 Ang II は末梢において血管収縮作用を示すことから、 Ang II 受容体 (AT1a) の拮抗薬は高血圧症の第一選択薬とされている。近年、この Ang II シグナルも Na^+ シグナルと同様に脳に直接作用することで血圧制御を行っていることが示唆されている。しかしながら、その詳細な神経回路機構は不明である。また、 Ang II シグナルと Na^+ シグナルの 2 つの血圧制御シグナルが脳内においてどのように情報統合されているのかも分かっていない。

本研究では、脳において Na^+ シグナルによる血圧上昇機構に対する Ang II シグナルの作用機構の解明を目的にしている。そのため、まず、脳内における Ang II による血圧上昇の仕組みについて解析した。さらに、既知の Na^+ シグナルと Ang II シグナルがどこでどのように統合されているのか検討を進めた。

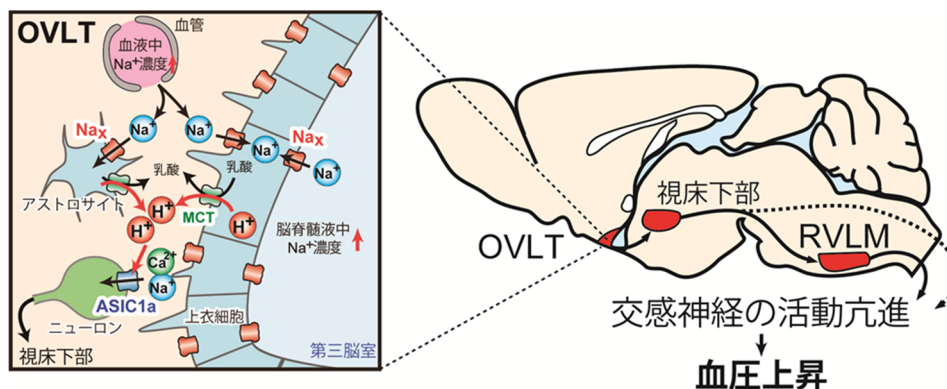


Fig. 1 食塩の過剰摂取による血圧上昇を担う神経機構

体液中の Na^+ 濃度の情報を OVLT のグリア細胞 (上皮細胞およびアストロサイト) に発現している Na_x が感知し、モノカルボン酸トランスポーター (MCT) を介して乳酸およびプロトン (H^+) が放出される。これにより、酸感受性イオンチャンネル (ASIC1a) を発現している視床下部投射ニューロンが活性化される。OVLT-視床下部-RVLM の神経回路が活性化されることで交感神経活動が増強され、血圧が上昇する。Nomura et al., *Neuron*, 2019 より改変引用⁽¹³⁾。

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-LacZ)⁽¹⁴⁾, *Agtr1a-ires-Cre* (AT1a-Cre, Jackson Labs)を使用した。AT1a 陽性ニューロン特異的に分子を発現させる実験では、AT1a-Cre マウスにDIOタイプのウイルスを導入した(2.3 ウイルスベクターの項を参照)。

2.2 免疫組織染色

マウスの脳を20%ホルマリンで灌流固定し、2日間かけて後固定を施した。次に、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 µm厚の切片を作成した。ロバ血清を用いてブロッキングしたのち、4°Cで2日間、1次抗体で染色した。1次抗体として、ヤギ抗 Fos 抗体(1:1000, sc-52G, Santa Cruz Biotechnology), ウサギ抗 β-gal 抗体(1:1000, 55976, Cappel), ウサギ抗 RFP 抗体(1:1000, 600-401-379, Rockland), ラット抗 GFP 抗体(1:1000, 04404-84, ncalaitesque)を使用した。2次抗体は、ロバ由来の蛍光タンパク質結合抗体を用いた。

2.3 ウイルスベクター

アデノ随伴性ウイルス(AAV)と高頻度逆行性レンチウイルス(HiRet; 改変した狂犬病ウイルス糖タンパク質を持たせたレンチウイルス)を使用した⁽¹⁵⁾。AAV-DIO-ChR2-EYFP, AAV-DIO-ChrimsonR-TdTomato, HiRet-DIO-EGFP, HiRet-GCaMP6fを使用した(DIO, double-loxP-flanked inverted orientation)。ウイルスベクターの調製は、生理学研究所の小林憲太准教授に協力して頂いた。

2.4 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。脳室内投与実験では、30G ステンレスカニューラ(3300P, Plastics One)を前後軸, -0.2 mm; 横軸, +1.0 mm; 腹側, +2.5 mmに設置した。ウイルスベクターはマイクロシリンジポンプ(Ultra Micro Pump III, World Precision Instruments)を用いてガラスキャピラリーを介してSFO(前後軸, -0.7 mm; 横軸, 0.0 mm; 腹側, +2.8 mm)および視床下部(前後軸, -0.7 mm; 横軸, +0.2 mm; 腹側, +4.9 mm)に投与した。術後のマウスは1週間以上の回復期間において実験に使用した。

2.5 血圧測定

麻酔中のマウスの左頸動脈に圧力センサープローブ(Millar Instruments, SPR-671)を挿入した。体温を37.0~37.5°Cに維持させながら、術後1時間ほど安静にさせた後、血圧測定を開始した。測定後、1分間ごとの平均血圧(MBP)を解析した。MBPを測定しながら、脳室内投与や脳内光刺激の実験を行った。

3. 研究結果

3.1 Ang II による SFO の血圧制御機構

まず、野生型マウスの脳室内に Ang II (50 ng/µL)を400 nL/minの速度で4 µL投与し、2時間後にホルマリンによる灌流固定を施し、脳サンプルを回収した。脳切片を作成し、神経活動マーカーである Fos を染色することで、Ang II に対して応答している神経核を確認した。その結果、sCVOs である脳弓下器官(SFO)およびOVLTにおいて Fos の発現が上昇していた(Fig.2a)。さらに、麻酔下のマウスにおいて、頸動脈から圧力センサープローブを挿入して血圧測定を行いながら、脳室内に同様の手法で Ang II を投与したところ、~12 mmHg の血圧上昇が確認された(Fig.2b)。マウスの血圧は投与開始3分後から徐々に上昇し、10分程度でピークとなりその後、次第に低下した。このことから、Ang II には脳に直接作用して血圧をすみやかに上昇させる機能があることが示唆された。

さらに、神経終末から逆行性に感染してマーカー遺伝子を導入できる高頻度逆行性ウイルスベクター(HiRet-EGFP)⁽¹⁵⁾を血圧制御中枢である視床下部に注入し、視床下部に投射しているニューロンの分布を解析した(Fig.3a)。その結果、SFOから視床下部に投射があり、さらに、AT1a-lacZ マウスを用いて AT1a 陽性ニューロンを可視化したところ、そのニューロンの一部に AT1a が発現していることが明らかになった(Fig.3b)。

SFO から視床下部に投射している AT1a 陽性ニューロンの血圧制御における機能を解析するため、AT1a 陽性ニューロン特異的に Cre リコンビナーゼが発現している遺伝子改変マウス(AT1a-Cre マウス)の SFO に、Cre 依存的に青色光駆動性陽イオンチャンネルであるチャンネルロドプシン2(ChR2)-EYFP を導入するためアデノ随伴性ウイルス(AAV-DIO-ChR2-EYFP)を感染させた(Fig.4a)。麻酔下のマウスにおいて頸動脈から血圧測定を行いながら視床下部に青色光を照射したところ、5分程度で~10 mmHg の血圧上昇が確認された(Fig.4b)。照射を止めると血圧

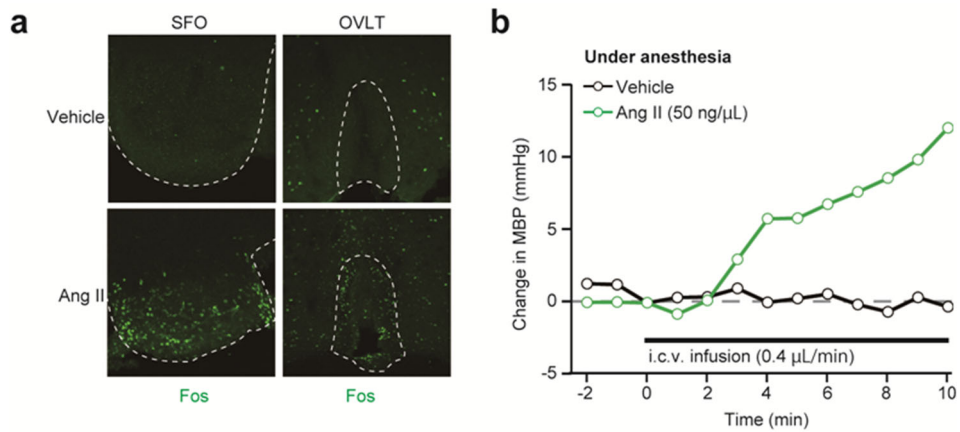


Fig. 2 Ang II の脳室内投与による神経核の活性化と血圧上昇

a. 脳室内 Ang II 投与によって、SFO および OVLT に Fos の発現が誘導された。

b. 脳室内 Ang II 投与によって、有意な血圧上昇が確認された。Vehicle を投与しても、血圧にほとんど変化は見られない。

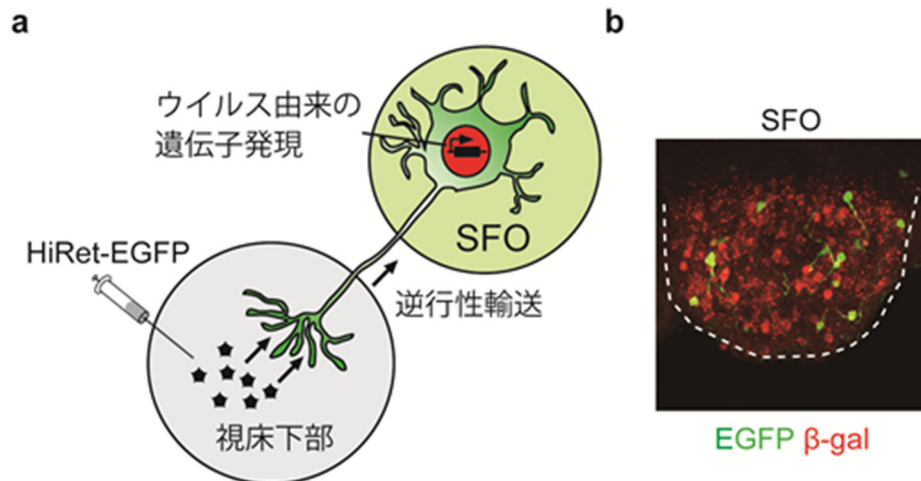


Fig. 3 高頻度逆行性レンチウイルスベクターを用いた神経路の解析

a. 狂犬病ウイルスの改変タンパク質を発現させたレンチウイルスベクターである。このウイルスベクターは神経終末から感染し、逆行性輸送され細胞体で目的遺伝子を発現させることができる。

b. SFO から視床下部に投射しているニューロン (緑色, EGFP) は AT1a 陽性細胞 (赤色, β-gal) と一部重なっている。

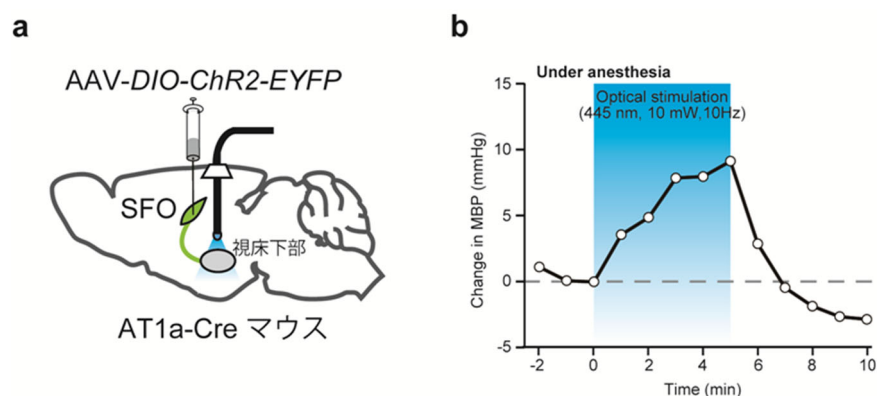


Fig. 4 SFO から視床下部に投射する AT1a 陽性ニューロンの人為的な活性化による血圧上昇

a. SFO から視床下部に投射する AT1a 陽性ニューロンを活性化するため、AT1a-Cre マウスの SFO に AAV-DIO-ChR2-EYFP を注入し、視床下部に対して青色光の照射を行った。

b. 光刺激 (445nm, 10 mW, 10 Hz) に応答して血圧上昇が確認された。

はただちに元に戻った。一方で、これまでの研究により、SFO には水分摂取を誘導する水ニューロンおよび塩分摂取を誘導する塩ニューロンが存在することを明らかにしている⁽¹⁰⁾。しかしながら、SFO から視床下部に投射している AT1a 陽性ニューロンを活性化しても、水分摂取および塩分摂取の誘導は確認されなかった。

3. 2 Na⁺シグナルおよび Ang II シグナルの相互作用機構の解析

これまでの研究結果から、食塩の過剰摂取による体液 Na⁺濃度の増加は OVLT で感知され、視床下部を経由して、交感神経制御中枢である延髄吻側腹外側野 (RVLM) に伝達されることが分かっている (Fig. 1 参照)⁽¹³⁾。SFO から伝達される Ang II シグナルも視床下部を経て RVLM へ伝達され、血圧制御を担っていると予想された。そこで、Na⁺シグナルと Ang II シグナルが血圧制御を担う同一のニューロンに伝達されているか検討するために、*in vivo* カルシウムイメージングの実施を検討した (Fig.5)。RVLM に HiRet-GCaMP6f を注入し、視床下部から RVLM に投射するニューロン群に蛍光 Ca²⁺インジケーターである GCaMP6f を発現させる。さらに、視床下部の上方に GRIN レンズを設置し、小型蛍光顕微鏡を用いて、GCaMP6f 発現ニューロンの Ca²⁺シグナルの変化を観察することで、神

経活動の測定を行う (Fig. 5)。さらに、上述の方法に組み合わせて、AT1a-Cre マウスの SFO に AAV-DIO-ChrimsonR -TdTomato を注入して、Cre 依存的に AT1a 陽性細胞に赤色光駆動性陽イオンチャネルである ChrimsonR を導入する。食塩の過剰摂取や高 Na⁺溶液の脳室内投与を行ったときに活動する視床下部のニューロン (Na⁺応答性ニューロン) を特定し、その神経活動を観察しつつ、視床下部に赤色光を照射して Ang II シグナルを伝達する SFO から視床下部に投射するニューロン群を活性化する (Fig. 5)。これによって、視床下部において Na⁺感受性ニューロンの神経活動がより活性化されるのか、あるいは、Na⁺シグナルと Ang II シグナルが異なるニューロンに伝達されるのかについて検討する予定である (現在、実験条件の最適化を進めている)。

AT1a-Cre マウスの RVLM に HiRet-GCaMP6f を投与し、血圧制御を担うニューロンの神経活動を可視化する。一方で、SFO に AAV-DIO-ChrimsonR を投与することで、Ang II シグナルを伝達するニューロンの神経活動を人為的に制御できるようにする。マウスに Na⁺シグナルを与えた際に応答する Na⁺応答性ニューロンを特定したうえで、Ang II シグナルを伝達するニューロンを活性化する。

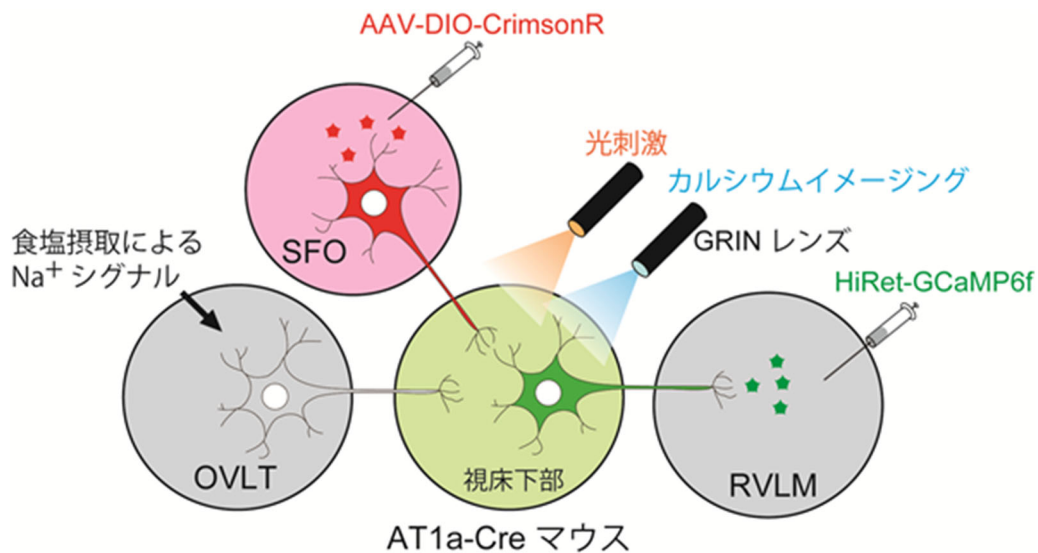


Fig. 5 Na⁺シグナルおよび Ang II シグナルの相互作用機構の解析

AT1a-Cre マウスの RVLM に HiRet-GCaMP6f を投与し、血圧制御を担うニューロンの神経活動を可視化する。一方で、SFO に AAV-DIO-ChrimsonR を投与することで、Ang II シグナルを伝達するニューロンの神経活動を人為的に制御できるようにする。マウスに Na⁺シグナルを与えた際に応答する Na⁺応答性ニューロンを特定したうえで、Ang II シグナルを伝達するニューロンを活性化する。

4. 考 察

我々はいままで、SFO において「Na 恒常性」の制御に関わる複数の神経機構を明らかにした。近年では、水分欲求を誘導するニューロン群(水ニューロン)および塩分欲求を誘導するニューロン群(塩ニューロン)を同定するとともに、それぞれの神経活動を制御する神経機構を世界に先駆けて明らかにした(Fig. 6)⁽¹⁰⁾。脱水状態ではグリア細胞に発現している Na_x が体液中の体液 Na^+ 濃度上昇を感知し、その結果、グリア細胞から乳酸が放出されるが、この乳酸によって活性化される GABA ニューロンを介して、塩ニューロンの活動が抑制されることで過剰な塩分摂取を抑えている。一方、水ニューロンは、コレシストキニン(CCK)に反応する GABA ニューロンによって抑制制御されており、塩欠乏状態において過剰な水分摂取を抑えている。

最近、SFO 内において CCK を分泌するニューロン(CCK ニューロン)が存在することを見出し、この CCK ニューロンは少なくとも 2 種類の細胞集団で構成されていることを明らかにした⁽¹⁶⁾。一つのグループは、体液の Na^+ 濃度が低下している状態(塩欠乏時)において持続的に活性化しており、CCK を通して GABA ニューロンを活性化して水ニューロンの活動を抑制している。もう一方のグループには、咽頭や消化管から飲水に伴うシグナルが伝達されており、分泌された CCK によって、異なる GABA ニューロンが活性化され、水ニューロンの活動が一過性に抑制される(Fig. 7)。過剰な水分摂取を抑制するための 2 つの神経機構が明らかとなったが、CCK ニューロンが体液 Na^+ 濃度の低下によって活性化する仕組みは未だに不明であり、さらなる研究が必要である。このように、SFO には「Na 恒常性」の制御を担う細胞が多数存在しており、その全容は未だ不明である。

高血圧症は日本において最も患者数が多いとされる生活習慣病であり、脳卒中や心筋梗塞など重篤な循環器疾患の原因となる。腎臓を始めとして末梢器官に関わる血圧制御の仕組みは古くから研究されているが、中枢神経系における血圧制御の役割はよく分かっていない。そのため、支援を頂いた本研究において詳細な解析を実施した。その結果、脳室内に Ang II を投与することで sCVOs である SFO および OVLT の神経活動が活性化され、それに伴って血圧上昇することが明らかになった。また、血圧制御

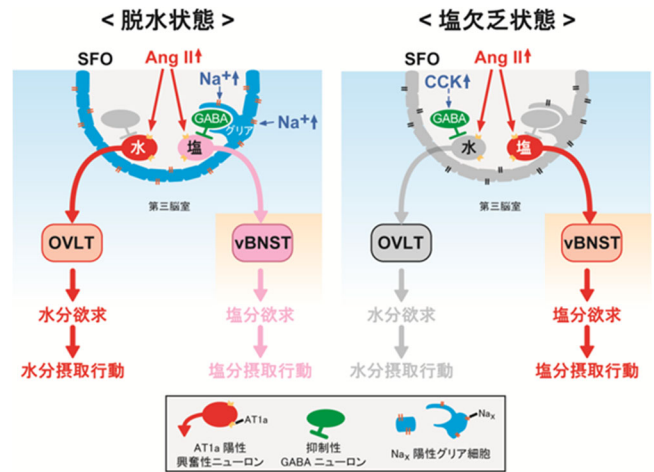


Fig. 6 水分欲求および塩分欲求を制御する神経機構
SFO 内に水分欲求を誘導する水ニューロンおよび塩分欲求を誘導する塩ニューロンを同定し、それぞれ OVLT および分界条床核(vBNST)に投射する Ang II によって活性化される AT1a 陽性ニューロンの集団であることを明らかにした。それぞれのニューロンは異なる GABA ニューロンによって抑制されており、脱水時には Na_x を介した Na^+ シグナルが、塩欠乏時には CCK シグナルが選択的に抑制制御を行っている。Matsuda et al., Nature Neuroscience, 2017 より改変引用⁽¹⁰⁾。

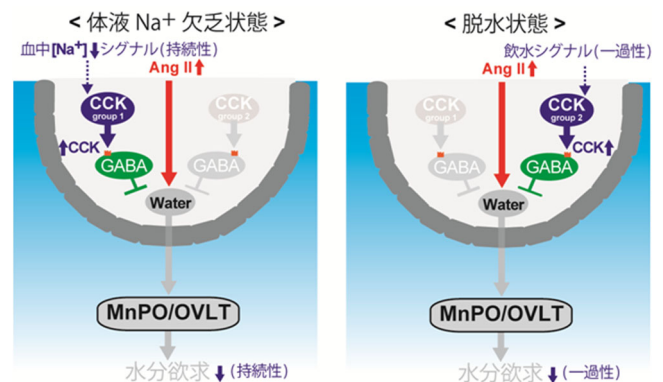


Fig. 7 CCK ニューロンにより水ニューロンの活動が制御される仕組み
SFO において体液中の Na^+ 濃度の低下に反応して持続的に活性化される CCK ニューロンの集団および飲水刺激によって一過性に活性化される CCK ニューロンの集団をそれぞれ同定した。それぞれが異なる GABA ニューロンを活性化することで水ニューロンの活動を抑制しており、いずれも過剰な水分摂取を抑える機構を担うことが明らかとなった。Matsuda et al., Nature Communications, 2020 より改変引用⁽¹⁶⁾。

を担う視床下部に投射している SFO の Ang II シグナルを伝達するニューロンを同定することに成功した。さらに、オプトジェネティクスの技術を用いて、このニューロンを人為的に活性化することで、血圧上昇が起こることを確認できた。この活性化では水分・塩分摂取行動は誘導されなかったことから、このニューロンは水ニューロンおよび塩ニューロンとは異なる細胞群であると推察される。さらにこの Ang II シグナルは Na⁺シグナルと同様に視床下部に伝達されていたことから、Na⁺シグナルと同一の神経路によって血圧制御を行っていることが考えられる。しかしながら、それぞれのシグナルが同一のニューロンに統合されているのか、異なるニューロンに別々に伝達されているのか不明であり、今後、解析を進める必要がある。

近年、SFO は様々な機能を持つ細胞集団が混在している組織であり、体液情報を感知するだけでなく他の器官に指令を与えて、個体の行動や生理機能を制御するための重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。SFO が血圧調節に関わっていることは以前から示唆されていたものの、その詳細なメカニズムは解明されていない。本研究により、SFO が実際に Ang II シグナルを受容し、血圧を制御することが明らかとなった。この成果は、神経生物学だけでなく生理学や内分泌学などの研究分野の発展にも貢献すると思われる。また、将来的には本態性高血圧症などの治療法の開発にも寄与すると考える。

5. 今後の課題

本研究により、脳における Ang II シグナルによる血圧制御機構の一端を解明することが出来た。一方で、これまでの研究で明らかにした脳内における Na⁺シグナルによる血圧制御に Ang II シグナルがどのように関与しているのか、今後、解析を進めていくことが必要である。これによって、食塩の過剰摂取に伴う高血圧症に対して、Ang II シグナルがどのような役割を果たしているのか明らかにすることを目指す。また、Ang II シグナルに応答する OVLT の役割については未だ不明であり、下流の神経回路を含めて血圧制御に関与しているか検討する必要がある。

6. 文 献

1. Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, Noda M. Nax channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neuroscience* 2002; 5: 511-512.
2. Hiyama TY, Watanabe E, Okado H, Noda M. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Nax sodium channels for the control of salt-intake behavior. *J Neurosci.* 2004; 24: 9276-9281.
3. Shimizu H, Watanabe E, Hiyama TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, Yanagawa Y, Obata K, Noda M. Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na⁺] sensing. *Neuron.* 2007; 54: 59-72.
4. Hiyama TY, Yoshida M, Matsumoto M, Suzuki R, Matsuda T, Watanabe E, Noda M. Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Nax, the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. *Cell Metab.* 2013; 17: 507-519.
5. Noda M, Hiyama TY. Sodium sensing in the brain. *Pflugers Arch.* 2015; 467: 465-474.
6. Sakuta H, Nishihara E, Hiyama TY, Lin CH, Noda M. Nax signaling evoked by an increase in [Na⁺] in CSF induces water intake via EET-mediated TRPV4 activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016; 311: 299-306.
7. Sakuta H, Lin CH, Yamada M, Kita Y, Tokuoka SM, Shimizu T, Noda M. Nax-positive glial cells in the organum vasculosum laminae terminalis produce epoxyeicosatrienoic acids to induce water intake in response to increases in [Na⁺] in body fluids. *Neurosci Res.* 2020; 154: 45-51.
8. Sakuta H, Lin CH, Hiyama TY, Matsuda T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Kobayashi K, Noda M. SLC9A4 in the organum vasculosum of the lamina terminalis is a [Na⁺] sensor for the control of water intake. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology.* 2020; 472: 609-624.
9. Noda M, Sakuta H. Central regulation of body-fluid homeostasis. *Trends Neurosci.* 2013; 36: 661-73.
10. 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. *Nature Neuroscience* 2017; 20: 230-241.

11. 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.
12. 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.
13. 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.* 2019; 101: 60–75.
14. 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.
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. Matsuda T, Hiyama TY, Kobayashi K, Kobayashi K, Noda M. Distinct CCK-positive SFO neurons are involved in persistent or transient suppression of water intake. *Nature Communications.* 2020; 11: 5692.
17. Oka Y, Ye M, Zuker CS. Thirst driving and suppressing signals encoded by distinct neural populations in the brain. *Nature.* 2015; 520: 349-352.
18. Zimmerman CA, Huey EL, Ahn JS, Beutler LR, Tan CL, Kosar S, Bai L, Chen Y, Corpuz TV, Madisen L, Zeng H, Knight ZA. A gut-to-brain signal of fluid osmolarity controls thirst satiation. *Nature.* 2019; 568: 98-102.
19. Pool AH, Wang T, Stafford DA, Chance RK, Lee S, Ngai J, Oka Y. The cellular basis of distinct thirst modalities. *Nature.* 2020; 588: 112-117.

Central Mechanisms for the Integration of Na⁺ and Ang II Signals in Blood Pressure Elevation by High-Salt Ingestion

Takashi Matsuda

Tokyo Institute of Technology, Homeostatic Mechanism Research Unit, Institute of Innovative Research

Summary

In terrestrial animals including humans, the concentrations of sodium ions (Na⁺) in body fluids are maintained at a constant level, and this “sodium homeostasis” is essential for maintaining the life. The brain senses changes in Na⁺ levels in body fluids and receives signals encoding the internal environment via circulating hormones such as angiotensin II (Ang II), and the integral control of salt- and water-intakes and blood pressure is accomplished. In the brain, sensory circumventricular organs (sCVOs) such as the organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) and subfornical organs (SFO) are known as brain regions sensing peripheral signals, because they lack a blood-brain barrier. Recently, our laboratory revealed mechanisms responsible for salt-dependent hypertension: Glial cells expressing Na_v, a sodium level sensor, in the OVLT detect an increase in Na⁺ levels in body fluids caused by excessive salt intake, which results in elevation of blood pressure through activation of sympathetic nerve activities. On the other hand, elevation of Ang II levels in body fluids induced by the increase of Na⁺ levels also elevates blood pressure like Na⁺ signals; however the Ang II-mediated central mechanism for the blood-pressure elevation has not been adequately understood. Also, integration mechanisms of these two signals in the brain have not been well clarified.

In the present study, we first analyzed the mechanism of Ang II-induced blood-pressure elevation in the brain. Intracerebroventricular infusion of Ang II activated neuronal activities in the SFO and OVLT, and an increase of ~12 mmHg in blood pressure was observed. Moreover, we identified Ang II receptor (AT1a)-positive neurons in the SFO, projecting to the hypothalamus. When these neurons were activated by using an optogenetic technique, an increase of ~10 mmHg in blood pressure was observed. At present, we are analyzing the inter-relationship between Na⁺ and Ang II signaling.

The central mechanism of Ang II-mediated blood pressure elevation may lead to the understanding of the relationship between Ang II signals and salt-dependent hypertension, which reveal the pathogenesis of neurogenic hypertension and finally contributes to improvement of the treatment.