

## 塩分摂取および水分摂取を抑制的に制御する神経機構の解明

松田 降志

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** ヒトを含む陸生動物において、体液中のナトリウムイオン( $\text{Na}^+$ )は様々な生理機能において重要な役割を担っている。体液中の  $\text{Na}^+$ 濃度を一定に保つため、脳は、体液  $\text{Na}^+$ 濃度や浸透圧、血中ホルモン濃度などの変化を感知し、それらの情報を神経活動に変換することによって様々な生理機能の制御を行う。体液  $\text{Na}^+$ 濃度が生理的範囲内から逸脱し始めると、脳は塩分欲求あるいは水分欲求、血圧、尿量などを制御することによって、体液  $\text{Na}^+$ 濃度を正常範囲に戻そうとする。体液  $\text{Na}^+$ 濃度が正常な範囲を超えた状態が長く続くと、低ナトリウム血症や高ナトリウム血症など様々な全身性の障害が発生する可能性がある。

我々はこれまでに、脳の中でも例外的に血液脳関門が欠損している感覚性脳室周囲器官 (sCVOs) である脳弓下器官 (SFO) において、アンジオテンシン II (AngII) の濃度上昇に応じて塩分欲求を誘導する神経細胞の集団 (塩ニューロン) および水分欲求を誘導する神経細胞の集団 (水ニューロン) を同定するとともに、それぞれの神経活動が体液状態によって抑制的に制御されていることを明らかにした。さらに、その後の研究成果により、これと異なる塩分・水分欲求の抑制メカニズムが存在することを発見した。

今回の研究では、後脳に存在する CCK ニューロンが塩分摂取制御において、どのように機能しているか詳細に解析した。in vivo カルシウムイメージングを用いて、塩分摂取時における CCK ニューロンの活動を観察したところ、塩分摂取後、直ちに神経活動が活性化されることを確認した。CCK ニューロンには、塩ニューロンの下流である腹側分界条床核 (vBNST) に連絡している集団が存在しており、これらのニューロンを活性化することによって塩分欲求が抑制された。また、カルシウムイメージングとオプトジェネティクスを組み合わせた解析から CCK ニューロンは vBNST の GABA ニューロンを活性化することによって塩分摂取の抑制を行っていることが示唆された。

本研究で明らかにした CCK ニューロンの集団は、体液状態が変化する前に塩分摂取行動を一過性に抑えることによって、過剰に塩分を摂取しないように機能していることが考えられる。生体は、体液状態の変化の予測に基づいた制御機構 (フィードフォワード制御) と実際の体液状態に基づいた制御機構 (フィードバック制御) を組み合わせて用いることによって、塩分摂取行動を高度に制御していることが明らかとなった。

### 1. 研究目的

ヒトを含む陸生動物において、血液や脳脊髄液、リンパ液などの体液は生命維持に重要な役割を果たしており、特に体液中の主要な電解質であるナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) は、浸透圧の維持、血液量の調節、神経細胞や筋細胞の活動維持など、様々な生理機能において重要な役割を担っている。体液中の  $\text{Na}^+$ 濃度は常に 135~145 mM に保た

れている ( $\text{Na}^+$ 恒常性)。塩分摂取の不足などによって体液  $\text{Na}^+$ 濃度が低下した状態が続くと、低ナトリウム血症などの重篤な症状が現れる<sup>(1)</sup>。一方で、飲水量の不足は脱水症状を招き、体液  $\text{Na}^+$ 濃度が上昇した状態 (高ナトリウム血症) において様々な障害が発生する<sup>(2)</sup>。いずれの状態も生命活動の維持において致命的である。

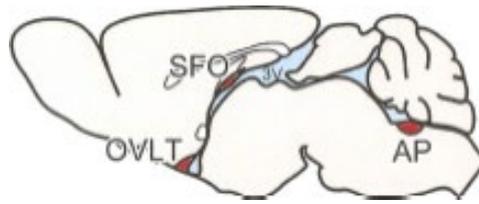
そのため、体液量と体液中の $\text{Na}^+$ 濃度を一定に保つこと(体液恒常性)は、生命維持において必要不可欠である。 $\text{Na}^+$ 恒常性を維持するため、脳は体液中の $\text{Na}^+$ 濃度や浸透圧に加えて、アンジオテンシン II (Angiotensin II, Ang II)などの血中ホルモン濃度などの変化を感知し、それらの情報を神経活動に変換することによって、塩分摂取行動および水分摂取行動、血圧の調節など様々な生理機能の制御を行う<sup>(3)</sup>。脳の中でも例外的に血液-脳関門が欠損している感覚性脳室周囲器官(Sensory circumventricular organs, 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(Fig. 1)<sup>(4)</sup>。sCVOsには神経細胞が存在しており、得られた体液情報はこの神経細胞から脳全体の関連した神経核に伝達される。また、sCVOsには神経細胞以外にも数種のグリア細胞など多様な細胞が存在しており、これらも体液情報のモニターに関与している。

sCVOsである脳弓下器官(Subfornical organ, SFO)や終板脈管器官(Organum vasculosum lamina terminalis, OVLT)では、Ang IIの受容体である $\text{AT1a}$ を発現する神経細胞や体液 $\text{Na}^+$ 濃度の上昇を検知する脳内 $\text{Na}$ レベルセンサー分子である $\text{Na}_x$ チャネルを発現するグリア細胞などが局在している<sup>(5)</sup>。私はこれまでに、SFOの $\text{AT1a}$ 陽性神経細胞の中から塩分欲求を誘導する集団(塩ニューロン)および水分欲求を誘導する集団(水ニューロン)を同定するとともに、それぞれの神経活動が $\text{Na}_x$ 陽性グリア細胞やコレシストキニン(Cholecystokinin, CCK)を分泌する神経細胞(CCKニューロン)によって抑制性神経細胞(GABA作動性ニューロン)を介して制御されていることを世界に先駆けて明らかにした(Fig. 2)<sup>(6, 7)</sup>。詳細は以下の通りである。

塩欠乏状態(体液 $\text{Na}^+$ 濃度の低下)および脱水状態(体液 $\text{Na}^+$ 濃度の上昇)のどちらにおいても、血中のAng II濃度は上昇する。SFOにおいて、塩ニューロンと水ニューロンがこれを感知し、塩ニューロンは腹側分界条床核(the ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis, vBNST)に、水ニューロンはOVLTおよび正中視索前核(Median preoptic nucleus, MnPO)にAng IIの情報を伝達して、それぞれ塩分と水分の摂取を促す<sup>(6)</sup>。脱水状態ではグリア細胞に発現している $\text{Na}_x$ が体液 $\text{Na}^+$ 濃度上昇を感知し、結果としてグリア細胞から乳酸が放出される。この

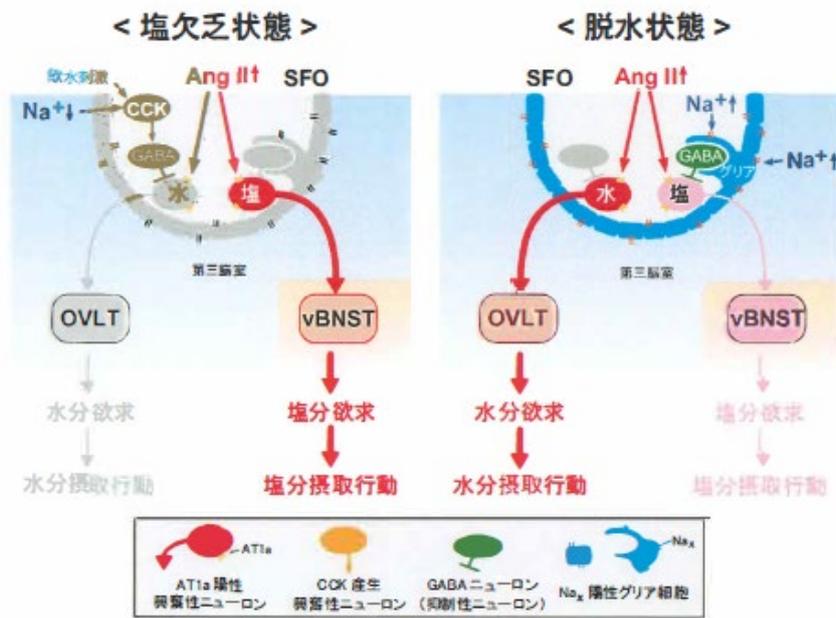
乳酸は、塩ニューロンに連絡しているGABA作動性ニューロンを選択的に活性化する。その結果、塩ニューロンの活動が選択的に抑制され、水ニューロンの活動が優位となって水分摂取行動が選択的に誘導される<sup>(6, 8-10)</sup>。一方、塩欠乏状態においては、SFOに存在する一部のCCKニューロン(グループ1)が活性化しており、GABA作動性ニューロンの活性化を介して水ニューロンの活動を選択的に抑制する<sup>(7)</sup>。その結果、塩ニューロンの活動が優位となり、塩分摂取行動が誘導される。また、これとは異なるCCKニューロン(グループ2)が飲水に応答して一過性に活性化し、GABA作動性ニューロンを介して水ニューロンの活動を一時的に抑制する<sup>(7)</sup>。このように体液 $\text{Na}^+$ 濃度を反映した抑制機構と体液 $\text{Na}^+$ 濃度の変化を予測した抑制機構を組み合わせることで、過剰な水分摂取が抑制されている<sup>(7)</sup>。

これまでの研究過程において、オプトジェネティクス的手法を用いてSFOのGABA作動性ニューロンを人為的に活性化したところ、塩欠乏状態における塩分摂取および脱水症状における水分摂取がそれぞれ有意に抑制されたが、完全には抑制できないことが分かった<sup>(6, 7)</sup>。この結果から、我々は、塩分および水分欲求の抑制制御に関わる神経機構が、他の神経核にも存在していると推測した。その後、後脳にも塩分摂取や水分摂取に反応して活性化するCCKニューロンが存在するという実験結果を得た。本研究では、主に塩分摂取に伴う一過性の塩分欲求抑制のメカニズムについて探求した。化学遺伝学的手法を用いて後脳のCCKニューロンを人為的に抑制したところ、塩欠乏状態における食塩水(0.3 M NaCl)の摂取量が有意に増加することを確認した。また、後脳のCCKニューロンの中に、SFOの塩ニューロンの下流であるvBNSTに連絡している集団が存在することを見出した(Fig. 3)。SFOのCCKニューロンが飲水刺激に反応してGABA作動性ニューロンを活性化している仕組み(Fig. 2)との類似性から、我々は、後脳のCCKニューロンも、同様に塩分摂取に反応してvBNSTのGABA作動性ニューロンを活性化しているのではないかと、という仮説を立て詳細な検討を行った。(なお、本研究内容は論文として投稿中であるため、本報告書では詳細なデータの提示は差し控えている。)



**Fig. 1** 脳における感覚性脳室周囲器官に属する主要な神経核

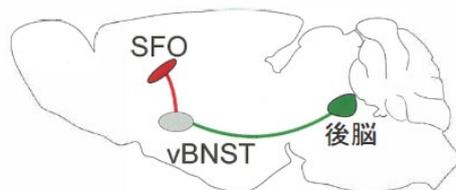
脳において、例外的に血液脳関門が欠損しており、かつ神経細胞を有している領域を感覚性脳室周囲器官 (Sensory Circumventricular Organs; sCVOs) と呼ぶ。前脳では、脳弓下器官 (Subfornical organ; SFO) と終板脈管器官 (Organum Vasculosum Lamina Terminalis; OVLT) が、後脳では最後野 (Area Postrema; AP) が sCVOs に属している。



**Fig. 2** 水分欲求および塩分欲求を制御する神経機構

SFO には塩分欲求を誘導する塩ニューロンおよび水分欲求を誘導する水ニューロンが存在する。塩ニューロンは vBNST に連絡しており、水ニューロンは OVLT/MnPO に連絡している。どちらも Ang II の受容体である AT1a 陽性のニューロン集団である。塩欠乏状態および脱水状態では、どちらにおいても血中の Ang II 濃度が上昇しており、塩ニューロンおよび水ニューロンが活性化されている。塩欠乏状態においては、SFO の CCK ニューロンが活性化することによって、GABA 作動性ニューロンを介して水ニューロンの活動が抑制され、結果として塩ニューロンの活動が優位となって、塩分摂取行動が誘導される。一方で、脱水状態においては、Na<sub>x</sub> を発現しているグリア細胞が活性化することによって、GABA 作動性ニューロンを介して塩ニューロンの活動が抑制され、結果として水ニューロンの活動が優位となって、水分摂取行動が誘導される。

Matsuda et al., Nature Neuroscience, 2017; Matsuda et al., Nature Communications, 2020 より改変引用<sup>(6, 7)</sup>



**Fig. 3** SFO および後脳から vBNST に連絡している神経回路

SFO において塩分欲求を誘導する塩ニューロン (赤) が vBNST に連絡している。後脳の一部の CCK ニューロンが vBNST に連絡しており、塩分欲求の抑制に寄与している。

## 2. 研究方法

### 2.1 マウス

実験には *Cck-ires-Cre* (*Cck-Cre*)<sup>(11)</sup>, *Slc32a1-ires-Cre* (*Vgat-Cre*)<sup>(12)</sup>を使用した。マウスは自由に水と餌 (Rodent Diet CA-1, CLEA Japan)を摂取でき、常に 23~25°Cで明期 (8:00~19:59)と暗期 (20:00~7:59)の環境下において飼育した。

### 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) を使用し、50  $\mu\text{m}$  厚の切片を作成した。ロバ血清を用いて室温でブロッキングしたのち、4°Cで 2 日間、1 次抗体を用いて染色した。その後、4°Cで 1 日間、2 次抗体を用いて染色した。1 次抗体として、ラット抗 GFP 抗体 (1:1000, 04404-84, nacalai tesque), ウサギ抗 RFP 抗体 (1:1000, 600-401-379, Rockland), ヤギ抗 Fos 抗体 (1:1000, sc-52G, Santa Cruz Biotechnology) を使用した。2 次抗体として、ロバ由来の蛍光タンパク質結合抗体を使用した。

### 2.3 ウイルスベクター

マウス脳に対する遺伝子導入のためアデノ随伴性ウイルス (AAV;セロタイプ DJ)を使用した ( $>1.0 \times 10^{10}$  Genomic Copies (GC)/ml)。導入する遺伝子として DIO-GCaMP6f (Addgene, #111393)<sup>(13)</sup>, DIO-ChR2-EYFP (Addgene, #20298), DIO-ChrimsonR-TdTomato (Addgene, #128589)<sup>(14)</sup>を準備した。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 3 種混合麻酔 (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) によって麻酔した後、脳定位固定装置にセットした。ウイルス投与は、マイクロシリンジポンプ (Ultra Micro Pump III, World Precision Instruments) と ガラスキャピラリーを用いて後脳あるいは vBNST に 100 nl/min の速度で 2 分間投与した。in vivo カルシウムイメージングの実験においては、GRIN レンズの挿入のためアスピレーターを用いて挿入経路の脳組織を除去した後、対象の神経核から上方 0.3 mm の位置までレンズ を挿入し、歯科用セメントで固定した。オプトジェネティクスを用いる実験においては、光ファイバーを挿入するためのガイドカニューラ (Plastic One) を挿入し、対象の神経核から上方 0.2 mm の位置において歯科

用セメントで固定した。術後のマウスは、メドミジン拮抗薬 (塩酸アチパメゾール 0.75 mg/kg) を投与したのち 37°C で保温し、覚醒してから 3 週間以上の回復期間を設けた。

### 2.5 in vivo カルシウムイメージング

小型蛍光顕微鏡 (Inscopix) と GRIN レンズが適切な焦点距離を常に保てるようにするため、ベースプレートを GRIN レンズの上方に歯科用セメントで固定した。マウスに小型蛍光顕微鏡を装着し、10 分間以上慣らしてから、イメージングを開始した。イメージングにおいて、フレームレートは 10 Hz で固定し、LED 光源の強度およびゲイン、焦点距離はマウス個体ごとに設定した。

### 2.6 行動実験

食塩水 (0.3 M NaCl) および水の摂取量の測定実験においては、マウスが水と食塩水を選択して摂取できる試験ケージに移動させ、最低 3 日間の馴化期間を経てから実験を行った。マウスを塩欠乏状態にするため、皮下注射によりフロセミド (1 mg/25 g body weight) を投与した後、24 時間の間、水とナトリウム欠乏餌 (CLEA Diet No. 010, CLEA Japan) を自由に摂取させた。その後、餌のない状態で水と食塩水 (0.3 M NaCl) の摂取量を 30 分間測定した。また、脱水状態における水の摂取量を測定するため、マウスを 48 時間絶水させたのち水を供給し、摂取量を測定した。

## 3. 研究結果

### 3.1 後脳の CCK ニューロンの塩分摂取に対する活動解析

後脳の CCK ニューロンが塩分摂取に応答していることを確認するため、CCK 陽性細胞において Cre が発現している CCK-Cre マウスの後脳に、Cre 依存的にカルシウムイメージングセンサー GCaMP6f を導入できる AAVDJ-DIO-GCaMP6f を感染させた。マウスを回復させたのちに、後脳の上に GRIN レンズを留置して、小型蛍光顕微鏡をレンズ上部に設置した。これにより、自由行動下において、後脳における個々の CCK ニューロンの神経活動を観察することに成功した。GCaMP6f の蛍光強度の増減は細胞内カルシウム濃度の増減に対応しており、一細胞レベルで経時的に神経活動の増減を測定することが可能である。塩欠乏状態のマウスに食塩水を摂取させたところ、後脳における一群の CCK ニューロンの活動レベルがほぼ同時に、かつ一過性に上昇する様子が観察された。このグループの活動は、主に食塩水摂取直後にピークに達した。

このグループは脱水状態における水分摂取には応答しなかった。また、食塩水が供給されていないダミーノズルを舐めた時には、CCKニューロンの活性化は観察されなかった。神経活性化マーカーである Fos の免疫染色においても同様に、塩欠乏状態における食塩水摂取時において CCKニューロンにおける Fos の発現量の増加が観察された。

また、オプトジェネティクスの手法を用いて、後脳の CCKニューロンの中から vBNST に連絡している集団を選択的に活性化したところ、塩欠乏状態における食塩水の摂取量が著しく抑制された。

一方で、脱水状態における水分摂取量には変化が現れなかった。また、後脳の CCKニューロンの中から vBNST 以外の神経核に連絡している集団を活性化しても、食塩水の摂取量に変化は見られなかった。これらの結果から、後脳の CCKニューロンが塩分摂取に反応して活性化し、vBNST にシグナルを伝達することによって、塩分摂取を抑制していることが示唆された。

### 3.2 後脳の CCKニューロンによる GABA 作動性

#### ニューロンの活動制御についての解析

上述のように、後脳から vBNST に連絡している CCKニューロンが塩分摂取を抑制する機能を有していることが示唆された。後脳において CCKニューロンは興奮性神経細胞のマーカーである Forkhead box protein P2 (FoxP2) 陽性であったことから、抑制性の GABA 作動性ニューロンを活性化することによって塩分摂取を抑制していることが考えられた。そこで GABA 作動性ニューロンに Cre が発現している Vgat-Cre マウスの vBNST において GABA 作動性ニューロンをオプトジェネティクスの手法を用いて人為的に活性化したところ、塩欠乏状態における食塩水の摂取量が優位に低下した。この食塩水の摂取量の低下は、後脳から vBNST に連絡している CCKニューロンを活性化した時と同程度であった。

上述の手法と同様に、vBNST の GABA 作動性ニューロンに GCaMP6f を発現させ、GRIN レンズを介して食塩水摂取時における GABA 作動性ニューロンの活動を観察した。その結果、後脳の CCKニューロン同様に、食塩水の摂取後すぐに vBNST の多くの GABA 作動性ニューロンが活性化されることが分かった。一方で、ダミーノズルを舐めた時には、こうした活動は観察されなかった。

最後に、vBNST の GABA 作動性ニューロンの活動は、後脳の CCKニューロンによって活動制御されているのかという点について検討した。具体的には、Vgat-Cre マウスと CCK-Cre マウスを掛け合わせた Vgat-Cre;CCK-Cre マウスを用いて後脳の CCKニューロンに赤色光活性化型チャンネルロドプシン ChrimsonR を現させ、vBNST の GABA 作動性ニューロンに GCaMP6f を発現させた。後脳の GABA 作動性ニューロンは vBNST に投射しておらず、vBNST には CCK 陽性細胞が存在していないことから、この手法によって後脳の CCKニューロンと vBNST の GABA 作動性ニューロンの関係を選択的に解析することが出来る。vBNST の GABA 作動性ニューロンの活動を観察しながら、後脳の CCKニューロンの活性化を赤色光による光刺激によって誘導したところ、vBNST の一部の GABA 作動性ニューロンにおいて光刺激と同調した活動変化が観察された。また、この GABA 作動性ニューロンの集団を対象に、塩欠乏状態における食塩水の摂取時の活動を観察したところ、食塩水の摂取と同期した活性化が観察された。一方でダミーノズルを舐めた時には、この GABA 作動性ニューロンの集団の活動上昇は見られなかった。また、光刺激に反応しなかった GABA 作動性ニューロンも食塩水の摂取に同期した活動は見られなかった。これらの研究結果は、後脳の CCKニューロンが vBNST の GABA 作動性ニューロンを活性化することによって、塩分摂取を抑制していることを示している。

### 4. 考察

脳が塩分を摂取したことを認識するためには、末梢器官から中枢へのシグナル伝達の仕組みが必要である。それは主に舌から鼓索神経あるいは舌咽神経を介した経路である<sup>(15)</sup>。また、脳は体液状態の変化を直接的に感知する機構を備えている<sup>(5)</sup>。この 2 つの経路から、動物の塩分摂取行動は適切に制御されていると考えられる。

舌の塩味受容体によって感知された Na シグナルは、神経伝達によって脳に伝達されると考えられる<sup>(16)</sup>。今回の研究において、後脳の CCKニューロンの一部のグループが、食塩水の摂取直後に一過性に活性化することを見出した (Fig. 4)。また、その下流となる vBNST の一部の GABA 作動性ニューロンも類似の活動様式を示した。vBNST には SFO の塩ニューロンが塩分欲求を誘導するシグナルを伝達しているが<sup>(6)</sup>、そのシグナルを vBNST の

GABA 作動性ニューロンが一過性に抑制していると考えられる (Fig. 4)。塩分が不足した体液状態が続いている限り、塩ニューロンによる塩分欲求を誘導するシグナルは発生し続ける。そのため、舌由来の塩分摂取刺激による塩分欲求の抑制は一過性となる。塩分摂取ののち、体液  $\text{Na}^+$ 濃度が正常範囲に戻り、塩分欲求を誘導するシグナルが消失することで、塩分摂取行動は初めて完全に停止すると推定される。

SFO において  $\text{Na}_x$  チャンネルを発現しているグリア細胞は、体液  $\text{Na}^+$ 濃度の上昇を感知して、塩分欲求を抑制する (Fig. 4)<sup>(5, 10)</sup>。一方で、本研究で同定した後脳の CCK ニューロンは塩分摂取に反応して、体液状態の変化が生ずる前に、塩分欲求を一過性に抑制する機能を有しており、前述のメカニズムとは性質が異なる。SFO の  $\text{Na}_x$  陽性グリア細胞は、脱水状態など体液中の  $\text{Na}^+$ が既に過剰な状態において、それ以上の摂取を防ぐ役割を担っていると考えられる。一方で、後脳の CCK ニューロンは塩分が必要な体液状態においても、体液状態が変化することを予測して、過剰な塩分摂取を防ぐ役割を担っていると考えられる。工学の分野では、こうした将来的変化を予測して制御する機構をフィードフォワード制御と呼んでいる。フィードフォワード制御は、変化が起きてからの制御 (フィードバック制御) に対して、正確性には欠けているが応答速度の面で優れている。 $\text{Na}^+$ の恒常性を維持するために、生物はフィードフ

ォワード制御とフィードバック制御を巧みに組み合わせて用いることによって、非常に高度な制御機構を備えていると考えられる。

体液中の  $\text{Na}^+$ 濃度を適切な範囲内で維持することは、血圧制御においても重要である。近年、我々は、OVLT において  $\text{Na}_x$  陽性グリア細胞が体液  $\text{Na}^+$ 濃度の上昇を感知し、プロトンの放出を介して酸感受性カルシウムチャンネル  $\text{ASIC1a}$  を発現する興奮性ニューロンを活性化することによって、交感神経系の活性化を通して血圧上昇を誘導することを明らかにした<sup>(17)</sup>。また、体液状態を反映した  $\text{Ang II}$  濃度の上昇によっても、脳を介した血圧上昇が誘導されることが知られている<sup>(18, 19)</sup>。このように、体液  $\text{Na}^+$ 濃度と血圧は密接な関係にあるため、塩分摂取を適切に制御することは血圧制御においても重要である。

我々はこれまでに、SFO において、塩分欲求を誘導するニューロン群 (塩ニューロン) 及び水分欲求を誘導するニューロン群 (水ニューロン) 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明らかにした (Fig. 2)<sup>(6)</sup>。本研究では、後脳の CCK ニューロンの中から vBNST に連絡している集団が、塩分摂取に応答して、体液状態が変化する前に、その摂取を一過性に抑える機能を有していることを明らかにした (Fig. 4)。一連の研究により、脳は塩分摂取行動を適切に制御するために、複数の異なるメカニズムを組み合わせて用いることを明らかにできた。

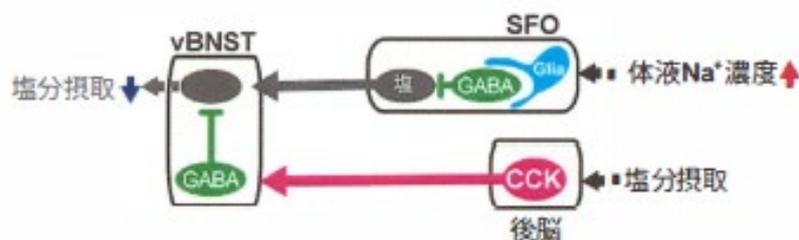


Fig. 4 塩分欲求を抑制するメカニズム

SFO においてグリア細胞 (青色) が  $\text{Na}_x$  チャンネルを介して体液  $\text{Na}^+$ 濃度の上昇を感知し、GABA 作動性ニューロン (緑色) の活性化することによって塩ニューロン (灰色) の活動を抑制する。一方で、後脳の CCK ニューロン (ピンク色) は塩分摂取のシグナルを受容し、vBNST において GABA 作動性ニューロン (緑色) を活性化することによって塩ニューロンのシグナルを受容しているニューロン (灰色) の活動を抑制していると考えられる。

## 5. 今後の課題

後脳の CCK ニューロンは、味覚由来のシグナルを受容していると考えられるが、詳細は不明である。後脳の CCK ニューロンに味蕾から直接入力が入るのか、いくつ

かの神経細胞を介して入力が入るのか、生理条件によって受容する入力強度に変化があるのかなど、さらなる研究が必要である。

塩欠乏状態において塩分を摂取することは、脳にとって「快」の刺激となることが知られている。そのため、塩分摂取行動には、扁桃体や側坐核など情動行動に関わる神経核の関与が考えられており、vBNSTもそういった神経核の一つである<sup>(20,21)</sup>。本研究において同定した後脳のCCKニューロンの活動が情動行動に影響を与える可能性も考えられるが詳細は不明である。

近年の研究では、塩分欲求や水分欲求を制御している神経細胞がsCVOsを含む様々な神経核において発見され、それらの機能解析が進められている<sup>(5, 22-24)</sup>。しかしながら、それぞれのメカニズムがどのような関係性を有するのか、特定の条件下においては協調して機能しているのか、といったことは不明であり、今後、詳細な研究が必要である。

※本研究内容は論文として投稿中のため、本報告書では詳細なデータの提示は差し控えている。

## 6. 文献

1. Adrogué, H. J. & Madias, N. E. (2000). Hyponatremia. *N. Engl. J. Med.* 342, 1581-1589.
2. Adrogué, H. J. & Madias, N. E. (2000). Hyponatremia. *N. Engl. J. Med.* 342, 1493-1499.
3. Fitzsimons, J.T. (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol. Rev.* 78, 583-686.
4. McKinley, M.J., & Johnson, A.K. (2004). The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol. Sci.* 19, 1-6.
5. Noda, M., & Matsuda, T. (2022). Central regulation of body fluid homeostasis. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 98, 283-324.
6. Matsuda, T., Hiyama, T.Y., Niimura, F., Matsusaka, T., Fukamizu, A., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Noda, M. (2017). Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. *Nature Neuroscience* 20, 230-241.
7. Matsuda, T., Hiyama, T.Y., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Noda, M. (2020). Distinct CCK-positive SFO neurons are involved in persistent or transient suppression of water intake. *Nature Communications* 11, 5692.
8. Shimizu, H., Watanabe, E., Hiyama, T.Y., Nagakura, A., Fujikawa, A., Okado, H., Yanagawa, Y., Obata, K., Noda, M. (2007). Glial Na<sub>x</sub> channels control lactate signaling to neurons for brain [Na<sup>+</sup>] sensing. *Neuron* 54, 59-72.
9. Hiyama, T.Y., Yoshida, M., Matsumoto, M., Suzuki, R., Matsuda, T., Watanabe, E., Noda, M. (2013). Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Na<sub>x</sub>, the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. *Cell Metab.* 17, 507-519.
10. Noda, M. & Hiyama, T.Y. (2015). Sodium sensing in the brain. *Pflugers Arch.* 467, 465-474.
11. Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., Kvitsiani, D., Fu, Y., Lu, J., Lin, Y., et al. (2011). A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71, 995-1013.
12. Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., Jr., Lowell, B.B. (2011). Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* 71, 142-154.
13. Li, S.J., Vaughan, A., Sturgill, J.F., Kepecs, A. (2018). A viral receptor complementation strategy to overcome CA V-2 tropism for efficient retrograde targeting of neurons. *Neuron* 98, 905-917 e905.
14. Klapoetke, N.C., Murata, Y., Kim, S.S., Pulver, S.R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y.K., Morimoto, T.K., Chuong, A.S., Carpenter, E.J., Tian, Z., et al. (2014). Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature Methods* 11, 338-346.
15. Ahmad, R., Dalziel, J.E. (2020). G Protein-Coupled Receptors in Taste Physiology and Pharmacology. *Front Pharmacol.* 11, 587664.
16. Oka, Y., Butnaru, M., Buchholtz, L., Ryba, N.J.P., Zuker, C.S. (2013). High salt recruits aversive taste pathways. *Nature.* 494, 472-475.
17. Nomura, K., Hiyama, T.Y., Sakuta, H., Matsuda, T., Lin, C.H., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Kuwaki, T., Takahashi, K., Matsui, S., Noda, M. (2019). [Na<sup>+</sup>] increases in body fluids sensed by central Na<sub>x</sub> induce sympathetically mediated blood pressure elevations via H<sup>+</sup>-dependent activation of ASIC1a. *Neuron.* 101, 60-75.

18. Dupont, A.G. & Brouwers, S. (2010). Brain angiotensin peptides regulate sympathetic tone and blood pressure. *Journal of hypertension*. 28, 1599-1610.
19. Coble, J.P., Grobe, J.L., Johnson, A.K., Sigmund, C.D. (2015). Mechanisms of brain renin angiotensin system-induced drinking and blood pressure: importance of the subfornical organ. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 308, R238-249.
20. Smith, C.M. & Lawrence, A.J. (2018). Salt appetite, and the influence of opioids. *Neurochemical Research*. 43, 12-18.
21. Johnson, A.K., Olmos, J., Pastuskovas, C.V., Zardetto-Smith, A.M., Vivas, L. (1999). The extended amygdala and salt appetite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 258-280.
22. Augustine, V., Lee, S., Oka, Y. (2020) Neural control and modulation of thirst, sodium appetite, and hunger. *Cell*. 180, 25-32.
23. Sakuta, H., Lin, C.H., Hiyama, T.Y., Matsuda, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Kobayashi, K., Noda, M.(2020). SLC9A4 in the organum vasculosum of the lamina terminalis is a [Na<sup>+</sup>] sensor for the control of water intake. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 472, 609-624.
24. Rowland, N.E. (2023). Neurobehavioral mechanisms of sodium appetite. *Nutrients*. 15,620.

## Central Mechanisms for the Inhibitory Controls of Salt and Water Intakes.

Takashi Matsuda

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

### Summary

In terrestrial animals including humans, sodium ions ( $\text{Na}^+$ ) in body fluids play an important role in maintaining the life. To keep a physiological  $\text{Na}^+$  concentration in body fluids, the brain senses changes of  $\text{Na}^+$  concentration, osmolality, and circulating hormones in body fluids, and translates these information into neural activity to control various physiological functions. When the  $\text{Na}^+$  concentration in body fluids begins to deviate from the physiological levels, the brain attempts to return the  $\text{Na}^+$  concentration to the normal range by controlling salt appetite, thirst, blood pressure, and urination. If the  $\text{Na}^+$  concentration remains abnormal level for a long time, various systemic disorders such as hyponatremia and hypernatremia can occur.

We previously identified two populations of neurons that induce salt appetite (salt neurons) and thirst (water neurons) in the subfornical organ (SFO), one of the sensory circumventricular organs (sCVOs) that lacks a blood-brain barrier in the brain. We also identified inhibitory systems in the SFO for salt neurons and water neurons in response to body fluid conditions. Moreover, our recent findings suggest the existence of a distinct inhibitory mechanism for salt appetite and thirst.

In the present study, we revealed CCK neurons in the hindbrain that control salt appetite. We monitored activities of CCK neurons during salt intake (0.3 M NaCl) using *in vivo* calcium imaging. These neurons were activated immediately after salt intake, before the changes in the body fluid level. We found that a subset of CCK neurons projects to the ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis (vBNST), which is downstream of salt neurons in the SFO. Furthermore, optogenetic activation of this population of CCK neurons suppressed salt appetite. Finally, combined analyses of calcium imaging and optogenetics suggested that CCK neurons in the hindbrain activate GABAergic neurons in the vBNST to inhibit salt intake behaviour.

These results indicate that the subpopulation of CCK neurons in the hindbrain have a function to prevent excessive salt intake prior to the changes in body fluid level by transiently suppressing salt intake behavior. In the animals, the body fluid salt balance is thus maintained by combinational control mechanisms based on prediction of changes in body fluid condition (feed-forward control) and actual body fluid condition (feed-back control).