

令和 2 年 8 月 19 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860324

氏 名 中子 ほか

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：パサデナ（国名：アメリカ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

飲水行動を修了させる神経回路の同定、および制御

3. 派遣期間：平成 30 年 6 月 1 日 ～ 令和 2 年 5 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

California Institute of Technology, Division of Biology and Biological Engineering

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

・研究背景・問題点・研究目的

体内の水分量調節には適切な飲水の開始と終了が重要である。飲水開始制御を司る神経回路は、近年の神経操作・可視化技術を用いた研究により大部分が明らかにされてきた (Oka et al., Nature, 2015; Matsuda et al., Nature Neurosci, 2017)。一方、飲水終了のメカニズムは未だ不明な点が多いが、消化管での水受容が飲水行動を制御する脳内の神経群の活動を抑制し、飲水を終了させることが推測されている。例えば、ヒトを含め脱水した動物は飲水開始後しばらくして飲水をやめるが、その時点で脱水による体液濃縮は回復していない (Ramsay and Booth, “Thirst”, 1991)。また、飲水行動を制御する脳内神経群の活動は飲水に伴い即座に抑制される (Zimmerman et al., Nature, 2016; Mandelblat-Cerf et al., Neuron, 2017)。これらの事実は、脳内飲水中枢へと消化管が飲水停止シグナルを送っていることを示唆するが、そのメカニズムは不明であった。申請者は派遣先において、消化管における水受容が動物の飲水欲求を抑制するメカニズムを明らかにしたいと考えた。

・研究経過、および得られた結果

1. 胃腸での水受容は、脳弓下器官 nNOS 神経細胞の活動性、及び飲水量を低下させる

胃腸での感覚受容が飲水欲求を抑制し動物を飲水終了へと導くことは以前より推測されていたが、その解析は飲水量の増減など行動学的な解析にとどまり、具体的な飲水停止の制御メカニズムは明らかでなかった。飲水停止には胃腸での低浸透圧性刺激（すなわち水）の受容が重要であることは既に知られていたが、申請者は自身の手で胃腸における水受容が飲水行動の抑制に重要な役割を果たしていることを検証することにした。過去の報告を参考に派遣先研究室でマウス胃ろうの造設法を立ち上げ (Ueno et al.,

2012, Sadio et al., 2016)、胃腸への液体注入直後、まだ体液浸透圧が回復していない段階で、マウスの飲水量を計測することにした。生理食塩水注入群と比較して水注入群では有意に飲水量が低下し、過去の報告通り胃腸での水受容は飲水行動を抑制した (図 1)。

続いて、脳弓下器官 nNOS 神経細胞の活動性がマウスの飲水欲求とよく関連することから、脳弓下器官 nNOS 神経細胞の活動性をマウス飲水欲求レベルのプロキシとして用い、胃腸における水受容が飲水欲求を抑制するか検討した。具体的には、胃ろうを介した液体注入中の nNOS 神経細胞の神経活動変化をファイバーフォトメトリーで観察した。その結果、生理食塩水、等張マンニトール液の注入ではなく水の胃への注入により、脳弓下器官 nNOS 神経細胞の活動性が減少した (図 2)。同様に、胃への水注入により脱水マウスの飲水量も減少した。この時点で体内浸透圧は回復しておらず、この nNOS 陽性神経細胞の活動性の減少、および飲水量の減少は、体内環境の回復による受動的なものではなく、能動的な抑制メカニズムによるものと推測された。

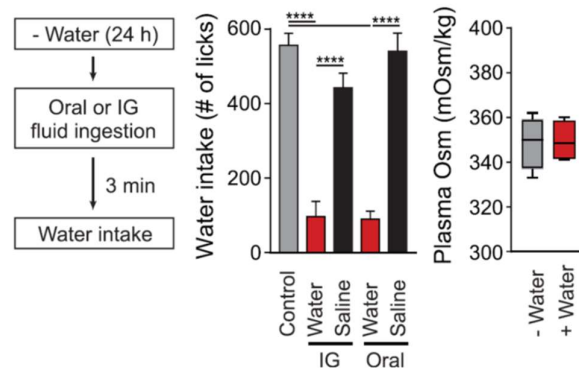


図1 生理食塩水注入群(黒)・無注入群(グレー)と比較して胃への水注入はマウスの飲水量を減少させる
この時点で水注入群(赤)の体液浸透圧は回復していない

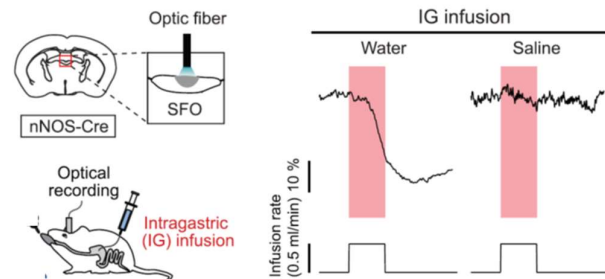


図2 胃への水注入は脳弓下器官nNOS陽性神経細胞の活動を抑制する

2. 脳弓下器官 GLP1R 陽性神経細胞は、胃での水受容により活性化し飲水行動を停止させる

派遣先研究室より、以前脳弓下器官の抑制性神経細胞が飲水行動を抑制することを報告していた。この神経細胞集団こそが胃での水受容による飲水抑制の神経基盤であるとの仮説のもとに、脳弓下器官抑制性神経細胞のより特異的なマーカーである GLP1R プロモータ下で Cre を発現するマウスラインを用い、胃腸への水注入に対する脳弓下器官抑制性神経細胞 (以下 GLP1R 陽性細胞) の神経活動変化を観察した (2. の実験については派遣先研究室の大学院生と共同で行った)。

胃腸への水注入は GLP1R 陽性細胞の神経活動を上昇させた。この神経活動の上昇は低浸透圧依存적であり、生理食塩水や液体飼料などの等~高浸透圧性の液体の注入では、GLP1R 神経細胞の活動上昇は観察されなかった。更に、ChR2 を用いた GLP1R 陽性神経細胞の活動上昇は、脱水時の飲水量を減少させた (図 3)。この飲水量の減少は脱水時の液体摂取特異的であり、例えば絶食時の液体飼料の摂取は抑制せず、GLP1R 陽性神経細胞は脱水による飲水摂取欲求特異的なストッパーであることが示唆された。

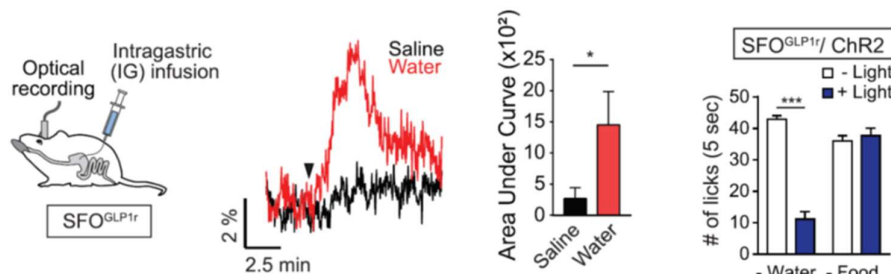


図3 胃への水注入は脳弓下器官GLP1R陽性神経細胞を活性化させ、GLP1R陽性神経細胞の活性化は飲水行動を抑制する

続いて光抑制オプシンを用いて、脱水時のマウスが水分摂取する際に GLP1R 陽性細胞の機能抑制が及ぼす影響を観察した。GLP1R 陽性細胞の機能抑制により、脱水時のマウスは水を過剰摂取した (図 4)。一方で、GLP1R 陽性細胞の機能抑制で生理食塩水の過剰摂取は起こらず、脳弓下器官 GLP1R 陽性細胞が胃腸における水受容を検出する神経基盤であることが示唆された。

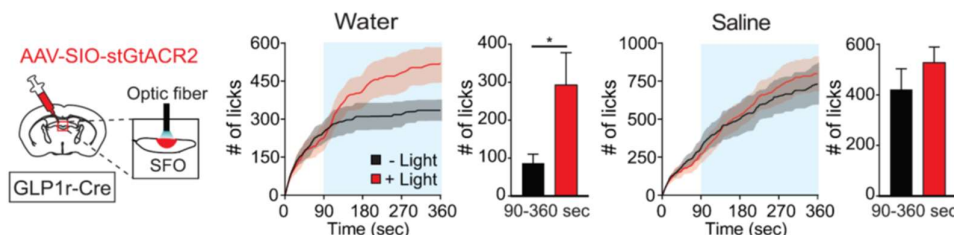


図4 GLP1R陽性神経細胞の活動抑制は、脱水時のマウスに、低浸透圧性の液体 (= 水) 特異的な過剰摂取を引き起こす

3. 消化管と脳を繋ぐ感覚神経経路の同定

それでは、どのような経路で胃腸における低浸透圧性の情報が GLP1R 陽性神経細胞へと伝わるのだろうか。内臓感覚神経、または胃腸からのホルモン分泌制御を経由することが想定されるが、過去の報告より迷走神経求心路を経由する内臓感覚神経が水受容の情報を GLP1R 陽性神経細胞へと伝達する可能性が高いと考えた。そこで、マウントサイナイ医科大学 de Araujo 研究室にて、迷走神経求心路の神経核である節状神経節、および消化管へのウイルスインジェクション法を習得した (Han et al., Cell 2018)。

まず初めに、節状神経節からの入力が脳弓下器官 nNOS 陽性細胞の活動性を調節するか検討した。具体的には節状神経節に AAV-syn-hM3Dq-mCherry を感染させ、CNO インジェクションによる節状神経節神経細胞の活性化が nNOS 陽性神経細胞の活動性に及ぼす影響をファイバーフォトメトリで観察した。CNO インジェクションによる節状神経節の活性化により、脱水時のマウス脳弓下器官における nNOS 陽性神経細胞の活動性および飲水量は減少した (図 5)。

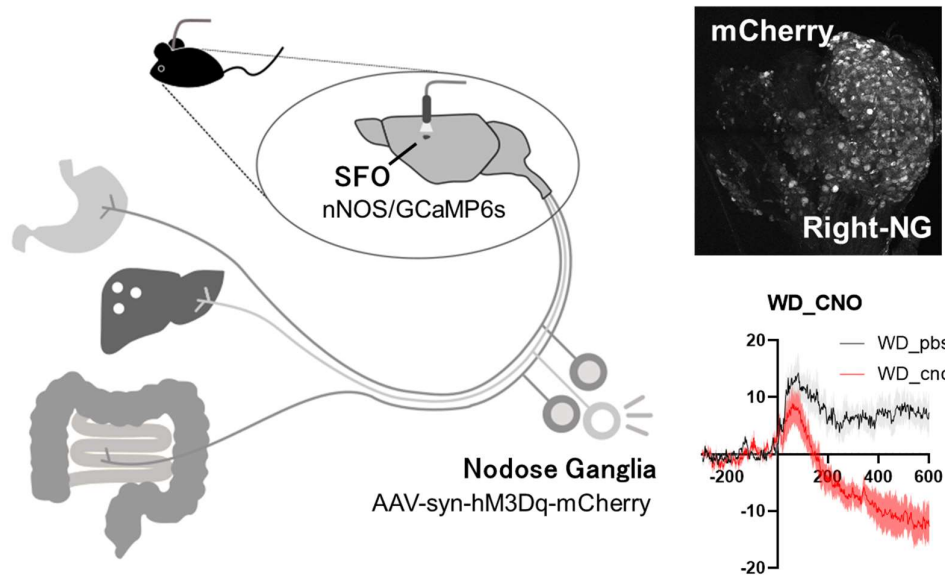


図5 CNOによる節状神経節の活性化は脱水時のnNOS陽性神経細胞の活動を抑制する

続いて、特定の臓器に innervation する節状神経節の神経細胞特異的にラベルするために、目的臓器に AAVrg-Cre を、節状神経節に AAV-syn-DIO-hM3Dq-mCherry を感染させた。感染部位に投射する神経細胞に逆行性に感染できる AAVrg の特性を生かし、臓器、胃、十二指腸、空腸、または回腸特異的な投射を持つ節状神経節細胞特異的に hM3Dq を発現させたが、CNO インジェクションにより、当該節状神経節神経細胞を活性化しても、脳弓下器官 nNOS 陽性細胞の活動減少および飲水量の低下は観察されなかった。その理由として、臓器特異的に投射する神経細胞を効率的にラベルできていなかった可能性が高いと申請者は考えている。

・総括、及びこれからの展望

現状、一番の問題点は臓器特異的な節状神経節神経細胞のラベル効率の悪さであり、その方策として2つ考えられる。第1の方策は、既存の技術を磨くことである。例えば、胃壁・腸壁へのウイルスインジェクション法を改良することで目的神経細胞集団のラベリング効率を上げられる可能性がある。第2の方策はラベル方法の変更である。例えば、近年複数の研究室より節状神経節神経細胞群はサブクラスターを持つことが報告されているが、個々のクラスター特異的な遺伝子操作を可能とする Cre ドライバーマウスラインはすでに存在する。これらのマウスを入手し節状神経節に AAV ウイルスを感染させることで、節状神経節神経細胞群のサブクラスター特異的な遺伝子操作および機能解析が可能になると考えている。今後臓器・細胞種特異的な水受容の解析へと研究を進めていきたい。