

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「オプトバイオロジーの開発による体液恒
常性と血圧調節を司る脳内機構の解明」

研究終了報告書

研究期間 2017年 9月～2023年 3月

研究代表者：野田 昌晴
（東京工業大学
科学技術創成研究院、特任教授）

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

亀井 G は、これまで昆虫や魚類等の低体温動物で実用化された IR-LEGO を哺乳類に適用するための技術開発を進めた。熱ショック応答温度を哺乳類に適用するために、当初は新規熱ショック因子1 HSF1 の導入を検討したが、発現量の調節が難しくこの方法で実用化は困難であると判断するに至った。一方、照射系において生体脳深部での局所加熱のために、新たに光ファイバーによる照射光学系を構築した。レーザーパワーは照射部の温度に直結するため、ファイバーに導入する光量と照射時間を制御する光学系を作製した。また、照射部位の温度計測方法を考案し、熱ショック誘導を適切に行える条件を決定した。

作田 G と **亀井 G** は協同で、マウス脳における熱負荷による遺伝子発現誘導系の構築を進めた。当初予定していた新規 HSF1 を用いた遺伝子発現誘導系の開発は困難だと判明したが、内因性の HSF1 を用いることにより、IR-LEGO 法によってマウス脳において外来遺伝子の発現を誘導できることを明らかにした。

大倉 G では、マルチファイバー解析法に用いる蛍光 Ca^{2+} プロブの開発を進めてきた。これまでに、色変換型 Ca^{2+} 蛍光インジケータ CaMPARI-2 の応答速度や蛍光変化量を改善した改変体 CP2X を作成し、*in vitro* においてその特性の解析を行った。さらに色変換型 Ca^{2+} 蛍光インジケータの蛍光が、*in vivo* で色変換後に標本を固定化处理しても検出できるように改良することを目指し、インジケータ分子中の蛍光素子の folding を向上させるなどの変異体作成を進め、そのインジケータの輝度、蛍光変化量、色変換能、PFA 固定化耐性能について解析し、CP2X の改良体 CP2X(31F)を見出した。次に、CP2X(31F)とマウス AT1a 受容体を融合させたキメラ受容体 AT1a-CP2X(31F)を作成し、その色変換型インジケータとしての性能を解析した。また、CaMPARI 系とは異なる新規の色変換型 Ca^{2+} 蛍光インジケータの作成とその特性の解析を進めた。開発したインジケータは **野田 G** と共有し、マウス脳に発現させて血圧調節機構の解析に活用していく。

野田 G は脳室周囲器官の1つ、SFO 内に、それぞれ Ang II 受容体(AT1a)を有する、水分摂取をコントロールする水ニューロンと塩分摂取をコントロールする塩ニューロンを同定し、水ニューロンが MnPO/OVLT へ、塩ニューロンが vBNST に連絡していることを明らかにしていた。また、体液 Na^+ 濃度が高い時は、脳内 $[\text{Na}^+]$ センサーである Na_x を発現する SFO のグリア細胞が活性化し、分泌された乳酸によって GABA ニューロンが活性化することにより、塩ニューロンが抑制されるという仕組みがあることを既に報告していた。CREST 研究では、SFO 内の CCK ニューロンが水分摂取の抑制に関与していることを見出し、体液 Na^+ 濃度減少時には CCK ニューロンから CCK が分泌され、CCK-B 受容体を発現する GABA ニューロンが活性化することによって、水ニューロンの活動が抑制されることを明らかにした。また、SFO 内の CCK ニューロンには、体液 Na^+ 濃度が減少したときに恒常的に活性化している集団と、飲水刺激に応じて一過性に活性化する集団があることを見出した。どちらも水分の過剰摂取の抑制に機能していた。また、これとは独立に水分、あるいは塩分摂取の刺激が、末梢から LPBN の異なる CCK 陽性ニューロンに伝達され、それぞれ MnPO あるいは vBNST に連絡し、そこで GABA ニューロンの活性化を介して、水分、あるいは塩分の欲求を一時的に抑制する仕組みがあることを明らかにした(論文準備中)。

さらに、**野田 G** は **作田 G** と共同で、OVLT において、 Na_x と同様に Na^+ 濃度上昇を感知する機能を有する SLC9A4 分子を見出した。体液の Na^+ 濃度上昇による水分欲求は、OVLT において Na_x /TRPV4 系と SLC9A4/ASIC1a 系の2つの独立した経路で担われていることを明らかにした。 Na_x のシグナルは飲水量の約 50%を、SLC9A4 のシグナルは約 30%を説明するものであった。残り 20%は浸透圧センサーのシグナルによると示唆された。

また、**野田 G** は塩分の過剰摂取による高血圧の誘導が OVLT のグリア細胞に発現する Na_x に始まることを明らかにした。 Na_x -KO マウスは体液中の Na^+ 濃度が上昇しても高血圧を発症しない。体液中の Na^+ 濃度の上昇は Na_x の活性化、 Na_x 陽性グリア細胞からの H^+ と乳酸の放

出、酸感受性チャンネル ASIC1a の活性化へとつながり、OVLT の ASIC1a 陽性ニューロン活性化のシグナルが OVLT→PVN→RVLM に伝搬されて、交感神経系を活性化することによって血圧が上昇するという脳内機構の存在を明らかにした。血圧はNa⁺以外にも多くの因子によって調節を受けているが、Na⁺濃度上昇は OVLT において、Ang II 上昇は SFO において感受され、両者は血圧を相乗的に上昇させていることがわかった。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 食塩の過剰摂取による血圧上昇を担う脳内メカニズムの解明

概要:食塩の過剰摂取などによる体液中の Na⁺濃度の増加によって血圧上昇が起こることは知られていたが、その詳細な仕組みは明らかにされていなかった。本研究成果は、脳内の OVLT において、脳内 Na センサーである Na_x チャンネルが体液 Na⁺濃度上昇を感知し、交感神経制御中枢の活性化を経て、交感神経の活性化を誘導することによって血圧上昇が起こるといふ一連の仕組みを世界で初めて明らかにした。

2. 新規脳内 Na⁺センサー分子の同定

概要:体液 Na⁺濃度上昇による飲水行動の誘導には、Na センサーである Na_x からのシグナルが関与することを明らかにしていたが、この Na_x が関わりと考えられる飲水行動は総飲水量の半分程度を説明するものであった。そこで、脳内 Na⁺濃度上昇を感知する部位と考えられる脳室周囲器官においてトランスクリプトーム解析を行い、新規 Na センサー分子の探索を行った。本研究において SLC9A4 を新しく Na センサーと同定したが、Na_x と併せて発現抑制する実験によって、体液 Na⁺濃度上昇によって誘導される飲水行動が完全に説明できることを見出した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. Na⁺濃度による血圧制御神経路の同定

概要:体液 Na⁺濃度上昇の情報を血圧制御中枢に伝える経路において重要な役割を担うセンサー分子とシグナル伝達分子として、脳内の終板脈管器官(OVLT)に発現する Na_x および ASIC1a を同定することが出来た。これは、食塩感受性高血圧の新たな治療戦略の開発につながる成果である。この研究成果をもとに、食塩感受性高血圧の治療薬開発方法に関する特許を取得した。

2. 光ファイバーを使った赤外線による局所加熱技術の確立

概要:これまでの IR-LEGO では顕微鏡対物レンズによる集光局所加熱しかできず、表面から 100 ミクロン程度までの細胞への遺伝子発現誘導しかできなかった。今回、光ファイバーで深部組織へのアプローチ法を確立し、深部細胞・組織での局所加熱による遺伝子発現誘導に道を拓いた。また、加熱温度やその範囲の温度計測法も確立し、より正確な温度制御も可能になった。本法は、TRP チャンネルを用いたサーモジェネティクス法による神経活動制御への応用も可能である。

3. AT1a と CP2X のキメラ分子による色変換型 Ang II インジケータの開発

概要: AT1a と CP2X を融合させて作成したキメラ分子が、Ca²⁺濃度上昇ではなく Ang II の結合によって蛍光が変化する分子であったことから、色変換型 Ang II インジケータとして機能することが明らかになった(論文準備中)。これは、AT1a 受容体と同様に 7 回膜貫通型構造を有する他の GPCR を用いた場合でも、AT1a 受容体の細胞内 C 末端部分をリンカーとして CP2X を融合させたキメラ分子を作成することで、当該 GPCR のアゴニストに特異的な色変換型インジケータを開発できる可能性を示す成果である。

<代表的な論文>

1. Kengo Nomura, Takeshi Y Hiyama, Hiraki Sakuta, Takashi Matsuda, Chia-Hao Lin, Kenta Kobayashi, Kazuto Kobayashi, Tomoyuki Kuwaki, Kunihiko Takahashi, Shigeyuki Matsui, Masaharu Noda. "[Na⁺] Increases in Body Fluids Sensed by Central Na_x Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H⁺-Dependent Activation of ASIC1a." *Neuron*, vol.101, No.1, p60–75, 2019

概要: 既存の光操作技術であるオプトジェネティクスを用いて特定の神経細胞集団(OVLT(→PVN)ニューロン)の活動を操作することで、血圧を制御できることを示した。体液 Na⁺濃度上昇を検知する Na_x が OVLT のグリア細胞に分布し、そのシグナルが H⁺の放出によって ASIC1a 陽性のニューロンに伝えられていることを明らかにした。その情報は OVLT→PVN→RVLM→SC と伝達されることを示した。

2. Hiraki Sakuta, Chia-Hao Lin, Takeshi Y. Hiyama, Takashi Matsuda, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Kenta Kobayashi, Masaharu Noda, "SLC9A4 in the organum vasculosum of the lamina terminalis is a [Na⁺] sensor for the control of water intake", *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, vol. 472, pp.609-624, 2020

概要: これまでに、体液 Na⁺濃度上昇によって水分摂取行動が誘導される神経機構として、Na センサーである Na_x からのシグナルが関与することを明らかにしていた。しかしながら、Na_x が関わりと考えられる飲水行動は総飲水量の半分程度であった。今回、新規の Na センサー SLC9A4 を同定した。SLC9A4 と Na_x を同時に発現抑制することで、体液 Na⁺濃度上昇によって誘導される飲水行動が完全に抑えられることを見出した。

3. Matsuda, T., Hiyama, T.Y., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Noda, M. "Distinct CCK-positive SFO neurons are involved in persistent or transient suppression of water intake", *Nature Communications*, 11, 5692, 2020

概要: 脳内の脳弓下器官(SFO)においてコレシストキニン(CCK)を分泌する神経細胞(CCK 作動性ニューロン)を同定し、この CCK 作動性ニューロンが活性化することで飲水行動が抑制されることを初めて明らかにした。また、*in vivo* カルシウムイメージング法を用いることによって CCK 作動性ニューロンは、体液のナトリウムイオン(Na⁺)濃度の低下に応じて持続的に活性化する集団と、飲水行動に反応して一過性に活性化する集団の2種類が存在することを発見した。

§3 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「野田」グループ

研究代表者:野田 昌晴(東京工業大学 科学技術創成研究院 特任教授)

研究項目

- ・体液恒常性維持機構の解析
- ・血圧調節機構の解析

② 「亀井」グループ

主たる共同研究者:亀井 保博(基礎生物学研究所 超階層生物学センター 特任教授)

研究項目

- ・哺乳類用 IR-LEGO 法の開発

③ 「大倉」グループ

主たる共同研究者:大倉 正道(九州保健福祉大学大学院 医療薬学研究科 教授)

研究項目

- ・蛍光インジケーターの改良と開発

④ 「作田」グループ

主たる共同研究者:作田 拓(基礎生物学研究所 超階層生物学センター 助教)

研究項目

- ・体液恒常性機構の解析
- ・哺乳類用 IR-LEGO 法の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・局所温度計測技術に関して、技術・情報交換の場として **Biothermology** 研究会を作り、コアメンバーとして活動し、毎年研究会を開催している(2022年度に第7回開催予定)。
- ・局所加熱のための赤外レーザー導入光学系の設計に関して、浜松ホトニクス社と連携を取りながら設計を行い、実機を組み上げた(論文投稿準備中)。これにより従来の IR-LEGO を安価に構築できるようになる。
- ・ソーラボジャパン社と連携を取りながら、顕微鏡光学計設計の実習コースを開催した(2021年度から2回開催)。