

氏 名 松田 隆志

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1940 号

学位授与の日付 平成29年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt  
appetite in the subfornical organ

論文審査委員 主 査 教授 東島 眞一  
教授 野田 昌晴  
准教授 渡辺 英治  
准教授 高木 新 名古屋大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Body-fluid conditions are continuously monitored in the brain to regulate thirst and salt-appetite sensations. The central monitoring of body-fluid conditions is considered to be mediated by sensory circumventricular organs (sCVOs), brain regions that lack a blood-brain barrier, but harbor neuronal cell bodies. sCVOs consist of the subfornical organ (SFO), organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT), and area postrema.

Na<sup>+</sup>-levels in body fluids are sensed by Na<sub>x</sub> channels expressed in specific glial cells in the SFO. The activation of Na<sub>x</sub> stimulates the glial cells to release lactate, which functions as a gliotransmitter that activates GABAergic inhibitory neurons in the SFO. It has been postulated that the activation of the GABAergic neurons suppress salt appetite. On the other hand, angiotensin II (Ang II) drives both thirst and salt appetite; however, the neural mechanisms underlying selective water- and salt-intake behaviors remain unknown.

To investigate water- and salt-intake behaviors, I established water- and/or Na-depleted conditions in mice by dehydration (water-depleted), furosemide treatment (water- and Na-depleted), or combining furosemide treatment with water satiation (Na-depleted), respectively. Blood Ang II levels increased to similar levels in all of the three conditions. Under the water-depleted and Na-depleted conditions, the expression of Fos, a marker for neuronal activity, was specifically increased in Ang II receptor type 1a (AT1a)-positive neurons in the SFO and OVLT.

To examine the contribution of the SFO and OVLT to water- and salt-intake behaviors, AT1a gene was site-specifically deleted in the SFO and/or OVLT. The local deletion of AT1a in the SFO resulted in significant reductions in water intake under the water- and Na-depleted condition and in salt intake under the Na-depleted condition. In contrast, the local deletion of AT1a in the OVLT resulted in marked reductions in water intake under the water- and Na-depleted condition, but not salt intake under the Na-depleted condition. These results suggested that AT1a signals in the SFO are involved in both water and salt intake, whereas those in the OVLT are involved only in water intake.

My anatomical analyses revealed that AT1a-positive neurons in the SFO were largely glutamatergic, and they had projections to the OVLT, ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis (vBNST), and so on. Notably, Fos-positive neurons under the water-depleted condition overlapped well with the SFO neurons projecting to the OVLT [SFO(→OVLT) neurons]. In contrast, the SFO neurons projecting to the vBNST [SFO(→vBNST) neurons] expressed Fos under the Na-depleted condition. Furthermore, I tested whether optical manipulations of the specific neural pathways

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

by using channelrhodopsin 2 and archaerhodopsin 3 can control the specific intake behaviors. As was expected, water- and salt-intake behaviors were selectively controlled by optogenetic manipulations of neuronal activities of the respective neuronal groups. From these results, I concluded that the SFO(→OVLT) neurons and SFO(→vBNST) neurons control thirst and salt appetite, respectively.

To examine the relationship between  $Na_x$  signals and AT1a-dependent control of salt appetite, I examined whether the activity of the SFO(→vBNST) neurons is regulated by  $Na_x$  signals through GABAergic neurons. As previously reported,  $Na_x$ -knockout (KO) mice did not show salt aversion under the water-depleted condition. Increased Fos expression was observed in the SFO(→vBNST) neurons of the  $Na_x$ -KO mice compared with wild-type mice. In addition, electrophysiological experiments demonstrated that the Ang II-induced firing activity of the SFO(→vBNST) neurons was suppressed dependent on the activity of GABAergic neurons by a hypertonic Na solution. The Na-dependent responses were absent in brain slices prepared from  $Na_x$ -KO mice. Thus,  $Na_x$  signals suppressed the activity of the SFO(→vBNST) neurons through activation of GABAergic neurons in the SFO.

In addition, I explored inhibitory signals that suppress the activity of the SFO(→OVLT) neurons. I tested cholecystokinin (CCK) because it reportedly inhibits water intake. I found that the Ang II-induced firing activity of the SFO(→OVLT) neurons was suppressed by application of CCK through activation of GABAergic neurons in the SFO. In line with this finding, CCK levels in the SFO were increased under the Na-depleted condition. Of note, CCK did not affect the activity of the GABAergic neurons which made synapse onto the SFO(→vBNST) neurons. These results indicated that CCK levels in the SFO modulate the activity of the SFO(→OVLT) neurons through activation of another population of GABAergic neurons.

In summary, I demonstrated that the AT1a-positive SFO neurons projecting to the OVLT and vBNST encode thirst and salt appetites, respectively. I named these two population of driving neurons “water neuron” and “salt neuron”, respectively. The thirst and salt-appetite behaviors were separately controlled dependent on body-fluid conditions. This would provide substantial explanations for the neural mechanisms in the SFO that generate appropriate water- and salt-intake behaviors based on body-fluid conditions.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

脳は常に、体液の状態を監視しており、その情報に基づいて水分や塩分の欲求を制御している。そのモニタリングの場合は、脳室に面し、血液—脳関門を欠している脳弓下器官(SFO)、終板脈管器官(OVLT)等の感覚性脳室周囲器官であると推定されている。これらの領域には、アンジオテンシン II (AngII)の受容体が多く発現している。また、脳室内に AngII を投与すると、水分と塩分の両方の欲求が誘導されることが知られている。しかしながら、動物は水分欠乏時には水を、塩欠乏時には塩分を選択的に摂取することから、AngII による水分と塩分欲求の誘導作用は体液状態に応じて調節されていると推定されるが、その脳内メカニズムは不明であった。

松田氏はマウスを用いて、まず水分／塩分両欠乏、塩欠乏、及び水分欠乏の 3 つの状態を作成し、血中の AngII 濃度が同様に約 3 倍に上昇することを確認した。次にそれぞれの状態における水と食塩水の摂取量を、WT と Ang II 受容体ノックアウトマウス(AT1a-KO)の間で比較した。その結果、塩分欲求は完全に AT1a 依存的であり、水分欲求は約半分が AT1a 依存的であることが分かった。さらに、SFO あるいは OVLT 特異的に AT1a をノックアウトしたマウスを作成し解析した結果、SFO の AT1a シグナルが水分と塩分の両方の欲求を制御しており、OVLT の AT1a シグナルは水分欲求を部分的に制御していることが明らかとなった。

SFO の AT1a ニューロンはグルタミン酸作動性の興奮性ニューロンであり、その投射先は OVLT、腹側分界条床核(vBNST)、室傍核(PVN)、視交差上核(SON)など、多くの神経核にわたっていた。水分欠乏時には SFO から OVLT に投射するニューロン(SFO(→OVLT)ニューロン)において Fos の発現が上昇したことから、SFO(→OVLT)ニューロンが水分欲求を制御していると予想した。一方、塩欠乏時には SFO から vBNST に投射するニューロン(SFO(→vBNST)ニューロン)に Fos が発現したことから、SFO(→vBNST)ニューロンが塩分欲求を制御していると予想した。この仮説を検証するため、高頻度逆行性レンチウイルスを用いて光感受性タンパク質を発現させ、これらの神経活動を選択的に光操作する実験(オプトジェネティクス)を実施した。その結果、SFO(→OVLT)ニューロンの活動が水分欲求を制御し、SFO(→vBNST)ニューロンの活動が塩分欲求を制御していることを実証することに成功し、SFO 内のそれぞれの AT1a 陽性ニューロンを「水ニューロン」、「塩ニューロン」と命名した。

松田氏の所属する研究室では、SFO のグリア細胞に発現している  $\text{Na}_x$  チャネルが、脱水時の体液中の  $\text{Na}^+$ 濃度上昇を感知し、抑制性ニューロンである GABA ニューロンを活性化して、塩分欲求を抑制することを明らかにしていた。松田氏はこの GABA ニューロンが抑制する相手が塩ニューロンではないかと考え、脳スライスを用いて電気生理学的手法によって確認実験を行った。その結果、予想通り、塩ニューロンは  $\text{Na}_x$  シグナルによって GABA ニューロンを介して抑制的な制御を受けていることが判明した。一方、水ニューロンは別のグループの GABA ニューロンによって抑制的に制御されており、この GABA ニューロンはホルモンの一つコレシストキニン(CCK)で活性化することを明らかにした。さらに、塩欠乏時には SFO 内で CCK 量が増加することを見出した。このことから、塩欠乏時には、CCK が水ニ

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

ニューロンの活動を抑えていると推定された。

以上の研究結果は、水分欲求、塩分欲求を担う神経路を世界に先駆けて同定するとともに、脱水時には水分欲求を、脱塩時には塩分欲求を選択的に亢進する脳内メカニズムを見事に説明するものであり、学位授与に値すると判断した。