

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22590196

研究課題名（和文）腎ネフロンに作用するアセチルコリンの分泌経路に関する研究

研究課題名（英文）The source of acetylcholine acting to the renal tubules.

研究代表者

前田 誠司（MAEDA SEISHI）

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10309445

研究成果の概要（和文）：

腎臓に作用するアセチルコリン（ACh）の由来を解明する為、ラット腎臓における副交感神経系および非神経性 ACh の局在を神経組織学的に検討した。腎神経標識の結果、腎臓へは交感神経節以外を由来とする神経線維は検出されなかった。一方、ACh 合成酵素 mRNA およびタンパク質が皮質集合管にみられたが、その分布は偏在性を示した。以上から腎臓では非神経性 ACh が優位であるが、その発現は限定的であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the source of acetylcholine (ACh) which acts to the kidney, parasympathetic innervations and non-neuronal expression of choline acetyl transferase (ChAT) were examined in the rat kidney by using a neuronal tracing method and histochemical methods, respectively. Retrograde neuronal tracer Fluoro-gold was treated to the renal nerve ends by a micro-capsule, resulting that there were no positive cells in any parasympathetic nuclei in the medulla oblongata and spinal cords. On the other hand, ACh-synthesizing enzyme ChAT was localized to the renal cortical collecting ducts with uneven distributions in the tubules. These results suggest that the non-neuronal ACh may be predominant over the neuronal ACh in the rat kidney.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：腎臓、アセチルコリン、ネフロン、自律神経、尿細管、集合管

1. 研究開始当初の背景

腎臓の自律神経支配は、一般臓器と同じく

アドレナリン作動性の交感神経および ACh 作動性の副交感神経の拮抗作用による

れている。腎臓の血管やネフロンには多くの ACh 受容体が発現しており、利尿および降圧作用に ACh が関与することは生理学的に知られている。一方で、迷走神経を含む副交感神経の投射は解剖学的および組織学的には確認されていない。この矛盾に対して明確に答えた研究はほとんどみられず、専門書においても神経投射の記述は曖昧で一定していない。

腎臓に作用する ACh の由来については、神経性以外に、血漿を介する体液性作用が考えられるが、血漿中での ACh の安定性や毛細血管壁の透過性の問題、さらには腎臓中の ACh エステラーゼの存在など、腎臓細管上皮が発現する受容体へのアクセスは悪いと考えられる。一方で、免疫細胞や気管上皮など非神経性細胞による ACh の産生が知られており、腎臓においても非神経性細胞による傍分泌様の作用経路の存在が考えられる。

よって、ネフロンへの ACh 作用経路として以下の2点が推測される。

(1) 迷走神経など副交感神経の直接もしくは間接的投射

(2) 腎内在細胞による非神経性 ACh の分泌

本研究はこれらの存在を仮定し検証することに主眼を置いて立案されたものである。

2. 研究の目的

腎臓に作用する ACh の由来およびその作用経路について明らかにするため、以下の2点について検討することを目的とした。

(1) 副交感神経の投射およびその中枢神経核の同定

腎臓に投射する自律神経系は、腎神経叢を経由して腎内へ進入すると考えられる。遠心性線維の多くはアドレナリン作動性である、少数の機能不明な線維の存在が示唆されている(Barajas ら, 1985, 1988)。また、腎臓への逆行性トレーサー注入による実験では、偽陽性反応が出るため(Gattone ら, 1986)、実験としては成立しないことが指摘された。よって本研究では、新規の神経探索法を導入することによって、副交感神経の投射を調査してその存在の有無を確認した。

(2) 腎組織内の ACh 産生細胞の同定

ACh が免疫細胞や上皮系細胞など多くの非神経細胞から産生されることが明らかになっている(Kawashima ら, 2000; Proskocil ら, 2004)。腎臓においても Pirola ら(1991)や Evans(1992)がその存在を示唆しているが、細胞の同定までは至っていない。本研究では、主に分子生物学的および組織学的手法を用いて、腎臓内における ACh 産生細胞の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 神経標識法による副交感神経中枢の探索

腎実質への逆行性神経トレーサーを注入する実験系では、延髄において偽陽性が確認されることから、神経トレーサーの注入法を改善した。SD ラット(♂, 250-300 g)を深麻酔下で開腹し、腎動脈に伴行する腎神経叢を外膜とともに剥離し、遠位側を切断、微小カプセルを装着した。装着したカプセル内に Fluoro-Gold を封入し、ラットを3~7日間飼育した後に10%ホルマリンにて灌流固定し延髄および仙髄を採取した。組織はゼラチン包埋し、薄切後蛍光顕微鏡下で観察した。

(2) 腎臓内における ACh 産生細胞の同定

ACh 産生細胞の同定を行うため、ACh 合成酵素である choline acetyltransferase (ChAT)の組織化学的検索を行い、その組織内分布と細胞内局在を検討した。SD ラット腎臓は、灌流固定後摘出し、細切して凍結保護処理を施し、凍結切片を作成した。組織切片は、ChAT 特異的 cRNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにて mRNA の局在を、抗 ChAT 抗体を用いた免疫組織化学にてタンパク質の局在を観察した。ChAT タンパク質の局在については、集合管マーカーである AQP2 タンパク質の二重染色を施し、その比率を計測した。

4. 研究成果

(1) 腎神経における副交感ニューロン神経核について

腎臓支配神経の標識は、腎実質への圧注入が一般的であるが、この手法では迷走神経背側運動核(MDV)に偽陽性が現れることがわかっている。この偽陽性の標識ルートは不明であるが、組織周囲の通過線維による取り込みが疑われた。本研究では、トレーサーの漏れによる異所的な取り込みを排除するため、腎神経をマイクロカプセルで封入し、周囲組織からの取り込みを極力排除することに成功した。その結果、副交感神経中枢であるMDV および仙髄中間帯において、陽性細胞は全く観察されなかった。このことは、腎神経には副交感神経の投射はほとんど無いことを示す。よって、腎臓において作用するAChの由来は、従来一般的な自律神経系によらず、以下に示すような、非神経性細胞や、その他のルートを経由すると考えるのが妥当である。

(2) 腎組織における ACh 合成酵素の発現と局在について

SD ラット腎組織において、ChAT mRNAの局在は主に集合管系にみられた。そして、免疫組織化学法によるChATタンパク質の局在も皮質集合管にみられたが、その分布は偏在的であり、集合管全体に対する比率をAQP2 陽性反応との割合で計測したところ、皮質集合管では15%程度であった。このことは、集合管系は潜在的にACh合成能をもつものの、何らかの制御因子によってその発現がコントロールされていることを示唆する。また、ChATの免疫反応が集合管主細胞のアピカル膜に認められたことから、ChATは集合管管腔付近で産生されている可能性が示され、その分泌経路についても尿細管腔を利用していることが推測された。腎臓におけるACh分泌経路として管腔を用いることは、これまで推定されておらず、尿生産に関わるAChの機能を解明する上で重要な知見となりうる。この作用経路については今後検討に値する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Hayakawa T, Kuwahara-Otani S, Maeda S, Tanaka K, Seki M, Localization in the vagal ganglia of calcitonin gene-related peptide- and calretinin-immunoreactive neurons that innervate the cervical and the subdiaphragmatic esophagus of the rat. J Chem Neuroanat 査読有、43 2012, pp. 34-42

DOI: 10.1016/j.jchemneu.2011.10.004

- ② Maeda S, Jun JG, Kuwahara-Otani S, Tanaka K, Hayakawa T, Seki M. Non-neuronal expression of choline acetyltransferase in the rat kidney. Life Sciences, 査読有、89, 2011, pp. 408-414.

DOI: 10.1016/j.lfs.2011.07.011

[学会発表] (計7件)

- ① 前田誠司 他、ラットの腎臓に投射する交感神経節細胞の分布について、第118回日本解剖学会総会、2013年3月29日、高松。
- ② 全 瑠坤、前田誠司 他、ラット腎上皮細胞におけるアセチルコリンによるカリウムチャンネル発現促進について、第117回日本解剖学会総会、2012年3月28日、甲府。
- ③ 全 瑠坤、前田誠司 他、ラット腎上皮系NRK52E細胞におけるアセチルコリンの作用について、第87回日本解剖学会近畿支部学術集会、2011年12月3日、西宮。
- ④ 全 瑠坤、前田誠司 他、ラット腎上皮系NRK52E細胞における水およびイオントランスポーターの発現、第86回日本解剖学会近畿支部学術集会、2010年11月27日、大阪。
- ⑤ 前田誠司 他、ラット腎臓におけるコリンアセチルトランスフェラーゼの免疫組織化学的解析、第86回日本解剖学会近畿支部学術集会、2010年11月27日、大阪。
- ⑥ 前田誠司 他、ラット腎臓における非神経性アセチルコリンの産生について、第150回日本獣医学会総会、2010年9月18日、帯広。

- ⑦前田誠司 他、ラット腎臓におけるコリン
アセチルトランスフェラーゼの発現、第62
回日本細胞生物学会大会、2010年5月19
日 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 誠司 (MAEDA SEISHI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10309445

(2) 研究分担者

早川 徹 (HAYAKAWA TETSU)
兵庫医科大学・医学部・教授
(2012年より連携研究者)
研究者番号：10098543

大谷 佐知 (栞原 佐知)
(KUWAHARA-OTANI SACHI)
兵庫医科大学・医学部・助教
(2012年より連携研究者)
研究者番号：40412001

(3) 研究協力者

全 瑠坤 (JUN JIN-GON)
兵庫医科大学・医学研究科・大学院生