

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460278

研究課題名(和文)腎血圧調節機構における神経性および細胞性作用経路の解明

研究課題名(英文)Role of the neuronal and non-neuronal regulatory mechanisms of the renal blood pressure

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓を支配する自律神経系は体液恒常性の維持や腎障害の慢性化に影響する。腎神経の作用経路を解明するために腎神経の局在および腎支配区域を調べた。ラット腎神経を特異的に標識することにより、腎神経は交感神経幹および腎上神経節(SrG)が主神経節であり、交感神経幹は腎尾側部を、SrGは腎吻側部を支配していることが明らかとなった。副交感神経が確認されなかったことから、非神経性作用経路の存在が示唆された。腎神経温存虚血/再灌流ラットモデルを用い交感神経系の活動と神経受容体の発現をみたところ、受容体に変化はみられず、神経伝達物質の発現が増強していたことから交感神経の活動亢進が腎障害慢性化因子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Topological analysis of the rat renal efferent nerve ganglia were observed by a specific neuronal tracing method with micro-capsule which introduce the fluoro-gold (FG) retrogradely into the renal nerve plexus. As the results, FG-labeled cells were observed to the sympathetic chain ganglia T10 to L1 and prevertebral suprarenal ganglia (SrG) while no labeled cells were observed to the parasympathetic motor nuclei. Tracer injection of FG into the cranial- or caudal-segment of the kidney was shown that the SrG neurons and T13 chain neurons may particularly innervate into the cranial- and caudal-segment, respectively. Novel renal ischemia/reperfusion model of rats which is preserved the renal nerves represented increasing in renal tyrosine hydroxylase immuno-reactivity but no apparent changes in the receptor expression. These indicate the hyper-activation of renal sympathetic nerves in this model and useful to investigate the effects of sympathetic activity in the renal I/R injury.

研究分野：神経解剖学、細胞生物学

キーワード：腎神経 自律神経 交感神経幹

1. 研究開始当初の背景

腎臓において自律神経系は、内分泌系と連動することで水やイオンの再吸収・排泄を調節し、体液恒常性の維持や血圧調節を行う。自律神経系は血管平滑筋、傍系球体装置、ネフロンなどに作用し、アドレナリン受容体(ADRs)やアセチルコリン受容体(AChRs)を介してこれらの機能を調節している。また、腎臓が傷害を受けた際に交感神経の活動が亢進することで、組織線維化や上皮細胞のアポトーシスなどが促進し慢性的な腎機能障害を引き起こす。一方で、副交感神経系の活動は多くの組織において組織傷害を軽減することも知られており、自律神経系の活動をコントロールすることは臨床的にも重要である。

腎臓に投射する交感神経の神経節は、椎前神経節および椎傍神経節に局在するとされるが、これらは消化器系やその他の腹部器官を支配する神経を含む腹腔神経節・交感神経幹中に混在しており、その分別は困難であった。よって腎支配神経の節後神経細胞のトポロジー分布の詳細を調べ、それらの腎内における投射を明らかにする必要がある。

一方、副交感神経の節前神経および節後神経細胞の局在は解剖学的に確認されておらず、よって腎ネフロンに作用するアセチルコリン(ACh)の由来についても明らかになっていない。これらの制御メカニズムを解明するためには、そのリガンドの作用経路を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、腎臓に作用する自律神経調節中枢の解明の一環として、腎外からの自律神経系の投射経路を明らかにすることに加え、腎内の非神経性 ACh 分泌機構の詳細な機序を解明し、腎臓における神経性尿生産・浸透圧調節機構についての臨床応用可能な基礎的データを提供することを目的としている。本研究の遂行の為に以下の実験系を設定した。

- (1) 腎臓支配自律神経節のトポロジー解析
- (2) 腎支配神経節細胞の神経終末の同定
- (3) 腎上皮系細胞における AChRs および ADRs の発現
- (4) 腎虚血/再灌流(I/R)による腎傷害と自律神経系作用の関係について

3. 研究の方法

(1)腎臓支配自律神経節のトポロジー解析
SD ラットの腎神経を特異的に標識するため、fluoro-gold (FG)を充填した微小カプセルを腎動脈周囲を走行する腎神経に装着する方法を開発した。処置後2日に各神経節を採材し凍結切片を作成した。各神経節は蛍光顕微鏡下にて標識細胞数を計数し、統計処理を行った。

さらに腎区域に投射するニューロンの神経節分布を調べるため、ラット左腎臓の吻側部もしくは尾側部にそれぞれ FG を注入し、

各神経節における標識細胞を計数した。また、蛍光色素(Alexa488 もしくは Alexa555)標識された2種類のコレラトキシンBサブユニット(CTb)を吻側部および尾側部に同時に注入して二重標識し、標識細胞の二重投射性を検討した。

(2) 腎支配神経節細胞の順行性標識と神経終末の同定

腎臓を支配する交感神経節を順行性に標識し、腎実質におけるターゲットを明らかにすることを試みた。腎支配の主神経節のひとつである SrG について、蛍光タンパク質をコードする遺伝子を有するプラスミド(pCAGGS-TdTomato)をエレクトロポレーション法にて導入した。腎臓は固定後に薄切片し、蛍光標識された神経終末を追跡した。

(3) 腎臓上皮細胞における AChRs および ADRs の発現

腎臓における自律神経系の作用経路を明らかにするため、腎臓上皮細胞における各種受容体発現解析を行った。マウス腎上皮細胞モデルである M-1 細胞について、各種ムスカリン性 AChRs および ADRs の発現を RT-PCR 法およびウェスタンブロットを用いて観察した。また、それらを腎組織上にて免疫組織化学的に確認した。

(4) 腎神経を温存した I/R モデルラットの作成と腎傷害にともなう自律神経関連因子の発現

従来の単純結紮法では腎動脈周囲の腎神経叢を傷害してしまう恐れがあるため、予め腎神経を動脈周囲より剥離・養生しておき、腎動脈のみを結紮して I/R 術を行うことを試みた。虚血時間は 45 分とし、一定時間後に腎組織を採材した。腎組織は HE 染色、PAS 染色、およびワンギーソン染色を施し、組織の病理進行および線維化を観察した。さらに ADRs および AChRs の発現を免疫組織化学的に観察した。

4. 研究成果

(1) 腎支配神経の交感神経節における細胞分布

本研究で用いたマイクロカプセルによる特異的神経標識法により、トレーサーの漏洩を防ぎ、かつ長時間の暴露が可能になった。その結果、腎神経の主要な交感神経節は、椎前神経節群では大内臓神経上に集塊する腎上神経節(SrG)に、椎傍神経節群(交感神経幹)では T12 および T13 にあることが示された。よって従来考えられてきた腹腔神経節や腎動脈神経節は副次的な神経節であることが示唆された。また、副交感神経系の神経核群には標識細胞は観察されなかったことから、腎神経叢には副交感神経線維は含まれていないことが示唆された。

さらに左腎吻側部と尾側部にそれぞれ FG を注入し、腎投射主要神経節における標識細胞の分布を調べた。その結果、腎吻側部注入群では SrG に、尾側部注入群では T13 に標識細胞が観察された。異なる蛍光で標識された CTb トレーサーによる二重標識でも FG 注入実験と同じ傾向が示された。また、二重標識された細胞は観察されなかった。以上から、腎吻側部および尾側部に投射する神経細胞には腎区域対応傾向があることが示唆された。

(2) 腎交感神経節細胞の投射終末について

ラット左側 SrG ニューロンを順行性に蛍光標識し、腎臓内におけるその終末を観察した。その結果、蛍光標識された神経線維は、腎動脈に沿って腎吻側部実質内に進入し、細動脈や尿細管間質に結節状構造を呈して分布していた。このことから、左側 SrG ニューロンは左側腎吻側部実質を支配する交感神経であることが示され、腎セグメントに対応した交感神経節ニューロンの支配を確認することができた。また、この技術を用いることにより、腎区域特異的に遺伝子導入できる技術の可能性を示唆した。

(3) 腎臓上皮細胞における AChRs および ADRs の発現

腎上皮細胞モデルとして M-1 細胞を用い、自律神経系関連受容体の発現を検討した。M-1 細胞は集合管上皮マーカーのひとつである AQP6 を優位に発現していることから、その性質は集合管介在細胞の形質を示した。M-1 細胞にはムスカリン性 AChR のサブタイプとして m1, m4 および m5 の mRNA が、ADRs では 2 および 1 サブタイプ mRNA の発現が確認された。腎組織上における免疫組織化学では、m1 および 1 の発現が介在細胞にみられたことから、介在細胞による酸塩基平衡機能に自律神経系が関与する可能性が示唆された。

(4) 腎神経を温存した腎虚血/再灌流 (I/R) モデルラットの作成と自律神経関連因子の発現

腎傷害にともなう自律神経系の活動変化を観察するために腎神経叢を温存した I/R モデルの作出を試みた。I/R 腎は対照群に比べ、術後 4 日目まで有意に間質線維化領域が広がった。線維化は外髄質が最も多く、直血管周囲に異常が認められた。尿細管においては I/R 処置後 2 時間で尿円柱が認められ、24 時間で上皮性円柱が増加した。そして線維化進行とともに退縮尿細管が明確になった。神経関連因子は、術後 4 日目チロシン水酸化酵素陽性線維の反応が強まったが、I/R 後 16 週では差は認められなかった。ADRs および AChRs については I/R 処置による発現の差は認められなかった。以上から、腎 I/R による病態生理学的進行は受容体の発現変化よりも交感神経活動亢進が主動因子となり、特に直血管への

影響がその要因になると考えられた。また、本モデル動物は腎臓の病態にともなう腎神経系の影響を観察するために有効であることが示唆された。

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 4 件)

1. 前田誠司: 腎支配神経の神経節分布について. 自律神経, 査読有, 51(3): 163-167, 2014. [DOI: なし]

2. Maeda S, Kuwahara-Otani S, Tanaka K, Hayakawa T, Seki M. Origin of efferent fibers of the renal plexus in the rat autonomic nervous system.. J Vet Med Sci 査読有, 76:763-765. 2014. [DOI: 10.1292/jvms.13-0617]

3. Jun JG, Maeda S, Kuwahara-Otani S, Tanaka K, Hayakawa T, Seki M. Expression of adrenergic and cholinergic receptors in murine renal intercalated cells. J Vet Med Sci. 査読有, 2014. [DOI: 10.1292/jvms.14-0315]

4. Hayakawa T, Kuwahara-Otani S, Maeda S, Tanaka K, Seki M. Brain-derived neurotrophic factor immunoreactive vagal sensory neurons innervating the gastrointestinal tract of the rat. J Chem Neuroanat 査読有, 61-62C:83-87. 2014. [DOI: 10.1016/j.jchemneu.2014.07.004]

[学会発表](計 6 件)

1. 前田誠司, 湊 雄介, 大谷佐知, 田中宏一, 八木秀司. 神経温存腎虚血/再灌流モデルラットにおける組織傷害と自律神経関連因子の発現について. 第 121 回日本解剖学会総会 2016. パレット福島(福島県・郡山市).

2. 前田誠司, 湊 雄介, 大谷佐知, 田中宏一, 早川徹, 八木秀司. Differential distribution of the renal nerve cells in the rat kidney. 第 91 回日本解剖学会近畿支部学術集会. 2015. 京都工芸繊維大学(京都府・京都市).

3. Maeda S, Kuwahara-Otani S, Tanaka K, Hayakawa T, Seki M. Differential innervation of the efferent nerves in the rat testis. 第 120 回日本解剖学会総会 2015. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

4. Maeda S, Kuwahara-Otani S, Tanaka K, Hayakawa T, Seki M. Neuronal and non-neuronal regulation of the functions of the nephron in the kidney. 4th International symposium on non-neuronal

acetylcholine. 2014. Giessen, Germany.

5. 前田誠司、大谷佐知、田中宏一、早川 徹、
関 真. ラット腎支配神経の交感神経節におけ
る細胞分布. 第 119 回日本解剖学会総会.
2014. 自治医科大学(栃木県・宇都宮市).

6. 前田誠司、大谷佐知、田中宏一、早川 徹、
関 真. ラット腎神経の神経節細胞の分布. 第
66 回日本自律神経学会総会. 2013. ウィンクあ
いち(愛知県・名古屋市).

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