

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08501

研究課題名(和文)腎臓の正常時および病態時における交感神経終末の分布様式とその機能制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of sympathetic nerve endings distribution patterns and their functional control in normal and pathological conditions of the kidney

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の傷害時には腎交感神経の活動亢進が起こり、腎機能障害を増悪することが知られている。しかしながら腎交感神経終末の特性や、腎傷害における変移は明らかではない。本研究では腎神経終末の微細構造や分子群を調べ、さらに腎神経を温存した虚血/再灌流(I/R)モデル動物を作出した。単独標識された腎交感神経線維は、非標識交感神経とともに線維束を形成し、血管平滑筋や尿細管へと軸索瘤終末を形成しながら投射していた。これらの終末はインテグリン 4 1により基底膜フィブロネクチンと接着していた。腎神経温存ラットは、従来法と比べ実験的I/R処置による腎神経への影響が少なく、本研究におけるモデルとして有用であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓の交感神経は体液の浸透圧調節をはじめ、血圧調節などに重要である反面、その活動亢進により腎機能障害の増悪や高血圧を引き起こす要因にもなる。本研究は、投射の複雑な腎臓の交感神経終末構築の微細形態および分子生物学的基盤を明らかにしつつ、傷害腎モデル動物の作出を試みたものである。本研究で得られた基礎的なデータは、複雑な腎臓の自律神経支配のメカニズムの解明に役立つのみならず、腎交感神経をターゲットとした高血圧治療や腎移植時の腎神経再生誘導などに応用できるだろう。

研究成果の概要(英文)：It is known that renal sympathetic hyperactivity occurs during kidney injury and exacerbates renal dysfunction. However, the properties of renal sympathetic nerve terminals and the transitions during injury is still unclear. In this study, the fine morphology and molecular property of the maintenance of rat renal sympathetic nerves are examined. Furthermore, we tried to prepare the ischemia/reperfusion (I/R) rats preserving their renal nerves. Single-labeled renal sympathetic nerve axon formed a nerve bundle with unlabeled-axons and projected into vascular smooth muscle and tubules while forming axonal varicosities. These endings were attached to the basement membrane fibronectin by the integrin 4 1. RNP rats were useful as a model in the present study because the experimental I/R treatment had less effect on the renal nerves than the conventional 2 kidney 1 clipping method.

研究分野：解剖学 組織学 神経科学

キーワード：腎臓 交感神経系 神経終末 シュワン細胞 インテグリン 自律神経系 腎傷害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

体液の恒常性維持や血圧調節に関わる腎臓の機能は、内分泌系のみならず自律神経系によっても調節されている。腎機能を支配する腎神経は、交感神経からなる遠心性線維とこれに伴行する求心神経があり、これらは中枢神経系を介する腎 - 腎反射や腎 - 心臓反射回路により、全身性の体液浸透圧や血圧調節に関与する (DiBona ら, 2010;他)。腎臓の交感神経は、血管平滑筋の収縮、尿細管各部における原尿の再吸収増加、そして傍系球体細胞におけるレニン分泌の促進など、多くの標的細胞の機能に関わる。しかしながら、これら個々の標的細胞への作用に加え、それぞれの機能に対する特異性や感度などの調節機構については不明な点が多い。

また、腎臓が傷害を受けた際に、腎交感神経の活動亢進が起こり、これにより尿細管のアポトーシスや間質の線維化が促進され、組織傷害の程度が進行することが腎機能障害や高血圧などの増悪要因となる。慢性の高血圧や急性腎傷害の際に外科的に腎神経を焼灼することが炎症の抑制に効果あることが報告されつつあるが、複数種の標的細胞に投射する多機能の交感神経に加え、伴行する求心神経も同時に切断する焼灼法には、その効果および安全性において疑問もある (Olsen ら, 2015)。よって臨床的にも組織特異的な交感神経系のコントロールが重要となる。このため、腎支配神経の投射経路および各標的細胞に対する神経終末の機能形態的な情報が必要である。

腎交感神経は、主に下位交感神経幹神経節で節後ニューロンに乗換え、腹大動脈から腎動脈周囲にかけて神経叢をつくり腎臓へと進入する (Maeda ら, 2014;他)。モデル動物として使用されるラットの下位交感神経幹神経節は、横隔膜および大腰筋に隠れており、生体麻酔下で操作を加えることは困難であったが、腹部内蔵へ投射する大内臓神経上にみられる神経節 (腎上神経節) におよそ 20% の腎支配ニューロンが局在し、これらが腎頭側区域に分布することを明らかにしたことから (Maeda ら, 2014)、この神経節を用いることで、腎臓の交感神経に人為的操作を加えられる可能性が示唆された (前田ら, 第 159 回日本獣医学会総会, 2016)。

### 2. 研究の目的

腎交感神経は腎臓内において、血管平滑筋、尿細管、そしてレニン分泌細胞など、多くの標的細胞に投射するが、腎支配ニューロンの分布と標的特異性については不明である。腎神経は下位交感神経幹神経節および腹腔神経節のサテライト神経節である腎上神経節に細胞体が分布しており、これらの分布は腎区域に特異性をもつことが明らかとなったことから、さらに単一の節後ニューロンが、どのような分布経路をとるのかを検討した。一方で、交感神経は軸索上に断続的にみられる膨隆 (軸索瘤) を形成し、標的細胞上を通過する過程でノルアドレナリン (NA) などの神経伝達物質を放出するとされる。しかしながら、その終末の特異的な構築様式などはほとんど明らかではない。よって腎交感神経終末と標的細胞のシナプス結合について、その詳細を超微細形態的に明らかにした。

さらに、腎虚血傷害時の交感神経活動亢進における神経終末の形態の変化の病態生理学的特徴を明らかにするために、虚血/再灌流 (I/R) モデルとして知られる 2 kidney- 1 clipping 法を改変した、腎動脈に伴行する腎神経を刺激せずに温存させたラット (RNP ラット) を作出し、その病理形態的特徴を観察した。

よって、以下の研究目標を設定した。

- 1) 腎上神経節ニューロンの腎臓内における投射経路とその分布
- 2) 腎交感神経終末の各標的細胞への投射様式と微細形態
- 3) 腎交感神経終末維持に関与する分子構成について
- 4) 腎神経を温存した新たな腎 I/R モデル動物の作出

### 3. 研究の方法

#### 1) 腎上神経節ニューロンの腎臓内における投射経路とその分布

腎上神経節ニューロンの腎臓内での分布を明らかにするために、腎上神経節への蛍光タンパク質遺伝子の導入を試みた。蛍光タンパク質遺伝子をコードするベクター (pCAGGS-td-Tomato) をエレクトロポレーション法により、SD ラットの腎上神経節細胞に導入した。腎組織および、腎神経を含む腹腔・上腸間膜動脈神経節を大動脈とともに摘出し、蛍光顕微鏡下でその経路を追跡した。また、腎組織切片を作成し、チロシン水酸化酵素 (TH) に対する抗体を用いた免疫組織化学法により、td-Tomato 陽性神経線維との二重標識をおこない、複数の細胞体由来の軸索の神経束における関係も観察した。

#### 2) 腎交感神経終末の各標的細胞への投射様式と微細形態

腎交感神経終末の軸索瘤における標的細胞とのシナプス構築について、免疫組織化学法および免疫電顕法を用いて明らかにした。SD ラットは深麻酔下にて灌流固定を行い、スクロースによる凍結保護後に液体窒素により急速凍結した。腎組織は凍結切片を作成し、免疫組織化学に供した。一次抗体は、抗 TH 抗体、抗シナプトフィジン (SYN) 抗体、および抗 S-100 タンパク質抗体を用いた。これら抗体による単染色もしくは多重染色を行い、蛍光標識した二次抗体に反応後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

さらに、免疫電顕観察用組織片は、腎組織を上記一次抗体で単染色し DAB にて発色させ、

オスミウム後固定したものをエポキシ樹脂に包埋した。包埋組織は超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡にて観察した。

### 3) 腎交感神経終末維持に関与する分子構成について

腎神経終末の標的細胞への接着の分子機構を調べるために、基底膜接着分子であるインテグリンの検討を行った。各種インテグリンサブユニットに対する抗体を用い、腎組織への免疫反応の局在を観察した。そのうち腎神経に局在がみられたインテグリン 4 について、インテグリン 1、SYP、およびフィブロネクチン(FN)の多重染色を行った。反応後は共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。それぞれの蛍光反応の局在について ImageJ により計測した。

### 4) 腎神経を温存した新たな腎 I/R モデル動物の作出

SD ラットは深麻酔下で開腹し、腎動静脈を表出させた。腎動脈周囲の腎神経を含む血管外膜を丁寧に筋層から剥離し、極細シリコンチューブによるループを装着した。数日間養生後、再び開腹してシリコンループを絞扼することにより I/R 処置を行った(RNP 群)。虚血時間は45分間とし、再灌流後、時間(日)区分により組織損傷の程度を計測した。対照実験群として、開腹後シリコンチューブを装着し、虚血処置を施さなかった群(CTL 群)およびシリコンループを取り付けずに従来の I/R 処置を施した実験群(DAC 群)を作成した。組織損傷の病理指標として、腎重量、変異尿細管の出現率、組織内マクロファージ(CD68+細胞)数、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)陽性筋線維芽細胞およびワンギーソン(VG)染色による線維化面積を計測し、各群と比較した。

## 4. 研究成果

### 1) 腎上神経節ニューロンの腎臓内における投射経路とその分布

蛍光顕微鏡観察下において、td-Tomato 陽性ニューロンは、腎動脈から弓状動脈にかけて、TH 陽性神経束として他の TH 陽性 td-Tomato 陰性ニューロンと同一の神経束を伴い腎実質内に進入していた。単独標識された個体においてニューロンの投射経路を追跡したところ、皮質内において小葉間動脈および細動脈上に数珠状の軸索瘤をもち、輸入細動脈では分枝したネットワーク状の分布を示し、側枝を出しながら腎小体を経て、尿細管基底側に達していた。また、これらの軸索瘤は SYP 陽性の神経終末であることが確認された。以上のことから、腎上神経節由来ニューロンは、腎皮質組織内において、細動脈、傍糸球体細胞、および尿細管になど複数の標的細胞に投射し、また、複数のニューロンがこれらの効果器を共同支配していることが示唆された。

### 2) 腎交感神経終末の各標的細胞への投射様式と微細形態

軸索瘤における SYP の分布をもとに、免疫電顕法を用いて終末部およびその周辺構造について観察した。SYP 陽性神経終末は、血管平滑筋細胞および尿細管上皮細胞の基底膜に付着していた。基底膜に対する接着面において、中枢神経などにみられるような電子密度の高い裏打ち構造などは認められなかったが、その接着部は基底膜表面に対して平面となり、また自由面は球状を呈していたことから、何らかの能動的な接着因子が関与している可能性が示唆された。一方、SYP と S-100 タンパク質の免疫組織化学では、動脈平滑筋にみられる神経終末が S-100 陽性シュワン細胞の細胞突起に覆われており、これらの軸索瘤は S-100 陽性シュワン細胞によって間質空間と区分されていた。SYP 陽性終末の一部が S-100 陽性の突起に開いた窓様の空隙から露出しており、その露出面は動脈平滑筋細胞に密着していた。このことから腎交感神経の軸索終末から分泌される NA などの伝達物質は、標的細胞に対して限局的に放出され、シュワン細胞の突起鞘により間質への拡散が抑制されるとともに、放出部位での NA の濃縮や方向性を決めるなどの調節が行われている可能性が示唆された。一方で、尿細管上皮細胞の基底膜に接着した神経終末は、しばしばシュワン細胞鞘を欠くが、その接着面は基底膜に能動的に密着していることから、軸索瘤神経終末の基底膜への接着はシュワン細胞による圧着ではなく、ニューロンが発現する接着分子と標的細胞基底膜分子の接着である可能性が示唆された。

### 3) 腎交感神経終末維持に関与する分子構成について

神経終末の形成には基底膜の細胞外マトリックス結合分子であるインテグリンが関与すると考えられるため、腎神経終末部に発現するインテグリン分子の検索を行った。これまで成体腎の交感神経終末におけるインテグリンの発現は検討されてこなかったが、各種インテグリンに対する特異抗体を用い免疫組織化学法にて検討したところ、インテグリン 4 サブタイプの局在が認められた。さらに、インテグリン 4 の免疫反応は、TH、SYP、およびインテグリン 4 とヘテロダイマーを形成するインテグリン 1 の免疫反応と共同在していた。また、インテグリン 4 1 のリガンドであるフィブロネクチンは、動脈平滑筋および尿細管上皮平滑筋にみられ、ImageJ により計測した分子間距離も極めて近かったことから、腎交感神経終末の標的細胞への接着は、インテグリン 4 1 (VLA-4) とフィブロネクチンによって維持されている可能性が示唆された。

#### 4) 腎神経を温存した新たな腎 I/R モデル動物の作出

腎虚血/再灌流(I/R)にともなう組織傷害への交感神経の影響を調べる目的で、腎神経温存 I/R モデル(RNP)ラットを作出した。RNP ラットでは、I/R 処置後、CTL 群と比較して変性尿細管数は有意に増加したが、7 日目以降では差は認められなかった。CD68+マクロファージ(M $\phi$ )は単位面積当たりの変性尿細管数に相関して変動した。一方、線維化の指数である  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の数と局在、および VG 染色陽性面積の比較では、I/R 後 4 日目以降で線維化面積が有意に増加するのに従い、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞の線維化部位への集積が認められた。このことから、変性尿細管の修復に M $\phi$  が関与し、その後の線維化に筋線維芽細胞が関与することが示唆された。一方、このモデルの有効性を確認するために直接腎動脈を絞扼した従来の 2 kidney-1 clipping モデル(DAC)との比較を行った。両者の虚血側腎の傷害の程度に差は認められなかったが、対側腎との相対重量比では I/R 後 72 時間において RNP 群で値が有意に大きくなった。腎 TH の発現量を Western Blot にて確認したところ、I/R 直後の DAC 群で虚血腎 TH 量が有意に高く、また対側腎 TH が有意に低い値となった。以上から、I/R モデルにおいて、従来法は I/R 直後に処置側の腎神経が過剰に刺激され、また対側腎にも影響を与えたと考えられる。よって腎傷害における交感神経機能の解析には RNP モデルが有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Maeda Seishi, Fujihira Mayumi, Minato Yusuke, Kuwahara-Otani Sachi, Tanaka Koichi, Hayakawa Tetsu, Yagi Hideshi | 4. 巻<br>300             |
| 2. 論文標題<br>Differential Distribution of Renal Nerves in the Sympathetic Ganglia of the Rat                                | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>The Anatomical Record   | 6. 最初と最後の頁<br>2263-2272 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/ar.23680   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>前田 誠司、堀 日和、湊 雄介、大谷 佐知、八木 秀司 |
| 2. 発表標題<br>腎臓における交感神経終末の分布様式とその形態について  |
| 3. 学会等名<br>第124回日本解剖学会総会               |
| 4. 発表年<br>2019年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Seishi Maeda, Mayumi Fujihira, Yusuke Minato, Sachi Kuwahara-Otani, Hideshi Yagi.  |
| 2. 発表標題<br>Innervation of suprarenal ganglion neurons to the visceral organs ~Anterograde and retrograde tracing study in the rat sympathetic nerves. |
| 3. 学会等名<br>第40回日本神経科学学会大会   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>前田 誠司、藤平 真弓、堀 日和、湊 雄介、大谷 佐知、八木 秀司                   |
| 2. 発表標題<br>ラット虚血/再灌流傷害腎における2 kidney-1 clipping法の腎神経温存法と従来法との比較 |
| 3. 学会等名<br>第123回日本解剖学会総会                                       |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>S. MAEDA, M. FUJIHIRA, H. HORI, Y. MINATO, S. KUWAHARA-OTANI, H. YAGI   |
| 2. 発表標題<br>Morphological and molecular characteristics of renal sympathetic nerve endings attached to multi-effector modules |
| 3. 学会等名<br>Neuroscience 2019 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>前田誠司、堀 日和、湊 雄介、大谷佐知、八木秀司          |
| 2. 発表標題<br>成体ラット腎臓における神経終末の構造およびインテグリンの発現と分布 |
| 3. 学会等名<br>第125回日本解剖学会総会                     |
| 4. 発表年<br>2020年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 連携研究者 | 湊 雄介<br><br>(Minato Yusuke)<br><br>(00710245) | 兵庫医科大学・医学部・助教<br><br><br><br>(34519) |    |