

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06415

研究課題名(和文)腎支配交感神経終末の機能形態学的構築とその病態生理学的変移の解析

研究課題名(英文) Analysis of the functional morphology of the renal sympathetic nerve terminals and their pathophysiological changes

研究代表者

前田 誠司 (Seishi, Maeda)

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎交感神経終末におけるシュワン細胞の特徴的な形態に着目し、神経終末・シュワン細胞・動脈平滑筋の三者間の形態的解析とその構築に関わる接着分子の探索を行った。腎神経終末の細動脈部では尿細管部と異なり、軸索を覆うシュワン細胞突起の神経終末部が窓のように標的側に開口していた。また、ラットシュワン細胞IFRS1細胞のRNA発現リストを元にNG2/CSPG4の発現分布を確認したところ、終末シュワン細胞で付近でNG2/CSPG4の局在が欠如していた。以上のことから、腎神経終末においてニューロン・シュワン細胞・標的細胞の三者間シナプス構築を支持する接着分子群の構成が交感神経作用に影響する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓を支配する交感神経は全身性の血圧や体液浸透圧の調節に重要である。また病的には交感神経の活動亢進により組織炎症の拡大や間質線維化を誘発し、腎機能低下をまねく。しかしながら糸球体や尿細管を含む複雑な構成をもつ腎臓組織において、交感神経の活動を制御する支持細胞の機能は不明であった。本研究は腎交感神経のシュワン細胞がその形態的特徴により腎機能調節へ関与することを示唆したものであり、ここで得られた基礎データがさらに病理解析に発展していき、最終的には臨床的にも重要な知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the characteristic morphology of Schwann cells in renal sympathetic nerve endings, we conducted morphological analysis of nerve terminal-Schwann cell-arterial smooth muscle, and searched for adhesion molecules involved in their construction. On the arterioles, unlike on the basal of the renal tubular regions, the nerve endings of the Schwann cell processes covering the axonal varicosities were open to the target side like a window. In addition, the distribution of NG2/CSPG4 which was picked up from the list based on the RNA expression of rat Schwann cells IFRS1 cells was examined by the immunohistochemistry and the immune-electron microscopy. As the result, the localization of NG2/CSPG4 was absent near the terminal Schwann cell window and was characterized by compositions of adhesion molecules. These results suggest that the composition of adhesion molecules supporting the tripartite synaptic architecture may influence the renal sympathetic nerve functions.

研究分野：神経解剖学

キーワード：腎臓 交感神経 シュワン細胞 自律神経系 組織化学

1. 研究開始当初の背景

腎臓を支配する腎神経は、全身性の血圧調節や体液浸透圧の調節に重要である。腎臓の交感神経は軸索上に数珠状に多数の膨隆終末(軸索瘤 varicosities)をもち、標的細胞に対し多くの終末をつくる(Barajas ら, 1984;他)。腎臓では交感神経刺激に対して、血管平滑筋、ネフロン各部、そしてレニン細胞などが標的となり、それぞれ異なる感受性をもって調節を行っていることが知られているが(DiBona ら, 1979;他)、腎臓の個々の標的細胞に対する投射特性をはじめ、神経終末の機能形態に関する基礎的データは乏しい。一方、高血圧や糖尿病などに伴う腎傷害において、交感神経の活動亢進が、組織炎症の拡大や間質線維化を誘発し、さらなる腎機能障害の増悪をまねく。臨床的には、腎神経のアブレーションなどの外科的除神経による治療の効果が期待されているものの(Esler ら, 2010;他)、腎臓特有の狭小なネフロン間質において、多様な標的細胞への作用機序は明らかではなく、多種の神経線維が混在する腎神経叢除去による、長期的な安全性についての問題も指摘されている(Olsen ら, 2015;他)。よって、より特異的な腎交感神経活動を制御する技術の開発が必要とされる。

近年、従来のシナプス前後の神経伝達物質による細胞間コミュニケーションに加え、グリア細胞がペリシナプスとして機能をもつ、「三者間シナプス」による調節機構が知られ(Araque ら, 1999)、末梢神経においても神経筋接合部のシナプス近傍のシュワン細胞がこれに相当すると注目されている(Court ら, 2008; 他)。しかしながら、自律神経系の無髄シュワン細胞のこうしたペリシナプス機能については詳細な報告はなく、軸索瘤終末との機能的関係は不明である。一方で、シュワン細胞が組織傷害に対する一次応答細胞として、神経再生やシナプス再構築に重要な働きをすることは知られている(Webber と Zochodne, 2010)。よって交感神経の無髄シュワン細胞も神経保護・維持および伝達制御の機能をもつと考えられ、シュワン細胞も含めた軸索瘤終末のシナプス構築の機能形態的意義を知り、病態時のシュワン細胞の応答性と終末の機能亢進との関連を明らかにする必要がある。また、腎臓はアドレナリン受容体発現の種類や量が最も多い組織の一つであるが、その神経終末シナプスとの局在対応については情報が少なく、交感神経終末から放出されるノルアドレナリンのアドレナリン受容体への作用経路も明確ではなかった。

2. 研究の目的

これまで研究代表者らは、腎交感神経節における節後ニューロンの分布とその腎投射区域の対応を明らかにし、腎神経節後ニューロンへの特異的なトレーサー導入による終末端までの標識を可能にした。また、多様なエフェクターに囲まれた狭小な間質をもつ腎組織において、標的細胞に面した軸索瘤終末がシュワン細胞鞘の窓から露出させていることがわかった。こうしたニューロン終末、シュワン細胞、および標的細胞の三者間の関係はより機能的である可能性があり、シュワン細胞の「終末窓」が伝達物質放出の方向や濃度を調節しているという仮説のもと、腎交感神経終末のより詳細な形態的特徴を明らかにするとともに、末梢自律神経系の三者間シナプス機構の存在とその3次元的構築の重要性を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

1) ラット腎交感神経終末における細胞構築の超微細形態的観察とアドレナリン受容体の局在

腎交感神経の終末の形態を透過型電子顕微鏡で観察し、その局在における形態の多様性を観察し、シナプスを形成する標的細胞に発現する各種アドレナリン受容体(AR)の局在を免疫組織化学法にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて詳細に観察した。ARのサブタイプは、1A-, 1B-, 1D-, 2A-, 2B-, 2C-, 1-, および 2-AR で、神経終末のマーカーとして抗シナプトフィジン抗体を、シュワン細胞のマーカーとして抗S-100B抗体によって可視化した。

2) ラットシュワン細胞における細胞接着分子群の遺伝子発現の検索

複雑な細胞構成をもつ腎臓組織における、特定細胞における遺伝子発現を検索することは困難であった。よって、シュワン細胞の発現する遺伝子群を、細胞の未分化期と突起伸長により立体構築された分化期を比較することで、ターゲットとする接着分子の候補の選別を行った。ラットシュワン細胞由来培養株である IFRS1 細胞は培養条件により髄鞘もしくは Remak 束様形態に分化可能である。本研究では IFRS1 細胞の細胞増殖期とより細胞接着の進行した成熟期に分化させた2群に分け、次世代シーケンサーによりその基本的なmRNA プロファイルを作成し2群比較を行った。主に細胞外基質成分である、ラミニン、フィブロネクチン、およびコラーゲン類とその細胞接着に關与するインテグリンやプロテオグリカンを検索対象遺伝子とし、分化成熟により発現が増強するものを選別した。

3) ラット腎臓の細動脈に分布する神経終末における NG2/CSPG4 の局在

先行研究である脾臓神経のシュワン細胞およびラットシュワン細胞培養細胞株 IFRS1 の mRNA 発現プロファイルを元に、プロテオグリカン NG2/CSPG4 およびその主たるリガンドである Ⅱ型コラーゲンをターゲットに選択し、その発現と分布を In situ ハイブリダイゼーション法、免疫組織化学法、免疫電顕法観察した。

4. 研究成果

1) ラット腎交感神経終末における細胞構築の超微細形態的観察とアドレナリン受容体の局在
透過型電子顕微鏡下で観察したラット腎臓の神経終末は、組織内の動脈系において、軸索はシュワン細胞で覆われており、より遠位の尿細管基底膜部において軸索や神経終末である軸索瘤はシュワン細胞鞘が疎らで表出していた。小葉間動脈および輸入細動脈壁におけるシュワン細胞は軸索を覆い、軸索瘤神経終末においてのみ動脈平滑筋に向けて窓を開放していた。これらの形態は、細動脈にシナプスをつくる神経終末軸索瘤において、血管壁および輸入細動脈中への NA 放出が集中的に行われるのに対し、より遠位の尿細管基底膜部では、en passage に拡散するように NA 放出が行われる可能性を示唆している。

各種 ARs の分布とシナプトフィジン陽性神経終末の関係について検討した結果、AR の発現は主に動脈平滑筋(2_A, 2), 系球体細胞(1_D, 2), 尿細管基底膜部(1_A, 2_B, 1)および同管腔部(1_B, 1_D, 2), および神経終末(2_C)にみられ、特に 1_B-, 1_D-, および 2-AR のように系球体細胞および尿細管の管腔部に局在する受容体については、神経終末終末が局所的に投射できない場であることから、細動脈のシナプスから放出された NA が血管壁を通じて血漿中に浸潤し作用するものと推定された。この結果は腎臓のおよそ 70%の交感神経投射が輸入細動脈に集中していることや(Barajas ら, 1992)、尿中の NA が腎臓内交感神経由来であること(Goldstein ら, 1983; Johnson ら, 1979)からも裏付けされる。この結果は、輸入細動脈の神経終末が尿細管等の終末と異なり、シュワン細胞の終末窓により放出の方向性や濃度を調節されているという仮説を裏付けるものである。上記の成果は、国際誌 Journal of Histochemistry and Cytochemistry に投稿し掲載された。

2) ラットシュワン細胞における細胞接着分子群の遺伝子発現の検索

ラットシュワン細胞株である IFRS1 細胞を用い、その未分化期と分化期を比較した結果、ラミニニン、フィブロネクチン、コラーゲン等の細胞外基質成分をリガンドとする接着分子群として、インテグリン(6, 7, 8, v, 1, b3, 4, 5, 8)およびプロテオグリカン(Cspg4)が高い TPM 値を示した。また、それぞれに対応するリガンドとともに免疫組織化学法により腎臓組織上での分布を確認したところ、NG2/CSPG4 と Ⅱ型コラーゲンの特徴的な分布が輸入細動脈壁で観察されたことから、これらの詳細を検討した(後述)。また、その他のインテグリンについてもさらに検討を行っている。

3) ラット腎臓の細動脈に分布する神経終末における NG2/CSPG4 の局在

ラット腎臓組織において、NG2/CSPG4 の免疫反応は細動脈平滑筋細胞とシュワン細胞の血管外膜接着部位に分布しており、その間に Ⅱ型コラーゲンが分布していた。In situ ハイブリダイゼーション法により、Cspg4 mRNA の発現がこれらの細胞にみられ、また Col6a mRNA が線維芽細胞に強く発現しており、シュワン細胞には少量確認できた。このことから、細動脈壁における神経終末の接着は、主に線維芽細胞が産生した Ⅱ型コラーゲンに対し、シュワン細胞および血管平滑筋が NG2/CSPG4 を発現することによって維持されていることが示唆された。さらに免疫電顕法にて NG2/CSPG4 の局在を詳細に観察したところ、シュワン細胞の終末窓付近において分布の欠如がみられ、また、平滑筋においてもシナプス形成部には NG2 の空白部がみられた。このことは、腎交感神経のシナプス部において、細胞外基質とその受容体構築が分子レベルで異なっていることを示唆するものである。以上の結果は、第 128 回および第 129 回日本解剖学会総会(2023 年, 仙台; 2024 年, 那覇)にて発表した。

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 Maeda Seishi, Minato Yusuke, Kuwahara-Otani Sachi, Yamanaka Hiroki, Maeda Mitsuyo, Kataoka Yosky, Yagi Hideshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Morphology of Schwann Cell Processes Supports Renal Sympathetic Nerve Terminals With Local Distribution of Adrenoceptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 495 ~ 513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/00221554221106812	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田誠司, 佐久間理香, 湊 雄介, 大谷佐知, 八木秀司
2. 発表標題 腎交感神経軸索終末部におけるNG2/CSPG4の発現と三者間シナプス構築について
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田誠司, 佐久間理香, 湊 雄介, 大谷佐知, 八木秀司 1
2. 発表標題 ラット腎神経終末におけるNG2/CSPG4と 型コラーゲンの発現と局在
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	湊 雄介 (Minato Yusuke) (00710245)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------