

脳腎連関を介した腎疾患制御機構

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学

井上 剛

1. 背景・目的

腎臓の線維化に特徴づけられる慢性腎臓病 (CKD) は、昨今の高齢化社会や生活習慣の欧米化に伴って世界的に急増しており、本邦でも現在2,000万人 (成人5人に1人) の慢性腎臓病患者が存在する (日本腎臓学会)。慢性腎臓病が進行し、末期腎不全となると血液透析などの腎代替療法が必要となるが、本邦での現在の透析医療費は年間1兆6000億円に上ると推計されており (2019年現在)、これは総医療費の4%を占める。残念ながら腎臓病の根本的な治療法はいまだに存在せず、新たな治療法の開発は喫緊の課題であり、新たな視点からの治療法探索が非常に重要であると考えられる。

我々はこれまでに、神経系 (自律神経および神経細胞) -免疫系を介した腎臓保護作用メカニズムについて、数々示すことを見出してきており、本分野で世界をリードしてきた¹⁻⁶。本研究では、我々がこれまで得た知見および蓄積したデータを踏まえ、神経が直接的に腎臓へと作用する脳腎連関を介した腎疾患制御機構の解明を目指す。

2. 方法

動物実験では7-10 週齢の野生型マウス (C57BL/6J)、近位尿管特異的 β 2 アドレナリン受容体ノックアウトマウス (Sglt2Cre: β 2ARflox/flox)、交感神経特異的チャンネルロドプシン発現マウス (DbhCre:ChR2) を使用した。いずれのマウスも雄を使用した。腎障害モデルとして両側側虚血再灌流障害 (26分間虚血、直腸温 35.0 ± 0.5 °C) を、敗血症モデルとしてLPS腹腔内投与 (5 mg/kg) を行なった。交感神経刺激として β 2 アドレナリン受容体アゴニスト (サルブタモール) (15 mg/kg) 腹腔内投与および腎交感神経光刺激 (20Hz、5V、片側5分間ずつ) を行なった。腎臓における免疫細胞数の評価にはフローサイトメーター (AttuneNxT 3レーザー) および組織免疫染色を使用した。腎臓の障害は、血漿クレアチン・尿素窒素 (BUN)、腎臓組織 (PAS染色)、PAS染色による急性尿管壊死の程度、急性腎障害のマーカーであるKim-1の腎臓での発現レベルなどを用いて評価した。遺伝子発現網羅的解析として、腎臓を用いた1細胞遺伝子発現網羅的解析 (10X Chromiumを使用) を行なった。

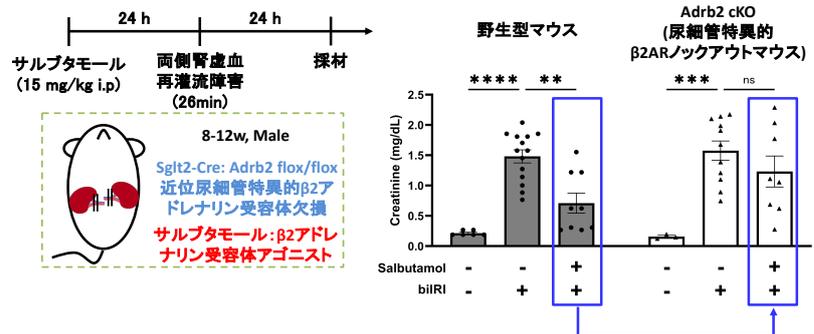


図1. 交感神経刺激による腎保護効果が尿管特異的 β 2 アドレナリン受容体欠損マウスでは軽減する

交感神経刺激として β 2 アドレナリン受容体アゴニスト (サルブタモール) (15 mg/kg) 腹腔内投与および腎交感神経光刺激 (20Hz、5V、片側5分間ずつ) を行なった。

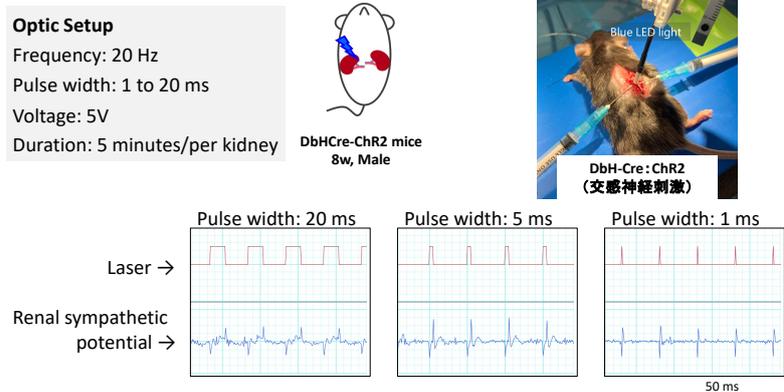


図2. 光による特異的神経刺激の手法の確立し、腎交感神経刺激を確認

3. 結果

脳腎連関を調べるために、まずは交感神経に着目し、交感神経神経伝達物質であるノルアドレリンの効果の評価を行なった。我々のこれまでの検討で、ノルアドレリンの受容体であるアドレナリン受容体の中でも $\beta 2$ アドレナリン受容体が重要であることを示しており、 $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニストを用いて検討を行なった。図1に示すように $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニスト投与を両側腎虚血再灌流障害の前日に投与することで、両側腎虚血再灌流障害による血漿クレアチニンの上昇が抑制され、腎臓が保護された。一方、これらの $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニストによる腎保護効果は、野生型マウスに比べ、近位尿細管特異的 $\beta 2$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスでは減弱しており、交感神経による腎臓保護効果発揮には近位尿細管特異的 $\beta 2$ アドレナリン受容体が重要であることが示唆された。

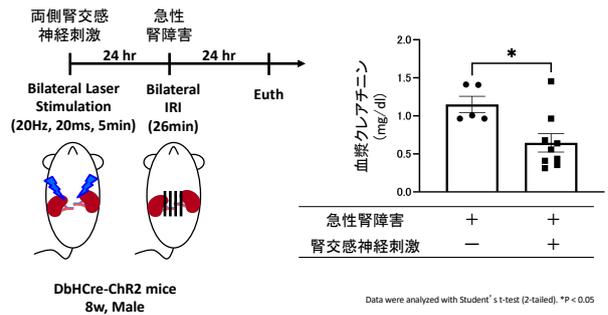


図3. 光による腎交感神経刺激によって腎臓が保護される

次に、腎臓交感神経の機能そのものを明らかにするために、交感神経特異的にチャンネルドプシンを発現させたマウスを作製し、腎臓交感神経を光によって特異的に刺激できる手法を確立した(図2)。図2下は腎交感神経の活動電位の記録になるが、光刺激のタイミングに合わせて腎交感神経が興奮していることが確認できた。そこで、本条件を用いて両側の腎交感神経を刺激し、翌日に両側腎虚血再灌流障害を行ったところ、図3に示すように、両側腎虚血再灌流障害による血漿クレアチニンの上昇が抑制された。これにより、一過性の腎交感神経が急性腎障害に対して腎保護効果を発揮することが明らかとなった。

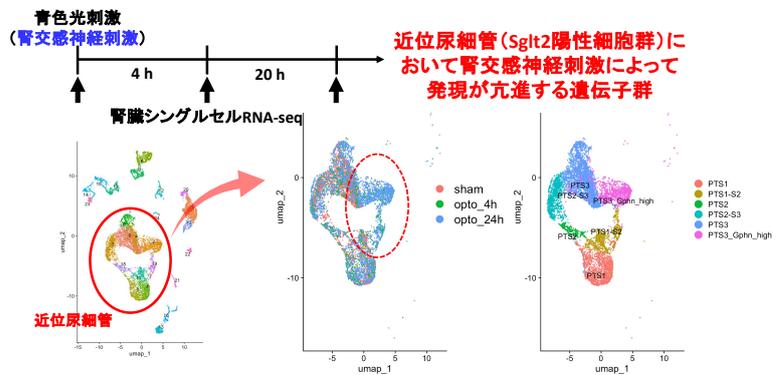


図4. 光による腎交感神経刺激によって新規尿細管細胞群が出現する

そこで、腎交感神経によって腎臓内で何が起きているか(腎臓内のどの細胞がノルアドレナリンを受け取り、どういった変化が起こるか)を明らかにするために、光による腎交感神経刺激後に経時的に腎臓のシングルセルRNA-seq解析を行った。その結果、腎交感神経刺激を行う前には認めなかった細胞群が近位尿細管において出現することを見出すことができた(図4)。これは、腎交感神経刺激に伴って、近位尿細管において、遺伝子発現パターンが変化していることを示唆していると考えられ、

どういった遺伝子群の発現変化を認めるかの解析を行なった。図5は、腎交感神経刺激に伴って、近位尿細管において遺伝子発現変化を認めた遺伝子群のenrichment解析である。ミトコンドリアにおけるNADHデヒドロゲナーゼ関連の遺伝子の発現変化を認めており、腎交感神経刺激によって近位尿細管におけるミトコンドリアの好氣的エネルギー代謝が変化することが明らかとなった。

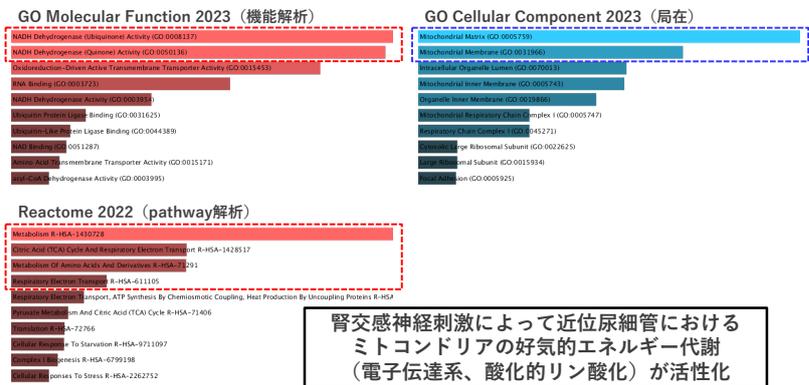


図5. 腎交感神経刺激を受けた近位尿細管におけるEnrichment解析

腎交感神経刺激によって近位尿細管におけるミトコンドリアの好氣的エネルギー代謝が変化することが明らかとなった。

4. 考察

我々は以前に、交感神経刺激によってマクロファージの形質が変化することで、尿細管保護が起こるメカニズムに関して明らかにしてきた。しかしながら、腎臓は交感神経支配が非常に豊富な臓器であり、腎交感神経による腎臓への直接的な影響を検討する必要があった。これまでも腎臓交感神経による腎機能調整に関して多くの研究がなされてきたが、これまでの神経刺激手法には特異性の点でいくつかの問題点があった。電気による腎交感神経刺激では神経の求心路および遠心路のいずれも同時に刺激してしまうこと、薬物による交感神経刺激では特定の神経のみを刺激できないことなどが挙げられる。そこで、これらを解決し得る手法として今回我々はオプトジェネティクスの技術を導入し、腎臓交感神経の特異的刺激によって急性腎障害から腎臓が保護されることを世界で初めて見出すことができた。また、シングルセルRNA-seqを組み合わせることによって、これまでに明らかにされていなかった腎臓交感神経による腎臓恒常性維持機構の一端を明らかにすることができた。

現在はこれらの機能のさらなる解明や分子メカニズムを明らかにするために、研究を推進しており、脳腎連関を介した腎恒常性維持機構、腎疾患制御機構の新たな解明を目指している。

5. 引用文献

1. Inoue, T., Abe, C., Sung, S.S., Moscalu, S., Jankowski, J., Huang, L., Ye, H., Rosin, D.L., Guyenet, P.G., and Okusa, M.D. (2016). Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through alpha7nAChR+ splenocytes. *J Clin Invest* 126, 1939-1952. 10.1172/JCI83658.
2. Abe, C., Inoue, T., Inglis, M.A., Viar, K.E., Huang, L., Ye, H., Rosin, D.L., Stornetta, R.L., Okusa, M.D., and Guyenet, P.G. (2017). C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nat Neurosci* 20, 700-707. 10.1038/nn.4526.
3. Inoue, T., Abe, C., Kohro, T., Tanaka, S., Huang, L., Yao, J., Zheng, S., Ye, H., Inagi, R., Stornetta, R.L., et al. (2019). Non-canonical cholinergic anti-inflammatory pathway-mediated activation of peritoneal macrophages induces Hes1 and blocks ischemia/reperfusion injury in the kidney. *Kidney Int* 95, 563-576. 10.1016/j.kint.2018.09.020.
4. Tanaka, S., Abe, C., Abbott, S.B.G., Zheng, S., Yamaoka, Y., Lipsey, J.E., Skrypnik, N.I., Yao, J., Inoue, T., Nash, W.T., et al. (2021). Vagus nerve stimulation activates two distinct neuroimmune circuits converging in the spleen to protect mice from kidney injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118. 10.1073/pnas.2021758118.
5. Hasegawa, S., Inoue, T., Nakamura, Y., Fukaya, D., Uni, R., Wu, C.H., Fujii, R., Peerapanyasut, W., Taguchi, A., Kohro, T., et al. (2021). Activation of Sympathetic Signaling in Macrophages Blocks Systemic Inflammation and Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol* 32, 1599-1615. 10.1681/ASN.2020121723.
6. Nakamura, Y., Matsumoto, H., Wu, C.H., Fukaya, D., Uni, R., Hirakawa, Y., Katagiri, M., Yamada, S., Ko, T., Nomura, S., et al. (2023). Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors signaling boosts cell-cell interactions in macrophages effecting anti-inflammatory and organ protection. *Commun Biol* 6, 666. 10.1038/s42003-023-05051-2.