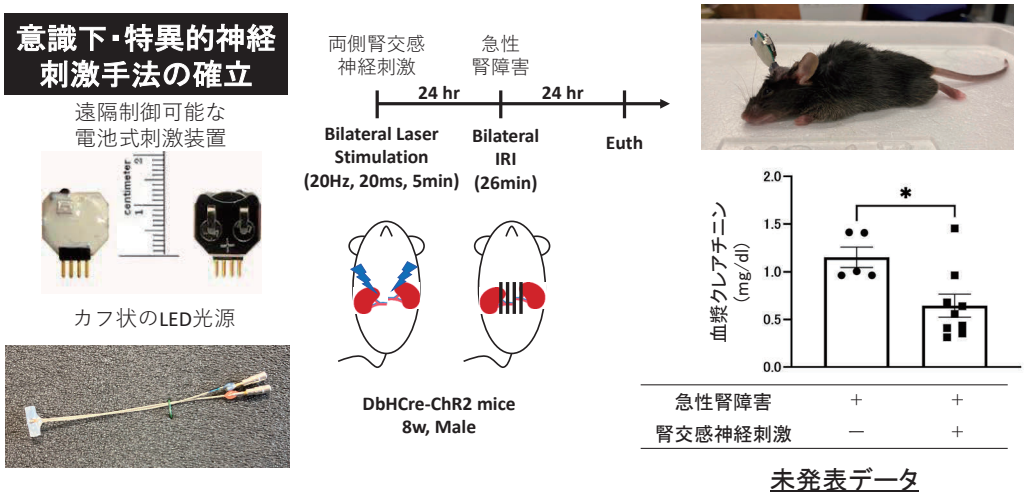
89　光による神経刺激法を用いた腎交感神経の機能解明	井上　剛

【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 1,330 万人（成人 8 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 6,000 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、数々見出してきており、本分野で世界をリードしてきた。本研究では、最新の論文報告に我々がこれまで得た知見および蓄積したデータ・確立した技術を踏まえ、腎交感神経による腎疾患制御機構に着目した。

【方法】オプトジェネティクスの手法を活用した腎交感神経の特異的刺激については、作製した遺伝子改変動物（交感神経特異的にチャネルロドプシン 2（ChR2）蛋白を発現させたマウス：DbHCre-ChR2 マウス）の雄マウスを使用した。急性腎障害モデルとして、両側腎虚血再灌流障害（ischemia-reperfusion injury：IRI）を使用した。光による腎交感神経刺激は、青色 LED 光源を腎門部に配置し、両側腎交感神経に光照射（5 Hz、20 ms、片側 5 分間ずつ）を行った。マウス腎臓における組織ノルアドレナリン濃度の測定には Mouse Noradrenaline（NA）ELISA Kit を使用した。細胞実験として HK2 細胞（ヒト近位尿細管細胞株）を使用し、細胞傷害を lipopolysaccharide（LPS）10 μg/ml を用いて誘導した。β2 アドレナリン受容体（β2AR）作動薬としてサルブタモールを使用した。データの解析に関しては、多重比較には一元配置分散分析を適用し、post-hoc 多重比較検定（Tukey's test）を行った。2 群間の比較には Student's t-test を使用した。

【結果】HK2 細胞に LPS とサルブタモールを同時に投与し、24 時間後に尿細管障害マーカーである Ngal の発現レベルを RT-qPCR で評価したところ、サルブタモールの濃度依存的に Ngal の発現が低下した。このことから、交感神経刺激による尿細管に対する直接的な保護作用が存在することが示唆された。そこで、オプトジェネティクスの技術を活用し、光による腎交感神経の特異的制御法を確立した。本手法を用いて、腎交感神経刺激による腎臓への影響を評価したところ、光による腎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が明らかとなった。

光による腎交感神経刺激によって腎臓が保護される



未発表データ

89. 光による神経刺激法を用いた腎交感神経の機能解明

井上　剛

長崎大学 大学院 医歯薬学総合研究科 内臓機能生理学

Key words：腎交感神経，オプトジェネティクス，腎障害

緒　言

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 1,330 万人（成人 8 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、最新の論文報告に我々がこれまで得た知見および蓄積したデータ・確立した技術を踏まえ、腎交感神経による腎疾患制御機構に着目した。我々はこれまでに交感神経刺激がマクロファージを介して腎臓を保護することを明らかにしてきた［6］。加えて、交感神経刺激（β2 アドレナリン受容体アゴニスト）が腎尿細管細胞に直接作用し、細胞保護効果を示すことを見出している。腎臓への交感神経支配は非常に豊富であり、体液量の調節・血圧の調節などの恒常性維持に大きく寄与していることが知られているものの、これまで研究に用いられてきた手法（電気による神経刺激や薬剤投与による神経刺激など）では特異性などに限界があり、腎交感神経を特異的に刺激することができなかったのが現状である。そこで、本研究では特定の神経を特異的に刺激することのできるオプトジェネティクスの手法を活用し、これまでに報告のない腎交感神経を光で特異的に刺激する手法を確立する。確立した本手法を用いて、腎障害モデルなどを組み合わせることにより、腎恒常性維持・腎臓保護において腎交感神経が果たす機能を明らかにする。

方　法

1. 動物実験

8〜12 週齢の雄野生型マウス（C57BL/6J）を使用した。オプトジェネティクスの手法を活用した腎交感神経の特異的刺激については、作製した遺伝子改変動物（交感神経特異的にチャネルロドプシン 2（ChR2）蛋白を発現させたマウス：DbHCre-ChR2 マウス）の雄マウスを使用した。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 染色による急性尿細管壊死の程度、急性腎障害のマーカーである Kim-1・Ngal の腎臓での発現レベルなどを用いて評価した。急性腎障害モデルとして、両側腎虚血再灌流障害（ischemia-reperfusion injury：IRI）を使用した。両側 IRI はこれまでに我々が行ってきた手法と同様の手法（両側腎動脈をクリップにより阻血：片側 26 分間ずつ）を用いて行った。

2. オプトジェネティクスを活用した青色光による腎交感神経刺激法

光による腎交感神経刺激は、以下の手法で行った。まず、混合麻酔（メデトミジン 0.3 mg/kg、ブトルファノール 5 mg/kg、ミダゾラム 4 mg/kg）の腹腔内投与により麻酔した後、背部より両側腎門部の腎動脈に沿って走

行する腎交感神経を露出した。次に、青色 LED 光源を腎門部に配置し、両側腎交感神経に光照射（5 Hz、20 ms、片側 5 分間ずつ）を行った。また、腎交感神経の繰り返し刺激に関しては、青色 LED の体内への埋め込みを行った。チップ型の小型青色 LED 光源を KWIK-SIL Silicone Adhesive Compound で右腎門部に留置し、皮下を通じた配線を頭部に固定した赤外線受信機に接続した。そして、赤外線受信機を介した遠隔での光照射（5 Hz、20 ms）を行った。マウス腎臓における組織ノルアドレナリン濃度の測定には Mouse Noradrenaline (NA) ELISA Kit を使用した。

3. 細胞実験

HK2 細胞（ヒト近位尿細管細胞株）は、10%FBS を含む DMEM/F12 を用いて、CO_2 インキュベーター（37℃、5%CO_2）内で培養した。培地は 2 日ごとに交換し、細胞の密度が 80～90%になったところで継代した。0.05% Trypsin-0.53 mM EDTA 4Na を用いて細胞を剥離し、5×10^4 cells/ml となるように播種した。細胞傷害は lipopolysaccharide（LPS）10 μg/ml を用いて誘導した。β2 アドレナリン受容体（β2AR）作動薬としてサルブタモールを使用した。

4. RT-qPCR 法

RNA 抽出には FastGene RNA Basic Kit を使用し、Synergy HTX により RNA 濃度を測定した。次に、得られた RNA から PrimeScript RT Master Mix を用いて cDNA を生成し、iTAC Universal SYBR Green Supermix を用いて各種遺伝子の mRNA 相対発現量を測定した。なお、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）を内在性コントロールとして使用した。最後に、CFX Connect Real-Time PCR Detection System を用いて qPCR を行い、ΔΔCt 法に基づいてデータを解析した。

5. 統計解析法

データは一元配置分散分析および Student's t-test を用いて解析し、有意差は $P<0.05$ と定義した。多重比較には、一元配置分散分析を適用し、post-hoc 多重比較検定（Tukey's test）を行った。2 群間の比較には Student's t-test を使用した。すべての分析は、GraphPad Prism version 9 を用いて実施し、すべての値は、平均値±SEM およびドットプロットにおける個々の値として示した。

結　果

1. β2 アドレナリン受容体刺激による直接的な尿細管保護作用

HK2 細胞に LPS とサルブタモールを同時に投与し、24 時間後に尿細管障害マーカーである Ngal の発現レベルを RT-qPCR で評価したところ、サルブタモールの濃度依存的に Ngal の発現が低下した（図 1）。このことから、交感神経刺激による尿細管に対する直接的な保護作用が存在することが示唆された。

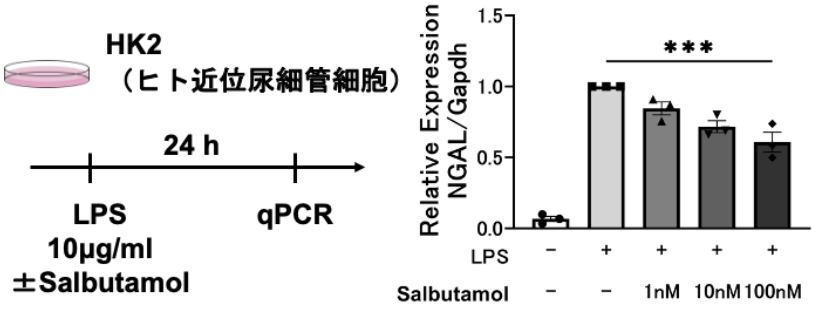


図 1.　β2 アドレナリン受容体刺激による尿細管細胞の直接的保護作用
HK2 細胞に LPS 10μg/ml とサルブタモール（1 n M、10 nM、100 nM）を投与し、24 時間後に回収した細胞から RNA を抽出し qPCR を行った。Ngal の発現レベルを評価したところ、サルブタモールの濃度依存的に発現が低下した。多重比較には、一元配置分散分析を適用し、post-hoc 多重比較検定（Tukey's test）を行った（***P＜0.001）。

2.　オプトジェネティクスを活用した腎交感神経特異的刺激法

オプトジェネティクスの技術を活用し、光による腎交感神経の特異的制御法を確立した。DbHCre–ChR2 マウスの背部より両側腎門部に青色 LED により光を直接照射することで、腎動脈に沿って走行する腎交感神経の刺激を行った（図 2A)。また、赤外線受信機を介して体内に埋め込んだ LED を発行させることにより、腎交感神経の刺激が可能となるマウスを作製した (図 2B)。これにより、繰り返し腎交感神経を刺激する手法を確立した。



図2．オプトジェネティクスを活用したマウス腎交感神経刺激の手法
A)　背部より腎門部に青色光を照射することで腎交感神経（腎動脈に並走）を直接刺激する。
B)　腎交感神経近傍に小型LED光源を埋め込み、頭部に設置したコントローラーを介して遠隔操作により発光させる。これにより、体外から低侵襲かつ繰り返し腎交感神経を刺激することが可能となる。

3.　腎交感神経特異的刺激による両側虚血再灌流障害に対する腎保護効果

結果 2 で確立した手法を用いて、腎交感神経刺激による腎臓への影響を評価した。DbHCre–ChR2 マウスの両側腎交感神経を青色光照射によって刺激し 24 時間後に両側 IRI を行ったところ、両側 IRI のみを行ったマウスと比較して血漿クレアチニン濃度が有意に低下した（図 3)。このことから、光による腎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が明らかとなった。また、腎臓におけるノルアドレナリン濃度を測定したところ、光によって腎交感神経を刺激したマウスでは、光を照射しなかったマウスと比較してノルアドレナリン濃度が上昇した（図 4)。

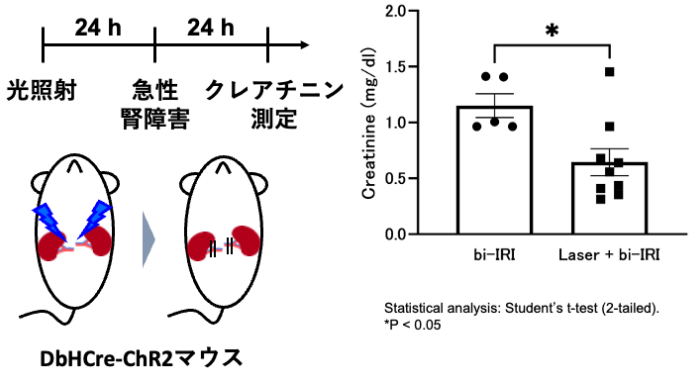


図 3. 腎交感神経刺激による腎虚血再灌流障害に対する保護作用

青色光照射によりDbHCre-ChR2マウスの腎交感神経を刺激した後、両側腎虚血再灌流障害により急性腎障害を起こし、血漿クレアチニン値を測定した。腎交感神経を刺激したマウスは、刺激していないマウスと比較して血漿クレアチニン値が有意に低下した。

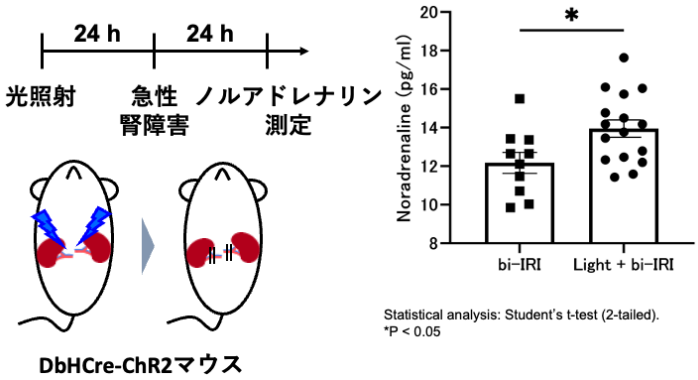


図 4. 腎交感神経刺激後の腎臓ノルアドレナリン濃度

図3同様に腎交感神経刺激後に両側腎虚血再灌流障害を行い、腎臓のノルアドレナリン濃度を測定した。腎交感神経を刺激したマウスはノルアドレナリン濃度が有意に上昇した。

考　察

本研究によって、オプトジェネティクス技術を活用した特異的腎交感神経刺激手法を確立することができた（図 2）。実際に刺激できているかどうかに関しては、光刺激後の腎臓におけるノルアドレナリン増加によって確認した（図 4）。また、急性腎障害モデルと組み合わせることで、特異的な腎交感神経刺激によって腎臓が保護されることを見出した（図 3）。今後は、腎交感神経刺激による腎保護メカニズムの解明を行う。特に、最近確立した腎臓のシングルセル RNA-seq の手法［6］を活用することにより、光による腎臓交感神経刺激後に腎臓のシングルセル RNA-seq を施行し、細胞ごとの遺伝子発現解析を行うことで、腎臓内のどの細胞が交感神経のシグナル（ノルアドレナリン）を受け取るのかを明らかにする。また、細胞間相互作用に関する解析などを行うことで、ノルアドレナリン刺激を受け取った細胞がどのようにして腎臓の恒常性維持・機能を発揮するのかを解明することを目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岐阜大学大学院医学系研究科生理学研究室の安部力であり、本研究遂行にあたり、多大なる助言およびご協力を頂きました。ここで感謝申し上げます。

文　献

1) Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through alpha7nAChR+ splenocytes. J Clin Invest. 2016;126(5):1939-52. doi: 10.1172/JCI83658. PubMed PMID: 27088805; PubMed Central PMCID: PMC4855936.

2) Abe C, Inoue T, Inglis MA, Viar KE, Huang L, Ye H, et al. C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. Nat Neurosci. 2017;20(5):700-7. doi: 10.1038/nn.4526. PubMed PMID: 28288124; PubMed Central PMCID: PMC5404944.

3) Inoue T, Abe C, Kohro T, Tanaka S, Huang L, Yao J, et al. Non-canonical cholinergic anti-inflammatory pathway-mediated activation of peritoneal macrophages induces Hes1 and blocks ischemia/reperfusion injury in the kidney. Kidney Int. 2019;95(3):563-76. Epub 2019/01/24. doi: 10.1016/j.kint.2018.09.020. PubMed PMID: 30670317.

4) Uni R, Inoue T, Nakamura Y, Fukaya D, Hasegawa S, Wu CH, et al. Vagus nerve stimulation even after injury ameliorates cisplatin-induced nephropathy via reducing macrophage infiltration. Sci Rep. 2020;10(1):9472. Epub 2020/06/13. doi: 10.1038/s41598-020-66295-0. PubMed PMID: 32528023; PubMed Central PMCID: PMC7290038.

5) Tanaka S, Abe C, Abbott SBG, Zheng S, Yamaoka Y, Lipsey JE, et al. 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. 2021;118(12). doi: 10.1073/pnas.2021758118. PubMed PMID: 33737395; PubMed Central PMCID: PMC7999957.

6) Hasegawa S, Inoue T, Nakamura Y, Fukaya D, Uni R, Wu CH, et al. Activation of Sympathetic Signaling in Macrophages Blocks Systemic Inflammation and Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. J Am Soc Nephrol. 2021;32(7):1599-615. Epub 20210419. doi: 10.1681/ASN.2020121723. PubMed PMID: 33875568; PubMed Central PMCID: PMC8425643.