

高血圧におけるナトリウム依存性腎アセチルコリン分泌機構の役割

清水 秀二, 川田 徹, 秋山 剛

国立循環器病研究センター

概要 目的 アセチルコリン(ACh)は、腎動脈内に投与すると血管内皮に作用し、一酸化窒素(NO)の産生を促し、腎細動脈を拡張することにより、腎血流を増加させ、腎保護的に作用することが知られている。一方で、高血圧モデルラットでは、この ACh を介した NO による血管拡張反応が損なわれていると報告されており、高血圧の発症・進展と腎内因性 ACh の間には密接な関連があると推察される。そこで、腎内因性 ACh の分泌機構と高血圧における役割を明らかにするために、腎臓にマイクロダイアリシス法を適用した。

方法 α クロラロース・ウレタン麻酔下の日本白ウサギの腎皮質にマイクロダイアリシス・プローベを植込み、エゼリンおよび薬剤を含んだ灌流液で灌流した。高カリウム液(200 mM)・高張食塩水(500 または 900 mM)・ Na^+/K^+ -ATPase 阻害薬(ウアバイン 100 μM)・上皮性 Na^+ チャネル遮断薬(ベンザミル 300 μM)を、プローベを介して局所投与し、透析液中の ACh 濃度の変化を高速液体クロマトグラフィにて分析した。

結果 高カリウム液では ACh 分泌に変化はなかった(1.0 ± 0.2 から 1.0 ± 0.3 nM, not significant)。高張食塩水は、濃度依存性に腎内因性 ACh 分泌を増加させた(500 mM: 1.2 ± 0.4 から 2.4 ± 0.4 nM, $P < 0.05$; 900 mM: 1.1 ± 0.3 から 5.0 ± 1.1 nM, $P < 0.01$)。 Na^+/K^+ -ATPase 阻害薬は、腎内因性 ACh 分泌を有意に増加させた(1.2 ± 0.2 から 2.2 ± 0.3 nM, $P < 0.01$)。上皮性 Na^+ チャネル遮断薬は、高張食塩水投与前・投与時のいずれの場合においても ACh 分泌を低下させた(ベンザミル, $P < 0.01$; 高張食塩水, $P < 0.01$; 交互作用, $P < 0.01$ by two-way ANOVA)。

考察 腎内因性 ACh 分泌は、高カリウム誘発性の脱分極に応答しない非神経性の分泌機構によるものであり、腎皮質細胞内の Na^+ 濃度の上昇が ACh 分泌を促進することが明らかとなった。腎内因性 ACh は、食塩負荷に対して腎血流を増加させ、腎保護的に作用している可能性が示唆された。

1. 研究目的

我が国の高血圧患者数は、4,000 万人とも言われており、高血圧は 40 歳以上の 2 人に 1 人がかかる国民病である。高血圧の発症には、腎自律神経・内分泌系が深く関与しており、副交感神経における神経伝達物質であるアセチルコリンは、腎動脈内に投与すると血管内皮に作用し、一酸化窒素(NO)の産生を促し、腎細動脈を拡張することにより、腎血流を増加させ、腎保護的に作用することが知られている。一方で、高血圧モデルラットでは、このアセチルコリンを介した NO による血管拡張反応が損なわれていると報告されている(文献 1)。したがって、高血圧の発症・進展と腎内因性アセチルコリン分泌との間には密接な関

連があると推察される。

しかしながら、腎において内因性アセチルコリンがどのようなメカニズムで分泌されるかは、今までほとんど分かっていなかった。Maeda らは、アセチルコリン合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼのメッセンジャー RNA が、腎皮質集合管の主細胞に広く発現していることを報告している(文献 2)が、アセチルコリンの分泌機構に関しては明らかになっていない。我々は、腎皮質のアセチルコリン濃度を持続的にモニターすることが可能になれば、腎内因性アセチルコリンの分泌機構を明らかにできると考え、麻酔下ウサギを用いた予備実験を行い、マイクロダイアリシス法を用いて腎皮質間質アセチルコリン濃度を持続的

にモニターすることに成功した。そこで本研究では、マイクロダイアリシス法を用いて腎間質アセチルコリン濃度を持続的にモニターすることにより、腎内因性のアセチルコリン分泌機構の詳細を解明し、腎内因性アセチルコリンが高血圧の発症および進展において果たす役割を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

2.1 実験準備

実験動物の取り扱いには、すべて日本生理学会動物実験倫理規定に従い、実験は国立循環器病研究センター実験動物委員会の許可を得て行った。

日本白ウサギ(2.3-3.4 kg)をペントバルビタール経静脈投与(50 mg/kg)にて麻酔導入し、 α クロラロース(16 mg/kg/h)およびウレタン(100 mg/kg/h)の持続静脈投与にて麻酔を維持した。気管切開後、人工呼吸器に接続し、酸素投与下に人工呼吸管理を行った。右大腿動脈および右大腿静脈よりラインを挿入し、動脈圧モニタリングおよび維持輸液を行った。また、心電図・食道温をモニターし、

体温は保温パッドを用いて 38~39°Cに維持した。右側臥位の後腹膜アプローチで左腎を露出して、マイクロダイアリシス法を施行した。

2.2 マイクロダイアリシス法

使用したマイクロダイアリシス・プローベは自作のもので、半透膜ファイバー(有効長 13 mm, 外径 310 μ m, 内径 200 μ m, PAN-1200, カットオフ分子量 50,000; Asahi Chemical, Tokyo, Japan)の両端にポリエチレンチューブ(長さ 25 cm, 外径 0.5 mm, 内径 0.2 mm)を接着したものである(文献 3, 4)。ガイド針を用いて、左腎皮質にマイクロダイアリシス・プローベを植え込んだ。マイクロインジェクション・ポンプ(CMA/102, Carnegie Medicin, Sweden)を用いて、マイクロダイアリシス・プローベを、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるエゼリン(100 μ M)および以下の薬剤(2.3.1~2.3.4)を含んだ灌流液で、2 μ l/minにて灌流し、透析液を10分間(20 μ l)採取した(Fig. 1)。透析液中のアセチルコリン濃度を高速液体クロマトグラフィにて測定した(文献 3)。

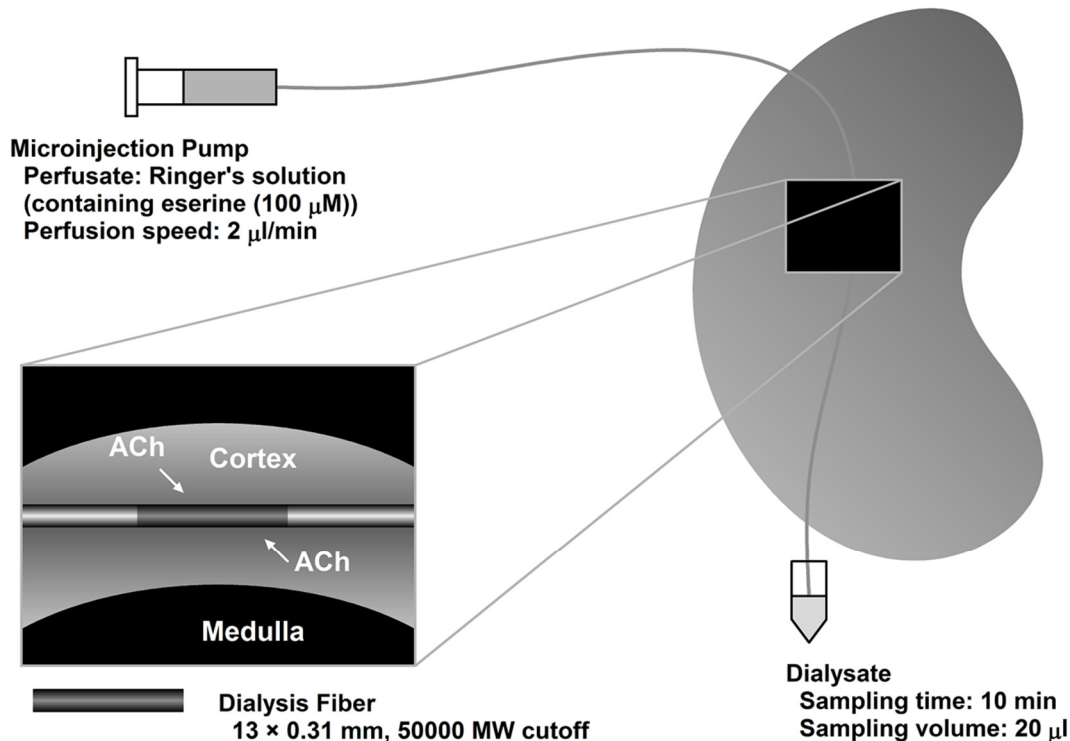


Fig. 1. Schema of renal microdialysis technique.

2. 3 プロトコール

2. 3. 1 神経性腎内因性アセチルコリン分泌応答の検討

腎皮質に植え込んだマイクロダイアリス・プローベを高カリウム液(200 mM)にて灌流し、神経終末の脱分極を促し、腎内因性アセチルコリン分泌応答を調べた(N=6)。対照群として左心室後壁に同じ有効長のプローベを植込み、高カリウム液(200 mM)にて灌流し、神経終末の脱分極を促し、アセチルコリン分泌応答を調べた(N=5)。

2. 3. 2 高張食塩水による腎内因性アセチルコリン分泌応答への影響の検討(N=6)

腎皮質に2本のマイクロダイアリス・プローベを植込み、500 mM および 900 mM の高張食塩水にて灌流し、腎内因性アセチルコリン分泌応答を調べた(N=6)。

2. 3. 3 Na⁺/K⁺-ATPase 阻害薬による腎内因性アセチルコリン分泌応答への影響の検討(N=7)

マイクロダイアリス・プローベをNa⁺/K⁺-ATPase 阻害薬であるウアバイン(100 μM)にて灌流し、腎内因性アセチルコリン分泌応答を調べた。

2. 3. 4 上皮性 Na⁺チャネル遮断薬による腎内因性アセチルコリン分泌応答への影響の検討(N=6)

腎皮質に2本のマイクロダイアリス・プローベを植込み、一方をリンゲル液で灌流し(プローベ1)、もう一方を上皮性 Na⁺チャネル遮断薬であるベンザミル(300 μM)で灌流し(プローベ2)、腎内因性アセチルコリン分泌応答を調べた。次いで、プローベ1を高張食塩水(900 mM)で、プロ

ーベ2を、ベンザミル(300 μM)を含む高張食塩水(900 mM)で灌流し、腎内因性アセチルコリン分泌応答を調べた。

2. 3. 5 腎皮質・髄質組織中アセチルコリン量の検討(N=6)

上記実験(2. 3. 1~2. 3. 4)終了後、左腎を摘出し、腎皮質・腎髄質組織を各 100mg 採取し、0.1 M Perchloric Acid を 1.0 ml 添加し、ホモジナイザーにてホモジナイズした(5,000 rpm, 5 sec, 数回)。遠心分離機(20,000 G, 15 min, 0°C)にて上清を分離した後、1M KHCO₃を適量添加し、pH を 5(4~7)付近に調節した。Millipore Ultrafree MC フィルタ(カットオフ分子量 10,000)を用いて、遠心分離機(5,000 G, 20 min, 20°C)にて濾過を行い、濾過液中のアセチルコリン量を高速液体クロマトグラフィにて測定した。

2. 4 統計検定

データは、mean±SE で表示し、プロトコール2. 3. 1~2. 3. 3、2. 3. 5では、Paired T-test にて検定を行った。プロトコール2. 3. 4では、Two-way ANOVA にて検定を行った。P<0.05 をもって統計的有意と判定した。

3. 研究結果

3. 1 神経性腎内因性アセチルコリン分泌応答の検討

高カリウム液(200 mM)の灌流では、腎でのアセチルコリン分泌に変化を認めなかった(1.0±0.2 から 1.0±0.3 nM, not significant) (Fig. 2A)。一方で、対照群である左

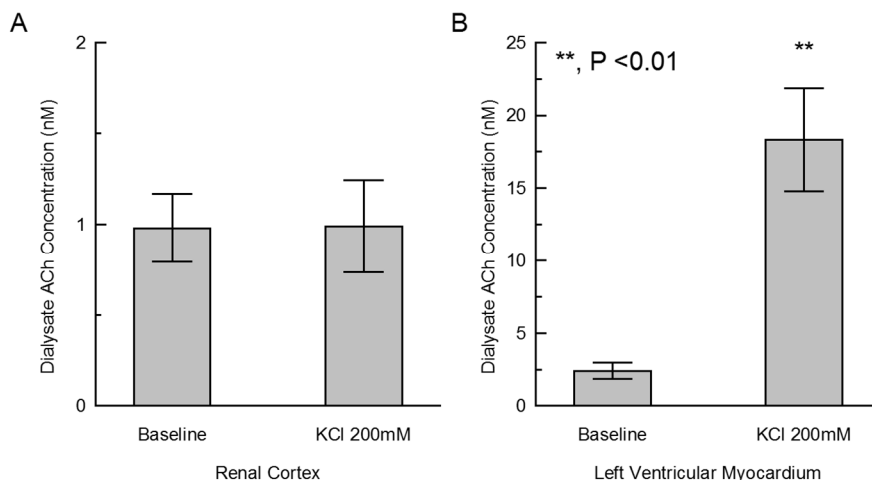


Fig. 2. Responses of acetylcholine (ACh) release to high potassium (KCl 200 mM) in the renal cortex (A) and the left ventricular myocardium (B).

心室後壁では、高カリウム液による灌流により、アセチルコリン分泌は有意に増加した(2.4±0.6 から 18.3±3.5 nM, P < 0.01) (Fig. 2B)。

3. 2 高張食塩水による腎内因性アセチルコリン分泌応答への影響の検討

腎皮質でのアセチルコリン分泌は、500 mM の高張食塩水の灌流で 1.2±0.4 から 2.4±0.4 nM (P < 0.05) に (Fig. 3A)、900 mM の高張食塩水の灌流で 1.1±0.3 から 5.0±1.1 nM (P < 0.01) に有意に増加した (Fig. 3B)。

3. 3 Na⁺/K⁺-ATPase 阻害薬による腎内因性アセチルコリン分泌応答への影響の検討

Na⁺/K⁺-ATPase 阻害薬であるウアバイン(100 μM)の灌流により、腎アセチルコリン分泌は有意に増加した(1.2±0.2 から 2.2±0.3 nM, P < 0.01) (Fig. 4)。

3. 4 上皮性 Na⁺チャンネル遮断薬による腎内因性アセチルコリン分泌応答への影響の検討

上皮性 Na⁺チャンネル遮断薬であるベンザミル(300 μM)の投与により、腎アセチルコリン分泌は、0.8 ± 0.2 から 0.2 ± 0.03 nM に低下した。また高張食塩水(900 mM)灌流時の腎内因性アセチルコリン分泌の増加は、ベンザミルの投与により 3.0±0.5 から 0.7±0.1 nM に抑えられた(ベンザミル, P < 0.01; 高張食塩水, P < 0.01; 交互作用, P < 0.01 by two-way ANOVA) (Fig. 5)。

3. 5 腎皮質・髄質組織中アセチルコリン量の検討

腎皮質組織中のアセチルコリンは、0.014 ± 0.002 nmol/g で、腎髄質中のもの(0.018 ± 0.004 nmol/g)と有意差は認めなかった(P = 0.40)。

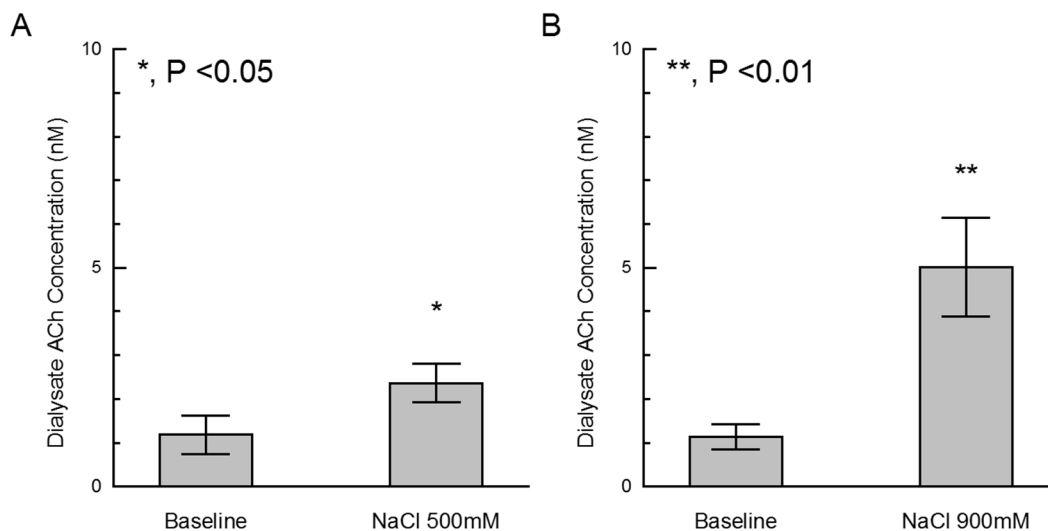


Fig. 3. Responses of acetylcholine (ACh) release to high sodium (NaCl 500 (A) or 900 mM (B)) in the renal cortex.

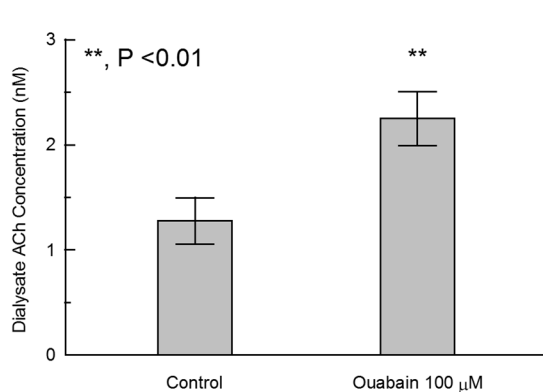


Fig. 4. Response of acetylcholine (ACh) release to Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor (ouabain 100 μM) in the renal cortex.

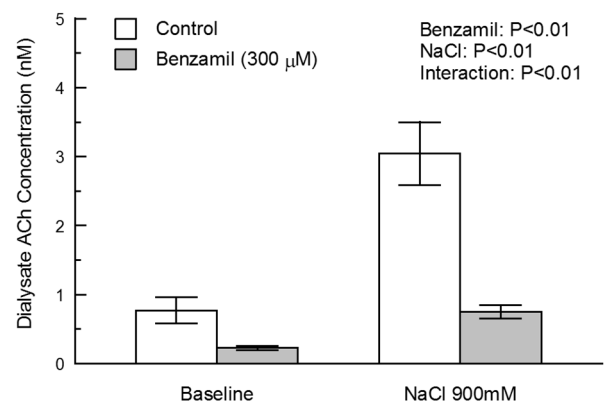


Fig. 5. Responses of renal acetylcholine (ACh) release to epithelial Na⁺ channel blocker (benzamil 300 μM) under baseline and high sodium (NaCl 900 mM) conditions.

4. 考 察

本研究では、腎での内因性アセチルコリンの分泌が、神経性のものではなく、主として非神経性の分泌機構によるものであり、腎皮質細胞内の Na^+ 濃度に依存するものであることを証明した。

4. 1 神経性および非神経性のアセチルコリン分泌機構

神経性分泌においては、マイクロダイアリシス・プローベを介して高カリウム液で灌流することにより神経終末が脱分極し、ニューロトランスミッターの分泌を促進させることが知られている(文献 5)。本研究においても、対照群であった左心室後壁においては、高カリウム液での灌流によりアセチルコリン分泌は有意に増加した。このことは、左心室後壁には、迷走神経の神経終末が存在し、神経終末の脱分極によりアセチルコリンが分泌されることを示している。一方で、腎皮質においては、高カリウム液による灌流では、透析液中のアセチルコリン濃度は変化しなかった。このことは、腎皮質にはアセチルコリン分泌性神経の神経終末がほとんど存在せず、神経性のアセチルコリン分泌が乏しいことを示唆している。一方で、腎皮質・髄質とも組織中にはアセチルコリンが存在しているため、神経性ではない分泌機構の存在が示唆される。

4. 2 細胞外 Na^+ 濃度上昇に対するアセチルコリン分泌

腎皮質に植え込んだマイクロダイアリシス・プローベを高張食塩水で灌流することにより細胞外 Na^+ 濃度を上昇させると、腎皮質でのアセチルコリン分泌が増加することが本研究により示された。Maeda らの研究では、腎皮質集合管の主細胞にコリンアセチルトランスフェラーゼのメッセンジャーRNA が広く発現していると報告されていることから(文献 2)、細胞外 Na^+ 濃度の上昇が、皮質集合管の主細胞での Na^+ の再吸収を増加させ、アセチルコリン分泌を促している可能性がある。主細胞では、管腔側の上皮性 Na^+ チャネルを介して、 Na^+ を細胞内に取り込み、 Na^+/K^+ -ATPase を介して Na^+ を血管内へと汲み出していることから、これら 2 つのチャネルが腎内因性アセチルコリンの分泌に重要な役割を担っている可能性がある。

4. 3 腎内因性アセチルコリン分泌における Na^+/K^+ -ATPase の役割

Na^+/K^+ -ATPase は、皮質集合管主細胞の基底膜側に存在し、細胞外の K^+ を細胞内へ取り込むかわりに、細胞内の Na^+ を血管側に汲み出している。したがって、

Na^+/K^+ -ATPase の働きを阻害することにより、細胞内の Na^+ 濃度は上昇する。腎皮質に植え込んだマイクロダイアリシス・プローベを Na^+/K^+ -ATPase 阻害剤であるウアバインで灌流することにより、腎皮質でのアセチルコリン分泌が増加したことから、腎内因性アセチルコリンの分泌は皮質細胞内の Na^+ 濃度の変化によるものだと考えられる。したがって、高張食塩水での灌流によるアセチルコリン分泌の増加は、細胞外 Na^+ 濃度の上昇に伴う細胞内への Na^+ 取り込みの増加が関与している可能性がある。

4. 4 腎内因性アセチルコリン分泌における上皮性 Na^+ チャネルの役割

皮質集合管主細胞の管腔側に存在する上皮性 Na^+ チャネルは、尿中 Na^+ を細胞内に取り込む働きを持っている。したがって、上皮性 Na^+ チャネルを阻害することにより、細胞内への Na^+ の取り込みを低下させ、細胞内 Na^+ 濃度を低下させることで、腎内因性アセチルコリン分泌を抑制することができると考えられる。腎皮質に植え込んだマイクロダイアリシス・プローベを上皮性 Na^+ チャネル遮断薬であるベンザミルで灌流すると、アセチルコリン分泌は低下し、高張食塩水での灌流時のアセチルコリン分泌も抑制することから、細胞内 Na^+ 濃度の低下に応じて、腎でのアセチルコリン分泌も低下することが分かった。

4. 5 まとめ

本研究の結果により、腎皮質での内因性アセチルコリンは、神経性ではなく、主として非神経性の分泌機構により分泌されることが判明した。また、この非神経性のアセチルコリン分泌機構は、腎皮質細胞内 Na^+ 濃度に依存し、細胞内 Na^+ 濃度の増加により増強し、細胞内 Na^+ 濃度の低下により抑制されることが分かった。アセチルコリンは、血管内皮に作用し、NO を産生することにより血管を拡張することから、 Na^+ 濃度の変化に対して腎血流を調節する役割を担っていると考えられ、腎内因性アセチルコリンは、食塩過負荷に対して腎血流を増加させ、腎保護的に作用していると考えられる。

5. 今後の課題

これらの研究成果を踏まえ、現在、Dahl 食塩感受性ラットを用いて、高血圧の発症における腎内因性アセチルコリンの役割をより詳細に検討中であり、今後、これらの実験

の結果を順次報告していく予定である。しかしながら、腎内因性アセチルコリンの分泌機構については、未だ不明の部分も多く、引き続き生理学的見地からも検討を重ねる必要がある。アセチルコリン合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼのメッセンジャーRNA が、腎皮質集合管の主細胞に広く発現していることは、すでに報告されているが(文献 2)、実際に主細胞からアセチルコリンが分泌されているかは明らかではない。また、細胞からどのようなメカニズムで、細胞外へ分泌されるかは定かではない。腎でのアセチルコリン分泌は神経性分泌ではないため、organic cation transporter や mediatophore を介した分泌経路が考えられ、これらを介した分泌機構の有無を検討していく必要がある。さらに、腎内因性アセチルコリン分泌への介入治療が、食塩感受性高血圧の発症や進展にどのような効果を及ぼすかについても今後、検討する必要がある。

文 献

- 1) Tuncer M and Vanhoutte PM. Response to the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine in perfused kidneys of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Blood Press.* 2:217-220, 1993.
- 2) Maeda S, Jun JG, Kuwahara-Otani S, Tanaka K, Hayakawa T, Seki M. Non-neuronal expression of choline acetyltransferase in the rat kidney. *Life Sci.* 89:408-414, 2011.
- 3) Akiyama T, Yamazaki T, Ninomiya I. In vivo detection of endogenous acetylcholine release in cat ventricles. *Am. J. Physiol.* 266:H854-H860, 1994.
- 4) Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Shishido T, Yamazaki T, Kamiya A, Mizuno M, Sano S, Sugimachi M. In vivo direct monitoring of vagal acetylcholine release to the sinoatrial node. *Auton. Neurosci.* 148:44-49, 2009.
- 5) Tokunaga N, Yamazaki T, Akiyama T, Sano S, Mori H. In vivo monitoring of norepinephrine and its metabolites in skeletal muscle. *Neurochem. Int.* 43:573-580, 2003.

The Role of Sodium-Dependent Renal Acetylcholine Release in Hypertension

Shuji Shimizu, Toru Kawada, Tsuyoshi Akiyama

National Cerebral and Cardiovascular Center

Summary

Background: Acetylcholine (ACh) activates endothelial nitric oxide synthesis, causing endothelium-dependent vasorelaxation in renal arteries. Because renal vasodilatation in response to exogenous ACh is attenuated in hypertensive rats, there may be a relationship between the progression of hypertension and endogenous renal ACh release.

Purpose: To clarify the mechanism of endogenous renal ACh release and the role of renal ACh in hypertension, a microdialysis technique was applied to the kidney.

Methods: A microdialysis probe was implanted into the renal cortex of α -chloralose and urethane anesthetized rabbits and was perfused with the Ringer's solution containing eserine (100 μ M) and various pharmacological agents. When high potassium (200 mM), high sodium (500 or 900 mM), Na^+/K^+ -ATPase inhibitor (ouabain 100 μ M), and epithelial Na^+ channel blocker (benzamil 300 μ M) were locally administered through the probe, dialysate samples were collected. Dialysate ACh concentrations were analyzed using high-performance liquid chromatography.

Results: High potassium never increased renal ACh release (1.0 ± 0.2 to 1.0 ± 0.3 nM, not significant). High sodium significantly increased dialysate ACh concentrations in a concentration-dependent manner (500 mM: 1.2 ± 0.4 to 2.4 ± 0.4 nM, $P < 0.05$; 900 mM: 1.1 ± 0.3 to 5.0 ± 1.1 nM, $P < 0.01$). Ouabain significantly increased dialysate ACh concentration (1.2 ± 0.2 to 2.2 ± 0.3 nM, $P < 0.01$). Benzamil significantly decreased dialysate ACh concentrations in both baseline and high sodium (900 mM) conditions (benzamil, $P < 0.01$; high sodium, $P < 0.01$; interaction, $P < 0.01$ by two-way ANOVA).

Conclusions: Because high potassium-induced depolarization never increases ACh release, endogenous renal ACh release is mainly dependent on non-neuronal mechanism. An increase in intracellular sodium level enhances this non-neuronal ACh release. Endogenous renal ACh may act as a renoprotective agent against high sodium conditions.