

急性腎障害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の検討

清水 秀二¹, 秋山 剛¹, 黒子 洋介², 岸 良匡², 内田 治仁³

¹ 国立循環器病研究センター, ² 岡山大学病院, ³ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

概要

急性腎障害(AKI)は、短期間で腎機能が急速に低下する病態であり、血中にクレアチニンと窒素化合物(尿素窒素)が蓄積することにより、水分および電解質の障害が発生する。AKIにおいては、わずか0.3 mg/dl程度の血清クレアチニンの上昇が、患者死亡に大きく寄与することが分かっており、有効な治療法の確立が不可欠である。一方で、腎に直接作用する医薬品は存在せず、輸液や血管作動薬投与が治療の主体となっているのが現状である。

本研究者は、ソルト・サイエンス研究財団の支援(助成番号 1427, 1539)のもと行った先行研究にて、腎皮質におけるアセチルコリン分泌が、細胞内外の Na⁺イオン濃度依存性の非神経性分泌であることを明らかにした(Shimizu et al. *J Physiol Sci.* 2017; 67: 587-593.)。また、Dahl 食塩感受性ラットでは、この Na⁺イオン濃度依存性の腎アセチルコリン分泌が障害されており、アセチルコリン分解酵素阻害薬の投与により腎障害が軽減されることも報告している。そこで本研究では、AKI における Na⁺依存性腎アセチルコリン分泌機構の役割を明らかにすることで、腎に直接作用することのできる医薬品開発を目的とする。

初めに腎前性 AKI における Na⁺依存性腎アセチルコリンの役割について検討を行った。全身麻酔下のラットにおいて急性腎虚血モデルを作製し、AKI を誘発した。腎皮質に植え込んだマイクロダイアリス・プローブを、eserine を含むリンゲル液で灌流、透析液を回収し、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を用いて測定した。その結果、当初の予想に反して、腎虚血により腎皮質におけるアセチルコリン分泌が大きく亢進することが明らかになった。このメカニズムを明らかにするために、上皮性 Na⁺チャネル阻害薬である Benzamil を投与した実験を行ったが、虚血中のアセチルコリン分泌を完全に抑制することは出来なかった。次に、腎性 AKI を模した造影剤腎症モデルを用いて同様の検討を行った。Iopamidol の経静脈投与により、腎皮質でのアセチルコリン分泌は低下する可能性が示唆された。これらの結果から、腎皮質でのアセチルコリン動態は、AKI の原因により大きく異なる可能性が示唆された。

1. 研究目的

急性腎障害(AKI)は、短期間で腎機能が急速に低下する病態であり、血中にクレアチニンと窒素化合物(尿素窒素)が蓄積することにより、水分および電解質の障害が発生する。AKIにおいては、わずか0.3 mg/dl程度の血清クレアチニンの上昇が、患者死亡に大きく寄与することが分かっており、有効な治療法の確立が不可欠である。一方で、腎に直接作用する医薬品は存在せず、輸液や血管作動薬投与が治療の主体となっているのが現状である。

本研究者は、ソルト・サイエンス研究財団の支援(助成番号 1427, 1539)のもと行った先行研究にて、腎皮質におけるアセチルコリン分泌が、細胞内外の Na⁺イオン濃度依存性の非神経性分泌であることを明らかにした。細胞外に高張食塩水を投与すると、腎皮質におけるアセチルコリン分泌は亢進し、また細胞外に Na⁺を汲み出す Na⁺/K⁺-ATPase の阻害薬である ouabain を投与することでも、アセチルコリン分泌は亢進した。一方で、細胞内に Na⁺を取り込む上皮性 Na⁺チャネルを遮断する Benzamil を投与することにより、アセチルコリン分泌が低下すること

を発見し、腎皮質における Na⁺依存性のアセチルコリン分泌機構を同定した (Fig. 1)。

また、Dahl 食塩感受性ラットでは、この Na⁺イオン濃度依存性の腎アセチルコリン分泌が障害されており、アセチルコリン分解酵素阻害薬の投与により腎障害が軽減されることも報告している (ソルト・サイエンス研究財団「第28回助成研究発表会」にて報告)。

そこで本研究では、AKI における Na⁺依存性腎アセチルコリン分泌機構の役割を明らかにすることで、腎に直接作用することのできる医薬品開発を目的とする。

2. 研究方法

2.1 腎前性 AKI における Na⁺依存性腎アセチルコリンの役割の検討

AKI の原因の 1 つに腎血流の低下がある (腎前性 AKI)。そこで腎虚血モデル動物を用いて、血流の低下が Na⁺依存性腎アセチルコリン分泌へ及ぼす影響を検討する。そのためには、腎皮質でのアセチルコリン分泌を連続的にモニタリングする必要があり、本研究では、腎マイクロダイアリシス法を使用する。

マイクロダイアリシス法は、組織に植え込んだ半透膜の性質を利用して、灌流液と組織間質の物質の濃度勾配により、透析液中に測定物質 (本研究の場合は、アセチルコリン) を回収する方法である。本研究では、腎皮質に植え込んだマイクロダイアリシス・プローブを介して、腎皮質の組織間質に分泌されたアセチルコリンを回収、その濃度を、高速液体クロマトグラフィを用いて測定する (Fig. 2, 3)。本研究で使用したマイクロダイアリシス・プローブは自作のもので、半透膜ファイバー (有効長 10 mm, 外径 310 μm, 内径 200 μm, PAN-1200, カットオフ分子量 50000, 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^{1), 2), 3)}。

イソフルランによる全身麻酔下の Sprague-Dawley (SD) ラットにおいて、後腹膜経由で左腎を露出する。左腎動脈を 5-0 silk 糸にて結紮することで、腎虚血を引き起こす。腎皮質に植え込んだマイクロダイアリシス・プローブをアセチルコリンエステラーゼ阻害薬である eserine 100 μM を含

むリンゲル液 2.0 μL/min で灌流、透析液を回収し、エイコム社製高速液体クロマトグラフィ (ECD-700, EP-700, ATC-700) にて透析液中のアセチルコリン濃度を測定することで、腎皮質でのアセチルコリン分泌をモニターする。虚血前 (Baseline) のサンプリングを 10 分間行った後に、腎動脈を結紮、虚血 60 分後まで、10 分間隔で計 6 回サンプリングを行う。

次に虚血時のアセチルコリン分泌が、Na⁺依存性のものであるかを確認するため、Na⁺の細胞内への取り込みを阻害する上皮性 Na⁺チャネル遮断薬 (Benzamil) を、マイクロダイアリシス・プローブを介して投与し、同様の実験を行う。前述と同様のプリパレーションを行い、虚血 1 時間前よりマイクロダイアリシス・プローブを、Benzamil 300 μM を含む灌流液で灌流する。Baseline のサンプリングを 10 分間行った後に、腎動脈を結紮、虚血 60 分後まで 10 分間隔でサンプリングを行う。

2.2 腎性 AKI における Na⁺依存性腎アセチルコリンの役割の検討

腎性 AKI の 1 つに造影剤腎症がある。そこで、造影剤腎症モデル動物を用いて、腎性 AKI における Na⁺依存性腎アセチルコリン分泌の役割を検証する。Indomethacin および L-NAME 前投与下に、造影剤 Iopamidol を経静脈投与することで、ラットでの造影剤腎症を誘発することが可能である。

全身麻酔下の SD ラットにおいて、後腹膜経由で左腎を露出し、腎皮質に植え込んだマイクロダイアリシス・プローブからの透析液を回収、高速液体クロマトグラフィにてアセチルコリン濃度を測定することで、造影剤 (腎症) が、Na⁺依存性腎アセチルコリン分泌機構へ及ぼす影響を明らかにする。

まず、Indomethacin 10mg/kg を経静脈投与し、15 分後に L-NAME 10 mg/kg を静脈投与する。L-NAME 投与の 15 分後から、造影剤投与前 (Baseline) のサンプリングを 10 分間行い、その後、造影剤 Iopamidol 10 mL/kg を徐々に静脈投与し、AKI を誘発する。造影剤投与後、10 分間隔で 60 分後までサンプリングを行う。

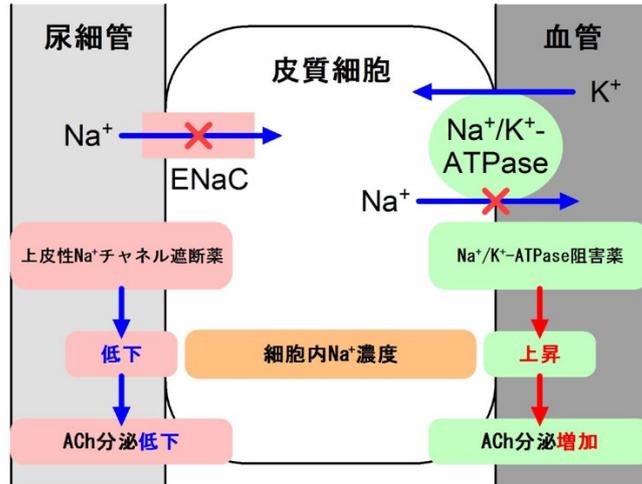


Fig.1 Mechanism of sodium-dependent acetylcholine release in the renal cortex
 (平成 27 年度ソルト・サイエンス研究財団研究報告集(助成番号 1539)より抜粋)

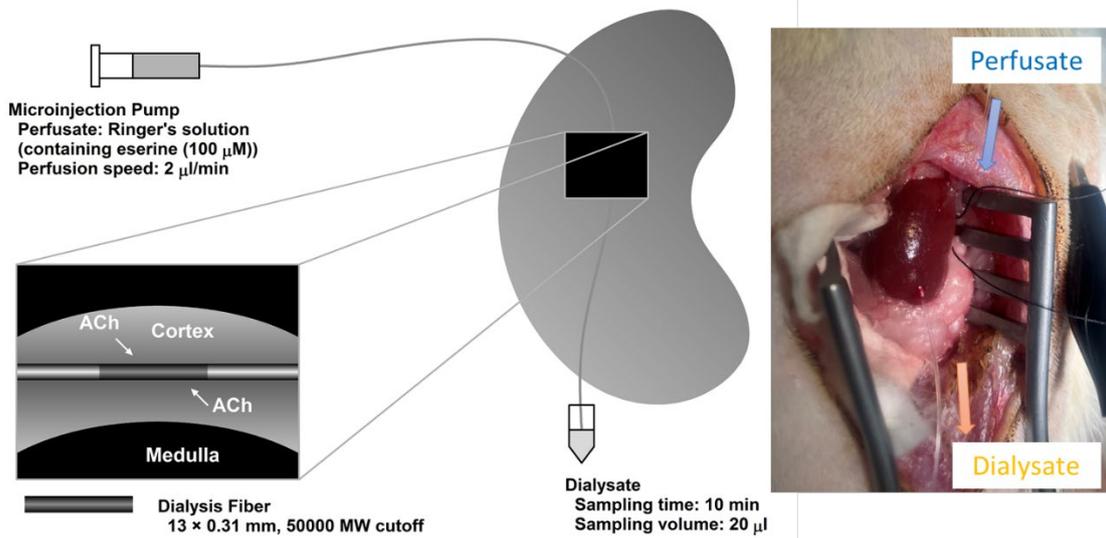


Fig.2 Renal microdialysis technique
 (平成 26 年度ソルト・サイエンス研究財団研究報告集(助成番号 1427)を改変)

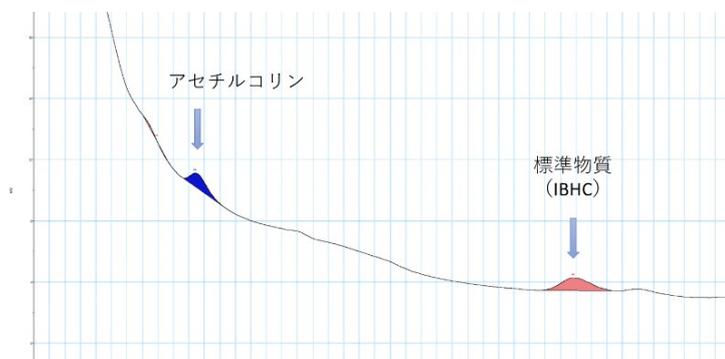


Fig.3 Acetylcholine measurement using high-performance liquid chromatography

2. 3 AKIにおける腎アセチルコリンの保護作用の検討

Na⁺依存性腎アセチルコリン分泌機構への介入が、AKI に対する腎保護作用を発揮するかを、造影剤腎症モデルラットを用いて検証する。イソフルラン吸入による全身麻酔下に、Indomethacin 10 mg/kg, L-NAME 10 mg/kgの順に、15分間隔で経静脈投与する。次いで、造影剤イオパミドール 10 mL/kgを緩徐に静脈投与することにより、造影剤腎症を誘発する。治療群においては、造影剤投与前1時間前に、コリンエステラーゼ阻害薬である Galantamine 1.25 mg/kg を経静脈投与する。対象群においては、同量の生理食塩水を投与する。

麻酔薬投与を中止し、覚醒させた後に、24時間ケージにて飼育する。24時間後に安楽死の処置を行い、血液および腎臓を採取する。血中の尿素窒素およびクレアチニンを測定し、腎障害の指標とする。摘出した腎臓は、ホルマリン固定・パラフィン包埋の後、HE染色およびPAS染色を行い、腎組織障害の程度を観察する。

3. 研究結果

3. 1 腎前性 AKI における Na⁺依存性腎アセチルコリンの役割の検討

腎動脈結紮を行った腎虚血モデルにおいては、虚血により、腎皮質におけるアセチルコリン分泌が大きく亢進することが明らかになった。

アセチルコリン分泌は、虚血直後(0~10分)から上昇し始め、虚血30~40分後にピークを迎え、60分後まで高値を示すことが分かった(Fig. 4)。

また、上皮性 Na⁺チャネル遮断薬である Benzamil を投与することで、Baseline のアセチルコリン分泌を抑制できる可能性が示唆されたものの、虚血時のアセチルコリン分泌を完全に抑制することは出来なかった。

3. 2 腎性 AKI における Na⁺依存性腎アセチルコリンの役割の検討

造影剤腎症モデルでは、Iopamidol の投与により、腎皮質でのアセチルコリン分泌は低下している可能性が示唆された(Fig. 5)。

一方で、前投与薬として Indomethacin と L-NAME が投与されていることから、これらの薬剤が結果に影響を及ぼしている可能性は否定できない。

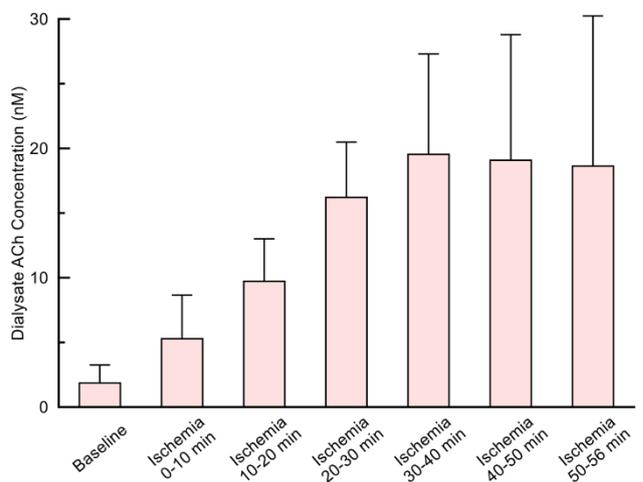


Fig.4 Ischemia-induced acetylcholine release in the renal cortex

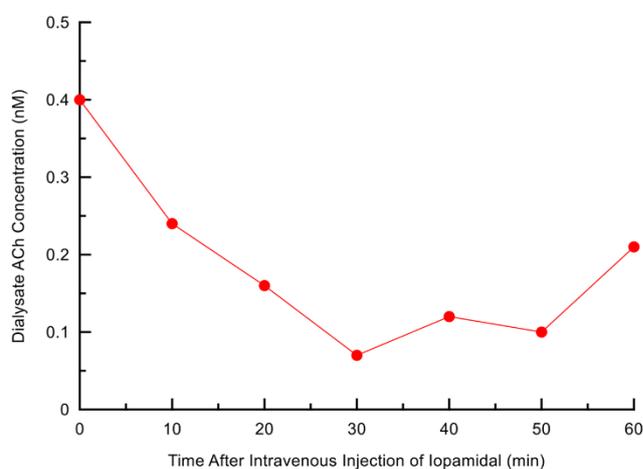


Fig.5 Ischemia-induced acetylcholine release in the renal cortex

3. 3 AKIにおける腎アセチルコリンの保護作用の検討

3. 1および 3. 2 での研究結果により、腎虚血モデルと造影剤腎症モデルでは、急性期のアセチルコリン動態が大きく異なることが判明した。そのため、研究方法2. 3の検討のみでは、Na⁺依存性腎アセチルコリンによる腎保護作用のメカニズムの全容を解明することは難しいと考えられた。そこで、腎虚血モデルを含めたものに計画を修正し、実験を開始し、血液・組織サンプルを蓄積している段階である。

4. 考察

本研究においては、腎虚血により腎皮質でのアセチルコリン分泌が大きく亢進することが明らかとなった。当初、本研究者らは、虚血によりアセチルコリン分泌が亢進す

ることを想定していなかったために、まずはそのメカニズムを解明することが第一の課題となった。

本研究者の先行研究では、マイクロダイアリシス・プローブを介した Na^+/K^+ -ATPase阻害薬であるouabainの局所投与が、腎皮質でのアセチルコリン分泌を亢進させることが明らかとなっている(Fig. 1)¹⁾。また、腎虚血においては、近位尿細管のATP(アデノシン 3リン酸)は数分で低下することが報告されている⁴⁾。このことから、ATPを必要とする Na^+/K^+ -ATPaseは、虚血後数分でその機能を停止する可能性があり、 Na^+/K^+ -ATPaseを介した細胞外への Na^+ の放出が阻害されることにより、細胞内 Na^+ 濃度が上昇し、アセチルコリン分泌を亢進させている可能性がある。

アセチルコリンを短時間で大量に細胞外へ放出するためには、細胞内アセチルコリン小胞の存在が不可欠である。通常、アセチルコリンを含有した小胞は、神経終末に存在しているが、腎においては、アセチルコリンを神経伝達物質とする副交感神経の支配については明らかになっていない⁵⁾。本研究者の先行研究においても、マイクロダイアリシス法を用いてKClを局所投与し、神経終末を強制的に脱分極させることを試みたが、アセチルコリンの分泌は亢進しなかった¹⁾。このことから腎皮質における副交感神経終末の分布は、非常に乏しいものと考えられる。そのため、腎皮質においてどの細胞がアセチルコリンを含有した小胞を有しているかは未だ分かっていない。

アセチルコリンを小胞内に取り込むためには、アセチルコリン輸送体の存在が不可欠である。小胞アセチルコリントランスポーター(VAChT)は、12回膜貫通タンパク質で、 H^+ 電気化学勾配を利用して小胞内にアセチルコリンを輸送している⁶⁾。ラットの腎臓では、VAChT mRNAが発現していることが分かっており⁷⁾、VAChTを有する細胞を同定することができれば、アセチルコリン分泌細胞を同定できる可能性があると考えられるが、未だ同定できていない。一方で、アセチル CoA とコリンを基質としてアセチルコリンを合成するコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の mRNA は、皮質集合管の主細胞に発現していることが報告されており⁷⁾、VAChT も同じ主細胞に発現している可能性がある。

腎虚血におけるアセチルコリンの役割は、未だ解明されていないものの、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体を介したコリン作動性経路が、腎虚血・再灌流障害に対して保護的に作用することが複数の論文で報告されている^{8), 9), 10), 11)}。そのために、虚血時に分泌されたアセチルコリンは、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体に作用し、腎保護的に作用している可能性がある。

造影剤腎症とアセチルコリンの関連については、ほとんど報告もなく、造影剤腎症においてアセチルコリンがどのような役割を担うかについては、全く分かっていない。一方で前述のように^{8), 9), 10), 11)}、アセチルコリンは、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体に作用し、抗炎症作用などを介して腎保護的に働くことが知られており、造影剤腎症においても腎保護的に作用する可能性はある。

造影剤腎症の発症機序には、直接的な腎細胞の障害の他に、腎血管の収縮による血流障害が報告されているが¹²⁾、本研究では、造影剤による腎皮質でのアセチルコリン分泌の亢進は認められなかった。そのため、腎虚血モデルでみられるようなATPが大きく低下する血流障害は、観察された60分の間には起こっていないと考えられた。一方で、本研究では、造影剤腎症が時間経過とともに、どのように進展していくかについては十分な検証ができておらず、より長時間にわたる観察が必要であると考えられた。

造影剤腎症(モデル)において、腎皮質のアセチルコリン分泌が低下する原因については、現時点では全く分かっていないが、本研究者の先行研究では、上皮性 Na^+ チャネルを阻害することにより、アセチルコリン分泌が低下することが分かっている¹⁾。したがって、造影剤が上皮性 Na^+ チャネルの機能不全を引き起こし、 Na^+ の細胞内への取り込みを抑制することにより、アセチルコリンの分泌を低下させている可能性は否定できない。

本研究により、腎障害時の腎皮質におけるアセチルコリン動態は、その原因により大きく異なっていることが明らかになった。そのため、この Na^+ 依存性アセチルコリン分泌機構を利用した医薬品の開発のためには、各々の障害原因に対して個別にアセチルコリン動態を解明していくことが不可欠であると考えられた。

5. 今後の課題

本研究により、腎虚血時に非神経性の Na⁺依存性アセチルコリン分泌が亢進することが、初めて明らかとなったことから、今後は引き続き、そのメカニズムを解明していく必要がある。

まず、腎皮質のどの細胞がアセチルコリン分泌を担っているかについて明らかにしていく必要があり、アセチルコリンの合成や小胞内取り込みに必要な ChAT や VAcChT を、免疫染色することにより、アセチルコリン分泌細胞の同定を試みる。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、ChAT および VAcChT mRNA を有する細胞を同定することで、分泌細胞の同定に繋げていく。

次に、アセチルコリン分泌には、細胞内小胞が関与していることが推察されるため、虚血時における細胞内小胞の役割について検討する。腎虚血前にマイクロダイアリス・プローブを介して腎皮質局所に VAcChT 阻害薬を投与し、虚血時のアセチルコリン分泌が抑制されるかを明らかにする。

加えて、本研究期間中には、再灌流時のアセチルコリン分泌については検討を加えることができなかったため、再灌流時にアセチルコリン分泌がどのように変化するのかを、腎マイクロダイアリス法を用いて明らかにする。

造影剤腎症においては、造影剤投与後にアセチルコリン分泌が低下している可能性があることから、アセチルコリン分泌を促す、もしくはアセチルコリンの分解を抑制することで、腎保護作用を発揮することができる可能性があり、引き続き、造影剤腎症モデルラットを用いた生化学・組織学的検討を重ねていく。

さらに、造影剤腎症におけるアセチルコリン分泌の低下の原因を解明するため、造影剤投与時の上皮性 Na⁺チャネルの活性に着目した基礎的研究を進めていくつもりである。

6. 文献

1. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sata Y, Turner MJ, Fukumitsu M, Yamamoto H, Kamiya A, Shishido T, Sugimachi M. Sodium ion transport participates in non-neuronal acetylcholine release in the renal cortex of anesthetized rabbits. *J Physiol Sci*. 2017 Sep;67(5):587-593. doi: 10.1007/s12576-016-0489-5. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27660058; PMCID: PMC10717196.
2. Akiyama T, Yamazaki T, Ninomiya I. In vivo detection of endogenous acetylcholine release in cat ventricles. *Am J Physiol*. 1994 Mar;266(3 Pt 2):H854-60. doi: 10.1152/ajpheart.1994.266.3.H854. PMID: 7909199.
3. 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*. 2009 Jun 15;148(1-2):44-9. doi: 10.1016/j.autneu.2009.02.006. Epub 2009 Mar 17. PMID: 19278905.
4. Yamamoto S, Yamamoto M, Nakamura J, Mii A, Yamamoto S, Takahashi M, Kaneko K, Uchino E, Sato Y, Fukuma S, Imamura H, Matsuda M, Yanagita M. Spatiotemporal ATP Dynamics during AKI Predict Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol*. 2020 Dec;31(12):2855-2869. doi: 10.1681/ASN.2020050580. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33046532; PMCID: PMC7790205.
5. Kirkpatrick JJ, Foutz S, Leslie SW. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Kidney Nerves. 2023 Jul 24. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. PMID: 29083631.
6. Nguyen ML, Cox GD, Parsons SM. Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. *Biochemistry*. 1998 Sep 22;37(38):13400-10. doi: 10.1021/bi9802263. PMID: 9748347.
7. 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*. 2011 Sep 12;89(11-12):408-14. doi: 10.1016/j.lfs.2011.07.011. Epub 2011 Jul 23. PMID: 21798270.
8. Sadis C, Teske G, Stokman G, Kubjak C, Claessen N, Moore F, Loi P, Diallo B, Barvais L, Goldman M, Florquin S, Le Moine A. Nicotine protects kidney from renal ischemia/reperfusion injury through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *PLoS One*. 2007 May 23;2(5):e469.

doi: 10.1371/journal.pone.0000469. PMID: 17520028;
PMCID: PMC1867857.

9. Yeboah MM, Xue X, Duan B, Ochani M, Tracey KJ, Susin M, Metz CN. Cholinergic agonists attenuate renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Kidney Int.* 2008 Jul;74(1):62-9. doi: 10.1038/ki.2008.94. Epub 2008 Apr 9. PMID: 18401335; PMCID: PMC2667336.

10. Yeboah MM, Xue X, Javdan M, Susin M, Metz CN. Nicotinic acetylcholine receptor expression and regulation in the rat kidney after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Sep;295(3):F654-61.

doi: 10.1152/ajprenal.90255.2008. Epub 2008 Jul 9. PMID: 18614620; PMCID: PMC2536882.

11. Kim H, Kim SR, Je J, Jeong K, Kim S, Kim HJ, Chang KC, Park SW. The proximal tubular $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor attenuates ischemic acute kidney injury through Akt/PKC signaling-mediated HO-1 induction. *Exp Mol Med.* 2018 Apr 20;50(4):1-17.

doi: 10.1038/s12276-018-0061-x. PMID: 29674665; PMCID: PMC5938048.

12. Vlachopoulos G, Schizas D, Hasemaki N, Georgalis A. Pathophysiology of Contrast-Induced Acute Kidney Injury (CIAKI). *Curr Pharm Des.* 2019;25(44):4642-4647. doi: 10.2174/1381612825666191210152944. PMID: 31820694.

Role of Sodium-Dependent Renal Acetylcholine Release in Acute Kidney Injury

Shuji Shimizu¹, Tsuyoshi Akiyama¹, Yosuke Kuroko², Yoshimasa Kishi², Haruhito A. Uchida³

¹ National Cerebral and Cardiovascular Center, ² Okayama University Hospital, ³ Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Summary

Acute kidney injury (AKI) is a condition in which renal function declines rapidly in a short period of time, and water and electrolyte disturbances occur due to the accumulation of creatinine and urea nitrogen in the blood. In AKI, an increase in serum creatinine of as little as 0.3 mg/dl has been shown to contribute significantly to patient mortality. Therefore, it is essential to establish an effective treatment for AKI. However, there are no drugs that act directly on the kidney, and infusions and vasoactive drugs are the mainstay of treatment.

In our previous study, which was supported by the Salt Science Research Foundation, we reported that the release of acetylcholine (ACh) in the renal cortex was non-neuronal and dependent on intracellular and extracellular sodium ion gradient. We also reported that this sodium-dependent renal ACh release was impaired in Dahl salt-sensitive rats and that an acetylcholinesterase inhibitor could reduce renal injury. Therefore, the purpose of this study is to evaluate the role of sodium-dependent renal ACh release in AKI and to develop drugs that can directly act on the kidney.

First, we examined renal ACh release in a prerenal AKI model. To induce prerenal AKI, we ligated the left renal artery of rats under general anesthesia. We implanted a microdialysis probe into the renal cortex of the rats and monitored dialysate ACh concentration using high-performance liquid chromatography. Contrary to our expectations, this experiment demonstrated that renal ischemia significantly increased dialysate ACh concentration. To investigate the mechanism of this renal ACh release, we tested an epithelial sodium channel inhibitor, Benzamil. However, Benzamil was unable to fully suppress this ischemia-induced renal ACh release. Next, we tested the contrast-induced AKI model. After intravenous injection of iopamidol, renal ACh release tended to decrease. These results suggest that the dynamics of renal ACh differ depending on the causes of AKI.