

# 脳交感神経中枢に着目した食塩誘発性夜間多尿の機序解明と 新規治療法開発に向けた基礎的研究

竹澤 健太郎<sup>1</sup>, 上田 倫央<sup>1</sup>, 福原 慎一郎<sup>1</sup>, 野々村 祝夫<sup>1</sup>, 小山 佳久<sup>2</sup>, 島田 昌一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科泌尿器科, <sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科神経細胞生物学

## 概要

夜間多尿は夜間頻尿の最大の原因である。我々はこれまで一酸化窒素 (NO) 産生低下と塩分過剰摂取にともなう腎局所レニンアンジオテンシン系 (RAS) の活性化が夜間頻尿を引き起こすことを明らかにしてきた。しかし、NO 産生低下と塩分過剰摂取が腎局所 RAS を活性化するメカニズムは未解明であった。

本研究では、この腎局所 RAS 活性化の機序として、脳交感神経中枢および腎交感神経の関与に着目し、

- ① 食塩誘発性夜間多尿モデルマウスにおける脳交感神経中枢の活動性を評価すること、
- ② 食塩誘発性夜間多尿モデルマウスに対する腎交感神経除神経が、腎局所 RAS 活性および夜間多尿に及ぼす影響を解明すること、

を目的とした。

実験①19週齢マウスに NO 合成酵素阻害薬 (L-NAME) と 1%高塩分食を投与し食塩誘発性夜間多尿モデルマウスを作成した。脳交感神経中枢の活動性を脳視床下部室傍核 (PVN) における c-Fos タンパク質の発現で評価した。

実験②外科的腎除神経術を施したマウスと Sham 手術マウスに L-NAME と 1%高塩分食を 8 週間投与した。腎局所 RAS 活性は腎臓内アンジオテンシノーゲン (AGT) 発現量で、夜間多尿は非活動期尿量率 (automated stain on paper method) で評価した。

結果①食塩誘発性夜間多尿モデルマウスでは、対照群と比較し脳交感神経中枢である PVN の c-Fos 陽性細胞数が有意に増加しており ( $P = 0.002$ )、脳交感神経中枢の活性化が確認された。

結果②腎除神経群では、Sham 手術群と比較して腎臓内 AGT 発現量が有意に低下し ( $P = 0.009$ )、腎局所 RAS 活性が抑制されることが分かった。さらに、Sham 群では L-NAME と高塩分食投与により非活動期尿量率が増加したのに対し、腎除神経群ではこの増加が有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

以上の結果から、NO 産生低下と塩分過剰摂取による夜間多尿の発症・進展において、脳交感神経中枢の活性化が腎交感神経を介して腎局所 RAS を亢進させるという新たなメカニズムが明らかになった。脳交感神経中枢や腎交感神経は、これまで有効な治療法が少なかった夜間多尿に対する新規治療ターゲットとなりうると考えられる。

## 1. 研究目的

夜間に排尿のために起きなければならない状態を夜間頻尿と呼ぶ。我が国では 70 歳以上の高齢者の 15%、80 歳以上の高齢者の 30%以上が夜間排尿のために 3 回以上起きており、夜間頻尿は多くの高齢者の QOL を低下させている<sup>1</sup>。さらに近年、夜間頻尿は生命予後を悪化させるこ

ともわかってきた<sup>2</sup>。夜間頻尿は高齢化の進む我が国において解決すべき重要疾患の一つである。

夜間頻尿の最大の原因は、夜間尿量の増加、すなわち夜間多尿である。我々はこれまで夜間多尿の病態解明を目指し臨床研究、基礎研究を行ってきた。臨床研究では、一酸化窒素 (NO) の低下と塩分過剰摂取の組み

合わせにより夜間多尿が引き起こされることを明らかにした(図 1)。また基礎研究ではマウスを用いた動物実験で, NO 産生の抑制と高塩分食投与により腎局所レニンアンジオテンシン系(腎局所RAS)が活性化し, 腎における Na 再吸収が亢進し, 夜間多尿が引き起こされることを明らかにした(図 2)<sup>3)</sup>。これらの研究成果は, 腎局所 RAS の活性化が夜間多尿の病態において重要な役割を果たしており, 夜間多尿の新たな治療ターゲットになることを示唆している。しかし, NO 産生の低下と塩分過剰摂取の組み合わせにより腎局所 RAS が活性化するメカニズムは明らかにできていなかった。

今回我々は腎局所 RAS 活性化の機序として, 腎交感神経と脳交感神経中枢の関与に着目した。腎交感神経

は腎臓に分布する交感神経であり, その活性化で神経終末からノルエピネフリンが放出されると腎局所でレニン分泌やアンジオテンシン II 産生が亢進し, 腎臓における Na 再吸収が亢進することが知られている。腎交感神経は脳にある脳交感神経中枢によりコントロールされていることも知られている。以上の知見に基づき我々は, 夜間多尿の病態における腎局所 RAS 活性化に, 脳交感神経中枢や腎交感神経中枢の活性化が関与しているのではないかと考えた(図 3)。

本研究ではこの仮説を検証するために

- ① 食塩誘発性夜間多尿における脳交感神経中枢の活動性
  - ② 食塩誘発性夜間多尿に対する腎交感神経除神経の効果
- を明らかにすることを目的とした。

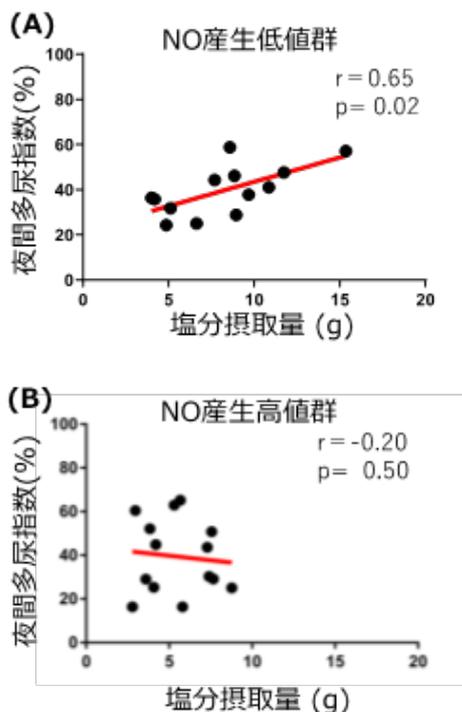


図 1. NO 産生量が塩分摂取量と夜間多尿の関係に及ぼす影響  
 A) NO 産生低値群では塩分摂取量と夜間多尿指数に正の相関を認めた  
 B) NO 産生高値群では塩分摂取量と夜間多尿指数に相関を認めなかった

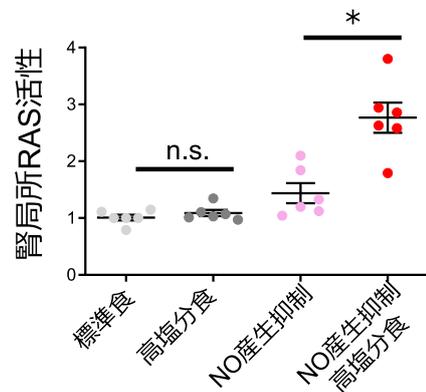
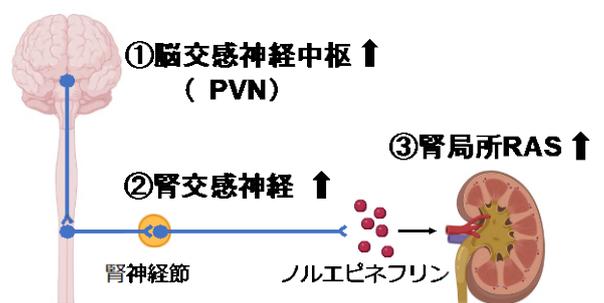


図 2. NO 産生抑制と高塩分食による腎局所 RAS 活性の変化  
 NO 産生抑制と高塩分食で腎局所 RAS 活性が亢進した



①脳交感神経中枢の活性化が②腎交感神経を介し③腎局所RASを活性化し夜間多尿を引き起こす

図 3. 本研究の仮説

## 2. 研究方法

### 2.1 食塩誘発性夜間多尿における脳交感神経中枢の活動性の評価

食塩誘発性夜間多尿モデルマウスと正常対照マウスで脳交感神経中枢活動を比較した。食塩誘発性夜間多尿モデルマウスは19週齢のマウスにNO合成酵素阻害薬(L-NAME)と1%高塩分食を2週間投与することで作成した。2週間後に脳を摘出した。摘出した脳の視床下部室傍核(PVN)におけるc-Fos発現を、免疫組織化学的に評価し脳交感神経中枢活性を評価した。

### 2.2 食塩誘発性夜間多尿に対する腎交感神経除神経の効果の検討

#### 2.2.1 腎交感神経除神経術の手技確立

顕微鏡下に腎動静脈周囲の神経組織を切断する、外科的腎交感神経除神経により腎交感神経除神経とした(図4)。手術により腎交感神経が全て切断できていることを確認するために、腎ノルエピネフリン濃度を測定した。

#### 2.2.2 腎交感神経除神経にともなう腎局所RAS活性の変化

19週齢のマウスを腎交感神経群とSham群の2群に分け、L-NAMEと1%高塩分食を8週間投与した。8週間後に腎臓を摘出し、腎局所RAS活性を評価した。腎局所RAS活性は、Western Blotting法による腎内アンジオテンシノーゲン(AGT)発現量で評価した。

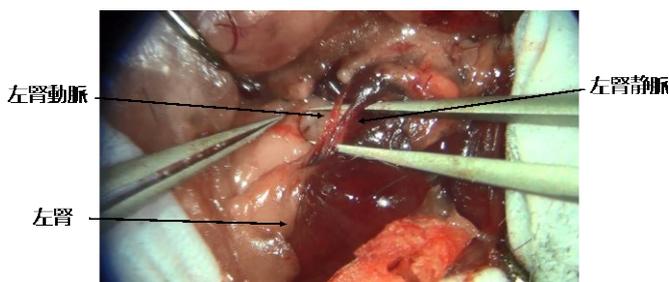


図4. マウス腎交感神経術 術中所見  
腎動静脈周囲の神経を外科的に切断した

### 2.2.3 腎交感神経除神経が食塩誘発性夜間多尿に及ぼす影響

19週齢のマウスを、腎交感神経除神経術を行なった腎交感神経群とSham手術を行なったSham群の2群に分け、L-NAMEと1%高塩分食を8週間投与した。8週間後に排尿行動を記録し、非活動期尿量率(ヒト夜間尿量率に相当)を評価した。マウスの排尿行動記録はautomated stain on paper methodにより記録し、非活動期尿量率=非活動期尿量÷1日尿量で算出した<sup>4)</sup>。

## 3. 研究結果

### 3.1 食塩誘発性夜間多尿における脳交感神経中枢の活動性の評価

食塩誘発性夜間多尿モデルではPVNにおけるc-Fos陽性細胞数が有意に増加していた(正常対照 vs. 食塩誘発性夜間多尿モデル  $37.1 \pm 4.2$  vs.  $94.5 \pm 17.5$  /10切片,  $P=0.002$ ) (図5)。このことから、食塩誘発性夜間多尿モデルの脳交感神経中枢が活性化されていることが分かった。

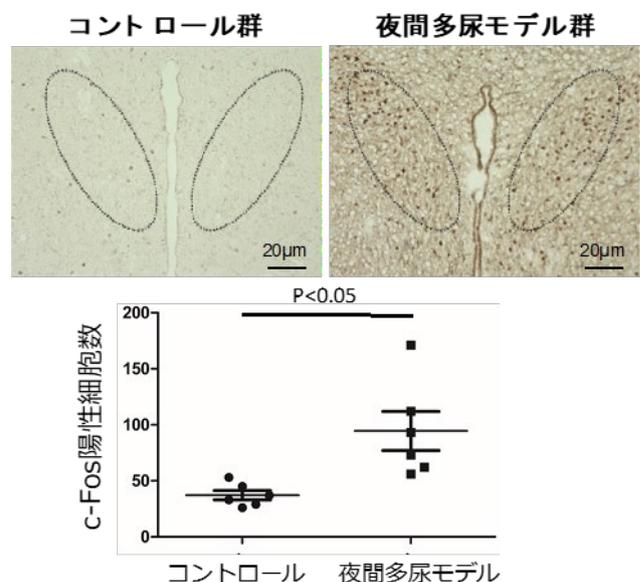


図5. 食塩誘発性夜間多尿における脳交感神経中枢の活動性  
夜間多尿モデル群では脳交感神経中枢活性が亢進した

### 3. 2 食塩誘発性夜間多尿に対する腎交感神経除神経術の効果の検討

#### 3. 2. 1 腎交感神経除神経術の手技確立

腎除神経群では腎ノルエピネフリン濃度が著明に低下していた ( $124.9 \pm 14.2$  vs.  $12.3 \pm 2.4$  ng/g,  $P = 0.002$ ) (図 6)。このことから腎交感神経は全て切断できていることが確認できた。

#### 3. 2. 2 腎交感神経除神経にともなう腎局所 RAS 活性の変化

腎除神経群では腎内 AGT 発現量が有意に低下していた ( $1.59 \pm 0.14$  vs.  $1.07 \pm 0.09$ ,  $P = 0.009$ ) (図 7)。このことから腎除神経により腎局所 RAS 活性が抑制されることがわかった。

#### 3. 2. 3 腎交感神経除神経が食塩誘発性夜間多尿に及ぼす影響

Sham 群では経過とともに非活動期尿量率が増加したのに対し、腎除神経群では非活動期尿量率の増加は認めなかった ( $P < 0.05$ , two-way repeated measures ANOVA) (図 8)。このことから腎除神経により食塩誘発性夜間多尿が改善されることが分かった。

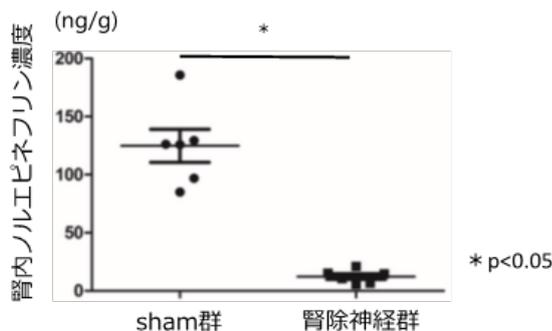


図 6. 腎除神経にともなう腎交感神経活性の変化  
腎除神経により腎交感神経活性は抑制された

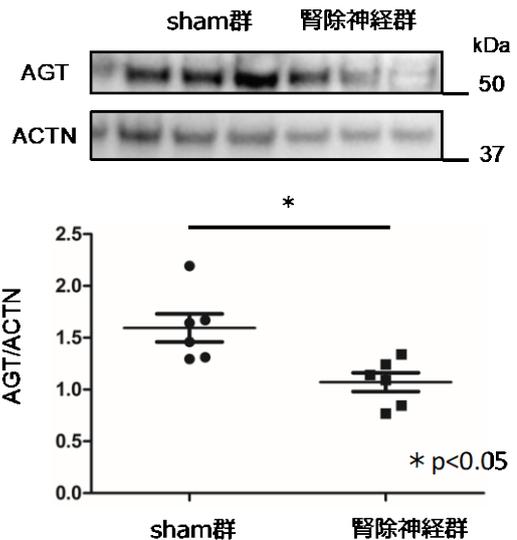


図 7. 腎除神経にともなう腎局所 RAS 活性の変化  
腎除神経により腎局所 RAS 活性が抑制された

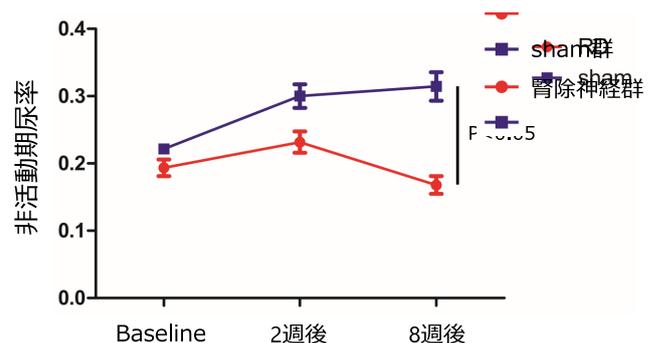


図 8. 腎除神経にともなう非活動期尿量率の変化  
腎除神経により夜間多尿が改善した

## 4. 考察

これまで夜間多尿の病態として NO 産生低下と塩分過剰摂取ともなう腎局所 RAS 活性亢進が重要な役割を果たしていることが分かっていたが、腎局所 RAS 活性亢進のメカニズムはよく分かっていなかった。本研究により、NO 産生低下と塩分過剰摂取により脳交感神経中枢活性が亢進し、腎交感神経を介して、腎局所 RAS 活性が亢進することが明らかとなった。腎除神経により腎局所 RAS 活性が抑制され、夜間多尿が改善されることも分かった。脳交感神経中枢や腎交感神経は、夜間多尿の新たな治療ターゲットになると考えられた。

## 5. 今後の課題

NO 産生低下により食塩誘発性夜間多尿が引き起こされるメカニズムとして、脳交感神経中枢、腎交感神経の活性化が明らかとなった。今後は NO 産生や交感神経をターゲットとした、夜間多尿の新規治療法開発が課題である。

また、本研究では求心性、遠心性の腎交感神経をともに切断した。今後は求心性腎神経のみを遮断する選択的腎除神経の効果を評価し、腎交感神経遮断による夜間多尿改善の詳細なメカニズム解明も課題である。

## 6. 文献

1. Mitsui T, et al. Prevalence and impact on daily life of lower urinary tract symptoms in Japan: Results of the 2023 Japan Community Health Survey (JaCS 2023). *Int J Urol.* 2024 Jul;31(7):747-754.
2. Funada S, et al. Impact of Nocturia on Mortality: The Nagahama Study. *J Urol.* 2020 Nov;204(5):996-1002.
3. Sekii Y, et al. Dietary salt with nitric oxide deficiency induces nocturnal polyuria in mice via hyperactivation of intrarenal angiotensin II-SPAK-NCC pathway. *Commun Biol.* 2022 Feb 28;5(1):175.
4. Takezawa K, et al. Authentic role of ATP signaling in micturition reflex. *Sci Rep.* 2016 Jan 22;6:19585.

# The Mechanism of Salt-Induced Nocturnal Polyuria Focusing on the Brain Sympathetic Nervous Center

Kentaro Takezawa<sup>1</sup>, Norichika Ueda<sup>1</sup>, Shinichiro Fukuhara<sup>1</sup>, Norio Nonomura<sup>1</sup>, Yoshihisa Koyama<sup>2</sup>,  
Shoichi Shimada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, The University of Osaka Graduate School of Medicine, <sup>2</sup>Department of Neuroscience and Cell Biology, The University of Osaka Graduate School of Medicine

## Summary

Nocturnal polyuria is the primary cause of nocturia. We have previously demonstrated that activation of the renal renin-angiotensin system (RAS), associated with reduced nitric oxide (NO) production and excessive salt intake, causes nocturnal polyuria. However, the mechanism by which reduced NO production and excessive salt intake activate the renal RAS remained unclear. This study focused on the involvement of the brain sympathetic nervous center and renal sympathetic nerves in the mechanism of renal RAS activation. The objectives were: (1) to evaluate brain sympathetic nervous center activity in a salt-induced nocturnal polyuria mouse model, and (2) to elucidate the effects of renal denervation (RDN) on renal RAS activity and nocturnal polyuria in this model.

Experiment 1: A salt-induced nocturnal polyuria model was created by administering an NO synthase inhibitor (L-NAME) and a 1% high-salt diet. Brain sympathetic nervous center activity was assessed by c-Fos expression in the paraventricular nucleus (PVN).

Experiment 2: Mice subjected to surgical RDN and sham-operated mice were administered L-NAME and a 1% high-salt diet for 8 weeks. Renal RAS activity was evaluated by intrarenal angiotensinogen (AGT) expression levels, and nocturnal polyuria was assessed by the inactive phase urine volume ratio.

Results 1: In the salt-induced nocturnal polyuria model mice, the number of c-Fos positive cells in the PVN was significantly increased compared to the control group ( $P=0.002$ ), indicating activation of the brain sympathetic nervous center.

Results 2: In the RDN group, intrarenal AGT expression was significantly lower compared to the sham group ( $P=0.009$ ), indicating that renal RAS activity was suppressed. Furthermore, while the inactive phase urine volume ratio increased in the sham group following L-NAME and high-salt diet administration, this increase was significantly suppressed in the RDN group ( $P<0.05$ ).

These results reveal a novel mechanism of nocturnal polyuria induced by reduced NO production and excessive salt intake: activation of the brain sympathetic nervous center enhances renal RAS activity via renal sympathetic nerves. The brain sympathetic nervous center and renal sympathetic nerves are considered potential new therapeutic targets for nocturnal polyuria.