

腎神経が食塩感受性高血圧に及ぼす影響の検討

田中 真司¹, 安部 力²

¹ 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科, ² 岐阜大学医学部生理学

概要

腎臓を支配する神経は、交感神経(遠心性)と感覚神経(求心性)の2種類からなる。食塩感受性高血圧の成立・進展において、腎交感神経が重要な役割を果たすことはこれまで多くの報告があるが、腎感覚神経が果たす役割について詳細は不明である。本研究では、腎感覚神経を選択的に抑制・刺激する系を確立し、食塩感受性高血圧において腎感覚神経が果たす役割を解明することを目的とした。

Trpv1Cre マウスの腎に Cre 依存性の DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) を組み込んだ retrograde AAV (逆行性アデノ随伴ウイルス) を微小注射することにより、上記目的を達成する計画であった。まずは微小注射プロトコルを確立するため、CTB (cholera toxin subunit B) を腎臓に様々なプロトコルで微小注射し、DRG (dorsal root ganglion: 後根神経節) を観察することによりどのプロトコルが腎感覚神経操作にベストかを検証することとした。

3つのプロトコルを試し、腎臓支配神経が同定できる CTB 注射プロトコルを確立した。確立したプロトコルを用い、様々なセロタイプの AAV を微小注射したが、これまでのところ感染成立が確認できていない。今後、別のセロタイプの使用やさらなるプロトコルの最適化を予定している。

1. 研究目的

腎臓を支配する神経は、脳から腎臓に情報を伝える交感神経(遠心性)と腎臓から脳に情報を伝える感覚神経(求心性)の2種類からなる。食塩感受性高血圧の成立・進展において、腎交感神経が重要な役割を果たすことはこれまで多くの報告があるが、腎感覚神経が果たす役割について詳細は不明である。

腎神経の遮断については10%フェノール溶液を腎神経に塗布することによって腎神経の遠心路および腎感覚神経の双方を焼灼することができ、これによって Deoxycorticosterone Acetate (DOCA) 食塩ラットの血圧が低下することが示されている⁽¹⁾。一方で腎感覚神経の神経終末と軸索に発現している TRPV1 受容体のリガンドであるカプサイシン溶液を同様に腎神経に塗布する手法: 感覚神経選択的除神経 (afferent renal denervation: aRDN) を行い、腎神経遠心路を保ったまま腎感覚神経のみを選

択的に除去することにより、フェノールによる除神経と同様に DOCA 食塩ラットの血圧が低下することが報告された⁽¹⁾。

腎交感神経遠心路は腎血管とネフロンをすべて支配しており、高い密度で存在するのは輸入細動脈に沿った分布である⁽²⁾。他方で腎感覚神経は遠心性の交感神経と互いに連携してナトリウムバランスの維持に寄与している。腎臓ほぼ全域に分布している遠心性交感神経と異なり、感覚神経は腎盂壁に最も密に分布しており、同部位の機械的な進展や圧の上昇を感知しているのではないかと考えられている。尿管の閉塞⁽³⁾やフロセミドや心房性ナトリウム利尿ペプチドといった利尿剤の投与⁽⁴⁾、動脈圧の上昇⁽⁵⁾などでの腎感覚神経の活動亢進が過去に報告されている。また Baumann らは鉍質コルチコイド過剰による水・ナトリウム貯留型高血圧モデルである DOCA 食塩高血圧マウスにおいて、インターロイキン1受容体の拮抗薬であるアナキンラと腎感覚神経遮断が同様に血圧を低下させ、またこれらの併用は相乗効果ではなく共通のメカニズムであると考えられるこ

とを報告した⁵⁾。すなわち腎感覚神経は機械刺激の受容器であるとともに化学受容器としての役割も持っているものと推測される。

以上、高血圧に対する腎感覚神経の役割についての研究では、いずれもカプサイシンによる腎感覚神経の選択的焼灼が用いられており、腎感覚神経の機能的な活性化や抑制が食塩感受性高血圧に対してどのような影響があるか、そしてそのメカニズムは何であるか、については現時点で不明である。腎神経の束の中では2種類の神経が混在しているため、両者を物理的に分けて選択的に操作することは不可能である。本研究では、最新の技術を用いて腎感覚神経を選択的に操作し、食塩感受性高血圧において腎感覚神経が果たす役割を解明することを目的とする。

2. 研究方法

2.1 動物実験

実験には生後8週から12週齢のオス C57BL/6J マウスを使用し、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパンより購入し、実験開始までは $20 \pm 3^\circ\text{C}$ の室温、40~70%の湿度かつ、12-12時間毎の明暗に光を制御された部屋で5個体1ケージとして飼育した。実験期間中すべてのマウスは標準マウス飼料と水道水を自由に摂取できた。マウスは実験にて施行されたすべての外科手術で、ドルベネ注 0.75 mg/kg (共立製薬)、ミダゾラム注射液「NIG」 4 mg/kg (日医工)、ベトルファール 5 mg/kg (明治アニマルヘルス) を生理食塩水に調整した混合麻酔の腹腔内注射によって麻酔された。麻酔は足指の刺激への反応の消失によって確認された。外科手術中は 37°C に保たれたホットプレート上で実験を行い、体温の低下を防いだ。外科的処置後は移動した臓器を元の位置に戻した後、筋膜および皮膚をナイロン糸にてそれぞれ縫合し閉創した。すべての手順は東京大学動物実験委員会によって承認され、東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルに従って実施された。

2.2 腎感覚神経の選択的除神経

高濃度のカプサイシンを野生型マウスの腎神経に塗布し感覚神経のみを除神経する。この方法は、腎感覚神経の軸索にカプサイシン受容体である TRPV1 が発現しており、交感神経には発現していないことを利用したものである¹⁾。マウス片側腎にカプサイシンを用いた aRDN ま

たは腎交感神経遠心路と感覚神経ともに除神経 (total renal denervation: tRDN) を行い、対側には薬剤の代わりに生理食塩水を用いた疑似対照腎として処置を行った。除神経処置の7日後に両側腎臓を採取し、CGRP および TH で免疫組織染色を行い観察し、それぞれ腎感覚神経および遠心性神経が除神経処置によって消失しているか確認した。

aRDN: 麻酔下のマウスを仰臥位に固定して腹部を剃毛の上、正中で 5 cm の皮膚および腹膜を切開した。綿棒を用いて腸管を反転させた後に生理食塩水を含ませた紙ワイパーを被せ乾燥を防いだ。後腹膜に穴を開けて腎動静脈を露出させた。腎神経を機械的に切断しないように注意しながら腎動静脈を周囲の脂肪組織から丁寧に剥離して腎神経を露出させた。露出させた腎茎部と背部および肝臓、腸管の間に短冊状のパラフィルムを挟み薬液が標的部以外に曝露することを防いだ。 $3 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$ の短冊状の紙ワイパーにカプサイシン溶液 (エタノール 5%, TWEEN80 (P5188; Sigma-Aldrich) 5%, 生理食塩水 90% でカプサイシン 33 mM (M2028; Sigma-Aldrich) としたもの) を浸し腎茎部に一周巻き付け 15 分間反応させた。15 分反応させた後にパラフィルムおよび紙ワイパーを除去し、拭き取った上で 1 mL の生理食塩水で 3 回洗浄した。カプサイシン溶液の代わりに生理食塩水を用いることで疑似対照群とした。

tRDN: 前述の aRDN と同様に腎茎部を露出させ、背面組織との間にパラフィルムの小片を置いた。 $3 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$ の短冊状の紙ワイパーにフェノール溶液 (エタノールにて 10% フェノール (P5566; Sigma-Aldrich) としたもの) を浸し腎茎部に一周巻き付け 1 分間反応させた。反応させた後にパラフィルムおよび紙ワイパーを除去し、拭き取った上で 1 mL の生理食塩水で 3 回洗浄した。選択的除神経同様に生理食塩水を用いることで疑似対照群とした。

2.3 腎感覚神経トレーシング

腎感覚神経の細胞体を後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) において同定することを目的として、マウスの右腎に蛍光蛋白を結合された (cholera toxin subunit B: CTB) を注入した。Vibrio cholerae によって産生されるコレラ毒素はコレラの発症の主な病原因子である。コレラ毒素は 84 kD のタンパク質でコレラ毒素 A サブユニット (CTA) と CTB のサブユニットからなる。CTB は 55 kD の

ホモ 5 量体からなり、シナプス可塑性に重要な役割を担う monosialotetrahexosylganglioside に高い親和性を持っており、これと結合して実際に毒素活性を有する CTA と共に神経細胞に取り込まれる⁶⁾。この性質を利用して CTB は神経細胞をトレーシングすることに用いられるが、本研究では CTB をマウス腎臓に注入し感覚神経末端から細胞体に到達させることで DRG において腎感覚神経の細胞体の同定を行った。

注入 7 日後に第 10 胸神経から第 2 腰神経までの左右 DRG を採取し、透明化および CTB の免疫組織染色を行い蛍光顕微鏡にて CTB に結合された蛍光蛋白および CTB を標識した蛍光を観察した。CTB の注入には Nanoject III 110V (#3-000-207; Drummond Scientific Company)を用いた。Nanoject Glass Capillaries (#3-000-203-G/X 3.5" length; Drummond Scientific Company)を、プーラー(PC-100; NARISHIGE)を用いてガラスピペットに加工した(1 段目ヒーター出力 60, 2 段目 55 の 2 段引き設定とした)。Cholera Toxin Subunit B Recombinant Alexa488 Conjugate (C34775; Invitrogen)にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え 4 mg/mL に調節した。

以下に示す 3 経路のアプローチでそれぞれ腎臓に到達し CTB を注入した。

- ① 腎門部腹側アプローチ: 麻酔下のマウスを仰臥位に固定して腹部を剃毛の上、正中で 5 cm の皮膚および腹膜を切開した。綿棒を用いて腸管を対側腹壁上に反転させた後に生理食塩水を含ませた紙ワイパーを被せ乾燥を防いだ。CTB/PBS 溶液 4 μ L をガラスピペットに充填し、NanojectIII で腎門部腹側 4 カ所(腎静脈流出部から外側に 1 mm の 1 点および、さらに外側に 1 点、上下にそれぞれ 1 点、それぞれ 1 mm の間隔をあけた 4 点)にそれぞれ 1 μ L ずつ 20 nL/秒で注入した。注入後に刺入部からの back leak を防ぐため 30 秒間経過した後にガラスピペットを抜去し、直ちに抜去部位に綿棒を押し当て、同部位からの CTB 液の漏出を防いだ。
- ② 腎門部背側アプローチ: 麻酔下のマウスを伏臥位に固定して背面を剃毛の上、右側部で 2 cm 皮膚および筋膜を切開した。腎門部を露出させた上で、CTB/PBS 溶液 4 μ L をガラスピペットに充填し、NanojectIII で腎門部背側 4 カ所(腎静脈流出部から

外側に 1 mm の 1 点および、さらに外側に 1 点、上下にそれぞれ 1 点、それぞれ 1 mm の間隔をあけた 4 点)にそれぞれ 1 μ L ずつ 20 nL/秒で注入した。

- ③ 尿管内注入: 麻酔下のマウスを仰臥位に固定して腹部を剃毛の上、正中で 5 cm の皮膚および腹膜を切開した。綿棒を用いて腸管を対側腹壁上によけた後に生理食塩水を含ませた紙ワイパーを被せ乾燥を防いだ。腎盂尿管移行部腹側の組織を可及的に除き、尿管前面を露出させた。注入した薬剤が直ちに膀胱へ流出することを防ぐために腎下極の高位で SUGITA ANEURYSM CLIP MINI(07-940-81; MIZUHO)を用いて尿管をクランプした。CTB/PBS 溶液 4 μ L をガラスピペットに充填し、NanojectIII で尿管前面より尿管内に注入した。注入速度は 20 nL/秒とした。注入した後、back leakを防ぐために 3 分間経過した後にクランプを解除してから、ガラスピペットを抜去した。直ちに抜去部位に綿棒を押し当て CTB 溶液の漏出を防いだ。

2. 4 DRG の採取と透明化

マウスの DRG は非常に小さく、凍結標本を用いて連続切片を作成することが困難であるため、本研究では 1 つの DRG を透明化し、全体を顕微鏡で観察する方法を採用した。まず、マウスを麻酔下に断頭し、上位胸椎から腰椎領域までの脊椎を切り出した。切り出した脊椎は矢状断方向に半割して左右を分離し、必要に応じて第 8 胸神経から第 2 腰神経までの DRG を 1 個ずつ採取した。採取した DRG は 96 ウェルマイクロプレートに収められ、4%PFA で 24 時間固定した後に透明化処理を施した。固定後、DRG を PBS で 24 時間洗浄し、Tissue-Clearing Reagent CUBIC-L for Animals(東京化成工業)を用いて 24 時間脱脂処理を行った。その後、再び PBS で 24 時間洗浄を行い、1 次抗体を 72 時間反応させ、PBS で 24 時間洗浄した。次に、2 次抗体を 48 時間反応させた後、さらに PBS で 24 時間洗浄を実施し、4%PFA/PBS に再度浸して 24 時間固定を行った。固定後は PBS で 24 時間洗浄し、最後に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen)を溶解した Tissue-Clearing Reagent CUBIC-R+(N) for Animals(東京化成工業)に浸し、24 時間かけて屈折率を調整した(図 1)。

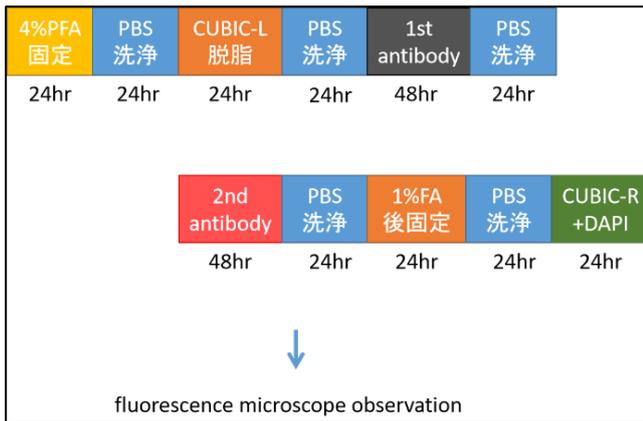


図 1. CUBIC キットを用いた DRG の透明化手順

透明化された DRG は、CUBIC-R+(N)と DAPI の混合液中で浮遊した状態で保たれた。この状態の DRG を、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) を用いて観察した。顕微鏡の Z 軸方向にフォーカスを動かすことで、任意の断面の蛍光像を疑似的に観察可能であった。

2. 5 免疫組織染色

腎臓は頸椎脱臼による安楽死の後、速やかに摘出された。免疫組織学的な評価に供する検体については直ちに 1% Periodate Lysine Paraformaldehyde で固定された後、18%スクロース/PBS で 4°C 中に一晚保存された上で凍結保存された。各腎臓について 10 μm 厚の凍結切片が作成された。aRDN および tRDN によって作成した凍結切片中の腎感覚神経または腎神経遠心路が除かれていることを確認するために、CGRP および TH の免疫組織染色と観察を行った。CGRP の検出には抗 CGRP (D5R8F) ウサギ IgG (1:300; #14959; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) および Alexa594 結合抗ウサギ IgG(H+L) ヤギ IgG (1:300; Invitrogen) を、TH の検出には抗 TH ヒツジ IgG (1:1000; AB1542; Sigma-Aldrich) および Alexa 594 結合抗ヒツジ IgG(H+L) ロバ IgG1 (1:300; # A-11016; Invitrogen) を使用した。

腎に注入された CTB が DRG に到達しているかを調べるために抗 CTB ウサギポリクローナル IgG (1:300; ab34992; Abcam) および Alexa594 結合抗ウサギ IgG(H+L) ヤギ IgG (1:300; Invitrogen) で CTB を染色し観察した。

すべての腎臓、DRG の光学顕微鏡所見および免疫蛍光染色所見は BZ-X710 (KEYENCE) を用いて観察した。フィルターはダイクロックミラー 495, 585 および 400 を使用した。

3. 研究結果

3. 1 感覚神経選択的除神経 (図 2)

生理食塩水を用いた疑似対照群では腎凍結切片において交感神経 (遠心性線維) の存在を示す TH 陽性の神経線維を腎実質の広範囲の細い神経線維と腎門部の動脈に伴走する太い神経線維に、感覚神経 (求心性線維) の存在を示す CGRP 陽性線維を腎盂壁直下の細い線維と腎動脈に伴走する太い神経線維に確認できた。一方で 10%フェノール液を用いた tRDN においては上記のいずれの線維も消失を確認しており、化学的な除神経によって交感神経、感覚神経のいずれもが除かれていることが確認できた。カプサイシンを用いた aRDN の腎臓では TH 陽性の線維については疑似対照群と同様に確認できたが、CGRP については末梢への分布が見られる腎盂壁直下について最大軸断面の腎盂壁全域について消失していることが確認された。生理食塩水による処置によって TH、CGRP 陽性線維が消失していないことと、aRDN において TH 陽性線維が消失していないことから、腎茎部を露出する手技および紙ワイプを腎茎部に巻き付けることによって機械的に除神経が起こっていないことが確認できた。また aRDN によって tRDN と同様に CGRP が消失していることとを合わせて、腎感覚神経を選択的に除神経できていることが確認された。

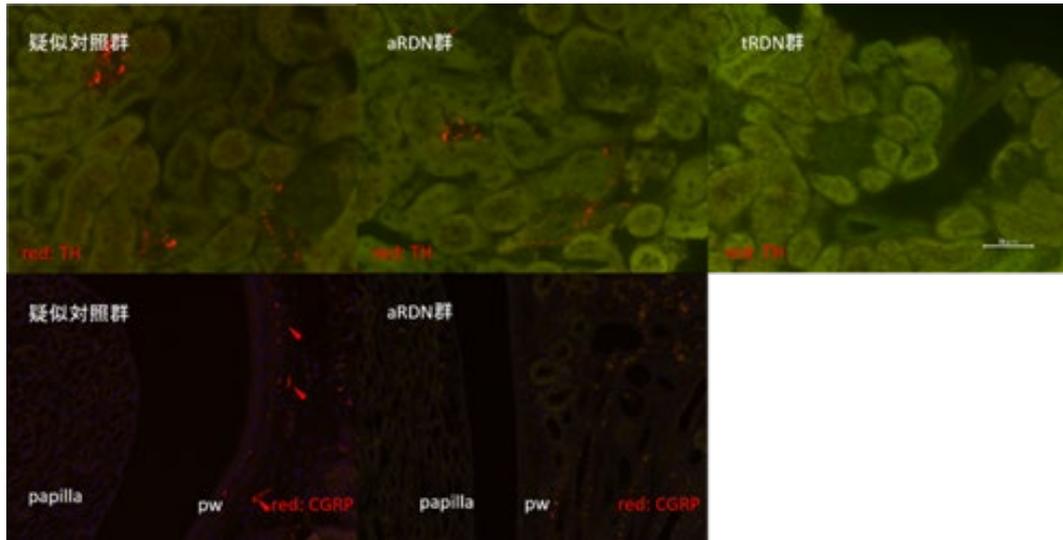


図 2. TH/CGRP による免疫組織染色

疑似対照群および aRDN 群では動脈周囲に TH の染色性が見られるが, tRDN 群では消失が確認できる(上段)
CGRP による免疫組織染色では疑似対照群では腎盂壁に染色性が見られるが, aRDN 群では消失が見られる(下段)

3. 2 腎感覚神経トレーシング, AAV 感染

次に, 焼灼ではなく腎感覚神経の機能を一時的に抑制または亢進させる方法の確立を試みた。具体的には, *Trpv1Cre* マウスの腎に, 抑制性(Gi)または興奮性(Gq, Gs)の Cre 依存性の DREADD を組み込んだ retrograde AAV を微小注射し, その後 CNO を腹腔内投与する計画であった。AAV 注射の前に, どのような微小注射プロトコルを用いれば効率的に腎感覚神経に到達できるかを検証する方針とした。感覚神経は腎門部より腎外に出た後に後 DRG を経由して脊髄に入る。腎臓を直接支配している神経線維の細胞体は DRG に存在しており, 脊髄後角でシナプスを形成するか, あるいはそのまま脊髄を上走する。そこで, まずは逆行性トレーサーである CTB を腎に微小注射し, 感覚神経の細胞体が存在する DRG で CTB を観察することとした。DRG の切片での観察では観察できる範囲が限られてしまい信頼性の高い結果が得られないため, DRG を透明化しホルマウントで観察することとした。

DRG 注射後の腎臓を観察すると, CTB に結合された蛍光蛋白が確認でき, 同一細胞に抗 CTB 抗体にて染色性が確認された。図 3 に代表的な一断面を示す。全ての注入方法について注入腎である右側の DRG で非注入側に対してより多くの CTB 陽性細胞が認められた。腎門部腹側アプローチでは注入側 DRG で最大で 36 個の陽性

細胞が認められた一方で非注入側について CTB 陽性細胞は認められなかった(図 4a) (CTB 注入腎臓側 n = 2・非注入腎臓側 n = 2)。CTB 陽性細胞は主に第 11 胸神経から第 1 腰神経にかけて存在し, 最も多く存在したのは第 13 胸神経の DRG であった。腎門部背側アプローチでは注入側 DRG で最大 4 個の CTB 陽性細胞が認められ, 対側では陽性細胞は認められなかった(図 4b) (CTB 注入腎臓側 n = 1・非注入腎臓側 n = 1)。尿管内注入について注入側 DRG に最大 35 個の CTB 陽性細胞が見られ, 非注入側については最大 11 個の CTB 陽性細胞が認められた(図 4c) (CTB 注入腎臓側 n = 2・非注入腎臓側 n = 2)。

以上から, 腎門部腹側アプローチが最も腎臓感覚神経に適したプロトコルと判断した。そして本アプローチを用い, *Trpv1Cre* マウスの腎に Cre 依存性の DREADD を組み込んだ retrograde AAV を微小注射する実験に進むため, まずは AAV 感染成立を確認するためコントロール AAV を用いた微小注射実験を行った。これまでに 3 つの異なるセロタイプ (Addgene 50459 pAAV-hSyn-DIO-mCherry (AAV 1/2/9)) を試したが, いずれにおいても DRG で mCherry シグナルは観察されず, 腎感覚神経への AAV 感染が成立していないことを示唆する結果であった。現在, 別のセロタイプやさらなるプロトコルの最適化を検討中である。

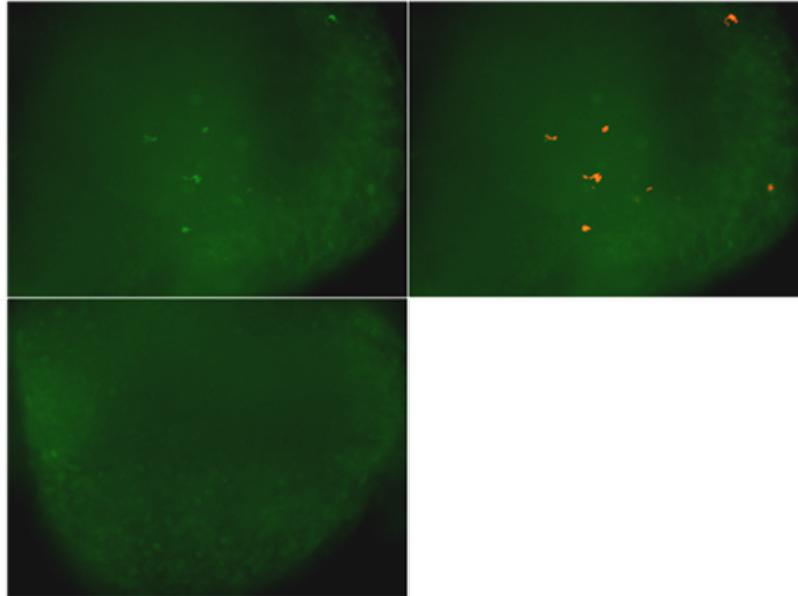


図 3. DRG における CTB 観察

CTB に結合された Alexa488 の蛍光(左)および抗 CTB 抗体で標識された Alexa596 の蛍光(右)
 一方で CTB 非注入側の DRG には蛍光蛋白を認めない(下)

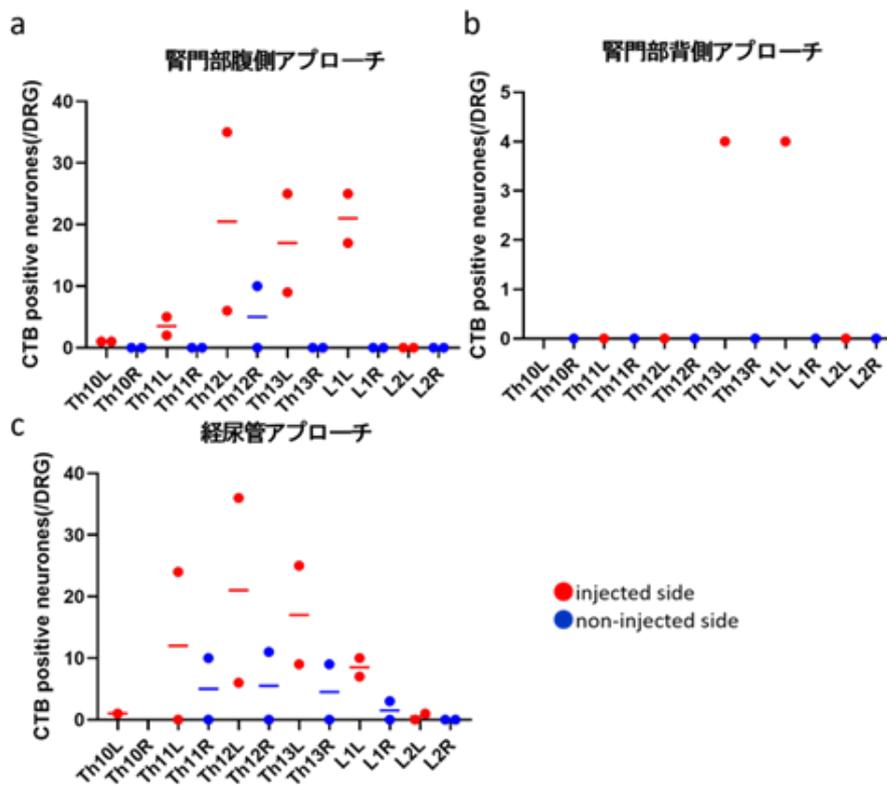


図 4. DRG に確認できた CTB 陽性細胞数

(a) 腎門部腹側アプローチ, (b) 腎門部背側アプローチ, (c) 尿管内注入

4. 考察

まずカプサイシンを用いた腎感覚神経の選択的除神経は既報通り成功したが、この手法が高血圧に与える影響はすでに報告されており、またこの手法に内在する limitation (カプサイシンは TRPV1 アゴニストなので塗布の直後は腎感覚神経を極度に興奮させることになる、焼灼による二次的な変化は除外できない、など) を克服するため、DREADD-AAV を腎感覚神経に感染させて機能的な抑制・興奮を達成する計画であった。

上述の結果において、今回 CTB を腎臓に注入することによって腎臓を支配している感覚神経の細胞体を DRG までトレーシングすることに成功した。特に腎門部 4 点に対する腹側アプローチでの注入によってより多くの神経細胞を同定することができた。同様に腎門部への注入を背側より行った場合に同定された神経細胞が少数であったことは、腹腔側からアプローチした場合と背面からアプローチした場合に腎臓のガラスピペットに対する角度が異なることによって同じ刺入点や深さであっても注入された液の腎被膜からの距離や腎門部との位置関係が異なる可能性や、腎の前後面において神経線維の分布が異なっている可能性などの要因が考えられた。尿管内に CTB を注入した時に注入側の DRG において陽性細胞が同定されたことは、逆行性に腎盂壁に存在する腎感覚神経を同定できている可能性を示唆したが、同時に CTB を注入していない対側の DRG にも CTB 陽性細胞が確認されたことから、目標とした神経細胞以外の神経細胞が標識されてしまったことが考えられた。CTB 注入後にガラスピペットを抜去する際に尿管壁においては腎実質への刺入と比較して多くの back leak が発生して CTB が腹腔内に漏れ出ている可能性や、CTB 注入に際しては尿管をクランプしており尿管下流に CTB が直接流出することを防いでいるもののガラスピペット抜去後にクランプを解除しており、膀胱は求心性線維が多臓器と比較して非常に豊富であることが報告されており⁽⁷⁾、クランプ解除の際に CTB が下位尿管に流出して膀胱、あるいはさらに逆行性に対側尿管を支配する神経細胞を標識してしまっている可能性が考えられた。いずれのアプローチ方法においても最も多くの腎感覚神経が同定された DRG は第 12 および 13 胸神経であり、とりわけ腎門部腹側アプローチによって最も多く CTB 陽性細胞

が確認され、対側 DRG には確認されなかった第 13 胸神経に最も腎感覚神経の細胞体が存在しているものと考えられた。ただし第 11 胸神経から第 2 腰神経にはいずれも数の差はあるものの CTB 陽性細胞が確認されており、この範囲に腎感覚神経はある程度の広がりをもって分布していると考えられた。マウスで腎感覚神経の支配レベルをきちんと調べた報告は無いが、ラットでは第 7 胸神経から第 2 腰神経の DRG に腎支配神経が存在していた⁽⁸⁾。

以上の結果から、腎門部腹側アプローチが最も腎臓感覚神経に適したプロトコルと判断し、AAV 感染実験に進んだが、これまでのところ腎感覚神経への AAV 感染は成立していない。DRG へ効率よく AAV を感染させることができたという報告は無く、さらに様々なセロタイプを検証すべきであると考えられた。また、上述の実験において、CTB によって腎臓を支配する全ての感覚神経細胞がラベルされているかの確認はできておらず、並行して微小注射プロトコルのさらなる最適化を進める必要があると考えられた。

5. 今後の課題

別のセロタイプの AAV 使用と腎臓への微小注射プロトコルのさらなる最適化により、腎感覚神経に DREADD-AAV を感染させ、CNO 投与により一時的に腎感覚神経を抑制または刺激できる系を確立する。その後、マウス食塩感受性高血圧モデルである DOCA-salt モデルで、腎感覚神経の抑制・刺激が高血圧に与える影響を検討する。具体的には、AAV 注射 4~6 週後に、DOCA ペレットを皮下に埋め込み、飲料水を 0.9% 生理食塩水に変更し、観察期間中は連日リガンドである CNO を投与する。血圧を 0, 1, 3, 7, 14, 21 日後に測定し、上記腎感覚神経操作が血圧に与える影響について検証する。

6. 文献

1. Foss JD, Wainford RD, England WC, Fink GD, Osborn JW. A novel method of selective ablation of afferent renal nerves by periaxonal application of capsaicin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 Jan 15;308(2):R112-22.
2. Kopp UC. Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 Jan 15;308(2):R79-95.

3. Ammons WS. Spinoreticular cell responses to renal venous and ureteral occlusion. *Am J Physiol.* 1988 Feb;254(2 Pt 2):R268-76.
4. Chen WG, Schloesser D, Arensdorf AM, Simmons JM, Cui C, Valentino R, Gnadt JW, Nielsen L, Hillaire-Clarke CS, Spruance V, Horowitz TS, Vallejo YF, Langevin HM. The Emerging Science of Interoception: Sensing, Integrating, Interpreting, and Regulating Signals within the Self. *Trends Neurosci.* 2021 Jan;44(1):3-16.
5. Baumann D, Van Helden D, Evans LC, Vulchanova L, Dayton A, Osborn JW. IL-1R Mediated Activation of Renal Sensory Nerves in DOCA-Salt Hypertension. *Hypertension.* 2024 Aug;81(8):1811-1821.
6. Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science.* 1986 Oct 3;234(4772):80-3.
7. Barajas L, Liu L, Powers K. Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992 May;70(5):735-49.
8. Stocker SD, Sullivan JB. Deletion of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Channel Attenuates Sympathoexcitation and Hypertension and Improves Glomerular Filtration Rate in 2-Kidney-1-Clip Rats. *Hypertension.* 2023 Aug;80(8):1671-1682.

Elucidating How Renal Nerve Affects Salt-Sensitive Hypertension

Shinji Tanaka¹, Chikara Abe²

¹The University of Tokyo Hospital, Division of Nephrology and Endocrinology,

²Gifu University, Graduate School of Medicine, Physiology

Summary

Nerves innervating the kidney consist of sympathetic nerves (efferent) and sensory nerves (afferent). Many papers have revealed that renal sympathetic nerves play an important role in the establishment and progression of salt-sensitive hypertension; however, roles of renal sensory nerves are still unclear. In this study, we aimed to establish the method by which renal sensory nerves can be selectively stimulated or inhibited and to elucidate the roles of renal sensory nerves in salt-sensitive hypertension.

For that purpose, we planned to microinject Cre-dependent retrograde DREADD-AAV into the kidney of *Trpv1Cre* mice. To establish the microinjection protocol, we microinjected CTB into kidneys with 3 different protocols and observed DRGs. With the established protocol, we microinjected AAV with various serotypes into the kidney of *Trpv1Cre* mice. However, we have not confirmed AAV infection so far. Now we are planning to use AAV with other serotypes and to further optimize the microinjection protocol.