

迷走神経を介したナトリウムバランス調節機構の解明

井上 剛

東京大学大学院医学系研究科慢性腎臓病病態生理学
(現所属:長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学)

概要

【目的】障害腎での迷走神経刺激の効果(ナトリウム調節機能への効果を含めて)について調べることを目的とする。

【方法】腎障害モデルとしてシスプラチン腎症(25 mg/kg を腹腔内投与)を使用し,迷走神経刺激として左頸部の迷走神経の電気刺激(5 Hz, 50 μ A, 10 分間)を行った。腎障害の程度は, BUN, 血漿クレアチニン, 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 の腎臓での発現レベルなどを用いて評価した。ナトリウム調節機能変化に関しては, FENa(%Na 排泄率で評価)を用いて評価した。

【結果】シスプラチン投与翌日に迷走神経刺激を施行すると,迷走神経刺激 2 日後には,迷走神経刺激によって腎臓の障害が軽減されることが判明した。この迷走神経刺激による腎保護効果は,前もって脾臓を摘出することによって消失した。また,シスプラチン投与翌日に, α 7 ニコチン性アセチルコリン受容体刺激したマクロファージを移入することによっても,腎障害の軽減効果があることが確認できた。血漿サイトカインの解析では,迷走神経刺激によって,シスプラチンにより誘導される CCL2 等のケモカインが抑制されることが判明。フローサイトメトリーによって,シスプラチンにより誘導されるマクロファージを中心とした免疫細胞の腎臓への浸潤が,迷走神経刺激によって抑制されることが明らかとなった。シスプラチン投与翌日に迷走神経刺激をし,次の日に腎機能およびナトリウム代謝を評価したところ,迷走神経刺激翌日には腎機能障害の改善は認めなかったものの,ナトリウム再吸収は改善を認めた。

【結論】迷走神経刺激は,腎障害を引き起こされた後でも有効であり,腎臓の障害を軽減もしくは治癒を促進することが明らかとなった。この腎保護効果発揮には, α 7 ニコチン性アセチルコリン受容体が刺激されたマクロファージが重要と考えられた。

1. 研究目的

近年,迷走神経刺激(VNS; Vagus nerve stimulation)による疾患の改善効果の報告が蓄積されてきており,その対象疾患は,うつやてんかんなどの脳疾患に加え,関節リウマチ・クローン病などの炎症性疾患,糖尿病・高血圧などの生活習慣病など非常に多岐にわたる。申請者らは, VNS によって腎臓が急性腎障害に対して保護されることを見出し¹, VNS による腎保護には Hes1 遺伝子が重要であることを同定した²。また,脳延髄にある C1 脳細胞の刺激によって,自律神経活性による腎保護作用も見出して

いる³。これらの腎保護効果発揮には, β 2 アドレナリン受容体を持つ CD4 陽性 T 細胞や, α 7 ニコチン受容体を持つマクロファージなどが重要な役割を果たし,その経路はコリン性抗炎症経路と呼ばれている(図 1)。

申請者らのこれまでの研究から VNS による腎保護作用は明らかなもの,腎生理機能の定量的な評価はまだ行われていない。腎臓の主要な機能のひとつであるナトリウム代謝と腎障害には密接な関連があり,腎障害が進行すると尿細管でのナトリウム再吸収が抑制されることが知られている。そこで本研究では,障害腎でのナトリウム調節

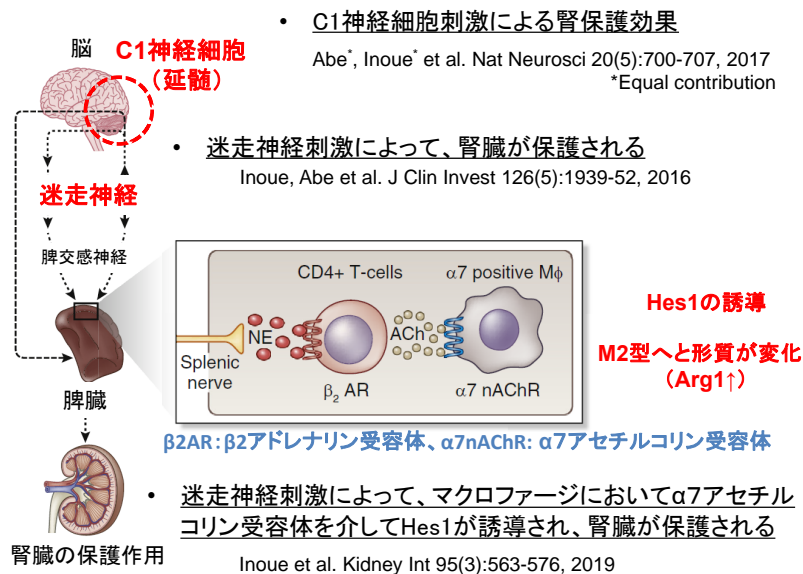


図 1. コリン性抗炎症経路を介した腎保護メカニズム

迷走神経刺激を中心とした神経-免疫系を介した腎臓保護メカニズムにおいて、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を持つ CD4 陽性 T 細胞や、 $\alpha 7$ ニコチン受容体を持つマクロファージなどが重要な役割を果たしている

機能回復に対する VNS の効果について調べることを目的とした。本研究の目的達成によって、腎疾患や高血圧に対する新規の治療法開発、特に非薬物的な治療の開発につながることを期待できる。

2. 研究方法

シスプラチンは広く使われている抗癌剤の一つであり、シスプラチンを使用した3分の1の患者で、尿細管障害を中心とした腎障害をきたすことが知られている。そこで、シスプラチン腎症動物モデルを使用し、迷走神経刺激の効果を評価した。動物実験では7-10週齢の雄野生型マウス(C57BL/6J)を使用した。シスプラチン投与(25 mg/kgを腹腔内投与)した翌日迷走神経刺激を施行し、シスプラチン投与3日目に腎機能および腎障害の程度(BUN, 血漿クレアチニン, 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の腎臓での発現レベルなどを用いて)を評価した。迷走神経刺激によるナトリウム調節機能変化に関しては、迷走神経刺激直後から蓄尿を始め、シスプラチン投与2日目に評価を行なった(FENa:%Na排泄率で評価)。迷走神経刺激は、これまでに我々が行ってきた手法と同様の手法(左頸部の迷走神経の電気刺激:5Hz, 50 μ A, 10分間)を用いて行った。

3. 研究結果

我々はこれまでの研究で、腎障害を引き起こす前に迷走神経刺激を行い、障害前の迷走神経刺激による腎保護効果を示してきた。しかし、実臨床においては、腎障害をきたした後に病院を受診することが多いため、本研究においては、腎障害を起こした後の迷走神経刺激による腎保護効果に主眼を置き、研究を推進した。

シスプラチン投与翌日に迷走神経刺激を行ったところ、シスプラチンによる腎障害は、迷走神経刺激により改善し(図2左:血漿クレアチニン)、尿細管障害の迷走神経刺激による改善も認めた(図2右:PAS染色)。この迷走神経刺激による腎臓保護効果は、脾臓を前もって摘出すると消失することから、免疫細胞が重要であることが想起された(図3)。なかでも、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体陽性のマクロファージが迷走神経刺激に伴う抗炎症効果発揮に重要であることが示されていることから^{1,2,4,5}、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体陽性のマクロファージに着目しさらなる解析を行った。

野生型マウスから脾臓を取り出し、MACSを用いてマクロファージ(F4/80陽性細胞)を単離した後、マクロファージを $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト(GTS-21)およびVehicleにて刺激した。PBSで洗浄したこれらのマクロファージを、シスプラチン投与した翌日にマウスに移

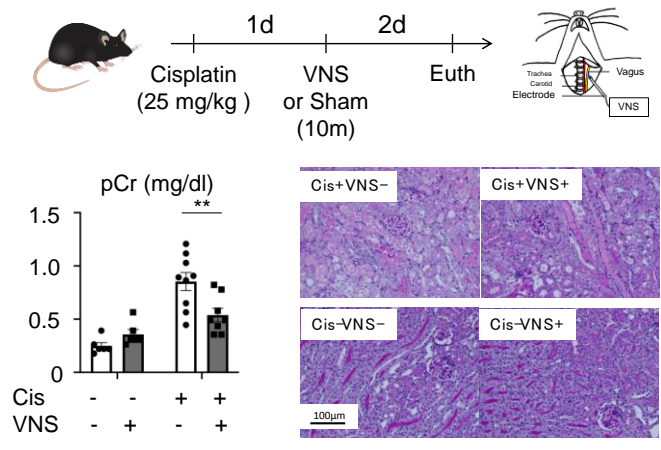


図 2. シスプラチン投与した翌日に迷走神経刺激を行うことで腎障害が軽減される
 シスプラチン腹腔内投与翌日に迷走神経刺激を施行し、第 3 日目に腎機能(血漿クレアチニン)および障害の程度(PAS による尿細管障害の評価)を評価した。左:シスプラチンによる腎障害(血漿クレアチニンの上昇)は迷走神経刺激により改善した。右:シスプラチンによる尿細管障害は迷走神経刺激により改善した。

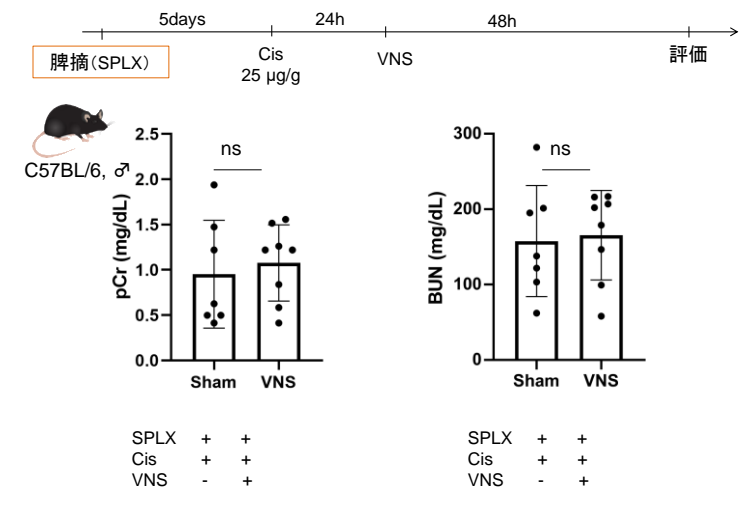


図 3. 脾臓を前もって摘出することにより、迷走神経刺激の効果は消失する
 脾臓をシスプラチン投与 5 日前に摘出すると、図 2 で認めていた迷走神経刺激による腎保護効果が見られなくなった。

入すると、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト (GTS-21) 刺激したマクロファージを受け取ったマウスでは腎保護が認められた(図 4)。次に、迷走神経刺激による腎保護効果メカニズムを調べるために、シスプラチン投与および迷走神経刺激を行なったのち(シスプラチン投与 3 日目)、血漿を採取し、23種類のサイトカインに関してマルチプレックス解析を行った。9種類のサイトカインがシスプラチン投与によって上昇し、そのうち4種類は迷走神経刺激によって優位に減少した(図 5)。この中には、免疫細胞

の走化性に関連する CCL2 や CCL11 などが含まれていた。実際、フローサイトメトリーを用いて、腎臓内に存在する免疫細胞数を評価したところ、シスプラチンによって誘導される腎臓への免疫細胞の浸潤が、迷走神経刺激によってマクロファージを中心とした免疫細胞の浸潤が抑制されることを見出した(図 6)。また、免疫染色によっても F4/80 陽性細胞の腎臓への浸潤が迷走神経刺激によって減少していることも確認した(データ未掲載)。これらの研究成果に関しては既に論文を作成し、受理された⁶。

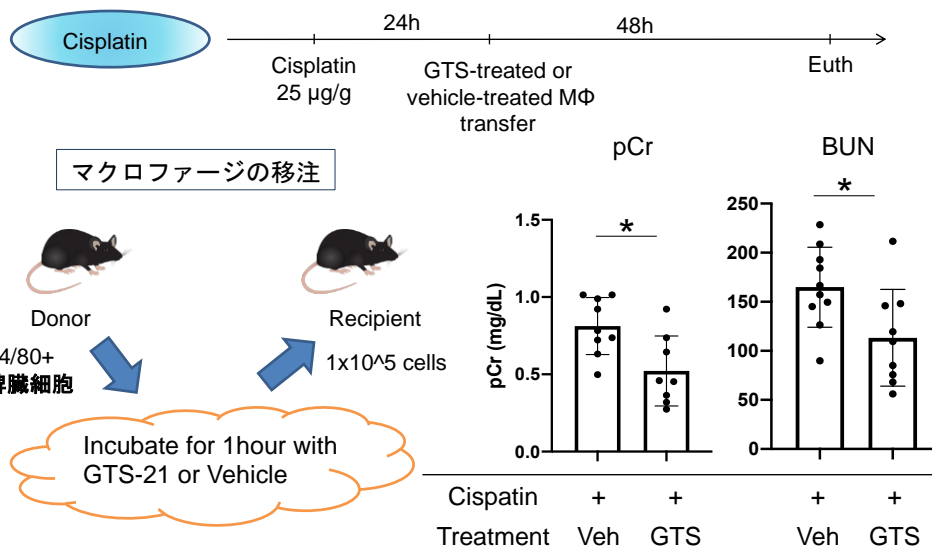


図 4. $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト刺激したマクロファージの移入により腎臓が保護される

シスプラチン腹腔内投与翌日に $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト(GTS-21) 刺激したマクロファージを移入し、第 3 日目に腎機能(血漿クレアチニンおよび BUN)を評価した。この結果、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト刺激したマクロファージを受け取ることで腎臓が保護されることが明らかとなった。

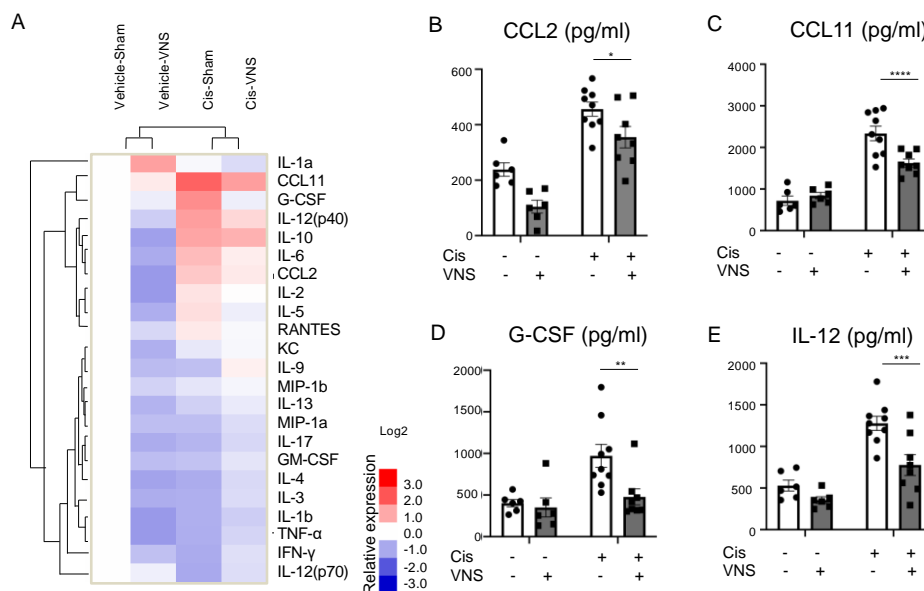


図 5. シスプラチン投与によって上昇したサイトカインのうち 4 種類は迷走神経刺激によって優位に減少した

シスプラチン腹腔内投与翌日に迷走神経刺激を施行し、第 3 日目に 23 種類のサイトカインレベルを Bio-plex を用いて血漿にて評価した。A は全データから作成したヒートマップ。シスプラチン投与にて上昇したサイトカインのうち、迷走神経刺激によって優位に減少したものに関して詳細データを B-E に記載した。マクロファージの走化性に関わる CCL2 の迷走神経刺激による減少を認めた。

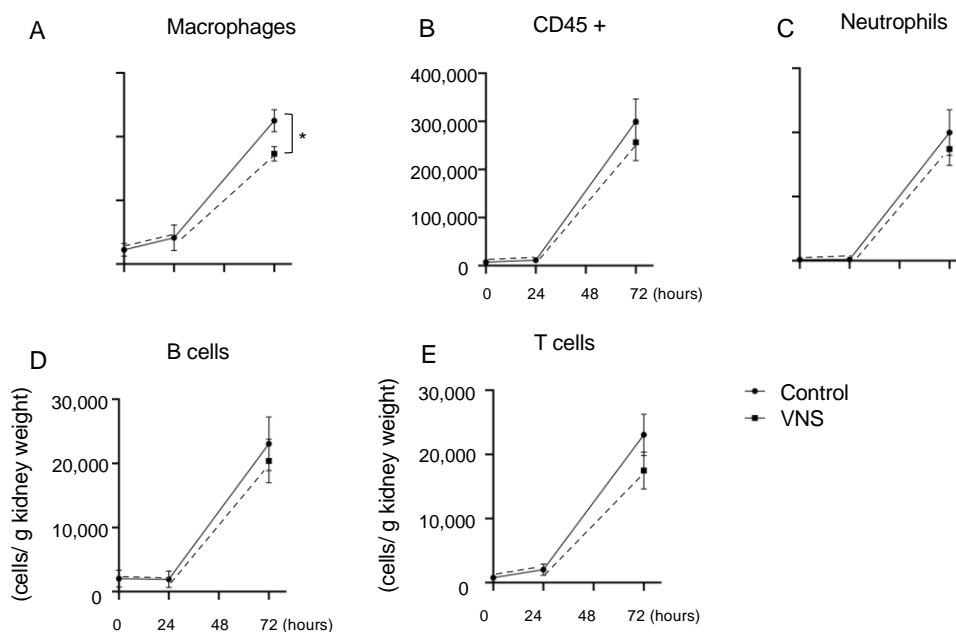


図 6. 迷走神経刺激によってシスプラチン投与に伴う腎臓へのマクロファージ浸潤が抑制された

シスプラチン投与時を 0 時間とし、24 時間後に迷走神経刺激を行い、フローサイトメトリーを用いて、腎臓内に存在する免疫細胞数を経時的に評価した。シスプラチンによって誘導される腎臓への免疫細胞の浸潤が、迷走神経刺激によってマクロファージを中心とした免疫細胞の浸潤が抑制されることが明らかとなった。

以上のように、シスプラチン投与後の迷走神経刺激による腎保護効果が確認できたため、同じ条件下において、迷走神経刺激がナトリウム代謝に与える影響を評価した。ここでは、迷走神経がより早期に与える影響を評価するために、シスプラチン投与翌日に迷走神経刺激を行い、刺激直後よりメタボリックケージを用いて蓄尿を始め 24 時間後(シスプラチン投与 2 日目)に尿を回収し、ナトリウム代謝を評価した。その結果、迷走神経刺激翌日では腎機能障害に差は認めなかったものの、ナトリウム代謝(ナトリウム再吸収)は改善を認めた(図 7)。

4. 考察

本研究は、腎障害後の迷走神経刺激の効果について世界で初めて示したのものになる(図 2)。迷走神経刺激による腎保護効果発揮には脾臓が重要であり、なかでも $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストで刺激したマクロファージが重要であることを見いだすことができた(図 4)。血漿サイトカインレベルの評価では、シスプラチン投与により誘導される単球・マクロファージの遊走に關与するケ

モカインである CCL2 が、迷走神経刺激により抑制されることも明らかとなった(図 5)。

ナトリウム代謝を評価したシスプラチン投与 48 時間後では、迷走神経刺激による腎障害の改善効果は認めなかったが、シスプラチン投与 48 時間では腎障害のマーカーである血漿クレアチニンおよび BUN の上昇がそもそも大きくなく、迷走神経刺激による腎機能改善効果が見られなかった可能性も考えられた。

5. 今後の課題

現在、LPS 敗血症モデルを用いて $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト(GTS-21)による腎臓保護/抗炎症効果を評価中である。また、*in vitro* の実験においても、マクロファージにおける LPS による TNF α の産生が、LPS 敗血症誘導後においても GTS-21 にて抑制されるという結果が得られている。マクロファージを用いた RNA-seq の結果も得られており、そちらの解析も進めていく。また、マクロファージ特異的 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体ノックアウトマウスの作成が終わっており、今後は本マウスを用いた解析を行う予定である。

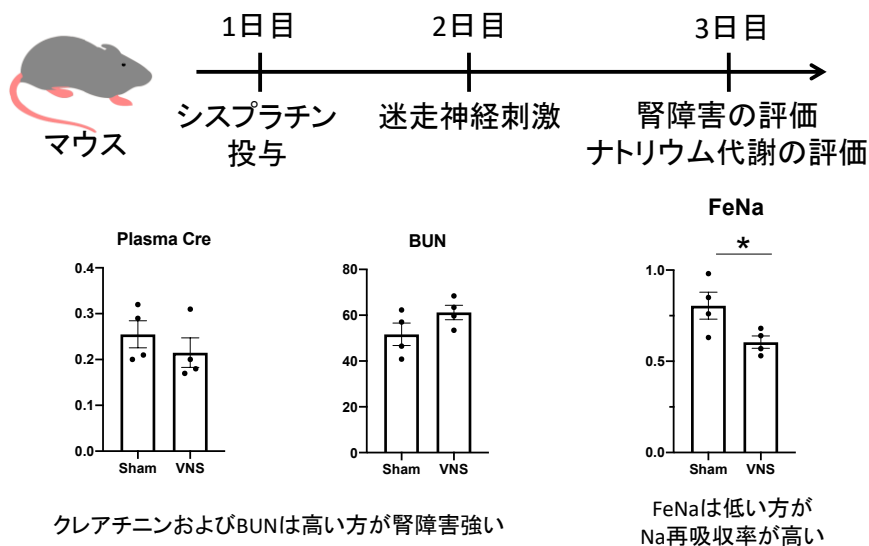


図 7. 迷走神経刺激によってナトリウム再吸収の改善を認めた

シスプラチン投与翌日に迷走神経刺激を行い、迷走神経刺激直後よりメタボリックケージを用いて蓄尿を始め 24 時間後(シスプラチン投与 2 日目)に尿を回収し、ナトリウム代謝を評価した。迷走神経刺激翌日には迷走神経刺激による腎機能改善効果は認めなかったものの、ナトリウム再吸収 (FeNa が低い方が Na 再吸収率が高い) の改善は認めた。

今回、迷走神経刺激によるナトリウム再吸収の改善と腎機能障害軽減の直接的な因果関係を見つけることはできなかったものの、迷走神経刺激によるナトリウム代謝の改善が、腎機能改善につながっている可能性を示唆するデータを得ることはできた(図 7)。ナトリウム代謝改善と腎機能障害軽減に関しては今後さらなる検討が必要と考えられた。

6. 文献

- Inoue T, Abe C, Sung SS, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7nAChR$ + splenocytes. *The Journal of clinical investigation* 2016; 126: 1939-1952.
- Inoue T, Abe C, Kohro T, 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: 563-576.
- Abe C, Inoue T, Inglis MA, et al. C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nature neuroscience* 2017; 20: 700-707.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-462.
- Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384-388.
- Uni R, Inoue T, Nakamura Y, et al. Vagus nerve stimulation even after injury ameliorates cisplatin-induced nephropathy via reducing macrophage infiltration. *Sci Rep* 2020; 10: 9472.

Regulation Mechanism of Sodium Balance through Vagus Nerve

Tsuyoshi Inoue

Division of Chronic Kidney Disease Pathophysiology, The University of Tokyo.

(Current affiliation: Department of Physiology of Visceral Function and Body Fluid, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University)

Summary

[Background] The purpose of this study is to investigate the effects of vagus nerve stimulation on the kidney injury (including effects on sodium regulation function).

[Methods] Cisplatin-induced nephropathy (25 mg/kg was intraperitoneally administered) was used for evaluating the effect of vagus nerve stimulation after injury. Electrical stimulation (5 Hz, 50 μ A, 10 minutes) of the vagus nerve of the left neck was performed as vagus nerve stimulation. The degree of kidney injury was evaluated by using BUN, plasma creatinine, the degree of acute tubular necrosis by PAS staining, and the expression level of Kim-1 which is a marker of acute renal injury in the kidney. Changes in sodium regulation function were evaluated using FENa (% Na excretion rate).

[Results] When vagus nerve stimulation was performed the day after cisplatin administration, it was found that vagus nerve stimulation reduced kidney damage two days after vagus nerve stimulation. The nephroprotective effect of this vagus nerve stimulation disappeared by removing the spleen in advance. Further, it was confirmed that the kidney injury-reducing effect was also obtained by transferring α 7 nicotinic acetylcholine receptor-stimulated macrophages the day after cisplatin administration. Analysis of plasma cytokines revealed that vagus nerve stimulation suppressed chemokines such as CCL2 induced by cisplatin. Flow cytometry showed that cisplatin-induced infiltration of immune cells centered on macrophages into the kidney was suppressed by vagus nerve stimulation. When vagus nerve stimulation was performed the day after cisplatin administration and kidney function and sodium metabolism were evaluated the next day, improvement in sodium reabsorption was observed, although no improvement in renal dysfunction was observed the day after vagus nerve stimulation.

[Conclusions] It has been shown that vagus nerve stimulation is effective even after kidney injury, reducing kidney damage or promoting healing. Macrophages stimulated with α 7 nicotinic acetylcholine receptor were considered to be important for exerting this kidney protective effect.