

## 塩分負荷が神経-免疫相互作用を介して腎障害に与える影響の解明

田中 真司<sup>1</sup>, 安部 力<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科, <sup>2</sup> 岐阜大学医学部生理学

**概要** 急性腎障害は急激な腎機能低下を特徴とする症候群で、多種多様な臨床場面において生じ得る臓器障害であり、炎症が病態形成・進展に重要な役割を果たしているが、薬剤など根本的な治療法はいまだ存在せず、新たな治療戦略が求められている。

多臓器連関、特に神経-免疫連関は、近年様々な疾患に対する新規治療戦略として非常に注目を集めている。助成研究者らはこれまで、迷走神経感覚性線維刺激や拘束ストレスが、延髄にある C1 ニューロンを活性化し、交感神経→脾神経→脾臓→腎臓という遠心路を介して、脾細胞のフェノタイプを抗炎症性に変えることにより急性腎障害に対して保護的に働くことを見出してきた。一方、食塩の過剰摂取や高張食塩水投与により血液中の Na<sup>+</sup>濃度が上昇すると、脳内の Na<sup>+</sup>濃度センサーである Na<sub>x</sub> がこれを感知し、終板脈管器官(OVLT)→視床下部室傍核(PVN)→C1 neurons→交感神経という経路が活性化され、血圧上昇につながる事が近年報告された。

以上から、助成研究者は「食塩の過剰摂取や高張食塩水投与による体内 Na<sup>+</sup>濃度の上昇は、脳内の Na<sub>x</sub> に感知されることにより、OVLT→PVN→C1 neurons→交感神経→脾神経→脾臓という経路を活性化し、脾細胞のフェノタイプを抗炎症性に変えることにより急性腎障害において保護的に働く」という仮説を立てた。

本研究はこの仮説が正しいかどうかを検証することを目的とした。結果としては、高張食塩水投与(経口投与 or 腹腔内投与)は既報通り血清 Na<sup>+</sup>濃度を有意に上昇させたが、急性腎障害モデル(両側腎虚血再灌流, シスプラチン腎症)を軽減させることは確認できなかった。その原因としては、今回の実験系においては既報のように C1 neurons→交感神経系の活性化が起きていない可能性があり、まずは C1 neurons の cFos 免疫染色や腎交感神経活動測定によってそれを検証する必要があると思われた。また C1 neurons→交感神経系の活性化が確認できた場合は、その他の腎障害モデル、すなわち急性腎障害モデルとしては葉酸腎症(24 時間後に sacrifice)、盲腸結紮穿刺;慢性腎臓病(腎線維化)モデルとしては、片側腎虚血再灌流、葉酸投与(14 日後に sacrifice)を検討したい。

### 1. 研究目的

急性腎障害は急激な腎機能低下を特徴とする症候群で、多種多様な臨床場面において生じ得る臓器障害であり、炎症が病態形成・進展に重要な役割を果たしている。入院患者の約 10%, ICU 患者の約半数が合併するとされる急性腎障害が、あらゆる症例の予後を悪化させることは数多くの疫学研究で報告されている。さらに急性腎障害を発症するとその後慢性腎臓病さらには末期腎不全に進展し得ることも大きな問題である。腎移植数が伸び悩む日本

において、ほとんどの末期腎不全患者は生涯にわたって透析を行うしかなく、透析患者は年々単調増加し、現在本邦に約 35 万人存在する。透析にかかる医療費は年間約 1 兆 7000 億円に上り、日本の医療経済を圧迫している。以上、急性腎障害は喫緊の臨床課題であるが、薬剤など根本的な治療法はいまだ存在せず、新たな治療戦略が求められている。

多臓器連関、特に神経-免疫連関は、近年様々な疾患に対する新規治療戦略として非常に注目を集めている。

その中でも、2000年に初めて報告された迷走神経刺激<sup>(1)</sup>は、コリン作動性抗炎症経路(図1)を活性化するため抗炎症効果を有し、炎症性腸疾患や関節リウマチを対象とした小規模臨床試験でも効果が示され、今後様々な炎症性疾患において臨床応用が期待されている。助成研究者の留学先(前所属先)であるバージニア大学 Okusa 研究室は、迷走神経刺激の急性腎障害への応用においてパイオニア的存在であり<sup>(2)</sup>、助成研究者は留学中に、optogenetics を用いた選択的迷走神経刺激、即ち感覚性(求心性)線維 vs. 遠心性線維を特異的に刺激する系を自ら確立し、迷走神経感覚性線維刺激が、古典的なコリン作動性抗炎症経路とは独立して、延髄にあるC1ニューロンを活性化し、交感神経→脾神経→脾臓→腎臓という遠心路(図2)を介して、脾細胞のフェノタイプを抗炎症性に変えることにより急性腎障害に対して保護的に働くことを見出した<sup>(3)</sup>。一方、留学先の研究室によって、拘束ストレス

も同じ遠心路(C1ニューロン→交感神経→脾神経→脾臓→腎臓)を介して、急性腎障害に対し保護的に働くことが示された<sup>(4)</sup>。

一方、食塩の過剰摂取や高張食塩水投与(腹腔内/脳室内投与)により体液(血液・脳脊髄液)中のNa<sup>+</sup>濃度が上昇すると、脳内のNa<sup>+</sup>濃度センサーであるNax(*Scn7a*によりコード)がこれを感知し、終板脈管器官(OVLT)→視床下部室傍核(PVN)→C1 neurons→交感神経という経路が活性化され、血圧上昇につながる事が近年報告された<sup>(5)</sup>。以上から、助成研究者は「食塩の過剰摂取や高張食塩水投与による体内Na<sup>+</sup>濃度の上昇は、脳内のNaxに感知されることにより、OVLT→PVN→C1 neurons→交感神経→脾神経→脾臓という経路を活性化し、脾細胞のフェノタイプを抗炎症性に変えることにより急性腎障害において保護的に働く」という仮説を立てた。本研究はこの仮説が正しいかどうかを検証することを目的とした。

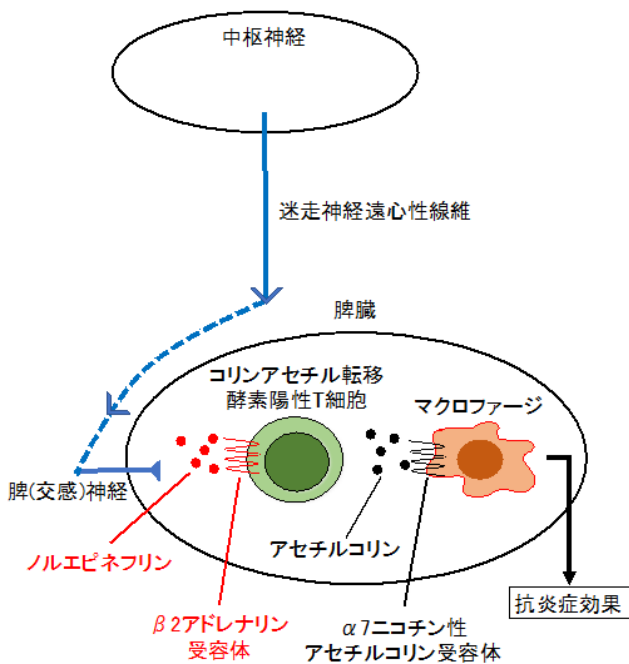


図1 コリン作動性炎症経路

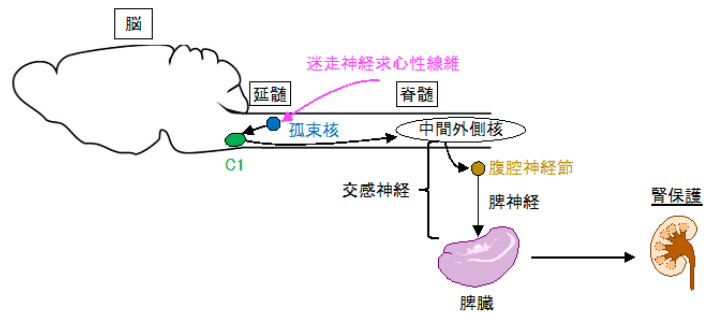


図2 迷走神経求心性線維刺激による腎保護に関わる神経回路

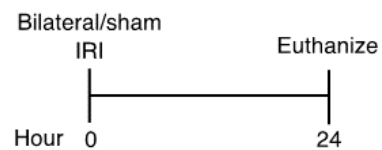


図3 両側腎虚血再灌流プロトコル

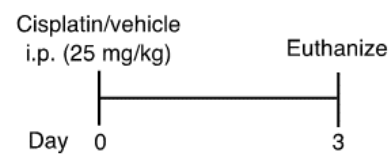


図4 シスプラチン腎症プロトコル

## 2. 研究方法

オス野生型マウス(C57B6J)を用いて以下の実験を行った。

### 2.1 高張食塩水投与プロトコル<sup>(5)</sup>

A. 経口投与(給水ボトル:2% NaCl vs. 水):

腎障害惹起 7 日前から試験終了まで継続

B. 腹腔内投与(3 M NaCl vs. 生理食塩水):

腎障害惹起 24 時間前から試験終了 24 時間前まで、  
1 回/日

### 2.2 急性腎障害惹起プロトコル

A. 両側腎虚血再灌流(虚血性腎障害のモデル; 図 3)

B. シスプラチン腎症(薬剤性腎障害のモデル; 図 4)

を用い、その評価には腎機能の指標である血漿クレアチニンを用いた。

## 3. 研究結果

まずは経口投与(給水ボトル:2% NaCl vs. 水)プロトコルが両側腎虚血再灌流障害に与える影響を調べた。7 日間の 2% NaCl の経口投与で、血清 Na 値は優位に上昇することが確認できた(図 5)。続いてそれらのマウスに両側腎虚血再灌流処置を施し、24 時間後に血漿クレアチニン(腎機能障害のマーカー)を測定したが、2% NaCl vs. 水群で差は無かった(図 6)。

次に腹腔内投与(3 M NaCl vs. 生理食塩水)プロトコルが急性腎障害に与える影響を調べた。腎障害惹起 24 時間前の 3 M NaCl 腹腔内投与で、血清 Na 値はコントロール群(生理食塩水投与)に比べ著明に上昇していることが確認できた(図 7)。続いてそれらのマウスに両側腎虚血再灌流処置を施し、24 時間後に血漿クレアチニンを測定したが、3 M NaCl 群 vs. 生理食塩水群で差は無かった(図 8)。さらに腹腔内投与プロトコルにおいて別の急性腎障害モデルであるシスプラチン腎症への影響(シスプラチン投与 72 時間後に sacrifice)を調べたが、このモデルにおいても両群間に差は認められなかった(図 9)。

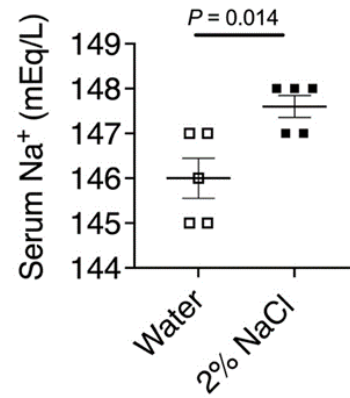


図 5 経口投与プロトコルでの血清 Na 値

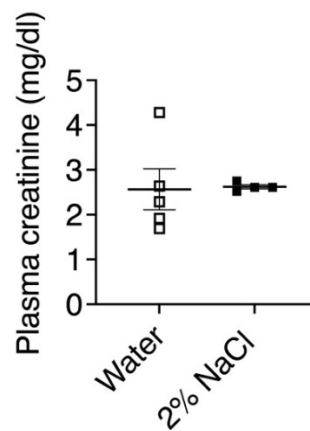


図 6 経口投与プロトコルでの血漿クレアチニン値  
(両側腎虚血再灌流)

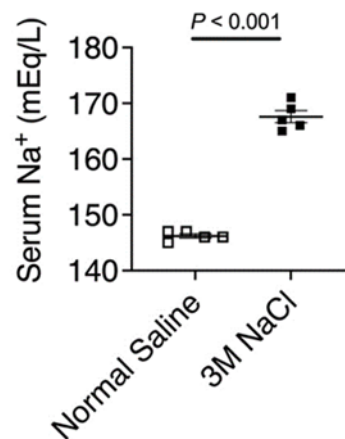


図 7 腹腔内投与プロトコルでの血清 Na 値

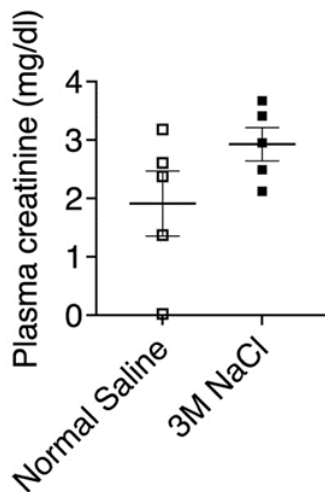


図8 腹腔内投与プロトコルでの血漿クレアチニン値  
(両側腎虚血再灌流)

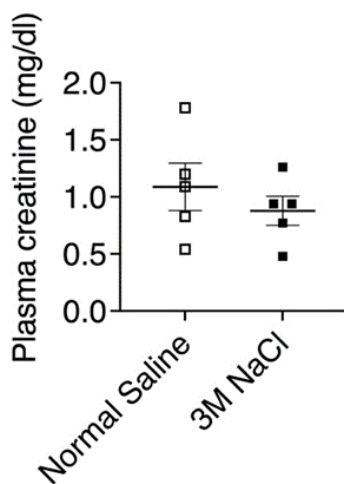


図9 腹腔内投与プロトコルでの血漿クレアチニン値  
(シスプラチン腎症)

#### 4. 考察

使用した経口投与プロトコルおよび腹腔内投与プロトコル両者において、高張食塩水投与は有意に血清 Na 値を上昇させることは確認できたが、期待した腎保護効果は、両側腎虚血再灌流モデルおよびシスプラチン腎症モデルにおいて認められなかった。その原因としては、今回の実験系においては既報のように C1 neurons→交感神経系の活性化が起きていない可能性があり、まずは C1 neurons の cFos 免疫染色や腎交感神経活動測定によってそれを検証する必要があると思われる。また C1 neurons→交感神経系の活性化が確認できた場合は、その他の腎障害モデル、すなわち急性腎障害モデルとしては葉酸腎症(24 時

間後に sacrifice), 盲腸結紮穿刺;慢性腎臓病(腎線維化)モデルとしては、片側腎虚血再灌流、葉酸投与(14 日後に sacrifice)を検討したい。

#### 5. 今後の課題

記追加実験で高張食塩水投与による腎保護効果を認めた際は、既報からその保護効果が脳内の  $\text{Na}^+$ 濃度センサーである Nax に依存しているかを調べるため、Scn7a ノックアウトマウスで腎保護効果が消失するかを検証する。次に腎保護に寄与する神経回路が我々の仮説通りかを検証するため、C1 neurons の選択的アブレーション・ヘキサメトニウムによる自律神経節遮断・脾神経アブレーション・脾摘により腎保護効果が消失するかを調べる。さらにフェノタイプが変容した脾細胞の存在が腎保護に十分であることを検討するため、高張食塩水投与を行った野生型マウス及び Scn7a ノックアウトマウスから脾細胞を単離し、その adoptive transfer ( $1 \times 10^6$  cells) がレシピエントマウスに腎保護効果をもたらすかどうかを検証する。

#### 6. 文献

1. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):458-62. doi: 10.1038/35013070. PMID: 10839541.
2. Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, Ye H, Rosin DL, Guyenet PG, Okusa MD. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through  $\alpha 7\text{nAChR}+$  splenocytes. *J Clin Invest*. 2016 May 2;126(5):1939-52. doi: 10.1172/JCI83658. Epub 2016 Apr 18. PMID: 27088805; PMCID: PMC4855936.
3. Tanaka S, Abe C, Abbott SGB, Zheng S, Yamaoka Y, Lipsey JE, Skrypnyk NI, Yao J, Inoue T, Nash WT, Stornetta DS, Rosin DL, Stornetta RL, Guyenet PG, Okusa MD. Vagus nerve stimulation activates two distinct neuroimmune circuits converging in the spleen to protect mice from kidney injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Mar 23;118(12):e2021758118. doi: 10.1073/pnas.2021758118. PMID: 33737395; PMCID: PMC7999957.

4. Abe C, Inoue T, Inglis MA, Viar KE, Huang L, Ye H, Rosin DL, Stornetta RL, Okusa MD, Guyenet PG. C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nat Neurosci*. 2017 May;20(5):700-707. doi: 10.1038/nn.4526. Epub 2017 Mar 13. PMID: 28288124; PMCID: PMC5404944.
5. Nomura K, Hiyama TY, Sakuta H, Matsuda T, Lin CH, Kobayashi K, Kobayashi K, Kuwaki T, Takahashi K, Matsui S, Noda M. [Na<sup>+</sup>] Increases in Body Fluids Sensed by Central Nax Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H<sup>+</sup>-Dependent Activation of ASIC1a. *Neuron*. 2019 Jan 2;101(1):60-75.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.017. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30503172.

## Exploring How Salt Loading Affects Kidney Damage via Neuro-Immune Interactions

Shinji Tanaka<sup>1</sup>, Chikara Abe<sup>2</sup>

<sup>1</sup> The University of Tokyo Hospital, Division of Nephrology and Endocrinology,

<sup>2</sup> Gifu University Graduate School of Medicine

### Summary

We previously reported that stimulation of vagal afferent fibers or restraint stress can activate the C1 neurons -> sympathetic nervous system -> splenic nerve -> spleen axis, resulting in the protection against acute kidney injury. On the other hand, it was demonstrated that elevated blood Na<sup>+</sup> concentrations induced by the administration of hypertonic saline activated OVLN -> PVN -> C1 neurons -> sympathetic nervous system, resulting in an elevation of blood pressure. Based on these findings, we hypothesized that elevated blood Na<sup>+</sup> concentrations induced by the administration of hypertonic saline activates the OVLN -> PVN -> C1 neurons -> sympathetic nervous system -> splenic nerve -> spleen pathway, resulting in the altered phenotype of the splenocytes and kidney protection against acute injury. First, we confirmed that serum Na<sup>+</sup> concentrations were significantly elevated by hypertonic saline administration (orally or by intraperitoneal injection), which is consistent with the previous study. Then we explored whether the elevated blood Na<sup>+</sup> concentrations resulted in kidney protection against acute injury using the bilateral renal ischemia-reperfusion model and cisplatin nephropathy model. Oral administration of hypertonic saline did not reduce plasma creatinine levels (a representative marker of kidney function) in the bilateral renal ischemia-reperfusion model. Furthermore, intraperitoneal administration of hypertonic saline did not affect kidney injury in either model. It is possible that the C1 neurons -> sympathetic nervous system axis was not activated in our mice. We need to confirm the activation of this axis by investigating cFos in C1 neurons and renal sympathetic nerve activity. We are also planning to test other kidney disease models (e.g., folic acid administration, unilateral renal ischemia-reperfusion, cecal ligation and puncture).