<研究課題> 腎神経を標的とした慢性腎臓病新規治療法の開発

代表研究者 東京大学医学部附属病院 腎臟·内分泌内科 助教 田中 真司

【抄録】

全世界の約10%が罹患している慢性腎臓病(CKD: Chronic Kidney Disease)は、進展すると末期腎不全に至る他、心血管病の強い危険因子でもある。CKD の発症と進行には高血圧・糖尿病・脂質異常症や加齢が深く関わっており、老年病かつ動脈硬化性疾患である CKD は喫緊の臨床課題であるが、現在の治療戦略は血圧管理など非特異的なものしかなく、その効果は限定的であるため画期的な新規治療戦略が必要である。本研究計画では腎神経を標的とした CKD 新規治療法を開発することを目的とした。具体的には、chemogenetics などの技術を用いて 2 種類の腎神経(感覚神経と交感神経)を特異的に操作する手法の確立を試みた。成果として、カプサイシンを用いた選択的腎除神経を達成し、腎臓への微小注射により腎感覚神経をラベリングすることに成功した。

1. 研究の目的

本研究では、慢性腎臓病 (CKD: Chronic Kidney Disease) に対する新規治療戦略とし て神経-腎臓連関に注目したい。腎臓を支配す る神経は2種類あり、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)からなる。腎神経を直 接標的とした治療戦略としては、難治性高血圧 に対する腎除神経術が臨床の場で行われてい る。これは腎動脈に挿入したカテーテルを用い て、血管内膜側から発生させた高周波などによ り外膜側に存在する腎神経を焼灼するもので ある。腎臓の炎症が高血圧の進展に寄与するこ と、動物実験で腎除神経により高血圧に伴う腎 臓の炎症が改善したことから、炎症の持続がそ の進展に重要な役割を果たすCKDにおいても 腎除神経が保護的に働くことが期待され、最近 の動物実験の報告もそれを支持するものであ った(Front Immunol 12: 823935, 2022 など)。 ここで注目したい点は、これまでのほとんどの 動物実験・ヒト臨床試験では、腎神経全体(交 感神経+感覚神経)が焼灼されているというこ とである。腎神経はいくつかの束に分かれて腎 動脈に沿って走行しており、それぞれの束の中 では 2 種類の神経が混在していることが多い ため、両者を物理的に分けて選択的に除神経ま たは刺激することは不可能であった。上述のよ うに、CKD に対して腎神経全体の除神経が保 護的に働くことが最近報告されたが、感覚神 経・交感神経それぞれが CKD 進展にどのよう に関与しているかは現時点では不明である。本 研究では、最新の技術を用いてこれら2種の神経を特異的に操作(除神経、抑制、刺激)し、CKD進展に与える影響を検討することを目的とした。

2. 研究方法と経過

2-1 腎神経の (選択的) 除神経

カプサイシンを野生型マウスの腎神経に直接 塗布することにより、感覚神経のみを除神経す る。高濃度のカプサイシンによる感覚神経の選 択的除神経は、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 (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 308: R112, 2015)。

2-2 腎神経の選択的抑制・刺激

Trpv1Cre、DbhCre 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 を腹腔内投与することで、それぞれ腎の感覚神経、交感神経を選択的に抑制または刺激する。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神経に到達できるかを検証するため、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脊髄後根神経節 (DRG) で CTB を観察する方針とした。

3. 研究の成果

3-1 腎臓感覚神経の選択的除神経

フェノールを野生型マウスの腎神経に直接塗布することにより、神経全体を除神経する手法はすでに確立していたため(Tanaka et al. 2021 PNAS)、高濃度のカプサイシンによる感覚神経の選択的除神経を試みた。図1に示すように、この手法を用いることにより腎感覚神経が選択的に除神経されることを確認できた。

3-2 腎臓感覚神経・交感神経の選択的抑制・刺激

次に、Trpv1Cre、DbhCre 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 を腹腔内投与することで、それぞれ腎の感覚神経、交感神経を選択的

に抑制または刺激する手法の確立を試みた。 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神経に到達できるかを検証するため、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脊髄後根神経節(DRG)で CTBを観察する方針とした。

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 を透明化しホールマウントで観察したいと考え、まず図2のように透明化DRG のホールマウント観察の手法を確立した。

次に腎への微小注射プロトコルを最適化するため、計6つのプロトコルを検証し、ようやく最適化されたプロトコルを確立できた(図3)。

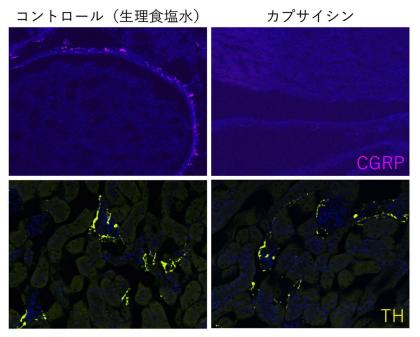


図1:カプサイシン塗布による腎感覚神経選択的除神経の確認 野生型マウスの腎神経にカプサイシンまたは生理食塩水を直接 塗布し、7日後に免疫組織染色で感覚神経(CGRP陽性)および交 感神経(TH陽性)を検出した。カプサイシン塗布により感覚神 経のみが選択的に除神経されていることがわかる。

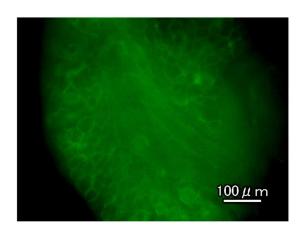


図2:透明化脊髄後根神経節 (DRG) のホールマウント観察 感覚神経レポーターマウス (TrpvICre-EYFP) のDRGを透明化し、 ホールマウントでEYFP蛍光を直接観察した。LittermateのCre陰性 のマウスでは緑色蛍光は観察されなかった。

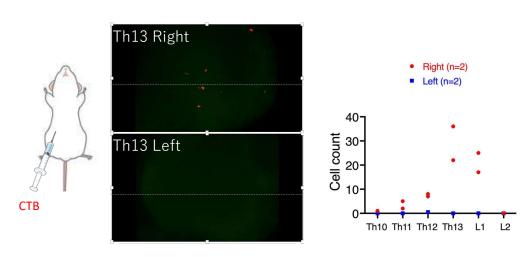


図3:腎臓感覚神経のlabeling

逆行性トレーサーであるCTBを野生型マウスの右腎のみに微小注射し、ホールマウントで脊髄後根神経節を観察した。

4. 今後の課題

腎臓感覚神経の選択的除神経および labeling に成功した。今後は、CTB で確立したプロトコルを用い AAV を腎臓に微小注射し、腎臓感覚神経・交感神経の選択的抑制・刺激を行う。そしてこれらの選択的操作が CKD (腎線維化)にどのような影響を与えるかを検討する。具体的には、CKD モデルとしては片側尿管閉塞・片側腎虚血再灌流・葉酸投与を用いる。これらはいずれも確立されたマウス CKD (腎線維化)モデルであり、処置 14 日後に採材する (片側腎虚血再灌流モデルの場合は採材 24 時間前に健側腎を摘出)。神経操作とのタイミングは、

(1) 除神経の場合はその7日後に腎障害を惹起、(2) DREADD の場合は、AAV 微小注射 4-6 週後に腎障害を惹起し、その3日後からCNOを

連日腹腔内投与、を考えている。腎線維化の程度は、腎機能(血清クレアチニン、尿素窒素)、腎組織 (Picrosirius red/Masson's trichrome staining; 定量評価も行う)、腎における線維化関連分子の発現 (Acta2, Col1a1, Col3a1 など)で評価を行う。

5. 研究成果の公表方法

日本腎臓学会学術総会およびアメリカ腎臓学会総会(Kidney Week)などで発表を行う予定である。その後最終的な研究成果は、一般領域または腎臓領域の雑誌への投稿を予定している。

Developing novel treatment strategies for chronic kidney disease targeting the renal nerves

Primary Researcher: Shinji Tanaka

Assistant Professor, The University of Tokyo Hospital

Approximately 10% of the population worldwide suffers from chronic kidney disease (CKD), which is associated with sustained inflammation and progressive fibrosis in the kidney. CKD can progress to end-stage kidney disease and is a potential risk factor for cardiovascular disease. Currently, even with widespread use of renin–angiotensin system blockers and sodium–glucose cotransporter 2 inhibitors, a substantial residual risk of CKD progression remains. Hence, it is important to develop novel therapeutic strategies for CKD. In this project, we aimed to selectively manipulate renal sympathetic nerve and sensory nerve. We have successfully ablated only renal sensory nerve with capsaicin in mice. We have also specifically labelled renal sensory nerve by microinjecting tracer into the kidney.