

自律神経刺激によるマクロファージの抗炎症メカニズム

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学

井上 剛

1. 背景・目的

急性腎障害は重篤な場合は致死的であり、慢性腎臓病（本邦で現在 1330 万人が罹患：日本腎臓学会）や末期腎不全へ移行し得るといっても非常に重要な疾患である。世界的にその発症頻度が上昇しているものの、対症療法以外に有効な予防法および治療法はこれまで開発されておらず、新規の治療法が熱望されている。我々は、これまでに迷走神経（副交感神経）の電気刺激および C1 ニューロンの光刺激（オプトジェネティクス手法を使用）によって、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7nAChR$) を介してコリン性抗炎症経路が活性化され、腎臓保護効果が発揮されることを見出してきた¹⁻³。

一方、予備実験にて、 $\beta 2$ アドレナリン受容体（交感神経）を介した抗炎症効果を確認しており、マクロファージを介した抗炎症効果および臓器保護効果発揮には、交感神経と副交感神経の両方の刺激が重要であると想起された。そこで、本研究では交感神経と副交感神経の関連に着目し、新規の抗炎症・臓器保護メカニズムの解明を目指す。新規の神経系-免疫系を介した抗炎症経路を見出すことで、腎臓病の治療へと繋がる可能性がある。また、本研究の成果は炎症性疾患全般に応用することが可能であると思われ、世界の研究発展に与える影響は非常に大きいと考えられる。

2. 方法

動物実験では 7-10 週齢の雄野生型マウス (C57BL/6J)、マクロファージ特異的 $\beta 2$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス (LysMCre; $\beta 2AR$ flox/flox)、マクロファージ特異的 $\alpha 7$ アセチルコリン受容体ノックアウトマウス (LysMCre; $\alpha 7AChR$ flox/flox) を使用した。腎障害モデルとして両側側虚血再灌流障害 (2 6 分間虚血、直腸温 35.0 ± 0.5 °C) およびシスプラチン腎症 (25 mg/kg を腹腔内投与) を、敗血症モデルとして LPS 腹腔内投与 (5 mg/kg) を行なった。交感神経刺激として $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニスト (サルブタモール) (15 mg/kg) 腹腔内投与を、迷走神経刺激として $\alpha 7$ アセチルコリン受容体アゴニスト (GTS-21) (20 mg/kg) 腹腔内投与および左頸部の迷走神経電気刺激 (5Hz、50 μ A、10 分間) を行なった。腎臓における免疫細胞数の評価にはフローサイトメーター (AttuneNxT3 レーザー) および組織免疫染色を使用した。腎臓の障害は、血漿クレアチン・尿素窒素 (BUN)、腎臓組織 (PAS 染色)、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。炎症の評価には TNF (ELISA) およびリアルタイム PCR での炎症性サイトカインなどの発現レベルの評価を行なった。細胞実験にはマウスマクロファージ細胞株である RAW247 および脾臓より MACS にて単離したマクロファージを使用した。遺伝子発現網羅的解析として、腎臓および脾臓を用いた 1 細胞遺伝子発現網羅的解析 (10X Chromium を使用) を行なった。

3. 結果

交感神経刺激に関しては、LPS 敗血症モデルおよびマクロファージ (RAW 細胞など) において $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニスト (サルブタモール) が炎症を抑制する効果を認めること (データ未掲載)、生体内において脾臓を前もって摘出することによりサルブタモールによる抗炎症効果が消失すること (データ未掲載) を見出した。以上のことから、交感神経刺激による抗炎症効果発揮には、マクロファージが重要である可能性が考えられた。そこで、マクロファージ特異的 $\beta 2$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス (LysMCre; $\beta 2AR$ flox/flox) を作製し、交感神経刺激による腎保護効果におけるマクロファージの役割について評価を行なった。その結果、野生型マウスでは図 1 に示すように交感神経刺激をすることにより (サルブタモール投与によって) 腎障害が軽減するものの、マクロファージ特異的 $\beta 2$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスではその腎保護効果が減弱することが明らかとなった。また、交感神経刺激 (サルブタモール刺激) したマクロファージ (脾臓より MACS を用いて単離) を移入することによって、レシピエントマウスにおいて腎保護効果が発揮されることも見出

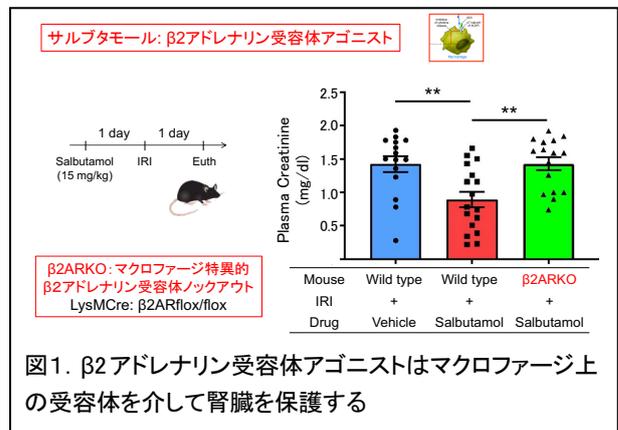
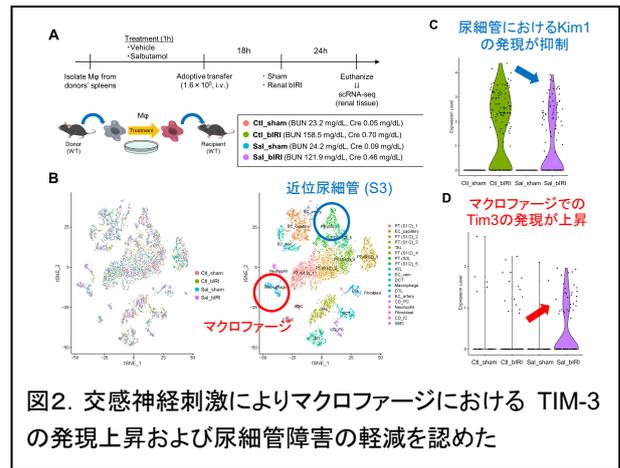


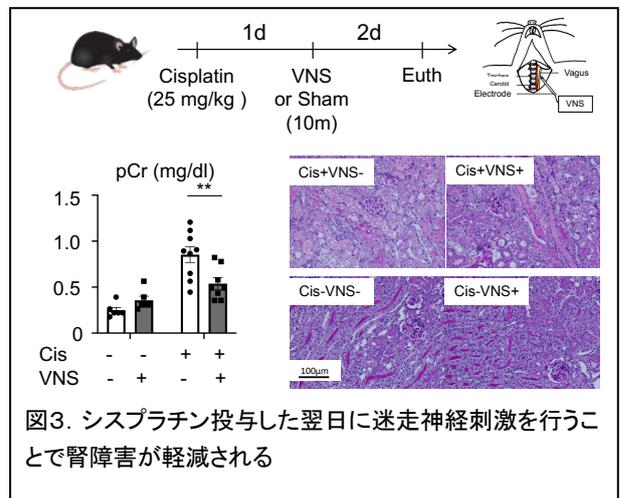
図1. $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニストはマクロファージ上の受容体を介して腎臓を保護する

した（データ未掲載）。これらの結果より、交感神経刺激による腎保護効果発揮には、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を介して刺激されたマクロファージが重要であることが明らかとなった。

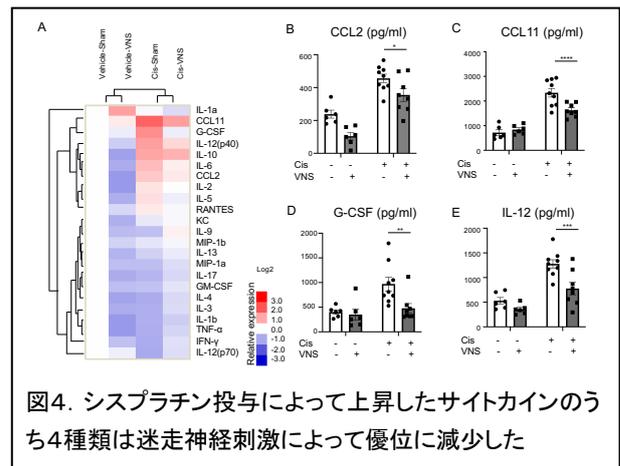
そこで、交感神経刺激したマクロファージがどのようにして腎保護効果を発揮しているかを調べるために、同条件下（サルブタモール刺激したマクロファージを移入し、翌日にレシピエントマウスに腎虚血再灌流障害を施行）において腎臓を単離したのち、シングルセル化を行い、1細胞遺伝子発現網羅的解析（シングルセルRNA-seq）を行なった。図2に示すように、各細胞の遺伝子発現パターンから腎臓におけるさまざまな細胞を区別することが可能となり、その中で交感神経刺激したマクロファージを移入した群において、マクロファージにおける *Tim3* 遺伝子の発現上昇および近位尿細管における *Kim1*（尿細管障害マーカー）の発現低下を認めた。さらに、*Tim3* の発現は循環マクロファージにおいて上昇が認めることが明らかとなり（データ未掲載）、交感神経刺激によって *Tim3* を発現したマクロファージが腎臓へと流入し、これらの細胞が直接的に近位尿細管を保護していることを見出すことができた。以上の成果を論文として報告した⁴。



迷走神経刺激による抗炎症・臓器保護効果に関しては、図3に示すように、シスプラチン投与翌日に迷走神経刺激を行ったところ、腎臓の障害が軽減されることを明らかにした。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（データ未掲載）。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^{1,3,5,6}、 $\alpha 7$ 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（データ未掲載）。



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、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4）。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、フローサイトメーターを用いて、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の中で、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（データ未掲載）。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（データ未掲載）、成果を論文として報告した⁷。

さらに、マクロファージ特異的 $\alpha 7$ アセチルコリン受容体ノックアウトマウス（*LysMCre:α7AChRflox/flox*）を作製し、迷走神経刺激におけるマクロファージ上の $\alpha 7$ アセチルコリン受容体の機能解明を行った。LPS敗血症モデルにおいて、 $\alpha 7$ アセチルコリン受容体アゴニスト（GTS-21）による効果がLPS投与4時間後ではマクロファージ上の $\alpha 7$ アセチルコリン受容体依存的であるものの、LPS投与24時間後ではGTS-21による抗炎症効果がマクロファージ上の $\alpha 7$ アセチルコリン受容体に依存しないことを見出した（未発表データ）。LPSお

よびGTS-21 投与4 時間後の脾臓を用いたシングルセルRNA-seq を既に施行しており、現在、細胞間相互作用について詳細な検討を行っている（未発表データ）。

交感神経および副交感神経による相乗的抗炎症効果に関しては、それぞれの受容体刺激薬を用いてin vitro の実験系（RAW細胞）では相乗的抗炎症効果を確認できたものの、生体内では確認できていない（未発表データ）。

4. 考察

図3および4で使用したシスプラチン腎症モデルでは、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ものになる。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3）。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関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4）。以上のように、本研究では、腎障害後の迷走神経刺激の有効性について初めて示すことができ（図3）、論文掲載へと至った⁷。

交感神経刺激による腎保護効果においても、マクロファージが重要な役割を果たしており、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を介してマクロファージの形質が変化し（Tim3の発現上昇を認め）、近位尿細管が保護されることを見出すことができた（図1および2）。これらの結果より、交感神経および副交感神経（迷走神経）刺激のいずれにもおいても、マクロファージの形質が変化することにより、腎保護効果を発揮することが明らかとなった⁴。今後は、細胞間の相互作用に加え、交感神経刺激と副交感神経刺激の相互作用やタイミング、バランス、強度などについても検討を進めていく。

5. 引用文献

1. Inoue T, Abe C, Sung SS, *et al.* Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7$ nAChR+ splenocytes. *J Clin Invest* 2016; **126**: 1939-1952.
2. Abe C, Inoue T, Inglis MA, *et al.* C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nat Neurosci* 2017; **20**: 700-707.
3. 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.
4. Hasegawa S, Inoue T, Nakamura Y, *et al.* Activation of Sympathetic Signaling in Macrophages Blocks Systemic Inflammation and Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol* 2021.
5. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; **405**: 458-462.
6. 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.
7. 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.