

神経系を中心とした様々な腎保護・抗炎症経路の解明

東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科

田中 真司

研究背景と目的

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る。入院患者の約10%、ICU患者の約半数が合併する急性腎障害は、あらゆる症例の予後を悪化させる他、その後に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。しかし急性腎障害に対する特異的な治療法はまだまだ存在せず、革新的な治療戦略が求められている。我々はこれまでに、迷走神経感覚性線維刺激と拘束ストレスが、ともにC1ニューロン(延髄)→交感神経→脾神経→脾臓→腎臓という遠心路(下行路)を介して、急性腎障害に対して保護的に働くことを明らかにしてきた(図1)^{1),2)}。この背景から、我々は生体が様々なストレスや刺激にさらされた際に、その情報が中枢神経に伝達・統合され、遠心路を通り末梢において抗炎症・臓器保護効果を発揮するようなシステムが生体に備わっているのではないかと着想するに至った。本研究では急性腎障害に焦点を当て、

- (1) 急性腎障害時に腎感覚神経が果たす役割の解明
- (2) 腎保護経路を活性化するその他の薬剤・ストレスの探索
- (3) 腎保護における脾臓→腎臓のmissing linkの解明

を目的とした。

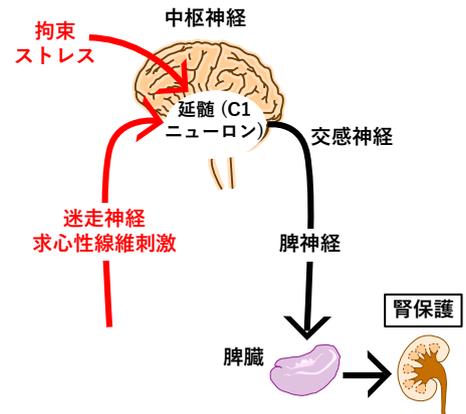


図1 これまで明らかにしてきた神経免疫連関を介した腎保護経路

研究成果と今後の計画・展望

- (1) 急性腎障害時に腎感覚神経が果たす役割の解明

急性腎障害が起きた際に、腎臓感覚神経がそれを感知してシグナルを中枢神経に伝達することにより、腎障害を軽減する方向に働く反射経路を活性化しているのではないかと、という仮説を立てた。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。マウスやヒトの腎臓の感覚神経は脊髄を通過して中枢神経に到達し、その細胞体は脊髄後根神経節(DRG)に存在することが知られているが、マウス腎臓を支配するDRGのレベルは不明であったため、まずはそれを同定することとした。神経の逆行性トレーサーであるCTB(コレラ毒素Bサブユニット)をマウス右腎に微小注射し、DRGを透明化してホルマウントで観察したところ、Th13をピークとしてTh11-L1の範囲に腎臓支配感覚神経が存在することがわかった(図2)。次に腎臓感覚神経が急性腎障害によって興奮するかを検証するため、右片側腎虚血再灌流を行い、3時間後に左右のTh13 DRGでのc-Fos(ニューロン活性化マーカー)陽性細胞数を比べたところ、 56.8 ± 10.3 (右) vs. 41.8 ± 7.4 (左)($n=4$, $P=0.0077$, paired t-test)と腎障害によって腎感覚神経が興奮することが示唆された。

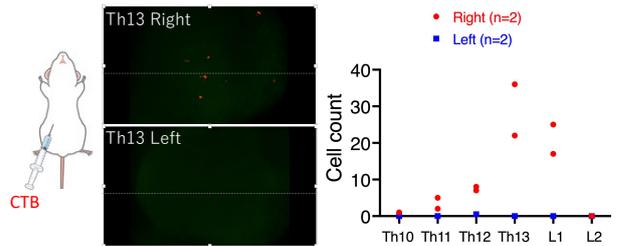


図2 マウス腎臓感覚神経のラベリングに成功

マウス右腎にCTBを微小注射し、7日後に左右のDRGを抽出し、透明化してホルマウントでCTB陽性細胞体の数を計測した。左DRGにはシグナルを認めず、非特異的なラベリングではない。

続いて、急性腎障害時に腎感覚神経が果たす

役割を調べるため、腎感覚神経への介入(焼灼・抑制・刺激)が急性腎障害の程度に与える影響を検討した。マウス急性腎障害モデルとしては、両側腎虚血再灌流、シスプラチン投与、LPS投与を用いた。腎神経の中では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困難である。そこでまず、高濃度のカプサイシンをマウス腎神経に塗布することにより感覚神経のみを選択的に焼灼した(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³⁾)。が、いずれのモデルにおいても急性腎障害の程度は変化しなかった(data not shown)。次に、神経の焼灼に比してより生理的と考えられる一時的な抑制や刺激を行い、腎障害への影響を検証することを計画した。具体的には、*Trpv1Cre*マウスの腎に、Cre依存性の抑制性(Gi)または興奮性(Gq/Gs)のDREADDを組み込んだAAVを微小注射し、4-6週後にCNOを投与することで、腎感覚神経の選択的操作を試みた。しかしながら、4つのAAVセロタイプを使用した。現時点でいずれのセロタイプでも効率的なAAV

感染は達成できていない。今後、様々なセロタイプのAAVを自作している研究室と共同研究を行うことにより、腎感覚神経の選択的操作によって腎障害がどのように影響を受けるかを検証する計画である。

(2) 腎保護経路を活性化するその他の薬剤・ストレスの探索

次に、中枢神経を介した腎保護経路の臨床応用を見据え、拘束ストレスや迷走神経刺激以外に、この腎保護経路を活性化できる薬剤を探索した。まず、迷走神経感覚性線維が受容体を発現している薬剤としてグレリン、GLP-1、GPR85アゴニストの腎保護効果を上述の3種類の急性腎障害モデルでスクリーニングしたが、安定した腎保護効果は認めなかった (data not shown, グレリンは両側腎虚血再灌流モデルにおいて保護効果を認めることがあったが、その効果は安定しなかった)。また、疼痛ストレス (ホルマリンを足背皮下注射) やラットによる脅威ストレスも検証したが、いずれのモデルにおいても腎保護効果を認めなかった (data not shown)。

興味深いことに、あるストレスXをマウスに惹起する薬剤Yが、上述のマウス急性腎障害モデル3つ全てにおいて強力な腎保護効果を有することを見出した (図3)。

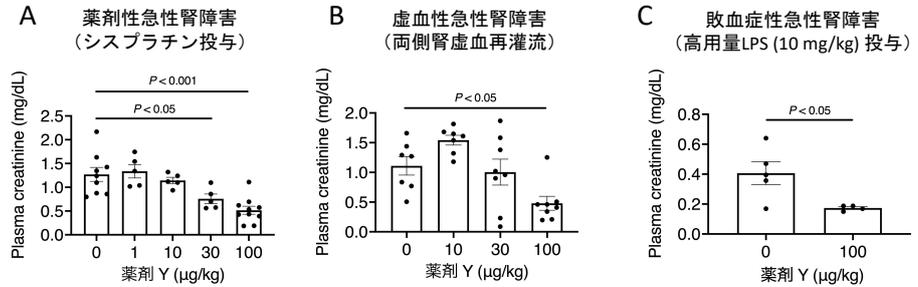


図3 ストレスXを惹起する薬剤Yの投与は様々なタイプの急性腎障害を軽減する

C57BL/6Jマウスに薬剤Yを腹腔内投与し、同時に急性腎障害 (3種類のモデル) を惹起した。グラフは24時間後 (シスプラチン投与では72時間後) の血漿クレアチニン (腎機能低下のマーカー) を表す。

病態が異なる3種類の急性腎障害モデルで非常に強い保護効果を確認したことから、薬剤Yの腎保護メカニズムを引き続き検討していく方針とした。以後の実験では、保護効果が強い・データのばらつきが小さい・臨床場面により直結している、という理由から、急性腎障害モデルとしてシスプラチン腎症を用いることとした。まず、薬剤Yが腎臓の遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析するため、薬剤投与の24時間後のマウス腎臓を用いてbulk RNA-seq解析を行った (シスプラチンの有無×薬剤Yの有無の4群)。薬剤Y投与により発現が上昇した遺伝子についてGO解析を行ったところ、生体異物代謝/排泄に関するGO termが有意にエンリッチされていたが (上位2つ; 図4)、薬剤Y単独ではそのような変化は全く認めなかった。Pathway解析でも生体異物に対する反応が最上位に抽出されており、薬剤Y投与が腎臓におけるシスプラチン代謝・排泄を促進している可能性が示唆された。

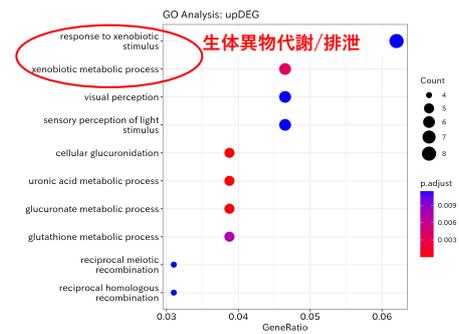


図4 薬剤Y投与による腎遺伝子発現変化 (マウスシスプラチン腎症; RNA-seq解析)

また、薬剤Yは受容体Zを介して中枢神経にシグナルを送ることによりストレスXをもたらすことが既報により示されている。そこで腎保護効果の受容体Zへの依存性を確認するため、受容体Z全身ノックアウトマウスを用いて実験を行った。非常に興味深いことに、薬剤Y投与による腎保護効果は受容体Z全身ノックアウトマウスにおいても野生型マウスと同等に認められ (図5)、腎保護効果においては既報と異なる神経回路・メカニズムが存在することが強く示唆された。薬剤Yが直接腎臓に作用してシスプラチン腎症を軽減している可能性については、腎臓近位尿細管細胞を用いた*in vitro*実験を行ったが、様々な濃度の薬剤Y添加は、シスプラチン添加や低酸素/再酸素化による細胞障害を軽減させなかった。既報と合わせると、本結果は薬剤Yが中枢神経を介して腎保護作用を発揮していることを支持するものである。

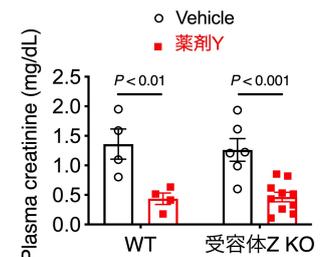


図5 受容体Zノックアウトマウスでも薬剤Yの腎保護効果は不変

次に、薬剤Yの投与が中枢神経からどの遠心路を介して末梢において腎保護効果を発揮しているか、について検討した。末梢臓器保護につながる遠心路としては、これまでHPA axis (マウスの場合、corticosteroneによる抗炎症作用) や自律神経系が多く報告されている。まず、薬剤Yの投与により血中のcorticosterone濃度は有意に上昇したが、corticosterone受容体拮抗薬であるmifepristoneの投与は薬剤Yによる腎保護効果に影響を与えなかったため、HPA axisの関与は否定的と考えられた (data not shown)。一方、自律神経節遮断薬であるヘキサメトニウムの投与は、薬剤Yによる腎保護効果を消失させたことから (図6)、自律神経系が遠心路である可能性が強く示唆された。最後に、我々は上述の通りこれまで交感神経→脾神経→脾臓→腎臓という腎保護につながる抗炎症経路を発見してきたため (図1)^{1,2)}、あらかじめ脾臓を摘出したマウスにおいて薬剤Yによる腎保護

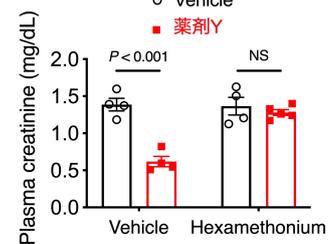


図6 ヘキサメトニウム投与により薬剤Yの腎保護効果は消失

が消失するか検討した。脾臓摘出は腎保護効果に影響を与えなかったため(図7)、我々が見出してきた経路とも異なる経路が考えられた。

今後の計画・展望としては、薬剤Y→中枢神経の求心路、脳内回路、中枢神経→腎臓の遠心路、腎臓bulk RNA-seq解析で同定した生体異物代謝/排泄亢進の分子メカニズムを明らかにしていきたい。また腎臓以外の他臓器疾患においても同様の保護効果が期待されるため、他臓器への展開も目指したい。

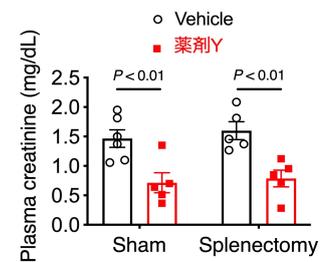


図7 脾臓摘出マウスでも薬剤Yの腎保護効果は不変

(3) 腎保護における脾臓→腎臓のmissing linkの解明

我々が明らかにしてきた腎保護経路(図1)において、腎保護効果が脾臓摘出で消失すること、迷走神経刺激や拘束ストレスで処置されたマウスの脾細胞のadoptive transferがnaiveなレシピエントマウスに腎保護効果をもたらすことから、脾臓が重要な役割を果たしていることが強く示唆されたが、脾細胞がどのように遠隔臓器である腎臓を保護するのかについてはいまだ不明である。予備実験において、迷走神経刺激後に脾臓重量が約3分の2になるという結果を得たため、抗炎症性のphenotypeの脾細胞が血中へ放出され腎臓に浸潤することで保護効果をもたらす、という仮説を立てた。本仮説の検証のためには脾細胞を生体内でトレースする必要があるが、その他の組織(リンパ節など)に存在する免疫細胞と区別できるような脾細胞特異的のマーカーが無いため、単純なレポーターマウスなどは使用できない。

そこでphotoconversionの技術を用いる計画とした。具体的には、本邦で開発されたKikGR (Kikume Green-Red)を全身で発現するマウス⁴⁾を用いる。KikGRはキクメイシ由来の蛍光タンパク質で、紫(外)光(360 nm - 410 nm)の照射で緑から赤に発する蛍光が変化する。KikGRマウスの脾臓のみに紫(外)光を照射して脾細胞のみを赤色にラベルし、その後介入(迷走神経刺激または拘束ストレス)を行った後急性腎障害を惹起し、ラベルされた脾細胞の局在(脾臓、循環血液中、腎臓)・内訳をFACSを用いて検討する、という計画である。まずはKikGRマウスの脾臓を摘出し、シングルセルにした後、その懸濁液に波長365 nmの紫外光を5分間照射したところ、図8に示すようにほぼすべての脾細胞がphotoconversionにより赤色蛍光を発するようになっており、ラベリングの成功を確認した。次に、マウス生体内の脾臓に直接紫外光を照射して脾細胞のラベリングを試みた。ファイバーの本数、紫外光強度、照射間インターバル時間、総照射時間、脾臓とファイバーとの距離・角度という様々なパラメータを検証した結果、7AAD陽性の死細胞を増やすことなく、約83%の効率(既報での最大値は27%)を達成することができた(図9)。しかし波長が短い紫外光の到達深度が懸念されたため、紫外光照射後の脾臓切片を観察したところ、脾臓表面では強くphotoconversionが起こっているものの、深部では効率が悪いことが判明した(図10)。この深度による効率の違いは本実験において大きな問題となるため、今後さらなるプロトコルの最適化を目指す。具体的には、到達深度を上げるためにより長い波長の光を使用する予定であるが、KikGRのphotoconversionは波長が短いほど効率が良いことが知られており、また脾臓に豊富に存在する赤血球中のヘモグロビンによる吸収も勘案する必要がある。少し長い波長の光によって到達深度(不均一性)の問題が解決しない場合、二光子顕微鏡を用いることでさらなる長波長の光を活用することも検討する。

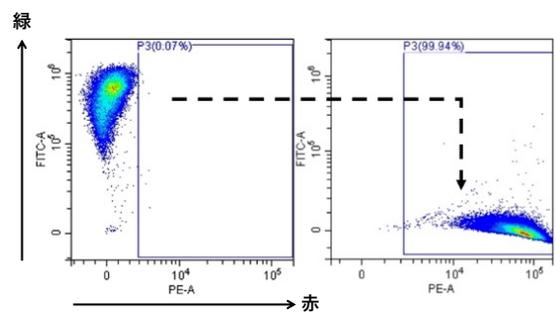


図8 脾臓細胞(シングルセル)への紫外光照射によるphotoconversion

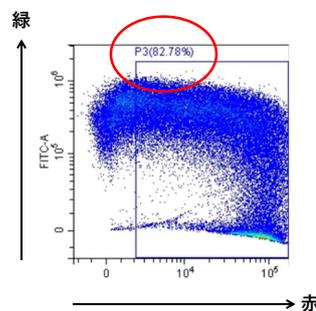


図9 マウス脾臓への紫外光照射によるphotoconversion

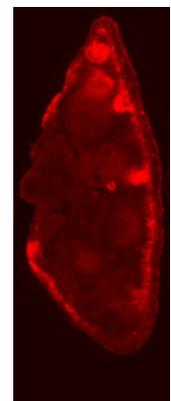


図10 紫外光照射後のマウス脾臓切片

文献

- 1) Tanaka S, Abe C, Abbott SBG, et al. 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;118(12):e2021758118.
- 2) Abe C, Inoue T, Inglis MA, et al. C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nat Neurosci*. 2017;20(5):700-707.
- 3) Foss JD, Wainford RD, England WC, et al. A novel method of selective ablation of afferent renal nerves by periaxonal application of capsaicin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;308(2):R112-22.
- 4) Tomura M, Hata A, Matsuo S, et al. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci Rep*. 2014;4:6030.