

感覚神経と骨髄球のクロストークに着目した炎症制御

所属 東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科

西 裕志

【研究背景】

自己免疫疾患の発症機序にはいまなお多くの謎が残されているが、研究の多くは複雑な細胞内シグナリングや細胞間ネットワークに重点が置かれている。自己免疫疾患で臓器障害が生じる大きな原因の一つが、その最終段階ともいえるエフェクター相における好中球や単球の過剰な活性化である。骨髄球の炎症局所への浸潤が全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、血管炎等において急性かつ激しい炎症時に見られる。申請者はこれまで、自己抗原と結合した自己抗体(主にIgG)に反応して活性化される好中球に注目してその機序を解析してきた(Chen, Nishi, et al: Blood 2012; Nishi, et al: J Clin Invest 2017)。例えば、免疫複合体に由来する好中球の過剰な活性化を薬理的に阻害することを目的として低分子化合物unbiasedなハイ・スループット・スクリーニングを実行し、約9000のライブラリー化合物からSrc/Abl inhibitorを同定しその作用機序と合わせて報告した。

【研究の起点・目的】

興味深いことに、好中球活性化の抑制活性をもつ上位ヒット化合物には種々のリン酸化酵素阻害薬や神経シグナル伝達物質が含まれていた。これらの低分子化合物効果がスクリーニングの小規模実験系のみならず、濃度・時間依存性などの薬理学的特性を担保する形で実証されれば、炎症性の固形臓器疾患における、前者は細胞内からの好中球の活性制御を、また、後者は臓器外からの神経シグナルによる好中球の活性制御を可能とする。そこで今回「求心性の感覚神経から炎症局所に浸潤した骨髄球を制御するシグナル分子が分泌されているという」仮説を検証する。

【研究結果】

1. 好中球内リン酸化酵素の機能解析

RNA 結合ドメインとリン酸化酵素活性ドメインの両方を持つ一部のリン酸化酵素がマウス骨髄好中球やヒト培養好中球に発現すること、ウイルスに感染された単球・マクロファージなどの抗原提示細胞で活性化されるのみならず、白血球遊走化因子の刺激によって自己リン酸化されることを明らかにした。さらに、リン酸化酵素が好中球の血管内皮接着や血管外遊走に対して促進的に作用することを実験動物系で見出した。細胞内シグナルの影響については阻害作用をもつ低分子化合物および shRNA ウイルスベクターを用いた培養細胞実験や動物実験によって、とくに RNA 依存性リン酸化酵素の好中球における発現や細胞活性化における機能の解析を進めた。これらの実験成果の一部は学会・研究会発表を重ねて、関係研究者からのさらなる情報を収集して研究を展開している(Nishi, Inoue, Osaka, Inoue, Yoshida, Nangaku: Keystone Symposia - Unraveling the Secrets of Kidney Disease. Whistler, BC, Canada. March 2019; Nishi, Inoue, Osaka, Inoue, Yoshida, Nangaku: The 17th International Congress of Immunology. Beijing, China. October 2019)。

2. スクリーニングデータのクラスター解析

先述のように、上位ヒット化合物群の標的分子さらにその下流分子・関連分子についてMassachusetts Institute of Technology (MIT), Gil Alterovitz助教授のご協力を得てクラスター解析を行った。さらにPubMed Abstractと照合し、これら分子がどのような受容体の下流に存在する分子としての報告が多いかを分析した。この結果、ドーパミン受容体を主体とする神経ペプチド受容体の下流シグナルの一部に含まれる分子が多いことが判明した。すなわち、

そこでさらに特定の神経ペプチド分子の好中球に対する作用を解析するために、候補分子の絞り込み作業を行った。具体的には、ドーパミン分子・受容体に加え、セロトニン分子・受容体、カンナビノイド分子・受容体について、受容体ノックアウト動物や骨髄単離好中球を用いた低分子化合物による細胞活性化抑制効果を検証した。

この結果、細胞系では比較的スクリーニングデータが再現可能であったが、生体内での生理作用を有する機構として好中球依存性免疫疾患モデルでの意義を実証できる分子・受容体の同定が非常に困難であった。しかし、さらに精力的に探索を続け、化合物BX13が主にやはり末梢神経に分布かつ作用する分子として同定されたため、この機能を探求することとした。

3. 終末臓器・部位における神経ペプチドの発現・分布の組織学的評価

固形臓器のひとつとして申請者が専門とする腎臓、及び、自己免疫異常時の標的組織となる関節と皮膚に焦点を当てて、化合物BX13と関連の深い感覚神経および神経ペプチドの局在を病理組織学的に評価した。この結果、脊髄後根神経節に分布するのと同じ神経ペプチドが踵関節にも見られることがわかった。

4. 神経ペプチド欠損マウスへの顆粒球依存組織障害モデルの導入

神経ペプチド遺伝学的欠損マウスを入手して、顆粒球が主体となるアレルギー反応 III 型の急性組織障害モデルを導入したところ、野生型マウスに比して神経ペプチド欠損マウスではとくに関節炎モデルに病変増悪が定量的に観察された。すなわち、このペプチドが生体内では抗炎症的に作用している可能性が示唆された。さらに化合物BX13投与もまた同様の効果を示した。

5. 神経欠落マウスへの顆粒球依存組織障害モデルの導入

遺伝学的及び薬理的に感覚神経を選択的に欠落させたマウスを作成し、顆粒球依存的な皮膚、腎臓等の終末臓器障害モデルを導入したところ、軽減効果が見られた。

6. 共培養実験に基づく末梢感覚神経と顆粒球細胞との相互作用の検証

げっ歯類の初代培養脊髄後根神経節神経細胞の培養系を星薬科大学成田年教授、濱田祐助教より分与して頂くとともに確立した。

【考察・今後の方針】

まず、細胞内シグナルの影響については好中球における RNA 依存性リン酸化酵素の上流・下流のシグナル解析と、遊走を促進する際に介在する細胞骨格分子への影響を解析する。また、好中球を主体とする炎症モデルでの低分子化合物の薬理作用も評価する。

また、臓器外神経系からの炎症コントロール機序については、引き続き細胞系でlentiviral shRNA vector を用いた遺伝子操作によって受容体分子を欠損させ、トランスウェルを用いて神経細胞と好中球・単球系培養細胞を共培養して、とくに神経細胞から分泌されるペプチドが IgG による白血球の活性化(貪食能、活性酸素産生、脱顆粒及びそれに伴う消化酵素の分泌)に影響を与えるか、種々の実験系で評価していく。

2018 年 5 月テキサス 州で開かれた米国免疫学会 Immunology 2018 では“Immunology in neuroscience”と題されたセッションが設けられ、免疫学と神経科学のクロストークについて Feinstein 医学研究所 Kevin Tracey や Harvard 大学 Isaac Chiu らが本分野の発展性を内外に示した。セッションの主眼は従来の神経免疫学に見られた多発性硬化症の動物モデルの病態解析や中枢神経系のグリア細胞の分子生物学ではなく、微生物感染時に微生物が直接的に感覚神経細胞に働きかける機序や、中枢神経からの自律神経シグナルが主に迷走神経を通じて脾臓マクロファージの形質を変化させる現象である。申請者が現在解析を進めている、神経系から免疫系に送られる生体シグナルという観点の報告はまだ少数であるが、臨床的には、とくに循環動態制御の観点で自律神経系のアンバランス、例えば交感神経系の過緊張が病態の悪化を招くことが経験される。末梢神経と炎症細胞のクロストークについて少数の可能性が提示されている一方で、骨髄球の関与についてはいまだに指摘されていないほか、CGRP、VIP以外の鍵分子の同定も進んでいない。以上の動向を鑑みた時、神経免疫学が新たな切り口によって徐々に注目されつつある一方で、申請者が開拓しつつある分野については先行文献が乏しく、本研究の成果の貢献は小さくないと予想される。

末筆ながら、本研修に多大なご支援を頂いた公益財団法人アステラス病態代謝研究会及びその関係者の皆様に深謝申し上げます。