

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06751

研究課題名(和文) 神経系ネットワークによる炎症性腎疾患制御

研究課題名(英文) Neural regulation of inflammatory kidney diseases

研究代表者

西 裕志(Nishi, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90784174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：好中球と免疫複合体の相互作用を阻害できる薬剤の同定を目指した低分子化合物ハイ・スループット・スクリーニングによって神経伝達物質アナログが複数発見された。白血球を病態の首座とする免疫学的組織障害モデルを、腎のみならず関節や皮膚を標的として導入し、これら薬剤を投与したところ一部で病態が改善した。また、腎臓における病理組織学的検討では間質領域に末梢神経に特異的とされるシグナルが認められた。さらに、神経ペプチド前駆体を欠損した遺伝子改変マウスを入手して上記の薬剤投与モデルで変化の見られた炎症疾患モデルに及ぶ影響も検討したところ、野生型に比してノックアウトマウスでは病態に変化が見られた。

研究成果の概要(英文)：Several neural network related molecules were discovered through a high throughput screen of small molecules to identify a drug which can inactivate neutrophil Fc receptor activation signals. Inflamed end tissues and organs due to neutrophil activation were partly attenuated by administration of these chemicals to animals. Immunohistochemical analysis revealed peripheral innervation in the kidney interstitial area. The tissue injury of neutrophil mediated diseases was altered in the neural peptide precursor deficient animals.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓

1. 研究開始当初の背景

これまで腎疾患の分子レベルでの病態解明に取り組んできた。一例として、赤血球のヘモグロビンや筋肉のミオグロビンと類似したファミリー分子であるサイトグロビンの腎間質における機能解析などを進め、同分子が酸化ストレスに対して組織保護的に働くことを見出し、治療標的になりうることを示した(引用文献 1, 2)。その後もさらに研究標的を免疫学的腎炎、それも発症初期に介入手段がないかと考えて実験手法を考え始めた。

免疫学研究の多くは獲得免疫とくにリンパ球生物学の探求が進んでいる。一方、好中球、単球・マクロファージ、ナチュラルキラー細胞等の自然免疫細胞は標的を非特異的に認識しながら、とくに急性炎症期に中心的な役割を果たす。腎臓分野では、ANCA 関連血管炎のほか、IgA 腎症やループス腎炎などの急性期にヒト腎生検組織で自己抗原と自己抗体の複合体(免疫複合体)と共に好中球が認められる。好中球 Fc γ 受容体シグナルの活性化に由来する細胞の活性化の定量的な評価方法としては、細胞内外での活性酸素測定系(Luminol/isoluminol 系, Homovanillic Acid 系など)や IgG 抗体でオプソナイズされたヒツジ赤血球貪食の定量系, myeloperoxidase, elastase など IgG 由来の好中球各種消化酵素などの古典的実験系がある。さらに、近年注目を集めている好中球細胞外トラップ NETS (neutrophil extracellular traps)のヒトおよびマウスの末梢好中球を用いた測定系、さらに、マウス精巣拳筋を使った *in vivo* NETS 測定系を樹立したことから、これらを生かし、無菌的環境で NADPH 非依存的に免疫複合体が NETS を誘導すること(引用文献 3)、ループス腎炎マウスモデルで見られる好中球 Fc γ 受容体シグナル活性化においてマクロファージの寄与が少ないこと(引用文献 4)、補体成分 C5a による priming 刺激が好中球活性酸素産生を促進すること(引用文献 5)などを共同研究において発見してきた。これらはいずれも好中球が無菌の炎症環境で細胞内外の種々の因子によって制御されていることをよく示している。

さらにこれら古典的プロトコールを発展させて、免疫複合体によって刺激された好中球から産生される活性酸素を効率よく定量できるハイ・スループット・スクリーニング法を確立した。384 ウェルプレート上で免疫複合体、マウス好中球、そして 8483 種類の低分子化合物を用いてスクリーニングを実施した。本質的に個体差が大きいマウス骨髄好中球を使用したにもかかわらず、アッセイ系の精度を表す最重要指標 Z' factor は 0.79 と高かった。

一例として、化合物スクリーニングの上位ヒットとして慢性骨髄性白血病の治療薬

bosutinib が薬理効果の最上位のひとつとして見いだされた。同薬添加によって *in vitro* で好中球の活性酸素産生に加え、脱顆粒、貪食(オプソナイズ化)など種々の Fc γ 受容体由来の細胞活性化現象が抑制された。さらに、急性期に好中球 Fc γ 受容体が関与することが知られる抗基底膜腎炎および全身性がエリテマトーデス SLE などマウスモデルで、同薬投与が組織障害(アルブミン尿、糸球体半月体形成)を軽減することを観察した。

Bosutinib は Bcr/Abl kinase 阻害剤であることから、Fc γ 受容体シグナルの下流に同リン酸化酵素が働いている可能性が見いだされた。そこで、培養細胞系において好中球に lentiviral vector を感染させて細胞内に Abl kinase を標的とする shRNA を発現させて、同遺伝子の発現を抑制させた。同時に、フローサイトメトリーを用いて細胞内 F-actin 定量系を樹立して、これを細胞形質の観察に用いた。結果として、Fc γ 受容体シグナル活性化が F-actin 脱重合を促すこと、また、細胞骨格脱重合には Abl kinase が必須であることを発見した。

以上の結果は、化合物のスクリーニング実験から、生体内の新しい機構の証明が可能であることをよく示すエピソードである。

そこで、他の上位ヒット化合物に焦点を当てることとした。上位ヒット化合物には bosutinib 以外にも、セロトニン、オピオイド、 γ -アミノ酪酸 GABA (4-aminobutanoic acid) などの神経伝達物質アナログが相当数含まれていた。これは生体とくに急性炎症において神経伝達物質が好中球に対して自己保護的に機能している可能性を示唆する。これらの生体内・細胞内作用の有無を検証することとした。

2. 研究の目的

すでに先行した企画として、好中球の活性化を制御可能な低分子化合物をスクリーニング分析・検証してきた。本企画では同スクリーニングでヒットした神経伝達物質アナログの、好中球が主体となる組織障害モデルにおいてその薬理作用を検証して、新規創薬の可能性を探ることとした。薬理効果を検証するために、古典的な貪食細胞培養細胞系、実験動物系のアッセイ、モデルに加え、NETS などの比較的新しく報告されている定量法を活用も視野に入れた。さらに、腎炎の急性炎症期において、生体内で神経系が炎症細胞の活性化(炎症促進作用)を制御しているという仮説を組織学的に検証して、「神経系腎臓(固形臓器)-自然免疫細胞」という新しいクロストーク・バイオロジーの確立を目指す。

3. 研究の方法

低分子化合物ハイ・スループット・スクリ

ーニングの序列化された一次結果を活用して、好中球活性を阻害する化合物として上位にランクされたもののうち、神経伝達物質アナログを用いて培養細胞系アッセイ（好中球の遊走・活性酸素産生・消化酵素放出・NETS、マクロファージの遊走・活性酸素産生・貪食機能）、実験動物系の確立したモデル（自然免疫細胞の寄与が大きいとされる抗基底膜腎炎、急性虚血モデル、血管炎モデルなど）を駆使して、その薬理作用を効率よく多面的に検証する。

さらに、状況に応じて、とくに低濃度で効果を発揮する化合物を選別しその生体内リガンドおよびリガンド受容体のノックアウトマウスを入手し、腎臓や他の臓器を標的とした急性炎症モデルを誘導することとした。これによって腎臓等の末梢臓器・部位の急性炎症気において、神経伝達ネットワークが炎症細胞の活性化（炎症促進作用）を制御しているという仮説を検証した。実験の前提として、腎臓における組織学的な神経線維の走行、毛細血管や炎症細胞など他の構造物との位置関係も評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞培養系における神経ペプチド化合物の薬理効果検証

先行のドラッグスクリーニングで見いだされた神経科学で汎用される低分子化合物、すなわちセロトニン、オピオイド、GABAなどの神経伝達物質アナログが相当数含まれている。細胞培養系での検証実験を進めたところ、このうち複数の化合物は、細胞毒性のある可能性が示唆されたため、細胞機能の抑制を細胞死と入念に判別する必要性に迫られた。また、細胞毒性が否定できる場合でも、薬理効果が濃度依存性に見られない化合物については逆説的現象を説明できないため、やはり、以後の実験には使用しない方針とした。

同時に、一次スクリーニングの序列化された化合物群を含む結果について、各化合物に対して annotate された薬理作用の情報、さらには医学生物学論文として既報がある分子シグナル経路の情報とを組み合わせ、in silico でクラスター解析を施行した。この結果、やはり複数の神経系回路の分子が、好中球の Fc γ 受容体の制御系として見いだされた。

(2) 腎実質の神経走行の病理組織学的検証

腎疾患の病態解明を念頭に置いた実験を進めるにあたり、腎臓における末梢神経支配について病理組織学的検討を行ったところ、腎実質内とくに尿細管腔及び尿細管上皮を除く領域に末梢神経に特異的とされるシグナルが認められた。腎実質内に神経走行が認められることは、神経的ネットワークによる炎症制御があるとした場合に合目的である。

(3) 神経ペプチドアナログの生体投与実験

大脳皮質ニューロペプチド類似化合物の一部に骨髄球系細胞の活性化（とくに血管内皮への接着と遊走を想定したような細胞の活性化）に対する制御作用が認められたことから、生体内の神経シグナルによる炎症制御の可能性が示唆された。そこで、白血球浸潤を病態の首座とする免疫学的組織障害モデル（腎のみならず関節や皮膚を標的とした）を導入して、種々の条件で上記の化合物投与実験を繰り返した。この結果、意外なことに、好中球が主たる役割を果たすような関節炎モデルや皮膚炎モデルでの薬剤投与による病態改善効果がとくに強く認められた。

(4) 遺伝子改変マウスによる検証

神経ペプチド前駆体を欠損した遺伝子改変マウスを入手して上記の薬剤投与モデルで変化の見られた炎症疾患モデルに及ぶ影響も検討したところ、野生型に比してノックアウトマウスでは病態に違いが見られた。これらは末端臓器の末梢神経に由来する神経シグナルペプチドが、好中球の Fc γ 受容体と IgG 抗体の相互作用に端を発する局所の炎症をコントロールしている可能性を示している。現在、この機序をさらに解明する追加実験を施行している。

(5) 二光子顕微鏡を用いたマウス系球体毛細血管内の好中球の挙動と Bcr/Abl kinase 阻害薬が与える効果の検証

上記、神経系のプロジェクトの進行に先立ち、既にスクリーニングで見出されていた bosutinib の薬理効果を生体内の細胞レベルでさらに詳細に検証する必要があると考えられた。そこで、腎臓特異的に生体内で検証するために、二光子顕微鏡でマウス生体内の腎臓系球体を観察した。マウスには抗基底膜抗体を静脈内投与して、系球体毛細血管床に IgG を沈着させ、これによって蛍光色素でラベルされた好中球が接着を起こすことをまず観察した。さらに、同薬剤によって前処理された好中球が対照群の好中球と比べて接着が弱まることを観察した。これは同薬剤が腎臓の毛細血管において、炎症で誘導される白血球の特徴的な挙動に影響を与えていることを示す。

(6) 薬剤の作用点である好中球 Fc γ 受容体の IgG 抗体との結合について生物物理学的検証

上記に示した Bcr/Abl 阻害薬の作用機序を考えた時に、そもそも好中球の Fc γ 受容体が血管床に付着した IgG 抗体とどのような力によって引き寄せあうのかが不明であり、それが細胞内酵素とどのように因果関係をもつのか不明であった。そこで、生体物理学的な分子間作用 catch bond に着目して、Abl kinase と関連する F-actin の阻害薬による影響を評価した。この結果、Fc γ 受容体と IgG の Fc domain は接着が弱すぎても強すぎても結合が弱い一方で、中間的な結合の時に最も強く引き合うことが示された。これは F-actin の重合を化学的に阻害することによって見られなくなる現象である。炎症環境に

において血管内を流れる白血球が tethering, rolling, adhesion, transmigration と一連の変化を示す過程で, その中間的過程が今回の薬剤の作用機構であることが示された.

<引用文献>

1. Hiroshi Nishi, Reiko Inagi, Norifumi Kawada, Katsutoshi Yoshizato, Imari Mimura, Toshiro Fujita, Masaomi Nangaku: Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. *Am J Pathol* 178: 128-139, 2011.
2. Koichi Shimizu, Hiroshi Nishi, Ayako Shimizu, Takashi Ozawa, Takaaki Senbonmatsu: Bidirectional nature of cardiovascular and kidney disease. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry* 12: 168-182, 2012.
3. Kan Chen, Hiroshi Nishi, Richard Travers, Naotake Tsuboi, Kimberly Martinod, Radu Stan, Kevin Croce, Tanya Mayadas: Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* 120: 442-4431, 2012. [Cover]
4. Florencia Rosetti, Naotake Tsuboi, Kan Chen, Hiroshi Nishi, Thomas Hernandez, Sanjeev Sethi, Kevin Croce, George Stavrakis, Jorge Alcocer-Varela, Diana Gomez-Martin, Nico van Rooijen, Vasileios Kyttaris, Andrew Lichtman, George Tsokos, Tanya Mayadas: Human lupus serum induces neutrophil mediated organ damage in mice that is enabled by Mac-1 deficiency. *J Immunol* 189: 3714-3723, 2012.
5. Naotake Tsuboi, Thomas Hernandez, Xun Li, Hiroshi Nishi, Xavier Cullere, Divya Mekala, Melissa Hazen, Jörg Köhl, David Lee, Tanya Mayadas: Regulation of human neutrophil Fcγ receptor IIa by C5a receptor promotes inflammatory arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 63: 467-478, 2011.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Hiroshi Nishi, Kazuhiro Furuhashi, Xavier Cullere, Gurpanna Saggi, Mark Miller, Yunfeng Chen, Florencia Rosetti, Samantha Hamilton, Lihua Yang, Spencer Pittman, Jiexi Liao, Jan Herter, Jeffrey Berry, Daniel DeAngelo, Cheng Zhu, George C. Tsokos, Tanya Mayadas: Neutrophil FcγRIIA promotes

IgG-mediated glomerular neutrophil capture via Abl/Src kinases. *J Clin Invest* 127: 3810-3826, 2017 (DOI 10.1172/JCI94039) 査読あり

2. Rachael Gordon, Jan Herter, Florencia Rosetti, Allison Campbell, Hiroshi Nishi, Michael Kashgarian, Sheldon Bastacky, Anthony Marinov, Kevin Nickerson, Tanya Mayadas, Mark Jay Shlomchik: Lupus and proliferative nephritis are PAD4 independent in murine models. *JCI Insight* 2: 92926, 2017 (DOI 10.1172/jci.insight.92926) 査読あり

3. Xun Li, Xavier Cullere, Hiroshi Nishi, Gurpanna Saggi, Enrique Durand, Michael Mansour, Jenny Tam, Xiu-yu Song, Xin Lin, Jatin Vyas, Tanya Mayadas: PKC-δ activation in neutrophils promotes fungal clearance. *J Leukoc Biol* 100: 581-588, 2016 (DOI 10.1189/jlb.4A0915-405R) 査読あり

4. Koshu Okubo, Mako Kamiya, Yasuteru Urano, Hiroshi Nishi, Jan Herter, Tanya Mayadas, Daigoro Hirohama, Kazuo Suzuki, Hiroshi Kawakami, Mototsugu Tanaka, Miho Kurosawa, Shinji Kagaya, Matsuhiko Hayashi, Keiichi Hishikawa, Masaomi Nangaku, Toshiro Fujita, Matsuhiko Hayashi, Junichi Hirahashi: Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation. *10: 204-215, 2016 (DOI 10.1016/j.ebiom.2016.07.012) 査読あり*

5. 井上玲子, 西裕志, 南学正臣. 高齢者の腎機能低下とその原因, 腎と透析, 東京医学社, 84, 376-382, 2018. 査読なし

[学会発表](計10件)

1. Hiroshi Nishi, Kazuhiro Furuhashi, Xavier Cullere, Gurpanna Saggi, Mark Miller, Yunfeng Chen, Florencia Rosetti, Samantha Hamilton, Lihua Yang, Spencer Pittman, Jiexi Liao, Jan Herter, Jeffrey Berry, Cheng Zhu, George C. Tsokos, Tanya Mayadas: FcγRIIA-driven glomerular neutrophil accumulation and proliferative glomerulonephritis are averted with inhibition of neutrophil Bcr-Abl kinases. *ISN Frontiers Meetings 2018 on Kidney Disease & Cardiovascular Disease*. 2018.

2. Reiko Inoue, Hiroshi Nishi, Masaomi Nangaku: Neutrophil interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase regulates stimulation-induced migration and production of reactive oxygen species. *ISN Frontiers Meetings 2018 on Kidney Disease & Cardiovascular Disease*. 2018.

3. Koji Takemura, Hiroshi Nishi, Masaomi Nangaku: Culture of low concentration of

oxygen amplifies slow twitch muscle fiber gene expression in skeletal C2C12 myotubes. ISN Frontiers Meetings 2018 on Kidney Disease & Cardiovascular Disease. 2018.

4. 西裕志 . 赤血球・白血球から捉えた腎臓病のリサーチ . 第 5 回 Tokyo Kidney Conference . 2017 年

5. 西裕志 . Hypoxic stimuli and hemoglobin effect on skeletal muscle. 一般社団法人日本アンチ・ドーピング研究コンソーシアムシンポジウム 2017 . 2017 年 .

6. 西裕志 . 腎系球体毛細血管で観る好中球の挙動と創薬応用 . 第 70 回 Blood Vessel Club . 2017 年 .

7. 西裕志 . 我が国の目指す医療のあり方と医学教育 , そして医療人育成 . 東北大学病院「コンダクター型総合診療医」育成プログラム公開シンポジウム「これからの地域包括ケアシステムと総合診療医への期待」. 2017 年 .

8. 佐々木昌弘 , 福井亮 , 西裕志 . 行政の立場から見たチーム医療 . 第 11 回日本 CKD チーム医療研究会 . 2017 年 .

9. 西裕志 . 低分子化合物スクリーニングが明らかにしたループス腎炎における免疫複合体と好中球 Abl kinase の役割 . 第 2 回川島カンファレンス . 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : Treatment of IgG-immune complex mediated organ damage.

発明者 : Hiroshi Nishi, Tanya Mayadas

権利者 : The Brigham and Women's Hospital, Inc.

種類 : USSN

番号 : 15/309,890

出願年月日 : 2016 年 11 月 9 日

国内外の別 : 国外

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西 裕志 (NISHI, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 90784174

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者