

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08232

研究課題名(和文)炎症性腎疾患における腎外・細胞内からの好中球制御

研究課題名(英文) Non-renal and enzymatic regulation of neutrophils in inflammatory kidney diseases

研究代表者

西 裕志 (Nishi, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90784174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：好中球は種々の炎症性腎疾患の活動期及び急性期の腎に蓄積し組織障害を助長すると考えられている。そこで、疾患活動期に注目して好中球の病的な過度の活性を腎外・細胞内から制御する手段を模索した。腎外からの好中球制御として、一部の神経伝達物質は中枢神経ではなく末梢神経が分布する末端臓器・組織において炎症に対して保護的に作用していた。細胞内からの好中球制御としては、DNA や RNA と結合或いはそれらによって活性化されるリン酸化酵素に着目した。これらは好中球の活性酸素産生や血管内皮接着や血管外遊走などを仲介しており、細胞の integrity を左右する細胞骨格の重合反応に必須であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球は種々の炎症性腎疾患の活動期及び急性期の腎に蓄積し、脱顆粒や活性酸素放出などのメカニズムを通じて、組織障害を助長すると考えられている。そこで、疾患活動期に注目して、特に炎症性腎疾患における腎外・細胞内からの好中球制御する手段を模索してきた。今後、好中球内の分子を標的にするような低分子化合物や上流シグナル遮断が可能になれば、炎症性腎疾患の治療手段として大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils accumulate and promote tissue damage in the kidneys during the active and acute stages of various inflammatory renal diseases. Therefore, we sought methods to regulate neutrophil activation from outside the kidney and intracellular space. As extra-renal stimuli, we spotted unknown function of neurotransmitter molecules. Our studies have shown that some of these neurotransmitters may act protectively against inflammation. As intra-cellular signaling, we focus on the phosphorylation signal pathway stimulated by migratory factors. In particular, a number of kinases activated by DNA and RNA is required for reactive oxidative species production, adhesion to vascular endothelium, and vascular migration, which was shown to play a role to interact with cytoskeleton and mediated vascular inflammation.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：好中球 腎臓 炎症 神経 血管生物学 白血球 血栓

1. 研究開始当初の背景

今日、腎代替療法が必要となる患者の過半数が糖尿病や高血圧といった全身的な生活習慣病が占めるようになって、自己免疫異常に起因する炎症性腎疾患のために一定割合が腎不全に陥っている。IgA 腎症やループス腎炎には依然としてステロイドを主体とする非特異的抗炎症療法が行われており、癌・リウマチ等の他分野に比して新薬導入が遅れている。

自己抗原と自己抗体からなる免疫複合体の沈着は IgA 腎症やループス腎炎、膜性腎症などの自己免疫性腎炎に共通した病理所見である。古典的には補体の活性化に加え、免疫複合体中の IgG に対する Fc 受容体を持つ貪食細胞の活性化が組織障害に寄与すると考えられている。さらに近年では、ループス腎炎における好中球特異的トランススクリプトームの亢進 (Banchereau R, Pascual V et al: *Cell* 2016) や好中球細胞外トラップの関与 (Lood C, Kaplan MJ et al: *Nat Med* 2016) が複数報告され、好中球と腎炎の関連に関心が集まってきている。これらは、免疫複合体との結合に始まる好中球の活性化に好中球内のシグナル分子が関与しており、これを自己免疫性腎疾患の治療標的にできることを示唆している。

免疫複合体による貪食細胞の活性化を考えた時に、その細胞内シグナルの制御を念頭に置くことはとくに *in vitro* 環境では重要であるが、多種多様な臓器・組織・システムが互いに制御しあっているのが *in vivo* システムであり、腎臓も例外ではない。免疫系が外的異物に対する生体保護やその破綻が自己免疫疾患を招くのに対し、神経系は情報伝達の緻密なネットワーク形成によって個体全体の運動・感覚・自律機能をつかさどる。両分野をまたぐ研究としては従来より多発性硬化症、マウス実験的自己免疫性脳脊髄炎 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) が広くテーマとして扱われ、また末梢神経系では substance P が血管内皮や炎症細胞から分泌され求心性神経を興奮させることがよく知られる。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、申請者は約 9000 種類のライブラリー低分子化合物を用いた小分子ハイ・スループット・スクリーニングを行った。その結果、好中球内の Abl kinase が免疫複合体との結合に始まる細胞活性化に関与していること、血管内の古典的「炎症」のコンテキストにおいて好中球が最初に血管内皮と出会う tethering ときに Abl kinase と細胞骨格が生体物理学的に連動していることなどを突き止めた (*J Clin Invest* 2017)。

申請者は Fc 受容体の下流には未知の鍵分子がほかにも存在するであろうと想定し、先術のオリジナルなスクリーニング・データを数理科学的に再解析してさらに別の鍵分子・シグナルの発見に挑む。本解析の一般的利点は既報や研究者のバイアスに影響されず、統計学で裏打ちされたデータが得られる点である。

また、前述のように、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。最近になり腎臓では求心性交感神経系を介した脳・腎臓連関 (Rafiq K et al: *Circulation* 2012)、脾・腎臓連関 (Inoue T et al: *JCI* 2016)、心・腎臓連関 (Fujii K et al: *Nat Med* 2017) などが指摘され始めた。さらに、近年では、乾癬モデルマウスにおいて侵害受容性求心性神経が真皮樹状細胞を刺激し組織保護的に働くこと (Riol-Blanco et al: *Nature* 2014)、気道アレルギー反応において、活性化免疫細胞から分泌された IL-5 が感覚神経の侵害性受容体に結合し、それに反応した神経が vasoactive intestinal peptide (VIP) を分泌して CD4 陽性 T 細胞を活性化し免疫反応を抑制すること (Talbot S et al: *Neuron* 2015) 等の報告がある。これら T 細胞や樹状細胞を仲介した末梢神経の免疫制御の可能性が複数提示される一方、局所の炎症反応ではリンパ球以外の炎症細胞、すなわち初期の炎症部位に集簇して組織障害を助長する好中球と神経シグナルの相互作用の解明は遅れている。

3. 研究の方法

好中球 Fc 受容体の下流シグナル分子として複数の細胞周期関連タンパクや微生物感染反応性タンパクに標的を絞って解析を進める。種々の炎症環境を想定した薬物刺激によって、これら関心キナーゼの標的分子がリン酸化され、かつ、その阻害剤が用量依存的に無菌的環境における好中球呼吸性バースト等の細胞活性化を抑制するかどうかを評価する。また、分子自体の発現を抑制したり機能ドメイン特異的に変異を導入した細胞安定株を樹立することによって loss-of-function study を進める。その方法論としては申請者が経験のある標的遺伝子に対する shRNA 配列を有する lentiviral vector 及び Crispr/Cas9 システムを組み込んだ lentiviral vector の使用を想定している。また、いずれの分子も阻害剤が入手可能であるので、投与経路や投与量を最適化した上で炎症を主体とした腎障害モデルに対する投与実験を行う。

侵害受容性求心性神経を想定して神経細胞(げっ歯類の脊髄後根神経節神経細胞)と炎症細胞のトランスウェルを用いた共培養又は神経細胞の condition media を培養白血球に添加してその細胞レベルの表現型が変化しないか, proof of concept の実験を行う。また, 神経関連因子全身ノックアウトマウスを入手し, 好中球が主体となるアレルギー反応 III 型の急性障害を皮膚に惹起する。

4. 研究成果

好中球は種々の炎症性腎疾患の活動期及び急性期の腎に蓄積し, 脱顆粒や活性酸素放出などのメカニズムを通じて 組織障害を助長すると考えられている。そこで 疾患活動期に注目して, 特に炎症性腎疾患における腎外・細胞内からの好中球制御する手段を模索している。

腎外からの好中球制御として特に神経伝達分子の役割に注目している。これら一部の神経伝達物質は中枢神経ではなく末梢神経が分布する末端臓器・組織において炎症に対して保護的に作用している可能性が動物実験から示された。現在, 他施設との共同研究によって神経細胞と血液炎症細胞の共培養実験を樹立を進めている。

細胞内からの好中球制御として炎症性サイトカインや遊走化因子で刺激された骨髄球活性化に関与するリン酸化シグナル経路に焦点を当てている。特に, DNA によって活性化する細胞内シグナルの一翼を担うリン酸化酵素や, 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リン酸化酵素が, 好中球の活性酸素産生や血管内皮接着や血管外遊走などを仲介していることを確かめた。さらに, 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リン酸化酵素は細胞骨格の重合反応に必須である一方, 接着因子発現・活性化への影響は乏しいことが示唆された。さらに, 下流シグナルを明らかにするために網羅的なリン酸化アレイを実施したところ, 有意に変化する候補分子が複数同定された。現在, ウェスタンブロットによってアレイデータの妥当性を検証しつつ, 阻害薬を用いた機能解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Vorobyev, Gupta, Sezin, Koga, Bartsch, Belheouane, Kunzel, Sina, Schilf, Korber-Ahrens, Beltsiou, Lara Ernst, Khil'chenko, Al-Aasam, Manz, Diehl, Steinhaus, Jascholt, Kouki, Boehncke, Mayadas, Zillikens, Sadik, Nishi, Ehlers, Moller, Bieber, Baines, Ibrahim, Ludwig	4. 巻 10
2. 論文標題 Gene-diet interactions associated with complex trait variation in an advanced intercross outbred mouse line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4097-4097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11952-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Maekawa, Tsuyoshi Inoue, haruki Ouchi, Tzu-Ming Jao, Reiko Inoue, Hiroshi Nishi, Rie Fujii, Fumiyoshi Ishidate, Tetsuhiro Tanaka, Yosuke Tanaka, Nobutaka Hirokawa, Masaomi Nangaku, Reiko Inagi	4. 巻 29
2. 論文標題 Mitochondrial damage causes inflammation via cGAS-STING signaling in acute kidney injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1261 ~ 1273.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Nishi, Tanya Mayadas	4. 巻 31
2. 論文標題 Neutrophils in lupus nephritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Rheumatology	6. 最初と最後の頁 193 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BOR.0000000000000577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 2件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Hiroshi Nishi, Reiko Inoue, Mizuko Osaka, Tsuyoshi Inoue, Masayuki Yoshida, Masaomi Nangaku
2. 発表標題 Neutrophil interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase (EIF2AK2) mediates vascular adhesion and transmigration in non-viral inflammatory disease
3. 学会等名 International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Reiko Inoue, Hiroshi Nishi, Mizuko Osaka, Masayuki Yoshida, Masaomi Nangaku
2 . 発表標題 Neutrophil interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase (EIF2AK2) promotes neutrophil adhesion and transmigration in acute phase of glomerulonephritis
3 . 学会等名 CKD Frontier Meeting
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Hiroshi Maekawa, Tzu-Ming jao, Reiko Inoue, Hiroshi Nishi, Tsuyoshi Inoue, Masaomi Nangaku, Reiko Inagi
2 . 発表標題 Mitochondrial DNA leakage causes inflammation via the cGAS-STING axis in cisplatin-mediated tubular damage.
3 . 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Hiroshi Nishi, Reiko Inoue, Mizuko Osaka, Tsuyoshi Inoue, Masayuki Yoshida, Masaomi Nangaku
2 . 発表標題 Neutrophil interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase (EIF2AK2) promotes vascular adhesion and transmigration in non-viral inflammatory disease.
3 . 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 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
2 . 発表標題 Fc RIIA-driven glomerular neutrophil accumulation and proliferative glomerulonephritis are averted with inhibition of neutrophil Bcr-Abl kinases.
3 . 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiko Inoue, Hiroshi Nishi, Masaomi Nangaku
2. 発表標題 Neutrophil interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase regulates stimulation-induced migration and production of reactive oxygen species.
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西裕志
2. 発表標題 白血球を介した腎の毛細血管における炎症制御 .
3. 学会等名 Renal Pathology Seminar For Young Nephrologists (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiko Inoue, Hiroshi Nishi, Mizuko Osaka, Tsuyoshi Inoue, Masayui Yoshida, Masaomi Nangaku
2. 発表標題 Neutrophil interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase (EIF2AK2) promotes adhesion in non-viral inflammatory kidney disease.
3. 学会等名 Asian Pacific Society of Nephrology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Narihito Tatsumoto, Suguru Saito, Hiroshi Nishi, Kenneth E. Bernstein, Michifumi Yamashita
2. 発表標題 Angiotensin converting enzyme-overexpressing neutrophils suppress glomerular injury in crescentic glomerulonephritis
3. 学会等名 American Society of Nephrology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上玲子, 西裕志, 大坂瑞子, 吉田雅幸, 南学正臣
2. 発表標題 好中球EIF2AK2阻害は血管内皮接着・血管外遊走を抑制し炎症性腎疾患急性期を制御する
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計5件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------