

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08721

研究課題名(和文)急性腎障害からの遠隔臓器障害に対する善玉経路としての神経免疫応答の検証

研究課題名(英文) Neuroimmune Responses as a Beneficial Pathway on Remote Organ Damage from Acute Kidney Injury

研究代表者

安田 日出夫 (Yasuda, Hideo)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60432209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急性腎障害(AKI)は臓器連関作用によって多臓器障害に陥いる。AKIによって生じる肺障害を軽減できれば生命予後改善に繋がる。本研究では、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト(GTS-21)はマウスにおける急性腎障害(AKI)後の血漿IL-6と肺障害を軽減した。GTS-21による肺障害軽減効果は脾臓摘出及び脾臓マクロファージを枯渇させたマウスで消失したが、肺胞マクロファージを枯渇させたマウスでは維持した。以上より、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストは脾臓におけるコリン作動性抗炎症経路を介してAKIによる肺障害を軽減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腎障害は高頻度、高死亡率な病態である。特に、透析を要する急性腎障害に多臓器障害を伴うと死亡率は40-50%程度と生命予後不良である。このように透析を行っても急性腎障害の予後が悪いのは、急性腎障害からの臓器連関作用による多臓器障害によると考えられている。本研究では、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストが脾臓マクロファージでの抗炎症経路を活性化して急性腎障害によって誘導される肺障害を軽減することを初めて明らかにした。本研究は、AKIによる臓器連関障害を軽減する新たな治療ストラテジーを提唱するもので、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストの急性腎障害患者び対する臨床応用への礎となる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that activation of a nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), which exerts cholinergic anti-inflammatory effects on macrophages, could reduce acute lung injury (ALI) after acute kidney injury (AKI). We induced AKI in male mice by unilateral ischemia-reperfusion injury (IRI) with contralateral nephrectomy and administered nAChR agonists in three experimental settings: 1) splenectomy, 2) deletion of splenic macrophages via intravenous administration of clodronate liposomes, and 3) alveolar macrophage deletion via intratracheal administration of clodronate liposomes. Treatment with GTS-21, an $\alpha 7$ nAChR-selective agonist, significantly reduced the levels of circulating IL-6 and lung injury after renal IRI. The effect of GTS-21 on the lungs was eliminated in splenectomized mice and mice depleted of splenic macrophages, but not in mice with depleted alveolar macrophages. These findings suggest that nAChR agonist reduces ALI after IRI-induced AKI via macrophages in the spleen.

研究分野：急性腎障害

キーワード：急性腎障害 急性肺障害 マクロファージ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害(acute kidney injury : AKI)は腎代替療法を行っても生命予後が不良である。それはAKIからのリモート作用で遠隔臓器に障害をきたすことが一因とされ、IL-6などの炎症性サイトカインが悪玉因子として血液を介して遠隔臓器に到達し障害をきたす。近年神経伝達経路が免疫応答を制御すること、さらに迷走神経刺激によって炎症性サイトカインが抑制されることが明らかとなってきた。以上よりAKIからのリモート作用は悪玉因子を運ぶ血液と善玉因子を運ぶ神経が拮抗しそのバランスで決定されること、迷走神経を刺激して抗炎症作用を強めることでAKIによる遠隔臓器障害が軽減し、生命予後が改善されるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的はAKI誘発急性肺障害に対してアセチルコリン受容体アゴニストが脾臓を介した神経免疫応答によって抗炎症作用を発揮して肺障害を軽減することを明らかにすることである。

3. 研究の方法

C57/B6 マウスを以下の4群に分けて肺障害の評価項目を検証した。偽手術+vehicle群、偽手術+アセチルコリン受容体アゴニスト群、腎虚血再還流(IRI)+vehicle群、IRI + アセチルコリン受容体アゴニスト群。AKIは腎虚血再還流障害によって惹起した。IRIは右腎摘出2週後に左腎動静脈に35分虚血再還流を行った。偽手術は右腎摘出2週後に、左腎動静脈を剖出した。アセチルコリン受容体アゴニストはニコチン(1mg/kg)または $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストGTS-21(4 mg/kg)を腎再還流の5時間前と0.5時間前に腹腔内投与した。

さらに、アセチルコリン受容体アゴニストの作用部位を明らかにするために、脾臓摘出モデル、脾臓マクロファージ枯渇モデル、肺泡マクロファージ枯渇モデルを作成してアセチルコリン受容体アゴニストの肺障害への効果を検証した。脾臓摘出モデルとして右腎摘出時に脾臓摘出を行った。脾臓マクロファージ枯渇モデルは、クロドロネート 150 μ LをIRI1時間前に静脈内投与を行った。肺泡マクロファージ枯渇モデルは、クロドロネート 40 μ LをIRI投与前3日間気管内投与を行った。

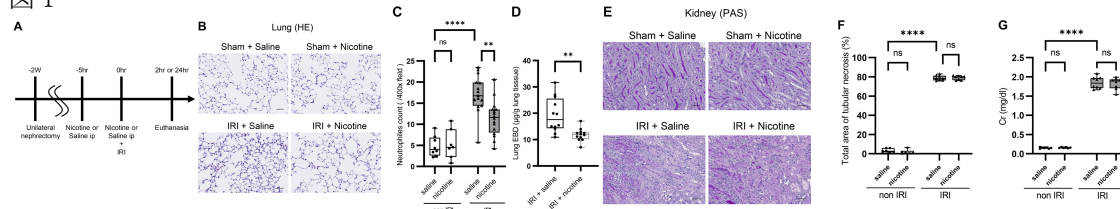
肺の評価項目は、HE染色での肺組織障害、好中球数、ELISAによる肺CXCL1定量、血管透過性指標としてのevans blue dyeの血管外漏出量を測定した。また、肺障害に関連する血漿IL-6値を測定した。

4. 研究成果

1) AKIは肺障害を惹起し、ニコチンはAKIによる肺障害を軽減する。

腎IRIは肺組織障害を誘発し、肺好中球を増加させ、肺血管透過性を亢進させた(図1B-D)。ニコチンは腎IRIによるこれらの急性肺障害を軽減した(図1B-1D)。ニコチンは腎IRIによるAKIを軽減しなかった(図1F, 1G)。

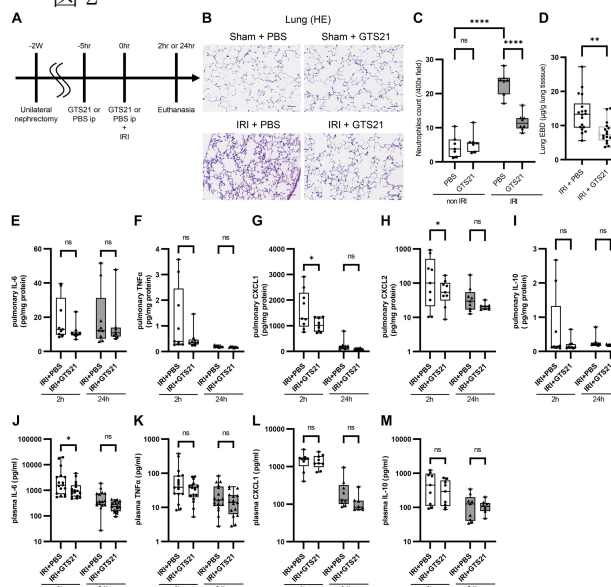
図1



2) $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストGTS-21はAKIによる肺障害を軽減する。

$\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト(GTS-21)はAKIによる肺障害を軽減した(図2B-2D)。GTS-21はAKI後早期の肺CXCL1、血漿IL-6を低下させた(図2G, 2J)。

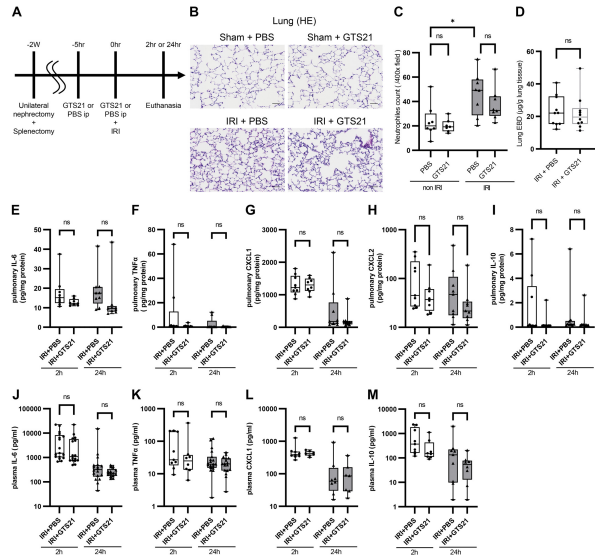
図2



3) 脾臓が摘出されたマウスではGTS-21はAKIによる肺障害を軽減しなかった。

図 3

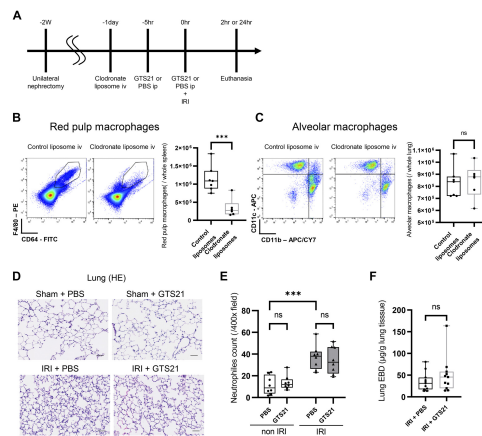
脾臓摘出マウスでは、AKI後に肺組織障害、肺好中球数増加がみられ、肺障害をきたした(図3B, 3C)。脾臓摘出マウスでAKI後の肺組織障害、肺好中球数増加、肺血管透過性をGTS-21は低下させなかった(図3B-3D)。さらに、脾臓摘出マウスでGTS-21はAKI後早期の肺CXCL1、血漿IL-6を低下させなかった(図3G, 3J)。



4) 脾臓マクロファージを枯渇させたマウスでは、GTS-21はAKI後の肺障害を軽減しなかった。

図 4

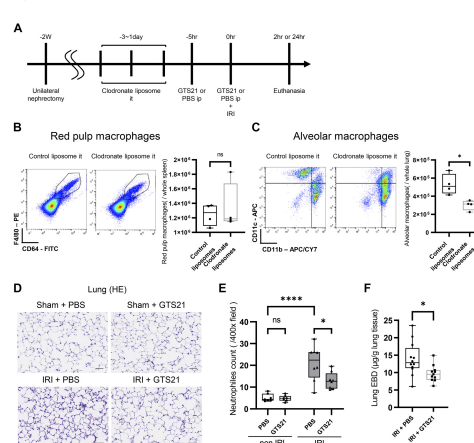
クロドロネート静脈内投与によって脾臓マクロファージは20%程度にまで低下した(図4B)。脾臓マクロファージを枯渇させたマウスでは、GTS-21はAKI後の肺障害を軽減させなかった(図4D-4F)。



5) 肺胞マクロファージを枯渇させたマウスではGTS-21はAKI後の肺障害を軽減した。

図 5

クロドロネート気管内投与によって脾臓マクロファージ数は変えずに肺胞マクロファージ数を60%程度にまで減少させた(図5B, 5C)。肺胞マクロファージを枯渇させたマウスでは、GTS-21はAKI後の肺障害を軽減した(図5D-5F)。



以上より、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストは脾臓のマクロファージを介して血漿IL-6を抑制して腎IRI誘発AKI後の急性肺障害を軽減した。本研究の結果より、急性腎障害に伴う肺障害を軽減するには脾臓におけるコリン作動性抗炎症経路が重要であることがわかり、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストによる急性腎障害患者の多臓器障害への進展抑制効果が期待される。

研究成果を發表した論文

Goto D, Nagata S, Naito Y, Isobe S, Iwakura T, Fujikura T, Ohashi N, Kato A, Miyajima H, Sugimoto K *et al*. **Nicotinic acetylcholine receptor agonist reduces acute lung injury after renal ischemia-reperfusion injury by acting on splenic macrophages in mice.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2022, **322**(5):F540-F552.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Daiki Goto, Soichiro Nagata, Yoshitaka Naito, Shinsuke Isobe, Takamasa Iwakura, Tomoyuki Fujikura, Naro Ohashi, Akihiko Kato, Hiroaki Miyajima, Ken Sugimoto, Hideo Yasuda	4. 巻 322
2. 論文標題 Nicotinic acetylcholine receptor agonist reduces acute lung injury after renal ischemia-reperfusion injury by acting on splenic macrophages in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol	6. 最初と最後の頁 F540-F 552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00334.2021	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 大樹、安田 日出夫
2. 発表標題 急性腎障害に続発する急性肺障害に対するアセチルコリン受容体アゴニストの保護効果の検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0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
研究協力者	後藤 大樹 (Goto, Daiki)	浜松医科大学・内科学第一講座・大学院生 (13802)	

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
---------	---------