

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17242

研究課題名（和文）自律神経による直接的な腎臓制御のメカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of direct renal control by the autonomic nervous system

研究代表者

井上 剛（Inoue, Tsuyoshi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・教授

研究者番号：30821665

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：シスプラチンによる腎障害後においても迷走神経刺激を行うことで腎障害が軽減することを明らかにし、神経刺激によって腎臓へ流入するマクロファージが抑制されることを見出した。抗炎症・腎臓保護効果発揮にはマクロファージに存在する 7アセチルコリン受容体が重要な役割を果たすことをノックアウトマウスを用いて明らかにした。また、交感神経を刺激することによっても腎臓が保護されることを見出した。交感神経刺激はマクロファージ上の 2アドレナリン受容体を介してTim3の発現を誘導し、近位尿細管保護へと繋がることを見出した。さらに、尿細管細胞が 2アドレナリン受容体刺激によって直接的に保護されることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの方が腎臓病を患う一方、腎臓病の根本的な治療法はいまだに存在せず、新たな治療法の開発は喫緊の課題である。本研究によって、障害後においても迷走神経刺激が腎臓保護・治療効果を発揮するメカニズムや、交感神経刺激によるマクロファージを介した腎保護メカニズムなど、神経系を介した新規の腎臓保護作用メカニズムの一端を解明することができた。今後さらに研究を進めることで、腎臓病の新規の治療法開発につなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：We found that vagus nerve stimulation alleviated renal injury after cisplatin-induced kidney injury, and that nerve stimulation suppressed macrophage influx into the kidney. Using knockout mice, we found that the 7 acetylcholine receptor on macrophages plays an important role in exerting anti-inflammatory and renal protective effects. We also found that sympathetic nerve stimulation also protects the kidneys. We found that sympathetic nerve stimulation induces Tim3 expression via 2 adrenergic receptors on macrophages, leading to proximal tubular protection. Furthermore, we found that tubular cells are directly protected by 2-adrenoceptor stimulation.

研究分野：腎臓学

キーワード：腎臓 自律神経

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害は重篤な場合は致死的であり、慢性腎臓病や末期腎不全へ移行し得るという点でも非常に重要な疾患である。また、世界的にその発症頻度が上昇しているものの、対症療法以外に有効な予防法および治療法はこれまで開発されておらず、新規の治療法が熱望されている。我々はこれまでに、本研究に繋がるさまざまな神経系-免疫系を介した腎臓保護作用に関する成果を発表してきた (Inoue et al. *J Clin Invest.* 2016, Abe, Inoue et al. *Nat Neurosci* 2017, Inoue, et al. *Kidney Int* 2019)。本研究は、関連領域における最新の研究状況を踏まえた上で、我々の研究成果および予備実験で得られた結果 (アセチルコリン受容体刺激による尿細管細胞の直接的な保護作用など) に着想を得て立案し、これまでにあまり注目されてこなかった脳腎連関に着目し本研究を提案した。

2. 研究の目的

腎臓の交感神経に関しては、これまでに交感神経切除による腎臓保護効果が示されている (*J Am Soc Nephrol* 24: 229-242, 2013, *Kidney Int* 87, 350-358, 2015) 一方、 $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニストによる腎保護効果 (*J Am Soc Nephrol* 25: 1157-1162, 2014) やポドサイト保護効果 (*Kidney Int* 96, 656-673, 2019) も示されており、自律神経の腎臓への関与は非常に複雑であることが想定される。また、マクロファージにおける $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体および $\beta 2$ アドレナリン受容体の機能については、生体内において評価されていない。そこで、本研究では、マクロファージ特異的神経伝達物質受容体ノックアウトマウスを用い、自律神経-マクロファージの関連を評価した。脳腎連関に関しては、尿細管細胞を用いて自律神経による直接的な尿細管細胞への影響に焦点をあて研究を推進する。

3. 研究の方法

動物実験では 7-10 週齢の雄野生型マウス (C57BL/6J) を使用した。遺伝子改変動物の作製には、LysMCre マウスおよび $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7$ nAChR) flox マウスおよび $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2$ AR) flox マウスを使用した。急性腎障害モデルとして両側虚血再灌流障害 (26 分間虚血、直腸温 35.0 ± 0.5 °C) を用いた。敗血症モデルとして LPS $5 \mu\text{g/g}$ 腹腔内投与を行った。シスプラチン腎症モデルではシスプラチン投与 (25 mg/kg を腹腔内投与) した翌日迷走神経刺激を施行し、シスプラチン投与 3 日目に腎機能および腎障害の程度を評価した。

腎臓の障害は、血漿クレアチン・尿素窒素 (BUN)、腎臓組織 (PAS 染色など)、腎臓での障害マーカーの発現レベル (Kim-1・Ngal など) などを用いて評価した。迷走神経刺激は、これまでに行ってきた手法と同様の手法 (左頸部の迷走神経の電気刺激: 5Hz、 $50 \mu\text{A}$ 、10 分間) を用いて行った。

細胞実験にはマウスマクロファージ細胞株である RAW247、ヒト単球系細胞株である U-937 およびヒト近位尿細管細胞の細胞株である HK-2 を使用した。アセチルコリン受容体刺激薬として $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体刺激薬である GTS-21 を、アドレナリン受容体刺激薬として $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニストであるサルブタモールを使用した。炎症の評価には TNF (ELISA) およびリアルタイム PCR での炎症性サイトカインなどの発現レベルの評価を行なった。遺伝子網羅的解析には RNA-seq を使用した。1 細胞遺伝子網羅的解析は、10X Chromium Controller を使用し施行した。

統計解析は 2 群では unpaired T 検定、3 群以上では ANOVA を使用した。

4. 研究成果

本研究によって、シスプラチン腎症モデルを用いて、腎障害後においても迷走神経刺激を行うことで腎障害が軽減することを明らかにし、迷走神経刺激は腎障害が生じた後でも効果を示し、治療に使用できる可能性を示唆する結果を得ることができた。迷走神経刺激による腎保護効果メカニズムを調べるために、シスプラチン投与および迷走神経刺激を行なったのち、血漿を採取し、23 種類のサイトカインに関してマルチプレックス解析を行った。9 種類のサイトカインがシ

スプラチン投与によって上昇し、そのうち4種類は迷走神経刺激によって優位に減少した。この中には、免疫細胞の走化性に関連する CCL2 や CCL11 などのケモカインが含まれていた。

実際、フローサイトメーターを用いて、腎臓内に存在する免疫細胞数を評価したところ、スプラチンによって誘導される腎臓への免疫細胞の浸潤の中で、迷走神経刺激によってマクロファージを中心とした免疫細胞の浸潤が抑制されることを見出した。また、免疫染色によっても F4/80 陽性細胞の腎臓への浸潤が迷走神経刺激によって減少していることも確認し、成果を論文として報告した (Sci Rep, 10(1):9472, 2020)。

さらに、マクロファージ特異的 $\alpha 7$ アセチルコリン受容体ノックアウトマウス (LysMCre: $\alpha 7$ ChRflox/flox) を作製し、迷走神経刺激におけるマクロファージ上の $\alpha 7$ アセチルコリン受容体の機能解明を行った。LPS 敗血症モデルにおいて、 $\alpha 7$ アセチルコリン受容体アゴニスト (GTS-21) による効果が LPS 投与 4 時間後ではマクロファージ上の $\alpha 7$ アセチルコリン受容体依存的であるものの、LPS 投与 24 時間後では GTS-21 による抗炎症効果がマクロファージ上の $\alpha 7$ アセチルコリン受容体に依存しないことを見出した。LPS および GTS-21 投与 4 時間後の脾臓を用いたシングルセル RNA-seq を施行し、リガンド受容体解析を行なった。解析の結果、LPS による炎症惹起状態において、GTS-21 がマクロファージ同士の相互作用を増加させることを明らかにした。また、*in vitro* の実験において、GTS-21 がマクロファージの遊走を促進させ、マクロファージ同士の接触を増加させること、ヒトおよびマウスのマクロファージの共培養実験によって、マクロファージ同士の接触が抗炎症効果を発揮することを見出した。さらに、マクロファージ同士の接触が多い脾臓を前もって摘出することにより、GTS-21 による抗炎症効果が消失することも見出した。以上により、アセチルコリン刺激を受け取ったマクロファージが、刺激を受け取っていないマクロファージに影響を及ぼすことにより、アセチルコリン受容体刺激を受け取ったマクロファージが抗炎症・腎臓保護効果を発揮することを明らかにした。

一方、交感神経刺激に関しては、LPS 敗血症モデルおよびマクロファージ (RAW 細胞など) において $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニスト (サルブタモール) が炎症を抑制する効果を認めること、生体内において脾臓を前もって摘出することによりサルブタモールによる抗炎症効果が消失することを見出した。以上のことから、交感神経刺激による抗炎症効果発揮には、マクロファージが重要である可能性が考えられた。そこで、マクロファージ特異的 $\beta 2$ アドレナリン受容体ノックアウトマウス (LysMCre: $\beta 2$ ARflox/flox) を作製し、交感神経刺激による腎保護効果におけるマクロファージの役割について評価を行なった。その結果、野生型マウスでは、交感神経刺激をすることにより (サルブタモール投与によって) 腎障害が軽減するものの、マクロファージ特異的 $\beta 2$ アドレナリン受容体ノックアウトマウスではその腎保護効果が減弱することが明らかとなった。また、交感神経刺激 (サルブタモール刺激) したマクロファージ (脾臓より MACS を用いて単離) を移入することによって、レシピエントマウスにおいて腎保護効果が発揮されることも見出した。これらの結果より、交感神経刺激による腎保護効果発揮には、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を介して刺激されたマクロファージが重要であることが明らかとなった。

そこで、交感神経刺激したマクロファージがどのようにして腎保護効果を発揮しているかを調べるために、同条件下 (サルブタモール刺激したマクロファージを移入し、翌日にレシピエントマウスに腎虚血再灌流障害を施行) において腎臓を単離したのち、シングルセル化を行い、1 細胞遺伝子発現網羅的解析 (シングルセル RNA-seq) を行なった。各細胞の遺伝子発現パターンから腎臓におけるさまざまな細胞を区別することが可能となり、その中で交感神経刺激したマクロファージを移入した群において、マクロファージにおける Tim3 遺伝子の発現上昇および近位尿細管における Kim1 (尿細管障害マーカー) の発現低下を認めた。さらに、Tim3 の発現は循環マクロファージにおいて上昇が認めることが明らかとなり、交感神経刺激によって Tim3 を発現したマクロファージが腎臓へと流入し、これらの細胞が直接的に近位尿細管を保護していることを見出すことができた。以上の成果を論文として報告した (J Am Soc Nephrol, 32 (7) 1599-1615, 2021)。また、ヒト尿細管細胞を用いて、尿細管細胞が $\beta 2$ アドレナリン受容体刺激によって直接的に保護されることも明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tanaka Shinji, Abe Chikara, Abbott Stephen B. G., Zheng Shuqiu, Yamaoka Yusuke, Lipsey Jonathan E., Skrypnik Nataliya I., Yao Junlan, Inoue Tsuyoshi, Nash William T., Stornetta Daniel S., Rosin Diane L., Stornetta Ruth L., Guyenet Patrice G., Okusa Mark D.	4. 巻 118
2. 論文標題 Vagus nerve stimulation activates two distinct neuroimmune circuits converging in the spleen to protect mice from kidney injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2021758118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2021758118	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 該当する
1. 著者名 Fujii Rie, Hasegawa Sho, Maekawa Hiroshi, Inoue Tsuyoshi, Yoshioka Kentaro, Uni Rie, Ikeda Yoichiro, Nangaku Masaomi, Inagi Reiko	4. 巻 321
2. 論文標題 Decreased IFT88 expression with primary cilia shortening causes mitochondrial dysfunction in cisplatin-induced tubular injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F278 ~ F292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00673.2020	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 Inoue Tsuyoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Neuroimmune system-mediated renal protection mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 915 ~ 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02062-3	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 Wu Chia-Hsien, Inoue Tsuyoshi, Nakamura Yasuna, Uni Rie, Hasegawa Sho, Maekawa Hiroshi, Sugahara Mai, Wada Youichiro, Tanaka Tetsuhiro, Nangaku Masaomi, Inagi Reiko	4. 巻 590
2. 論文標題 Activation of 7 nicotinic acetylcholine receptors attenuates monocyte endothelial adhesion through FUT7 inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 89 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.094	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 Yoshioka Kentaro, Hirakawa Yosuke, Kurano Makoto, Ube Yuko, Ono Yoko, Kojima Kensuke, Iwama Taiga, Kano Kuniyuki, Hasegawa Sho, Inoue Tsuyoshi, Shimada Takashi, Aoki Junken, Yatomi Yutaka, Nangaku Masaomi, Inagi Reiko	4. 巻 101
2. 論文標題 Lysophosphatidylcholine mediates fast decline in kidney function in diabetic kidney disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 510 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2021.10.039	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 1.Higashijima Y, Matsui Y, Shimamura T, Nakaki R, Nagai N, Tsutsumi S, Abe Y, Link VM, Osaka M, Yoshida M, Watanabe R, Tanaka T, Taguchi A, Miura M, Ruan X, Li G, Inoue T, Nangaku M, Kimura H, Furukawa T, Aburatani H, Wada Y, Ruan Y, Glass CK, Kanki Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Coordinated demethylation of H3K9 and H3K27 is required for rapid inflammatory responses of endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e103949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019103949	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

1. 著者名 Uni Rie, Inoue Tsuyoshi, Nakamura Yasuna, Fukaya Daichi, Hasegawa Sho, Wu Chia-Hsien, Fujii Rie, Surattichaiyakul Bongkod, Peerapanyasut Wachirasek, Ozeki Atsuko, Akimitsu Nobuyoshi, Wada Youichiro, Nangaku Masaomi, Inagi Reiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Vagus nerve stimulation even after injury ameliorates cisplatin-induced nephropathy via reducing macrophage infiltration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66295-0	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 Tanaka Shinji, Abe Chikara, Abbott Stephen B. G., Zheng Shuqiu, Yamaoka Yusuke, Lipsey Jonathan E., Skrypnik Nataliya I., Yao Junlan, Inoue Tsuyoshi, Nash William T., Stornetta Daniel S., Rosin Diane L., Stornetta Ruth L., Guyenet Patrice G., Okusa Mark D.	4. 巻 118
2. 論文標題 Vagus nerve stimulation activates two distinct neuroimmune circuits converging in the spleen to protect mice from kidney injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2021758118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2021758118	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10件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 自律神経-免疫系を介した抗炎症メカニズム(Anti-inflammatory mechanism through autonomic-immune system)
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 Role of macrophages in the protective effect of the kidney through the autonomic nervous system
3. 学会等名 ERA-EDTA-JSN joint symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 脳腎連関を介した腎疾患進展抑制メカニズム
3. 学会等名 第51回日本腎臓学会西部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 バージニア大学腎臓内科学
3. 学会等名 第44回日本分子生物学学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 自律神経 - 免疫系を介した抗炎症・臓器保護メカニズム
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 自律神経制御による腎不全予防戦略
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 Elucidation of anti-inflammatory and kidney protection mechanisms through nervous-immune systems using single cell RNA-seq
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 Neuro-immune systems-mediated renal protection mechanism
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 自律神経系による炎症制御におけるマクロファージの役割
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 自律神経 - 免疫系を介した抗炎症メカニズム (Anti-inflammatory mechanism through autonomic-immune system)
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会 合同大会（招待講演）
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

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		
米国	バージニア大学		