

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08222

研究課題名(和文)炎症性腎疾患における好中球核酸結合蛋白シグナル

研究課題名(英文)Neutrophil RNA-binding proteins 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・准教授

研究者番号：90784174

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)：炎症性腎疾患の急性期・活動期に暴走する骨髄系細胞のうち特に好中球が果たす病態への寄与及び治療可能性を探求することを目的とした。外来微生物のオプソニイズ化や免疫複合体を想定したIgGによって、複数のRNAセンサー兼リン酸化酵素が活性化(自己リン酸化)されることがわかった。これらリン酸化酵素の活性化は最終的に、好中球がもつ細胞生物学特性、すなわち、呼吸性バーストや脱顆粒、細胞外DNAトラップ、血管内皮接着、血管外遊走の各作用に影響することが分かった。これらは外来微生物はもちろん、自己組織に対しても攻撃的な側面をもち、特に免疫複合体を起点とする自己免疫疾患の分子基盤を説明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症刺激によって好中球内のRNAセンサー兼リン酸化酵素が活性化(自己リン酸化)されることがわかった。また、その下流に既報で知られるリン酸化カスケードが存在を確認したほか、リン酸化アレイにより新規のリン酸化酵素を従えることも明らかにした。これらは自己組織に対して攻撃的な細胞活性化に寄与することから、免疫複合体を起点とする自己免疫疾患の創薬標的ともなりえる。

研究成果の概要(英文)：During the acute and active phases of inflammatory kidney disease, multiple RNA sensors and kinases were activated (autophosphorylation) by opsonization of foreign microorganisms and IgG, which is assumed to be an immune complex. Activation of these kinases ultimately contributes to the cell biological properties of neutrophils, such as respiratory burst, degranulation, extracellular DNA trapping, and transmigration. These have aggressive aspects not only against foreign microorganisms but also against self-tissues, which may explain the molecular basis of autoimmune diseases that originate from immune complexes.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：好中球 腎 白血球 炎症 腎臓 血管生物学

1. 研究開始当初の背景

腎代替療法が必要となる患者の過半数が糖尿病・高血圧が占めるようになった今日でも、依然として、現行治療では難治な炎症性腎疾患のために一定割合の患者が腎不全に陥っている。ヒト循環血白血球の最大分画である好中球は細菌・真菌等の感染防御で重要な役割を果たすのみならず、腎臓を始めとする固形臓器における非感染性炎症性疾患においても病態形成に寄与している。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: Cell 2016) や好中球細胞外トラップ neutrophil extracellular traps (NETS) の関与 (Lood: 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。申請者は炎症初期・重度炎症で役割を果たす好中球に焦点を当て、細胞内分子シグナルや腎外因子による制御メカニズムを研究しており、本研究もその延長線上にある。

2. 研究の目的

申請者は約 9000 種類のライブラリー化合物を用いた小分子 high throughput screen (HTS) を行い、好中球の異常活性化を制御できる低分子化合物及び標的分子を同定してきた。例えば、血管炎症の初期において好中球が最初に血管内皮と出会う tethering ステップで、Abl キナーゼと細胞骨格が生体物理学的に連動する (Nishi: J Clin Invest 2017)。この HTS 結果からは未知の媒介分子がまだ多く存差異なる可能性が示唆されており、創薬可能性に期待し免疫学的腎炎での意義を解析する。一連の研究で興味深いのは、一部のキナーゼは微生物感染時にウイルス由来 dsRNA に誘導されると古典的に理解されている点である。しかし近年では、外来 RNA に加えて自己 RNA による RNA 結合蛋白を介したリン酸化経路、すなわち炎症・ストレス応答としてゲノムやミトコンドリアに由来する細胞内 RNA ネットワークの変化が注目されている (Nakamura: Cell Rep 2015; Kim: Mol Cell 2018)。この変化を認識する RNA 結合蛋白は、プロテオーム及び in silico の解析により哺乳動物では約 1500 個と、転写因子とほぼ同数だけ存在する (Gerstberger: Nat Rev Genet 2015)。そこで申請者は、炎症性腎疾患の初期変化としても、好中球内の RNA ネットワークの変化をリン酸化経路が感知し、炎症性シグナルを伝達するという仮説を立てた。

3. 研究の方法

好中球としては、培養好中球細胞、ヒト末梢血好中球、マウスコツ図好中球を、目的に応じて使い分けた。蛋白発現はウェスタン・プロットを中心に行った。好中球の機能解析としては、流体環境における血管内皮ローリング・接着はフローチャンバー、遊走はボイデン・チャンバーを用いた。また、好中球の表面分子発現の定量評価にはフローサイトメトリーを用いた。また、培養好中球細胞内の遺伝子改変目的にレンチウイルスベクターを用いた。動物モデルとしては、背側エアパウチモデルで流入好中球カウント、急性の腎毒性血清腎炎 (免疫学的腎炎) モデルでアルブミン尿を定量した。

4. 研究成果

(1) 好中球とキナーゼ

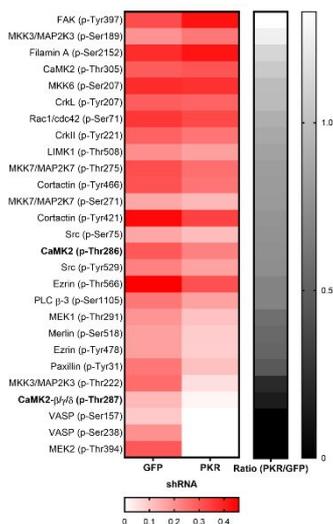
好中球は細菌や真菌の感染から自己を守るが、その過剰な活性化は自己組織損傷を招きかねず、血管炎や糸球体腎炎などの活動期・急性期の中心的な病態と考察されている。我々が以前から注目してきた核酸結合蛋白であるプロテインキナーゼ R (PKR) については好中球において、内皮細胞上での好中球ローリングには影響しないが内皮細胞への好中球接着や白血球遊走因子に反応した好中球遊走で必要であることをつぎのように明らかにした。

(2) 好中球 PKR と血管炎症

プロテインキナーゼ R (PKR) はマクロファージや樹状細胞においてウイルス核酸を感知して感染防御機構、特に eIF2 を介したインターフェロン産生を誘導するキナーゼである。一方、近年では中枢神経細胞の PKR が神経変性疾患における創薬標的意義としても注目されつつある。今回我々は、免疫学的腎炎の治療介入機転としての可能性を探る目的で、解析が進んでいない好中球における PKR 作用に注目した。血管生物学的見地からマイクロ流体フローチャンバーや古典的 Boyden チャンバーを用いてヒト好中球の PKR 機能解析を行った結果、好中球 PKR は内皮細胞上での好中球ローリングには影響しないが内皮細胞への好中球接着や白血球遊走因子に反応した好中球遊走で必要であった。また、静止状態では、好中球 PKR が細胞接着に伴う細胞進展と ICAM-1 への結合を媒介していた。

(3) 好中球 CaMKII と血管炎症

さらに、遺伝学的 PKR 発現抑制好中球を用いてリン酸化抗体マイクロアレイ (図) を実施したところ、アクチン関連分子の一つであるカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) が活性型 PKR によってリン酸化され、白血球遊走化因子に誘導されるアクチン重合も仲介することがわかった。さらに、マウス実験学的腎炎における腎系球体における好中球集積と急性期アルブミン尿は、薬理的な PKR 阻害によって減少した。このように、好中球 PKR は、微生物感染と関係しない血管炎症において、好中球内のアクチン重合を介した血管内皮接着や血管外遊走などの急性期炎症に重要な役割を担っていることが明らかになった。



(4) 好中球キナーゼ：今後の展開

さらに、近年自然免疫 cGAS/STING 系や細胞内核酸検知経路として注目される別のキナーゼたんぱく質についても、好中球がそもそももつ細胞生物学的な特性、すなわち、呼吸性バーストや脱顆粒、細胞外 DNA トラップ、血管内皮接着、血管外遊走の各作用に与える影響を検討した。これまでの解析から Rho ファミリー低分子量 G タンパク質をはじめとする細胞骨格関連タンパク質を下流シグナルに従えていることが明らかとなった。また、マウス実験学的腎炎モデルの腎系球体における急性期アルブミン尿を、薬理的な阻害によって減少させられることも判明した。

(主な参考文献)

Inoue R, Nishi H, Osaka M, Yoshida M, Nangaku M. Neutrophil Protein Kinase R Mediates Endothelial Adhesion and Migration by the Promotion of Neutrophil Actin Polymerization. *J Immunol.* 2022 May 1;208(9):2173-2183.

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Inoue T, Nakamura Y, Tanaka S, Kohro T, Li LX, Huang L, Yao J, Kawamura S, Inoue R, Nishi H, Fukaya D, Uni R, Hasegawa S, Inagi R, Umene R, Wu CH, Ye H, Bajwa A, Rosin DL, Ishihara K, Nangaku M, Wada Y, Okusa MD | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Bone marrow stromal cell antigen-1 (CD157) regulated by sphingosine kinase 2 mediates kidney fibrosis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Medicine | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.993698 | 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 Yoko Yoshida, Hiroshi Nishi | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 The role of the complement system in kidney glomerular capillary thrombosis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.981375 | 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 Suguru Saito, Narihito Tatsumoto, Duo-Yao Cao, Nobuyuki Nosaka, Hiroshi Nishi, Daniel N Leal, Ellen Bernstein, Kenichi Shimada, Moshe Arditi, Kenneth E Bernstein, Michifumi Yamashita | 4. 巻 323 |
| 2. 論文標題 Overexpressed angiotensin-converting enzyme in neutrophils suppresses glomerular damage in crescentic glomerulonephritis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology | 6. 最初と最後の頁 F411 ~ F424 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00067.2022 | 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 Reiko Inoue, Hiroshi Nishi, Mizuko Osaka, Masayuki Yoshida, Masaomi Nangaku | 4. 巻 208 |
| 2. 論文標題 Neutrophil protein kinase R mediates endothelial adhesion and migration by the promotion of neutrophil actin polymerization | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Immunology | 6. 最初と最後の頁 2173-2183 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2001349 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Hiroshi Nishi | 4. 巻 101 |
| 2. 論文標題 Lay A TRAP for myeloid cell response in diabetic kidney disease | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Kidney International | 6. 最初と最後の頁 872-874 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2022.02.001 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Takaaki Higashihara, Motoki Odawara, Hiroshi Nishi, Takehito Sugasawa, Yumika Suzuki, Satoshi Kametaka, Reiko Inagi, Masaomi Nangaku | 4. 巻 194 |
| 2. 論文標題 Uremia impedes skeletal myocyte myomixer expression and fusogenic activity: implication for uremic sarcopenia | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 The American Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 759-771 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2024.01.005. | 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 - |

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Yasuhiro Oda, Hiroshi Nishi, Masaomi Nangaku | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Role of inflammation in progression of chronic kidney disease in type 2 diabetes mellitus: clinical implications | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Seminars in Nephrology | 6. 最初と最後の頁 151431-151431 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semnephrol.2023.151431 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hiroshi Nishi | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Aptamer-based proteomic platform for human immune-mediated kidney diseases | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Kidney International Reports | 6. 最初と最後の頁 1450-1452 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2022.05.010 | 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 - |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 井上玲子, 西裕志, 南学正臣 |
| 2. 発表標題 好中球CaMKIIは接着・遊走の制御を介して腎臓炎症に関与する |
| 3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 東原崇明, 西裕志, 亀高諭, 南学正臣 |
| 2. 発表標題 腎不全環境はMyomixer発現低下と共に骨格筋細胞融合を抑制するが, 抗酸化剤アスコルビン酸投与が有効である |
| 3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西裕志, 井上玲子, 南学正臣 |
| 2. 発表標題 特定健診結果にみる人工透析・慢性腎不全の病識の地域別の差異 |
| 3. 学会等名 日本透析医学会学術集会・総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koji Takemura, Hiroshi Nishi, Takaaki Higashihara, Masaomi Nangaku |
| 2. 発表標題 Pharmacological hif prolyl hydroxylase inhibition improves exercise endurance capacity in CKD mice |
| 3. 学会等名 European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takaaki Higashihara, Hiroshi Nishi, Koji Takemura, Masaomi Nangaku |
| 2. 発表標題 Uremic milieu exacerbates muscle regeneration after the muscular injury in mice |
| 3. 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西裕志, 水野秀哉, 富士野健人, ロエインノセンティオ, 石出崇, 神保泰彦, 南学正臣, 小谷潔 |
| 2. 発表標題 モーションキャプチャ技術を利用した腎エコー描出補助システムの開発 |
| 3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 竹村浩至, 西裕志, 東原崇明, 吉田瑤子, 南学正臣 |
| 2. 発表標題 薬理的HIF-PH阻害はCKDマウスにおいて運動耐容能を改善する |
| 3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小田康弘, 西裕志, 松浦亮, 阿部浩幸, 金子順一, 赤松延久, 牛久哲男, 長谷川潔, 南学正臣 |
| 2. 発表標題 肝移植後の腎機能障害における腎生検組織像と腎予後 |
| 3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 吉田瑠子, 西裕志, 稲城玲子, 南学正臣 |
| 2. 発表標題 免疫学的腎炎モデルにおける血栓制御機構の関わり |
| 3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 東原崇明, 西裕志, 竹村浩至, 南学正臣 |
| 2. 発表標題 腎不全環境で尿毒素がマウス骨格筋の再生・分化に与える影響解析 |
| 3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 東原崇明, 西裕志, 亀高諭, 南学正臣 |
| 2. 発表標題 尿毒素インドキシル硫酸が及ぼす骨格筋筋芽細胞融合抑制には, 抗酸化剤アスコルビン酸が有効である |
| 3. 学会等名 日本腎臓リハビリテーション学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計9件

| | |
|--------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 権杞映, 西裕志, 南学正臣 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 東京医学社 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 腎と透析 | |

| | |
|------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 西裕志, 南学正臣 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 全日本病院出版会 | 5. 総ページ数 8 |
| 3. 書名 Monthly Book ENTONI | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 西裕志, 南学正臣: 慢性腎臓病. 日本臨床別冊 腎臓症候群 (第3版) I, 日本臨床社, 22, 10-14, 2022. | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 日本臨床社 | 5. 総ページ数 5 |
| 3. 書名 日本臨床別冊 腎臓症候群 (第3版) I | |

| | |
|---------------------|-----------------|
| 1. 著者名 西裕志, 南学正臣 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 日本医事新報社 | 5. 総ページ数 2 |
| 3. 書名 私の治療 | |

| | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 川村万里子, 西裕志 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 文光堂 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 Medical Practice | |

| | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 東原崇明, 西裕志, 南学正臣 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 学樹書院 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 臨床医のための循環器診療 | |

| | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 小田康弘, 西裕志, 南学正臣 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 日本臨床社 | 5. 総ページ数 3 |
| 3. 書名 慢性腎臓病-臨床の最新動向- | |

| | |
|--------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 西裕志, 南学正臣 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 中外医学社 | 5. 総ページ数 5 |
| 3. 書名 腎臓内科Controversy | |

| | |
|----------------|-----------------|
| 1. 著者名 西裕志 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 朝倉書店 | 5. 総ページ数 2 |
| 3. 書名 内科学 | |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|