

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20874

研究課題名(和文) アセチルコリン受容体を介した腎機能障害改善メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of acetylcholine receptor-mediated kidney injury

研究代表者

中村 恭菜 (Nakamura, Yasuna)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：60908523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究にて、申請者は急性腎障害に対するアセチルコリン受容体刺激の臓器保護作用について検証した。迷走神経刺激、コリン作動性抗炎症経路による腎臓保護効果に着目し、マクロファージ特異的 7ニコチン性アセチルコリン受容体ノックアウトマウスを用いて生体内における 7ニコチン性アセチルコリン受容体陽性マクロファージが不可欠であることを実証した。さらに、シングルセルRNA-seqによる網羅的解析を行い、アセチルコリン刺激はマクロファージ-マクロファージ相互作用を誘導し抗炎症・臓器保護効果をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腎障害は、様々な原因により発症し生命予後に関わりうる重篤な病態であるにも関わらず、確立した治療法はなくその治療は対症療法にとどまる。関節リウマチや炎症性腸疾患などへの臨床応用が期待されている迷走神経刺激が、急性腎障害を軽減するということが動物モデルでは立証されつつあるものの、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。本研究にて、アセチルコリン刺激の受取手としてのマクロファージの重要性やアセチルコリン刺激がマクロファージ同士の細胞間相互作用が誘導することを見出した。これらは急性腎障害のメカニズム解明や神経系を介した臓器保護作用メカニズムの解明に新たな見解を与えることができたと考える。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the organ-protective effects of acetylcholine receptor stimulation on acute kidney injury (AKI). Focusing on the vagus nerve stimulation and the cholinergic anti-inflammatory pathway, we demonstrated the essential role of 7 nicotinic acetylcholine receptors in the renal protective effects using macrophage-specific 7 nicotinic acetylcholine receptor knockout mice. Furthermore, through comprehensive analysis using single-cell RNA-seq, we revealed that acetylcholine stimulation induces macrophage-macrophage interactions, leading to anti-inflammatory and organ-protective effects.

研究分野：腎臓学

キーワード：急性腎障害 マクロファージ アセチルコリン 自律神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害は、様々な原因により発症し生命予後に関わりうる重篤な病態であるにも関わらず、確立した治療はなくその治療は対症療法にとどまる。そのような背景の中、動物モデルにおいては迷走神経刺激が急性腎障害を軽減させることがわかっている(1,2)。この作用の背景には、神経を介した炎症制御機構であるコリン作動性抗炎症経路(CAP)(3)が関与すると想定されている一方で、腎臓に対してはどのような機序で腎保護効果をもたらされるかは不明な点も多い。申請者は本研究にて、CAPにおいて重要とされるマクロファージやアセチルコリン受容体に着目し、急性腎障害改善のメカニズムを明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

副交感神経(迷走神経)支配が明らかではない腎臓において、アセチルコリン受容体刺激がどのようにして急性腎障害を改善させるかを明らかにすることを目的とした。

CAPにおいては、脾臓内のマクロファージ上に存在するアセチルコリン受容体のサブユニットの一つ 7ニコチン性アセチルコリン受容体(7nAChR)が重要と考えられている。これは、*in vitro*の実験や、全身性の7nAChRノックアウトマウスを用いた実験結果より想定されているものの(4)、この経路には迷走神経や脾臓内のCD4陽性T細胞(アセチルコリン産生細胞)、ノルアドレナリンなど介在する要素が多く存在し、マクロファージに存在する7nAChRが生体内において実際に重要な役割を果たすのかは*in vivo*では実証されていない。CAPによる抗炎症効果や臓器保護作用に関しては様々な疾患で立証されており、特に腸管や肺など迷走神経支配のある臓器では脾臓を介したCAP以外にも、対象臓器にアセチルコリンが直接作用して臓器保護効果をもたらされる経路があることもわかっている(5,6)。また、予備実験において、腎臓の尿細管細胞をアセチルコリン受容体作動薬で刺激すると、腎臓の障害マーカーが減少するという結果を得ており、腎障害からの保護効果に腎臓直接保護の経路が存在する可能性も否定はできない。

3. 研究の方法

1. 生体内における7nAChR陽性マクロファージの腎臓への影響を評価する

*In vivo*での7nAChR陽性マクロファージの影響のみに着目するために、マクロファージ特異的7nAChRノックアウトマウスを作成した(LysMCre:7flox/flox)。このマウスを用いて、lipopolysaccharide(LPS)による敗血症性急性腎障害モデルにおいて腎障害が軽減されるか否かを検証した。野生型(C57BL/6J)マウスとマクロファージ特異的7nAChRノックアウトマウスにLPS(5mg/kg)腹腔内投与15分前に7ニコチン性アセチルコリン受容体特異的作動薬であるGTS-21(20mg/kg)腹腔内投与を行い、4時間後に全身の炎症(血漿TNF- α)、腎機能障害マーカー(Ngal, Kim-1)、腎組織障害(TUNEL染色)を評価した。続いて、脾臓内でアセチルコリン受容体刺激により起こる変化を網羅的に評価するために、脾臓のシングルセルRNA-seqを行った(10x Chromium Controller)。加えて、マウスマクロファージ細胞株であるRAW 264細胞、ヒト単球系細胞株U937を用いて*in vitro*での検証を行った。

2. 腎臓尿細管へのアセチルコリンの直接的な影響を評価する

予備実験にて得られた、腎臓尿細管細胞株がアセチルコリン受容体アゴニスト投与により腎障害マーカー(Ngal)が減少するという結果より、アセチルコリンが尿細管に及ぼす影響を検証した。ヒト尿細管細胞株であるHK2細胞を用い、様々な種類のアセチルコリン受容体siRNAを用いたノックダウン実験を行い、Ngalの変化をRT-PCRで評価した。

4. 研究成果

1. 生体内における7nAChR陽性マクロファージの腎臓への影響を評価する

野生型マウスでは、LPSにより惹起されたTNF- α の上昇や腎障害マーカー、腎組織の細胞死が

GTS-21 の投与により軽減した一方で、マクロファージ特異的 $\alpha 7$ nAChR ノックアウトマウスでは GTS-21 を投与しても炎症・腎障害の軽減は認めなかった。このことより、*in vivo* においてマクロファージ上に存在する $\alpha 7$ nAChR が不可欠であることが立証できた。続いて、GTS-21 が脾臓内の細胞に及ぼす影響を網羅的に解析するために野生型マウスの脾臓のシングルセル RNA-seq を行った。GTS-21 の投与によりマクロファージを含む細胞数などに変化は見られなかった。また、マクロファージやマクロファージ以外の細胞においても GTS-21 の投与による遺伝子発現変化は乏しかった。一方で、リガンド-受容体解析を行ったところ、LPS により炎症が惹起された状態で GTS-21 はマクロファージ同士のリガンド-受容体相互作用を増加させることがわかった。解析結果より、GTS-21 はケモカインや接着因子を増加させマクロファージ-マクロファージ細胞間相互作用を増強させると考えられた。

実際に、*in vitro* にて RAW264 細胞をトランスウェルで非接触下に共培養したところ、GTS-21 の存在下ではマクロファージ遊走が増えることを確認した。さらに、マクロファージ細胞株を共培養し培地中に放出される TNF- α を測定したところ、マクロファージ同士を共培養しただけで、TNF- α の産生が減少した。この結果より、*in vitro* では GTS-21 によるアセチルコリン受容体刺激と同様にマクロファージ同士の接触でもマクロファージ-マクロファージ相互作用が惹起され、抗炎症効果を発揮すると考えられた。実際に *in vivo* にて脾臓の摘出を行うと、GTS-21 による抗炎症効果は消失した。また、CD4 陽性 T 細胞を欠損させたマウスに GTS-21 を投与した場合には、GTS-21 による抗炎症効果が認められた。このことは、生体内においても CD4 陽性 T 細胞からのアセチルコリンの供給に依存せず、マクロファージ上の $\alpha 7$ nAChR を介してマクロファージ-マクロファージ相互作用が惹起され抗炎症効果がもたらされることを裏付ける。これらの結果を、学術論文として報告した (Commun Biol, *in press*)。

2. 腎臓尿管へのアセチルコリンの直接的な影響を評価する

アセチルコリン受容体のうち、ニコチン性受容体($\alpha 5$, $\alpha 7$)についてノックダウン実験を行ったものの、評価に値する結果は得られなかった。一因として、HK2 細胞におけるアセチルコリン受容体 RNA 発現量が低く、RT-PCR を用いた検証は困難と考えられたため、検討を中止した。

<文献>

- (1) J Clin Invest 126:1939-52, 2016.
- (2) Kidney Int, 95(3):563-76, 2019.
- (3) Nature 405:458-462, 2000.
- (4) JMA J 3(3):164-174. 2020.
- (5) Front Neurosci 13:418, 2019.
- (6) Curr Opin Pharmacol 40:18-25, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

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 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 993698
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 -
1. 著者名 Chikara Abe, Chikako Katayama, Murat Bazek, Yasuna Nakamura, Kento Ohbayashi, Kazuhiro Horii, Chisato Fujimoto, Mamoru Tanida, Yusaku Iwasaki, Tsuyoshi Inoue, Fumiaki Nin, Hironobu Morita	4. 巻 111
2. 論文標題 Repeated activation of C1 neurons in medulla oblongata decreases anti-inflammatory effect via the hypofunction of the adrenal gland adrenergic response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 138-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbi.2023.04.003	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 Ryusuke Umene, Yasuna Nakamura, Chia-Hsien Wu, Kumiko Muta, Tomoya Nishino, Tsuyoshi Inoue	4. 巻 665
2. 論文標題 Induction of tetraspanin 13 contributes to the synergistic anti-inflammatory effects of parasympathetic and sympathetic stimulation in macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 187-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.04.118	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村恭菜, 呉家賢, 井上剛, 南学正臣, 稲城玲子
2. 発表標題 アセチルコリン受容体刺激は脾臓のマクロファージ細胞連関を惹起し抗炎症効果を発揮する
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村恭菜, 井上剛
2. 発表標題 アセチルコリン受容体刺激は脾臓のマクロファージ細胞連関を惹起し抗炎症効果を発揮する
3. 学会等名 第73回西日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuna Nakamura, Tsuyoshi Inoue, Reiko Inagi, Masaomi Nangaku
2. 発表標題 Cholinergic Signaling Increases Macrophage-Macrophage Interactions and Protects Sepsis-Induced AKI
3. 学会等名 Kidney Week 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 中村恭菜, 井上剛	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 148
3. 書名 循環器内科 (第90巻第6号)	

1. 著者名 中村恭菜, 井上剛	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 122
3. 書名 腎臓内科 (第16巻第4号)	

1. 著者名 中村恭菜, 井上剛	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本腎臓財団	5. 総ページ数 81
3. 書名 腎臓 (第45巻)	

〔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
---------	---------