

## 論文の内容の要旨

論文題目 Mechanism of anti-inflammation and organ-protective effect via acetylcholine receptor.

(アセチルコリン受容体を介した抗炎症・臓器保護メカニズムの解明)

氏名 中村 恭菜

迷走神経刺激装置は難治性てんかんなどの治療に使用される電気刺激装置である。一方、迷走神経刺激 (vagus nerve stimulation: VNS) が抗炎症経路を活性化し、炎症性疾患に有益であることが動物を用いた実験で明らかとなっており、関節リウマチではヒトでのパイロット試験でもその有効性が示されている。この神経系を介した免疫応答メカニズムはコリン作動性抗炎症経路 (cholinergic anti-inflammatory pathway: CAP) と呼ばれ、近年では炎症性疾患のみならず糖尿病、肥満、高血圧、そして急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) などの疾患への有用性が動物実験で示されている。CAP において、迷走神経求心路が活性化されると、中枢神経、迷走神経遠心路を経てそのシグナルは脾臓へ伝達される。脾臓では、脾神経終末より放出されたノルアドレナリンが、コリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase: ChAT) 陽性 T 細胞に発現する  $\beta 2$  アドレナリン作動性受容体に作用し、その刺激を受けた T 細胞がアセチルコリン (ACh) を放出する。続いて ACh はマクロファージに発現する  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体 ( $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor:  $\alpha 7$ nAChR) に結合し、マクロファージによる炎症誘発性サイトカインの産生を抑制する。これら一連の反応による抗炎症効果は、様々な神経線維、神経伝達物質、そして免疫細胞が関与し、臓器間連関を介しもたらされるとされている。

AKI は急激な腎機能低下により体液の恒常性の破綻を来した状態であり、腎臓そのものの障害のみならず、薬剤、他の疾患の付随や全身状態の悪化により起こる疾患群である。臨床においては特に入院患者に多くみられる一方で、その治療法については原因薬物の回避や保存的加療に留まり、未だ確立された治療法はない。近年の報告で、AKI のモデルの一つである腎臓の虚血再還流障害モデルマウスにおいて、予め VNS による CAP 活性化を行ったマウスでは腎障害が軽減されることが示された。この効果は他の AKI モデルであるシスプラチン腎症モデルやリポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS) による敗血症モデルでも確認されており、AKI に対する治療的効果を持つ可能性を秘めている。しかし、実臨床の場合において AKI 発症をいち早く感知し、予防的に介入する事は多くの場合困難である。

また、先行研究にて、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストであるニコチンにより CAP の活性化を施した  $\alpha 7$ nAChR 陽性マクロファージをレシピエントマウスに移入すると腎保護効果を認めたが、 $\alpha 7$ nAChR ノックアウトマウス ( $\alpha 7$ nAChR<sup>-/-</sup>) より採取したマクロファージをニコチン処置後に移入しても腎保護効果を認めなかったことから、 $\alpha 7$ nAChR は CAP 活性化に重要な役割を果たす因子の一つであると考えられている。よって本研究では、 $\alpha 7$ nAChR を介した反応に着目することとした。受容体特異的な反応を見るために、CAP の活性化には  $\alpha 7$ nAChR の特異的

アゴニストである GTS-21 を使用した。

本研究においては、CAP 活性化の腎障害改善メカニズムの解明のために下記の検証を行った。

1) CAP 活性化の臨床への応用を踏まえ、腎障害発症後においても CAP 活性化は腎障害を軽減するのかどうかを、LPS を用いた敗血症モデルにて検証した。

2) 続いて、その一連の反応に  $\alpha 7nAChR$  がどのように寄与するのか調べるために、マクロファージ特異的  $\alpha 7nAChR$  ノックアウトマウス ( $LysM-Cre : \alpha 7nAChR^{flx/flx}$ ) を作成しその効果を検証した。

3) また、AKI において CAP 活性化が腎臓そのものへの影響を及ぼすかを確認するためにヒト近位尿細管細胞を用いた検証を行った。

一連の実験より、1) LPS モデルにおいて CAP 活性化は腎障害後であっても炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  を減少させた。まず *In vitro* で3つのマクロファージ細胞 (マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 細胞, ヒト単球細胞株 U937 細胞を PMA で処置しマクロファージに分化させた細胞, 野生型; WT マウスから取り出した腹腔マクロファージ) にて LPS 刺激により上昇した TNF- $\alpha$  が GTS-21 により障害前と同様に障害後においても低下することを確認した。続いて *In vivo* では WT マウスにおいて、障害後であっても血漿 TNF- $\alpha$  や腎臓における炎症性サイトカインの上昇を有意に抑制した。さらに腎障害マーカーの軽減, 組織学的変化である尿細管障害を軽減した。これらの抗炎症効果・腎保護効果メカニズムを解明するために、RAW 264.7 細胞を用いて RNA-sequencing による網羅的探索を行い、炎症誘導の前後に共通して GTS-21 が上昇させる6つの因子を同定した。

2) 既存の報告では全身性  $\alpha 7nAChR$  欠損 ( $\alpha 7nAChR^{flx/flx}$ ) マウスでは CAP の活性化による抗炎症・腎保護効果が打ち消されることがわかっている。CAP の活性化には脾臓におけるマクロファージ上の  $\alpha 7nAChR$  が関与するとされているため、 $LysM-Cre : \alpha 7nAChR^{flx/flx}$  マウスにおいても、CAP 活性化の効果が打ち消されると想定されたが、本研究にて有意差を持って証明することは出来なかった。対して、 $\alpha 7nAChR^{-/-}$  マウスから取り出した腹腔マクロファージを用いた *in vitro* の実験では、 $\alpha 7nAChR$  を欠損していても CAP 活性化の効果が見られた。このように *in vivo* と *in vitro* の結果から導き出された矛盾から、マクロファージが CAP 活性化において効果を発揮するためには、マクロファージ以外の細胞における  $\alpha 7nAChR$  を介した反応を起こす可能性や、マクロファージが脾臓内で他の免疫細胞と相互作用し修飾を受ける可能性があると考えた。この新たな仮説を証明するためには脾臓に存在する各々の免疫細胞が CAP 活性化を受けどの様に変化するのかを調べる必要があると考え、脾臓の single-cell RNA-sequencing を行い、現在解析を進めている。

3) LPS 刺激を行った近位尿細管細胞株である HK2 細胞を GTS-21 で処置すると、腎障害マーカーである Ngal が減少することを見出した。また、ACh 合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase : ChAT) を蛍光色素で標識したマウスの腎臓を免疫組織染色で確認したところ、驚くべきことに腎臓内の構造物に ChAT 陽性細胞を見出した。これは、腎臓内において ACh が存在することを示唆する結果であり、ACh 受容体を介した CAP 活性

化が腎臓へも直接効果を及ぼす可能性を秘めている。腎臓への迷走神経支配は未だ確認されていないため、VNS が腎臓に直接作用する可能性は低いと想定していたが、これらの結果はこの概念を覆すものである。免疫組織染色を行い、ChAT 陽性細胞がどの構造に相当するのか神経線維のマーカーやボウマン嚢上皮・傍糸球体装置のマーカーと共染色し構造の同定を試みたが、本研究ではその特定は出来なかった。

以上の一連の研究により、CAP 活性化による腎保護効果は障害後であっても有効であると考えられた。CAP の活性化がどのように腎障害軽減させるのかのメカニズム解明については、今後更に検討する必要がある。