

塩分負荷が脾臓を介して急性腎障害に与える影響の解明

田中 真司¹, 安部 力²

¹ 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科, ² 岐阜大学医学部生理学

概要

急性腎障害は急激な腎機能低下を特徴とする症候群で, 多種多様な臨床場面において生じ得る臓器障害であり, 炎症が病態形成・進展に重要な役割を果たしているが, 薬剤など根本的な治療法はまだまだ存在せず, 新たな治療戦略が求められている。

多臓器連関, 特に神経—免疫連関は, 近年様々な疾患に対する新規治療戦略として非常に注目を集めている。助成研究者らはこれまで, 迷走神経感覚性線維刺激や拘束ストレスが, 延髄にある C1 ニューロンを活性化し, 交感神経→脾神経→脾臓→腎臓という遠心路を介して, 脾細胞のフェノタイプを抗炎症性に変えることにより急性腎障害に対して保護的に働くことを見出してきた。一方, 食塩の過剰摂取や高張食塩水投与により血液中の Na⁺濃度が上昇すると, 脳内の Na⁺濃度センサーである Nax がこれを感知し, 終板脈管器官(OVLT)→視床下部室傍核(PVN)→C1 neurons→交感神経という経路が活性化され, 血圧上昇につながる事が近年報告された。

以上から, 助成研究者は「食塩の過剰摂取や高張食塩水投与による体内 Na⁺濃度の上昇は, 脳内の Nax に感知されることにより, OVLT→PVN→C1 neurons→交感神経→脾神経→脾臓→腎臓という経路を活性化し, 脾細胞のフェノタイプを抗炎症性に変えることにより急性腎障害において保護的に働く」という仮説を立てた。

本研究はこの経路のうち, 脾臓→腎臓の missing link を解明することを目的とした。具体的な方法としては, photoconversion の技術を用い, KikGR (Kikume Green-Red) を全身で発現するマウスの脾細胞をトレースすることとした。365 nm の紫外光を用いて photoconversion の最適化を試みた。脾細胞の変換効率は 83% が達成され, 照射により死細胞の割合は上昇しなかったが, 組織切片を解析したところ, 脾臓表面近くでは強く photoconversion が起こしているものの, 深いところでは photoconversion が十分に起こせていないことが示唆された。深度による photoconversion の効率の違いは脾細胞のトレースに大きな影響を与えてしまうため, 今後はより長波長の光を用いることを検討しており, プロトコルの最適化をさらに進めていく予定である。

1. 研究目的

急性腎障害は急激な腎機能低下を特徴とする症候群で, 多種多様な臨床場面において生じ得る臓器障害であり, 炎症が病態形成・進展に重要な役割を果たしている。入院患者の約 10%, ICU 患者の約半数が合併するとされる急性腎障害が, あらゆる症例の予後を悪化させることは数多くの疫学研究で報告されている。さらに急性腎障害を発症するとその後慢性腎臓病さらには末期腎不全に進

展し得ることも大きな問題である。以上, 急性腎障害は喫緊の臨床課題であるが, 薬剤など特異的な治療法はまだまだ存在せず, 新たな治療戦略が求められている。

近年, 神経系と免疫系の相互作用が炎症性疾患の新たな治療戦略として注目されている。その中でも, 2000 年に初めて報告された迷走神経刺激¹⁾は, コリン作動性抗炎症経路(図 1)を活性化するため抗炎症効果を有し, 炎症性腸疾患や関節リウマチを対象とした小規模臨床試験

でも効果が示され、今後様々な炎症性疾患において臨床応用が期待されている。申請者の留学先(前所属先)であるバージニア大学 Okusa 研究室は、迷走神経刺激の急性腎障害への応用においてパイオニア的存在であり²⁾、申請者は留学中に、迷走神経刺激は古典的なコリン作動性抗炎症経路とは独立して、迷走神経求心性線維→延髄のC1ニューロン→交感神経→脾神経→脾臓(図2)という経路も活性化し、脾細胞のフェノタイプを抗炎症性に変えることにより急性腎障害に対して保護的に働くことを見出した³⁾。しかし、脾細胞がどのように遠隔臓器である腎臓を保護するのかについてはわかっていない(図2)。一方、食塩の過剰摂取や高張食塩水投与により体液(血液・脳脊髄液)中のNa⁺濃度が上昇すると、脳内のNa⁺濃度センサーであるNaxがこれを感知し、終板脈管器官→視床下部室傍核→C1 neurons→交感神経という経路が活性化され、血圧上昇につながるものが近年報告された⁴⁾。

以上から、申請者は「食塩の過剰摂取や高張食塩水投与による体内Na⁺濃度の上昇は、脳内のNaxに感知されることにより、終板脈管器官→視床下部室傍核→C1ニュー

ロン→交感神経→脾神経→脾臓へとシグナルが伝達され、脾細胞のフェノタイプを抗炎症性に変えることにより急性腎障害を軽減する」という仮説を立てた。この仮説を検証するため、昨年度は神経回路にフォーカスした研究をおこなったが、本年度は脾臓→腎臓の missing link を解明することにフォーカスする。

2. 研究方法

申請者は予備実験において、迷走神経刺激後に脾臓重量が約3分の2になるという結果を得たため、高張食塩水を投与するとフェノタイプを抗炎症性に変えた脾細胞が血中へ放出され腎保護に寄与する、という仮説を立てた。本研究ではphotoconversionの技術を用い脾細胞をトレースすることで、この仮説を検証する。脾臓以外の組織(リンパ節など)に存在する免疫細胞と区別できるような脾細胞特異的のマーカが無いため、脾細胞のトレース目的に単純なCre/loxPシステムなどは使用できない。本研究ではまず脾細胞トレース法を確立し、脾臓→腎臓の missing link を解明する。

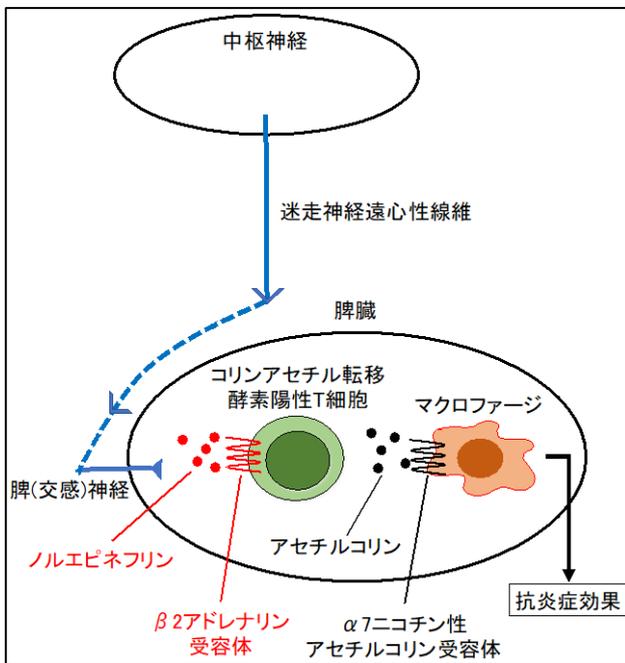


図1 コリン作動性炎症経路

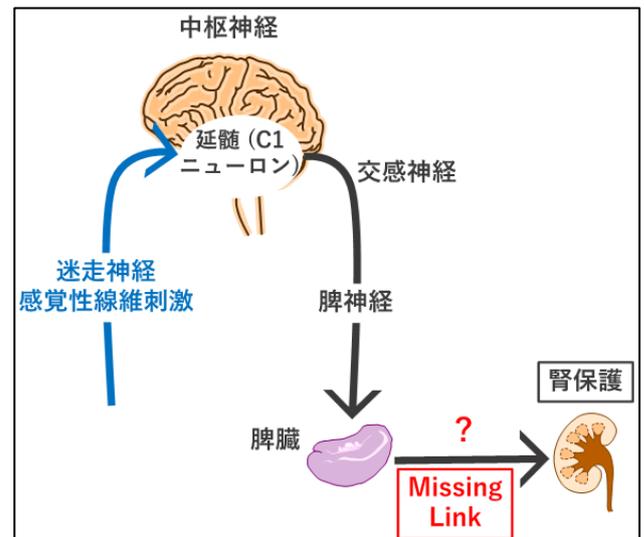


図2 申請者らが明らかにしてきた神経-免疫連関を介した腎保護経路

2. 1 脾細胞トレース法の確立

本邦で開発された KikGR (Kikume Green-Red) を全身で発現するマウス⁵⁾を用いる。KikGR はキクメイシ由来の蛍光タンパク質で、紫(外)光(360 nm – 410 nm)の照射で緑から赤に発する蛍光が変化する。本実験においては、紫(外)光による細胞毒性、変換後の赤蛍光タンパク質の半減期がキーとなるので、まずは紫(外)光照射プロトコルを最適化する。

2. 2 脾細胞による腎保護メカニズムの解明

最適化されたプロトコルを用い、KikGR マウスの脾臓のみに紫(外)光を照射しラベルする。その後高張食塩水投与を行った後、急性腎障害を惹起し、ラベルされた脾細胞の局在(脾臓、循環血液中、腎臓)・内訳を、FACS を用いて検討する。急性腎障害モデルとしては、両側腎虚血再灌流、シスプラチン投与(25 mg/kg) および葉酸投与(250 mg/kg)を用いる。脾細胞の腎浸潤が著明な場合は腎臓構成細胞への直接作用が考えられるが、それ以外の場合は脾細胞から放出される液性因子(抗炎症性サイトカインなど)の関与が考えられるため、血液サンプルの multiplex assay を行い、重要な液性因子を同定する。またいずれの場合でも、ラベルされた脾細胞を FACS でソートし、single cell RNA-seq を用いて遺伝子プロファイルを解析することで分子メカニズムの解明を目指す。さらに、腎保護メカニズムにおいて、二次リンパ組織の中での脾臓の特殊性および脾細胞の血中への放出の重要性を別角度で検証するため、フィンゴリド(脾臓とリンパ節両方からの免疫細胞の移出を抑制) vs. Spns2 阻害薬(リンパ節のみからの免疫細胞の移出を抑制。申請者らが世界で初めて Spns2 阻害薬を報告⁶⁾)の投与が腎保護効果を消失させるかを検討する。本研究で対象としている神経-脾臓を軸とした抗炎症経路は、様々な組織・臓器で保護的に働くことが示されており、本研究で得られる知見は他分野にも大きな影響を与えられとされる。

3. 研究結果

3. 1 高効率の脾細胞ラベリング法の確立

KikGR マウスの生体内で脾細胞にできるだけ効率よく photoconversion を起こすことができるプロトコルの確立に取り組んだ。既報において最も効率が良かったとされた波長 365 nm の紫外光を用いた。温度上昇を起こさない光強度においては、脾細胞の photoconversion はほとんど起こせない

ことが判明した。そこで、サーモグラフィーで脾臓の温度をモニターし、温度が上昇せず一定に保たれるように、生理食塩水を滴下して脾臓を冷却することにより、照射する紫外光の強度を上げることに成功した(図 3)。

次に、紫外光による細胞毒性をできるだけ抑えながら効率をできるだけ上げられるようなプロトコルの最適化を試みた。細胞毒性は照射後の脾細胞の viability (7AAD 陰性) で評価し、photoconversion 効率は光変換された後の蛋白である KikRed 陽性脾細胞の割合によって評価した(いずれも脾臓をシングルセルにし、フローサイトメリーで評価)。連続照射では容易に死細胞数が増加してしまったため、既報を参考にして、照射と照射の間に様々な時間のインターバルを設けることとした。ファイバーの本数、紫外光強度、インターバルの時間、総照射時間、脾臓とファイバーとの距離・角度など、様々に条件をふって検証した結果、7AAD 陽性の死細胞率を増やすことなく(図 4)、約 83%の効率(図 5)で脾細胞の photoconversion を起こす方法を確立した。

最後に、紫外光の到達深度が懸念されたため、組織切片を用いて、位置情報を含んだ photoconversion の状況を確認した。Photoconversion 前(KikGreen, 緑)と後(KikRed, 赤)を区別して認識できる抗体の作成は容易でないため、native fluorescence を観察する方針とした。固定方法を最適化し、紫外光照射後の脾臓切片を観察したところ、脾臓表面で特に強く photoconversion が起こっており、深部では明らかな赤色の蛍光を発する細胞は少なかった(図 6)。



図 3 実際の photoconversion 実験の様子

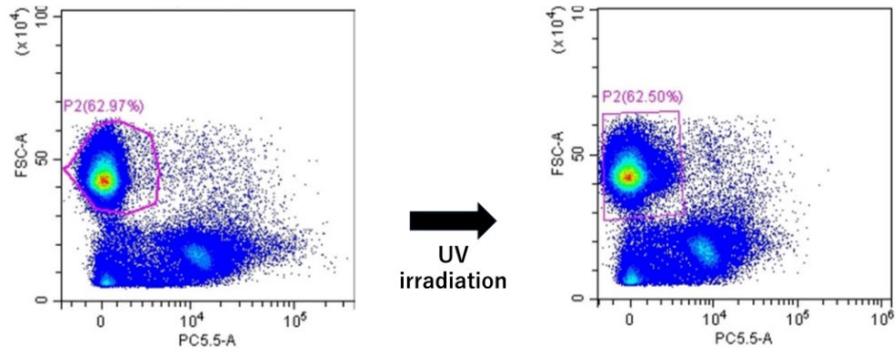


図 4 7ADD 陽性の死細胞の割合の照射前後での比較

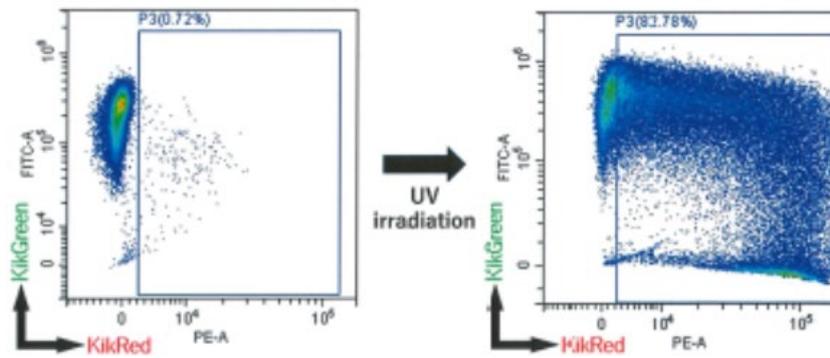


図 5 脾細胞の photoconversion 効率の最適化

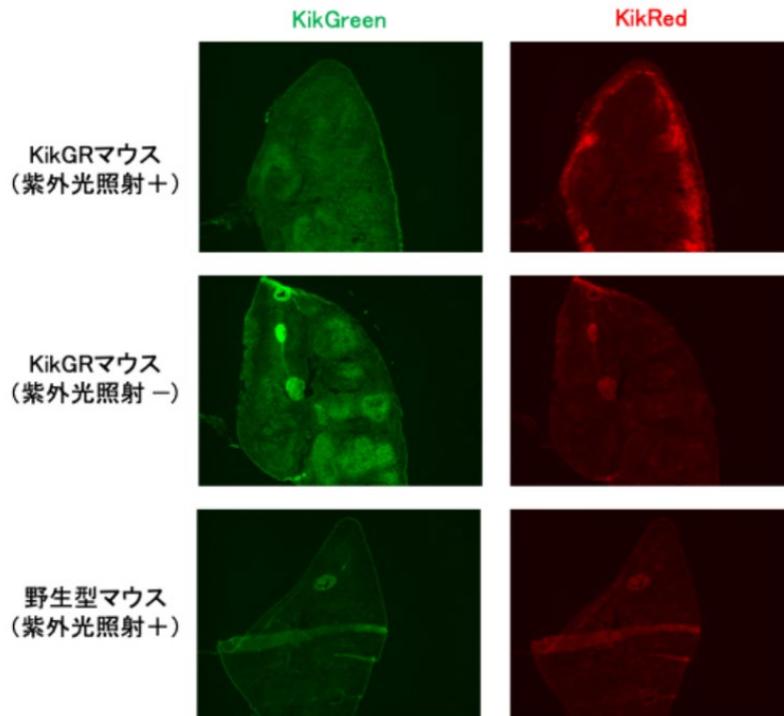


図 6 深度による photoconversion 効率の違い(脾臓)

4. 考察

以上確立したプロトコルによって、KikGR マウスの脾細胞の生体内ラベリングについて、死細胞率を上げることなく、既報(27%)を大きく超える効率(83%)を達成することができた。しかし、図 6 に示されたように、現在のプロトコルでは、脾臓表面では photoconversion が強く起こっているのに対し、深いところでは起こっていたとしても非常に弱い(KikRed の分子数が非常に少ない)。この深度による photoconversion 効率の違いは、本実験においては大きな問題となる。そのため、プロトコルのさらなる最適化、具体的には深度によって photoconversion 効率が大きく異なるようなプロトコルの確立がまず必要であると考えられる。

5. 今後の課題

上述の通り、まず photoconversion プロトコルのさらなる最適化を行う。具体的な方策としては、光の到達深度を上げるために、より長波長の光を用いることを検討している。しかし、KikGR の photoconversion は波長が短いほど効率が良いことが知られているため、photoconversion 効率と到達深度はトレードオフの関係にあることに注意が必要である。さらに、脾臓には赤血球が豊富に存在するため、ヘモグロビンによる吸収、という第三の要素も検討に入れる必要がある。

そして、脾臓は様々な細胞種によって構成されているが(T細胞, B細胞, マクロファージなど)、細胞種によって photoconversion 効率に差がないことも、本実験に進む前に確認する必要がある。

以上が達成された後、最適化されたプロトコルを用い、KikGR マウスの脾臓のみに紫(外)光を照射シラベルし、その後高張食塩水投与を行った後、急性腎障害を惹起し、ラベルされた脾細胞の局在(脾臓、循環血液中、腎臓)・内訳をまず FACS を用いて検討していく予定である。

6. 文献

1. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):458-62. doi: 10.1038/35013070. PMID: 10839541.
2. Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, Ye H, Rosin DL, Guyenet PG, Okusa MD. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7nAChR+$ splenocytes. *J Clin Invest*. 2016 May 2;126(5):1939-52. doi: 10.1172/JCI83658. Epub 2016 Apr 18. PMID: 27088805; PMCID: PMC4855936.
3. Tanaka S, Abe C, Abbott SBG, Zheng S, Yamaoka Y, Lipsey JE, Skrypnik NI, Yao J, Inoue T, Nash WT, Stornetta DS, Rosin DL, Stornetta RL, Guyenet PG, Okusa MD. Vagus nerve stimulation activates two distinct neuroimmune circuits converging in the spleen to protect mice from kidney injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Mar 23;118(12):e2021758118. doi: 10.1073/pnas.2021758118. PMID: 33737395; PMCID: PMC7999957.
4. Nomura K, Hiyama TY, Sakuta H, Matsuda T, Lin CH, Kobayashi K, Kobayashi K, Kuwaki T, Takahashi K, Matsui S, Noda M. $[Na^+]$ Increases in Body Fluids Sensed by Central Nax Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H^+ -Dependent Activation of ASIC1a. *Neuron*. 2019 Jan 2;101(1):60-75.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.017. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30503172.
5. Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FH, Nakanishi Y, Ikebuchi R, Ueha S, Tsutsui H, Inaba K, Matsushima K, Miyawaki A, Kabashima K, Watanabe T, Kanagawa O. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci Rep*. 2014 Aug 12;4:6030. doi: 10.1038/srep06030. PMID: 25112380; PMCID: PMC4129424.
6. Tanaka S, Zheng S, Kharel Y, Fritzscheier RG, Huang T, Foster D, Poudel N, Goggins E, Yamaoka Y, Rudnicka KP, Lipsey JE, Radel HV, Ryuh SM, Inoue T, Yao J, Rosin DL, Schwab SR, Santos WL, Lynch KR, Okusa MD. Sphingosine 1-phosphate signaling in perivascular cells enhances inflammation and fibrosis in the kidney. *Sci Transl Med*. 2022 Aug 17;14(658):eabj2681. doi:10.1126/scitranslmed.abj2681. Epub 2022 Aug 17. PMID: 35976996; PMCID: PMC9873476.

Exploring How Salt Loading Affects Acute Kidney Injury through the Spleen

Shinji Tanaka¹, Chikara Abe²

¹ The University of Tokyo Hospital, Division of Nephrology and Endocrinology,

² Gifu University, Graduate School of Medicine, Physiology

Summary

We previously reported that stimulation of vagal afferent fibers or restraint stress can activate the C1 neurons -> sympathetic nervous system -> splenic nerve -> spleen axis, resulting in the protection against acute kidney injury. On the other hand, it was demonstrated that elevated blood Na⁺ concentrations induced by the administration of hypertonic saline activated OVLT -> PVN -> C1 neurons -> sympathetic nervous system, resulting in an elevation of blood pressure. Based on these findings, we hypothesized that elevated blood Na⁺ concentrations induced by the administration of hypertonic saline activates the OVLT -> PVN -> C1 neurons -> sympathetic nervous system -> splenic nerve -> spleen -> kidney pathway, resulting in the altered phenotype of the splenocytes and kidney protection against acute injury. This year, we focused on investigating the missing link between the spleen and kidney. We used photoconversion to trace splenocytes *in vivo*. We optimized the photoconversion protocol and obtained 83% efficiency with 365 nm light without increasing the number of dead cells. However, the efficiency was high only in the superficial region of the spleen. Thus, we need to further optimize the protocol (e.g., using a longer wavelength).