

白血球細胞外トラップ抑制による急性腎障害新規治療開発

平橋淳一

慶應義塾大学医学部 総合診療科

【研究の背景】

生体の新たな生体防御反応として2004年に発見された白血球細胞外トラップ(ETs)現象は、自己免疫疾患をはじめ敗血症を含む難治性炎症性疾患、心筋梗塞や深部静脈血栓等の血栓性疾患、癌の転移等の重要なメディエーターであることが判明し、特に最近ではCOVID-19の重症化をもたらす血栓症を誘導する因子として注目を浴びている。

【目 的】

我々の研究室は、2016年生体内多機能タンパクであるLactoferrin (LF)が、ETs放出を抑制する物質であることを見出し¹⁾、これをもとに臨床応用可能なETs阻害薬開発の研究を進めてきた。2018年、創薬におけるスクリーニング系として最適なETs依存性マウスモデルを探索する中で、マウス横紋筋融解症後急性腎障害(Crush症候群)モデルが白血球(マクロファージ)細胞外トラップに依存することを証明し²⁾、これをETs阻害薬開発のスクリーニングツールとして採用した。本研究では、Crush症候群の新規治療薬としてのETsの開発と、その作用メカニズムの解明を目的とした。

【方 法】

新規ETs阻害薬の開発におけるin vitroでのスクリーニング系として、ヒト末梢血由来好中球からの好中球細胞外トラップ(NETs)放出を培養液中のdsDNA濃度測定により定量するpicogreen法を採用し、NETs放出抑制効果を保持した12アミノ酸残基からなるウシLF由来塩基性ペプチド(FK-12)配列を特定した。この活性に重要なアミノ酸配列を保持しながらFK-12にさらに構造改変を加えて約30種のペプチドを作成し、マウスCrush症候群モデルをin vivoでのスクリーニングツールとした構造活性相関研究により、新規ペプチドFK-12AMを創製するに至った。さらに、FK-12AMが治療効果を発揮する生体メカニズムを探索するため、横紋筋融解惹起6時間後にFK-12AMを投与し、その後の血中および腹腔内のミオグロビンおよび炎症性サイトカインを時系列で測定した。

【結 果】

横紋筋融解が完成した後(グリセロール筋肉内投与後6時間)にFK-12AMを投与することにより、無治療群と比較して筋障害マーカーであるCPKの急速な改善を認めることを見出した。この所見から、我々はCrush症候群では初期の筋崩壊後にETsを介した炎症のpositive feedback回路が作働し、ETsがもたらす全身の炎症がさらなる筋崩壊をもたらして病態を増悪させるvicious cycleが存在すると推測した。血漿、尿、および腹腔内洗浄液の炎症性サイトカインレベルを時系列で測定した結果、無治療群では、血液および尿中の炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6)の上昇はTime 6 hではごく軽微であるがTime 12 hに顕著な上昇を認めた。予想外なことに、腹腔内でも血液や尿に先んじて顕著なTNF- α , IL-6の一過性の上昇を認めた。これはTime 6 hにピークを迎えTime 8 hで自然にピークアウトしていた。一方、FK-12AMの予防投与群においては、血中、尿中、腹腔内のTNF- α , IL-6レベルの上昇は顕著に抑制されていた。従って、初期の腹腔内炎症を抑制することは続発する急性腎障害に対して大きな治療的意義があると考えられた。さらに、FK-12AMの直接の標的と考えられる

ETsの推移を、血中および腹腔内において検証した。驚いたことに、腹腔内のdsDNAレベルが筋 crush 後に大きく上昇し、これがFK-12AMの予防的および治療的投与で有意に抑制されることが判明した。

【考 察】

我々が新規に開発した治療ペプチドは、12残基のアミノ酸からなる直鎖C末端アミド化ペプチドで6つの塩基性アミノ酸を含有し、ペプチド全体では正に帯電しており、この陽性荷電を通じてETsの放出を抑制すると考えられる。Crush症候群の初期には崩壊した筋からミオグロビンが放出されることにより腎障害が起こるが、その過程には全身のサイトカインストームが関与し、活性化マクロファージ由来のETsが、クラッシュ症候群における全身炎症と筋崩壊の間に悪循環を形成しているというメカニズムが想定された。ETs放出を阻止することにより、この<筋由来ミオグロビン-炎症性サイトカイン-ETs放出-筋崩壊-筋由来ミオグロビン放出>という悪循環が断ち切れ筋崩壊が急速に収束する可能性がある。FK-12AMの腹腔内投与により腹腔内におけるETsの放出を抑制し、これが腹腔内において抗炎症性に作用して結果的に全身性炎症を抑制し、RIAKIの成立を阻んでいるというメカニズムが想定された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

FK-12AMはすでに横紋筋融解症後急性腎障害マウスモデルで顕著な治療効果を認めワンショットで効果を発揮する。これは、腎臓のみに働くのではなく、全身の炎症を急速に収束させることにより、炎症に依存する筋崩壊の持続を食い止めてミオグロビンの放出を抑制し、結果的に急性腎障害からの回復をもたらすと理解される。本研究により、新規薬剤FK-12AMは、ETsを標的とした炎症性疾患への臨床応用が期待される薬剤であることが示された。

【参考・引用文献】

1. Okubo K, Kamiya M, Urano Y, Nishi H, Herter JM, Mayadas T, Hirohama D, Suzuki K, Kawakami H, Tanaka M, Kurosawa M, Kagaya S, Hishikawa K, Nangaku M, Fujita T, Hayashi M, Hirahashi J. Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine* 204-15 (2016)
2. Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M, Urano Y, Suzuki A, Yamamoto K, Hase K, Homma K, Sasaki J, Miyauchi H, Hoshino T, Hayashi M, Mayadas TN, Hirahashi J. Macrophage extracellular trap formation promoted by platelet activation is a key mediator of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nature Medicine*. 24(2):232-238 (2018)