

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05313

研究課題名(和文) 血中タンパク質AIMの慢性腎臓病における役割の解析と治療応用への検討

研究課題名(英文) Investigation of roles of circulating protein AIM in chronic kidney disease and its therapeutic application

研究代表者

新井 郷子(Arai, Satoko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：60422276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：急性腎障害時、尿細管内腔に蓄積した壊死細胞の除去を促進することでその治癒に寄与することが示されている血中タンパク質apoptosis inhibitor of macrophage(AIM)は、その特性から、慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD)においても予防や回復に効果があることが期待される。本研究ではCKDにおけるAIMの役割を明らかにし、AIMによるCKDの予防・治療効果を検討することを目的とし、CKDモデルの作製を中心に研究を進めることで、AIMがCKDの病態進行に置いても関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における腎疾患患者は増加傾向にあり、中でもCKDは進行すると末期腎不全となり人工透析が必要となるなど、健康への重大な影響をもたらすだけでなく、日本の医療財政を大きく圧迫する原因にもなっている。しかしながら、現在、CKDは画期的な治療薬が無く、対症療法が主なものであるという問題がある。本研究では特にAKIから進展するCKDに着目し、AKI治癒において非常に重要な分子であるAIMが、CKD発症や病態進行においても、その予防・抑制に重要な役割を果たす可能性を見出した。本研究は、CKDの病態解明および予防・治療薬開発という観点で重要な知見をもたらしたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Since we had demonstrated that the circulating protein, apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), contributes to recovery from acute kidney injury(AKI) by enhancing removal of dead cell debris accumulated within the lumen of renal proximal tubules, it was expected that AIM could also play roles in prevention and/or improvement of chronic kidney diseases(CKD). In this study, we examined the effects of AIM in CKD through establishment of CKD models, and found possible involvement of AIM in CKD progression.

研究分野：疾患生命科学

キーワード：慢性腎臓病 急性腎臓病 AIM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における腎疾患患者は増加傾向にあり、現在死因の第8位を占めている。中でも慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) は腎機能が低下した状態が長期間続くことで脳梗塞や心筋梗塞等のリスクが上昇し、進行すると末期腎不全 (end stage renal disease: ESRD) となり人工透析が必要となるなど、健康への重大な影響をもたらす疾患である。実際に人工透析患者は年々増え続け、2011年に30万人を超え、日本の医療財政を大きく圧迫する原因にもなっている。特に最近では生活習慣病に伴うCKD患者の増加が著しいことから、CKDに対する積極的かつ画期的な予防・治療法開発に取り組むことは日本医療界における急務である。

我々は以前、血中タンパク質 AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) が急性腎障害 (acute kidney injury; AKI) の治癒に非常に重要な役割を果たしていることを発見した。AIM はマクロファージ由来の分泌型タンパク質で、システイン残基を多く含む SRCR (scavenger receptor cysteine-rich) ドメインという特徴的なドメインを3つ有し、マウス、ヒトにおいて同様の機能が確認されている。AIM の分子量は約 40kD であるが、血中において免疫グロブリン M (Immunoglobulin M; IgM) 五量体と結合することで安定化し、約 1000kD 以上の巨大な複合体として血中を循環しており、その血中濃度はヒトで平均約 5 µg/ml である。通常はほとんどの AIM が五量体 IgM に結合した形で存在しているため、尿中の AIM 量は非常に少なくほぼ検出されないが、我々は、AKI 時に AIM が五量体 IgM から大量に解離し、遊離型 AIM として尿中に排出されることで、AKI の治癒に寄与していることを発見した。

AKI は、虚血再灌流をはじめとした様々な原因により短時間のうちに腎機能が低下する症状を示す急性の疾患である。近位尿細管の上皮細胞が壊死して尿細管管腔を閉塞するのが特徴で、腎機能を正常化するためには、尿細管を閉塞する死細胞塊を迅速に除去し、正常な上皮細胞の再生と組織の再構築を促すことが非常に重要である。先述のように、AIM は血中で分子量が大きい IgM に結合しているために糸球体を通過できず、健常時は尿中には存在しないが、AKI 時には何らかのメカニズムにより全身性に IgM から解離して遊離型となり尿中へ移行する。尿中へ移行した活性型 AIM は、死細胞塊に結合し貪食細胞の目印となり、死細胞塊の速やかな除去を促進する役割を果たす。このとき、傷害された尿細管上皮細胞は、スカベンジャー受容体的一种である KIM-1 を高発現していることが知られており、KIM-1 を介して AIM が付着した死細胞塊が上皮細胞に貪食されることで、その除去が速やかに行われる。実際に、AIM 欠損マウスにおいて虚血再灌流により AKI を誘導すると、尿細管における死細胞塊の蓄積が解消されず、著しい腎機能の低下により、多くの個体が死に至るが、AIM の投与により腎機能が回復した。このことから、AIM は AKI においては特に KIM-1 を介する壊死細胞除去を促進することで治癒に重要な役割を果たし、AKI の治療薬になり得ることが明らかになった。

AKI は一過的に腎機能が低下する病態であり、CKD と違い治癒するという認識がある一方で、AKI 時に生じる組織障害や炎症の残存により、CKD の原因となる病態でもあることが論じられている。そのため、AKI から CKD への進展や、CKD の病態進行にも AIM が関与している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

CKD に至る原因は様々であるが、AKI を発症した後、その不完全な治癒がその発症の原因となり得ることが知られている。また逆に、CKD 患者には AKI が生じやすく、それによりさらに腎機能が悪化するケースも知られており、AKI は CKD の発症・病態進行に深く関与していると考えられる。従って、AKI の治癒に効果を持つ AIM が CKD の予防や治療においても、同様に効果を有する可能性が示唆される。本研究では、CKD の発症および病態進行における AIM の関与を明らかにし、AIM を利用した CKD 予防・治療法開発の基盤となる知見の取得を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腎疾患モデルの解析: CKD モデルとして 5/6 腎摘、さらに腎線維化における AIM の役割を調べるため、片側尿管結索 (UUO) モデル等、様々な腎疾患モデルの作製・解析を行った。

(2) AKI 由来の CKD モデルマウスの作出: CKD の既存の動物モデルとして広く用いられる 5/6 腎摘はヒトにおける実際の CKD 発症機序を踏襲したモデルであるとは言い難く、CKD に至る過程の解析には適していないと考えられる。特に AIM が CKD の病態抑制に作用するとすれば、AKI と密接に関与する CKD モデルが必要となる。そのため、本研究では、AKI の不完全な治癒により CKD を発症するケースを想定し、マウスに虚血再灌流処置 (ischemia reperfusion; IR) を 1 回あるいは複数回実施することで CKD 様の症状を誘導する疾患モデルの作出を試みた。

(3) ICR 背景の AIM 欠損マウスの作製: また、本研究では AIM の欠損が CKD 発症や病態進行へ与える影響を調べるために AIM 欠損マウスを用いるが、当研究室が所持する AIM 欠損マウスは C57BL/6 背景であり、C57BL/6 系統のマウスは腎障害に抵抗性があることが知られていた。そのため、本研究において、より腎障害を誘導し易くするために、CRISPR/Cas システムにより、ICR 背景の AIM 欠損マウスの作製を行った。

4. 研究成果

(1) 腎疾患モデルの解析

C57BL/6 背景マウスを用いて 5/6 腎摘、UUO モデル等を作製し、野生型マウスと AIM 欠損マウ

スにおける比較を行った。その結果、特に UUO において、AIM の有無による差異が観察された。すなわち、AIM 欠損マウスでは野生型と同様に組織全体に線維化は誘導されてはいるものの線維の密度が低く、尿細管の拡張が顕著であることが、HE 染色や PAS 染色、Sirius-red 染色等の組織学的観察から示唆された。また、実際に、線維化マーカーの mRNA 発現量を調べたところ、AIM 欠損マウスでは野生型のような経時的な発現量の上昇がみられなかった。さらに、尿細管上皮細胞の傷害マーカーである KIM-1 の発現が持続することが示されると共に、尿細管に存在するチャンネルやポンプの mRNA 発現量が AIM 欠損マウスにおいて野生型よりも低く、AIM 欠損マウスでは尿細管機能も低下していることが示唆された。これらのことから、傷害を受けた腎臓において、その機能維持と組織修復には初期尿細管機能の線維化が重要な役割をもつことが示され、さらに、その線維化には AIM が必要であることが示唆された。これまで線維化は腎障害においては増悪因子としてその有害な側面が注目されていたが、初期の線維化はむしろその後の組織の修復補助と機能維持に必要であり、AIM がその誘導に関与している可能性が示唆された。一方、5/6 腎摘においては C57BL/6 背景マウスでは CKD 様の症状（血清クレアチニン値の上昇等）が観察されず、より適した系として ICR 背景での解析を行うために、ICR における AIM 欠損マウスの作製を行うこととした。

(2) AKI 由来の CKD モデルマウスの作出

先にも述べた通り、AKI 後に組織障害の修復が不十分であることが CKD へ進展する要因となると考えられている。本研究では、その病態を再現するためのモデル作出を行った。C57BL/6 マウスを用い、IR 処置の回数や程度、期間について様々な条件軽度の IR 処置を行い、その後の血清クレアチニン値や腎組織の変化を解析することで、CKD 様を呈する条件の探索を行った。その結果、軽度の虚血時間による IR を 2 週間空けて 2 回処置を行うことで、腎臓全体において尿細管拡張、間質障害、マクロファージの浸潤、腎線維化等を呈する CKD 様の病態を作出することができた。一方で、血清クレアチニン値については、IR 処置後に上昇するがその後低下し通常域へ戻るため、組織学的な障害の誘導は確立されたが、実際の腎機能低下にまでは至らないことが確認された。しかしながら、AKI 時に誘導される AIM の IgM からの解離に関しては IR 処置後、時間が経過しても解離が持続していた。これは、ヒト CKD 患者でも同様の現象がみられる傾向にあることから、上記の方法で CKD に近い病態を樹立できたことを示唆している。組織学的には CKD 様を呈するにもかかわらず、腎機能が低下しない原因として、腎障害に耐性のある C57BL/6 マウスを用いていることが考えられたため、より感受性の高い ICR マウスを用いて解析を行うために ICR において AIM 欠損マウスを作製することとした。

(3) ICR 背景の AIM 欠損マウスの作製

CRISPR/Cas システムを用いて AIM 欠損マウスを作製した。すなわち、AIM 遺伝子の ATG を含む配列のガイド配列を組み込んだ pX330 ベクターを ICR マウスの受精卵にマイクロインジェクションすることで、ATG 周辺の配列を欠損したマウスを得た。得られた F1 マウスにおいてゲノム DNA を抽出し、ATG を挟むように設計したプライマーで PCR を行い、DNA 断片を増幅させることで DNA 配列を決定した。ATG を含む領域が欠損しているマウスからホモ接合体（ノックアウト）マウスを得ることができた。この ICR/AIM KO マウスを用いて、(2) で作出した 2 回 IR による CKD モデルを作製し、野生型マウスと比較を試みた。さらに、ICR/AIM KO マウスを用い、1 回のみ IR を行い、より長期である 12 週間後における野生型マウスと AIM KO マウスの差の解析も行った。特に後者では、AIM KO において、野生型と比較、尿細管の拡張等の特徴がより顕著である個体が存在し、(1) の UUO と類似した傾向がみられた。このことから、AKI 発症から CKD へ導かれる過程において AIM が抑制的に関与している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

新井 郷子, 宮崎 徹. IgM による血中タンパク質 AIM の活性制御と疾患とのかかわり, 生体の科学, 70:148-154, 2019, 査読無

Hiramoto E, Tsutsumi A, Suzuki R, Matsuoka S, Arai S, Kikkawa M, Miyazaki T. The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Sci Adv.* 4:eaau1199, 2018. doi: 10.1126/sciadv.aau1199, 査読有

Arai S, Miyazaki T. A scavenging system against internal pathogens promoted by the circulating protein apoptosis inhibitor of macrophage (AIM). *Semin Immunopathol.* 40:567-575, 2018. doi: 10.1007/s00281-018-0717-6, 査読有

Sugisawa R, Komatsu G, Hiramoto E, Takeda N, Yamamura KI, Arai S, Miyazaki T. Independent modes of disease repair by AIM protein distinguished in AIM-felinated mice. *Sci Rep.* 8:13157, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-31580-6, 査読有

Tomita T, Arai S, Kitada K, Mizuno M, Suzuki Y, Sakata F, Nakano D, Hiramoto E, Takei Y, Maruyama S, Nishiyama A, Matsuo S, Miyazaki T, Ito Y. Apoptosis inhibitor of macrophage ameliorates fungus-induced peritoneal injury model in mice. *Sci Rep.* 7:6450, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-06824-6, 査読有

新井 郷子, 森 伸子, 宮崎 徹. ネコAIMの特殊性と腎疾患との関連性, *Felis*, 11:88-94, 2017, 査読無
新井 郷子, 宮崎 徹. 虚血再灌流障害 による急性腎障害における AIM の臨床応用の可能性, *臨床免疫・アレルギー科*, 67:617-621, 2017, 査読無
新井 郷子, 宮崎 徹. 血中タンパク質 AIM による体内のスカベンジングシステム, *感染・炎症・免疫*, 47:98-107, 2017, 査読無
新井 郷子, 森 伸子, 宮崎 徹. 猫 AIM の特殊性と腎疾患との関連性, *info Vets*, 188:43-49, 2017, 査読無
Yamazaki T, Sugisawa R, Hiramoto E, Takai R, Matsumoto A, Senda Y, Nakashima K, Nelson PS, Lucas JM, Morgan A, Li Z, Yamamura KI, Arai S, Miyazaki T. A proteolytic modification of AIM promotes its renal excretion. *Sci Rep*. 6:38762, 2016. doi: 10.1038/srep38762, 査読有
Sugisawa R, Hiramoto E, Matsuoka S, Iwai S, Takai R, Yamazaki T, Mori N, Okada Y, Takeda N, Yamamura KI, Arai T, Arai S, Miyazaki T. Impact of feline AIM on the susceptibility of cats to renal disease. *Sci Rep*. 6:35251, 2016. doi: 10.1038/srep35251, 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

新井 郷子, 平本 絵美莉, 宮崎 徹, The novel finding for the structure of IgM pentamer harboring AIM/CD5L, 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018
平本 絵美莉, 新井 郷子, 宮崎 徹, Impacts of circulating AIM protein on the pathogenesis of IgA nephropathy, 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018
Miyazaki T, Hiramoto E, Arai S, A Revised structure of IgM pentamer, an asymmetric pentagon with an open groove that AIM protein fits in. *EMBO Workshop, Antibodies and complement: Effector functions, therapies and technologies*, 2018
平本 絵美莉, 包 明久, 鈴木 里沙, 松岡 茂, 新井 郷子, 吉川 雅英, 宮崎 徹, The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein, 第 18 回東京大学生命科学シンポジウム, 2018
Arai S, Miyazaki T, Study on activation of circulating AIM in multiple diseases - acute kidney injury to NASH-HCC -, Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammation (MPCTU) 第 4 回シンポジウム, 2017
杉澤 良一, 新井 郷子, 宮崎 徹, ネコ AIM 独自の IgM 高親和性が肥満病態に及ぼす影響の検討, 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017
高井 亮輔, 宮崎 徹, 腎障害における線維化の重要性と AIM の役割, 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 2017
平本 絵美莉, 宮崎 徹, 慢性腎臓病 (CKD) における AIM の役割の検討, 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 2017
杉澤 良一, 松岡 茂, 平本 絵美莉, 新井 郷子, 宮崎 徹, ネコ特異的な腎疾患自己治療機構の欠損, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016
新井 郷子, 宮崎 徹, 血中タンパク質 AIM による異物除去機構を介した新しい疾患制御パラダイム, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016
高井 亮輔, 新井 郷子, 宮崎 徹, 腎障害における初期線維化の重要性と AIM の役割, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016
山崎 智子, 新井 郷子, 宮崎 徹, 血中における AIM の切断とその機能的変化, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016
中村 恵子, 新井 郷子, 宮崎 徹, ヒト AIM の疾患治療応用に向けた最適化, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016
平本 絵美莉, 松岡 茂, 山崎 智子, 新井 郷子, 宮崎 徹, 血中 AIM 活性化ファクターの開発とその疾患治療応用, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016
Yamazaki T, Arai S, Miyazaki T, Dedifferentiation of renal tubular epithelial cells to phagocytes to ameliorate acute kidney injury through scavenging necrotic cell debris deposited with apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) protein, *Cell Symposia -100 Years of Phagocytes-*, 2016
杉澤 良一, 松岡 茂, 平本 絵美莉, 新井 郷子, 宮崎 徹, ネコ AIM 独自の特性に起因したネコ腎不全好発機序の解明と治療応用への検討, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 恭彦

ローマ字氏名：ITO, yasuhiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。