様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月 ２０ 日現在

機関番号：８２８３８
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０６８６７

研究課題名（和文）AIMによる新規脳梗塞治療法開発に向けた基盤研究

研究課題名（英文）AIM/CD5L ameliorates ischemic stroke by suppressing DAMPs-mediated sterile inflammation and promoting neurogenesis

研究代表者

前原　奈都美（Maehara, Natsumi）

一般社団法人ＡＩＭ医学研究所・研究部門・シニアリサーチフェロー

研究者番号：９０７８３６２１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、急性腎不全において尿細管管腔内の死細胞塊のクリアランス促進作用が報告されているマクロファージ特異的な分泌型タンパク質AIM（Apoptosis Inhibitor of Macrophage,CD5L）について、脳梗塞発症後、梗塞巣周辺のマクロファージ／ミクログリアにおいて強く発現誘導されることや、AIMが梗塞巣の死細胞塊および死細胞から生じたダメージ関連分子パターン（DAMPs）に結合し、クリアランスが促進された結果、炎症を抑制し、脳梗塞病態を改善する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
本研究成果より、急性腎障害において尿細管管腔内の死細胞塊の除去を促進することが知られていたAIMタンパクに関し、梗塞巣周辺のマクロファージ／ミクログリアにおいて強い発現が誘導され、梗塞巣の死細胞塊および死細胞から生じたダメージ関連分子パターン（DAMPs）の除去が促進された結果、炎症を抑制し、脳梗塞病態を改善させることが明らかになった点において、学術的意義がある。また、生体由来のタンパク質であるAIMの投与による、副作用の少ない新規脳梗塞治療法の開発基盤となりうる点において、社会的意義があると考える。

研究成果の概要（英文）：The prognosis after primary injuries, such as ischemic stroke, worsens due to the sterile inflammation triggered by damage-associated molecular patterns (DAMPs). However, no effective treatments currently exist to regulate DAMPs. In this study, we demonstrate that AIM protein reduces sterile inflammation by binding to DAMPs, promoting their clearance and preventing their interaction with inflammatory receptors, thereby improving outcomes in ischemic stroke. In experimental stroke models, AIM-deficient mice suffer greater neurological damage and higher mortality due to increased DAMPs and inflammation, while recombinant AIM administration reduces inflammation and mortality. Our findings provide a foundation for developing therapies that target DAMPs to improve outcomes in ischemic stroke.

研究分野：病態医科学

キーワード：AIM　CD5L　脳梗塞　DAMPs　セルフ・パソジェン

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

（1）脳梗塞は、日本において高い発症率及び再発率が報告されている疾患であり、障害調製生命年（Disability-Adjusted Life Year; DALY）の国際的な調査の結果、神経障害の中において最も高いことが報告されたように、罹患者の QOL が著しく損なわれる疾患である（引用文献 ①、②、③）。

（2）既存の治療法は、血栓溶解報や血管内治療等、急性期において適応されるものが多く、慢性期においてはリハビリや再発防止に向けた対処療法のみであるため、より適応範囲が広く、効果的な治療薬の開発が望まれている。

（3）脳梗塞の病態は、血管の閉塞後、その欠陥の支配領域における血流低下により、ATP の枯渇に伴う過剰なグルタミン酸の放出による神経毒性や、イオン濃度の異常による細胞内へのカルシウム流入により、活性酸素種や活性窒素種が産生され、DNA、細胞内タンパクの損傷、酸化ストレスの上昇により、神経細胞死が誘導されるため、脳梗塞の治療には、既存の治療薬にあるような血栓溶解や活性酸素種除去の他に、死細胞塊の除去、DAMPs の除去、炎症の抑制といった、脳梗塞による脳内での異常状態を鎮静化した後、神経細胞の再生が誘導される必要がある（引用文献④、⑤、⑥、⑦）。

（4）組織マクロファージ特異的な分泌型タンパク質である AIM（Apoptosis Inhibitor of Macrophage）は、これまでに、肝がん細胞や急性腎不全における尿細管管腔内の死細胞塊、アミロイドβプラーク等、その蓄積が疾患の原因となる「セルフ・パソジェン」を認識し、そのクリアランス促進作用を有する（引用文献⑧、⑨）。

２．研究の目的

本研究では、脳梗塞の予後を左右する、死細胞とそれから放出され「無菌状態の炎症」（Sterile Inflammation）を惹起する damage associated molecular patterns（DAMPs）を AIM によって除去できるか、さらに AIM が脳梗塞に対して治療効果を持ち得るかの検証を目的とした。

３．研究の方法

（1）急性期における AIM の発現様式、治療効果の検証

① 脳梗塞発症前後における AIM の発現量の変化

野生型（WT）マウスを用いて、中大脳動脈閉塞（Middle Cerebral Artery Occlusion; MCAO）により脳梗塞モデルマウス（虚血時間 45 分間）を作製し、経時的な RNA の発現量および免疫組織化学法による解析を行った。

② AIM による脳梗塞発症後の生存率、神経スコア、脳梗塞病態への影響

WT マウス及び AIM 欠損（AIM KO）マウスを用い、MCAO モデルマウスを作製し、麻痺の状態を評価する神経症状スコア（表 1）を測定した。それぞれ脳を摘出し、免疫組織化学法を用いて梗塞巣の大きさ（MAP2 陰性エリア）や貪食細胞の浸潤度（Iba1）を定量した。

表1. 神経症状スコア

Neurological score (points)	The summary of criteria
0	normal
1	mild turning behavior with/without inconsistent curling when picked up by tail, < 50% attempts to curl to the contralateral side
2	mild consistent curling, > 50% attempts to curl to contralateral side
3	strong and immediate consistent curling, mouse holds curled position for more than 1-2 s, the nose of the mouse almost reaches tail
4	severe curling progressing into barrelling, loss of walking or righting reflex
5	comatose or moribund

③ AIM タンパク投与による脳梗塞治療効果の検証

AIM タンパクによる脳梗塞治療効果を検証するために WT マウス及び AIM KO マウスを用い、MCAO モデルマウスを作製し、それぞれのマウスに対し、1 日 1 回、1 回あたり 500 μg の rmAIM を投与し、生存率と神経症状スコアを測定した。脳組織の摘出は rmAIM 投与 1 時間後に行い、免疫組織化学法を用いて梗塞巣の大きさや、細胞死により放出された DAMPs の蓄積量、貪食細胞の浸潤度を定量した。また、定量的 PCR 法による炎症マーカーの解析も行った。

④ AIM による DAMPs 除去作用の検証

脳梗塞発症後、死細胞から放出され、炎症を惹起することが知られている DAMPs と AIM の結合について、リコンビナントタンパクを用いた ELISA 法により検証した。

４．研究成果

（1）① WT マウスを用い MCAO モデルマウスを作製すると、MCAO day3 より、AIM の顕著な発現増加が認められた（図 1A 左側）。さらに、抗 CD11b 抗体-磁気ビーズを用いて細胞を分離し、定量的 PCR 法による解析を行った結果、CD11b 陽性細胞において MCAO day3 以降に顕著な AIM の発現上昇を認めた。このことから、脳梗塞発症後、梗塞巣およびその周囲に存在するミクログリア

／マクロファージが AIM を高発現することが明らかになった(図 1A 右側)。また、免疫組織化学法による解析の結果、梗塞巣（MAP2 陰性のエリア）において、AIM の強いシグナルを検出し、ミクログリア／マクロファージ以外にも、核を認めない細胞外の領域においても AIM のシグナル確認されたことから、AIM は死細胞塊等の梗塞巣を構成するセルフ・パソジェンと結合していることが示唆された（図 1B）。

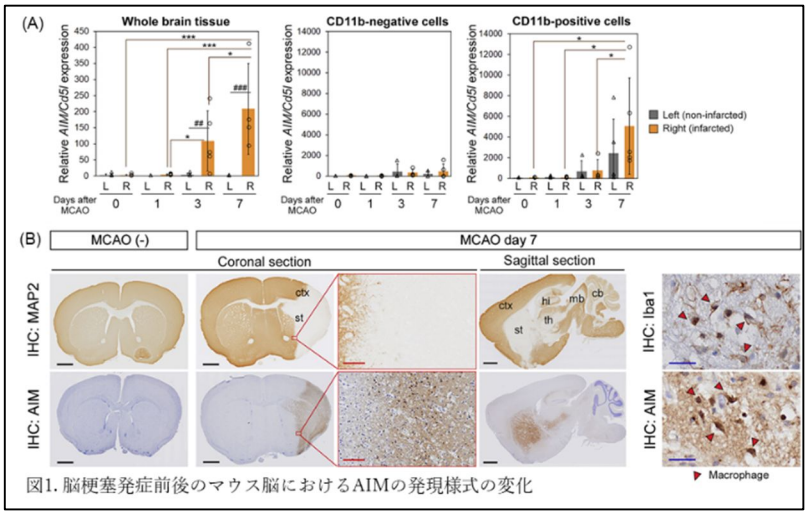

図1. 脳梗塞発症前後のマウス脳におけるAIMの発現様式の変化

② 急性期における生存率及び神経症状スコアについて解析した結果、WT マウスと比較し、AIM KO マウスにおいて予後不良となることが示された（図 2A，B)。一方、梗塞巣（MAP2 陰性エリア）の大きさやミクログリアの総細胞数について差異は認められなかったが（図 2C，D)、梗塞巣における死細胞塊を貪食したことを示す Oil red-O 陽性 Iba1 陽性細胞については WT について顕著に多いことから（図 2E)、AIM は梗塞巣における死細胞塊の除去を促進していることが示唆された。

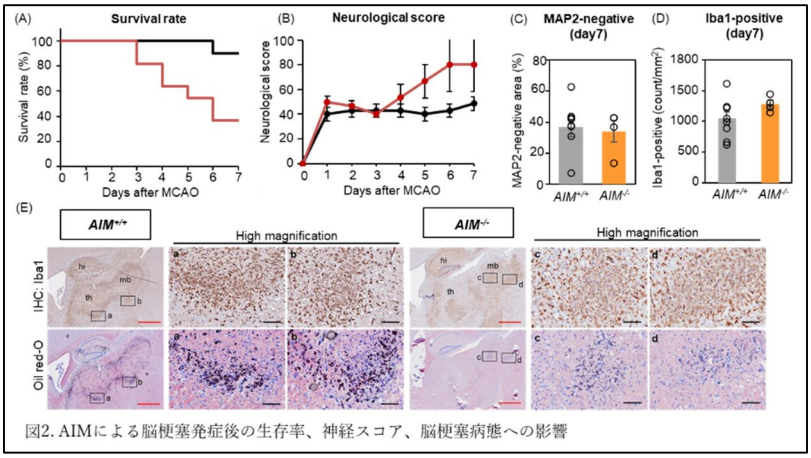

図2. AIMによる脳梗塞発症後の生存率、神経スコア、脳梗塞病態への影響

③ 生存率及び神経症状スコアについて、WT マウスと比較し、AIM KO マウスは予後不良であったが、AIM KO マウスに rmAIM を投与することにより改善されることを認めた（図 3A)。また、投与した rmAIM は、MCAO day7 まで、梗塞巣エリアに到達していることを確認した（図 3B)。脳梗塞発症後、死細胞から放出され、炎症を惹起することにより、梗塞巣拡大の一端を担うことが知られている DAMPs について、MCAO day3、7 における梗塞巣への蓄積量を定量した。まず、PRDX1（図 3C 左側）について、MCAO day3 における PRDX1 の蓄積量は、AIM KO マウスと比較し、WT マウスにおいて少ないことが明らかになった。また、WT マウス及び AIM KO マウスのどちらにおい

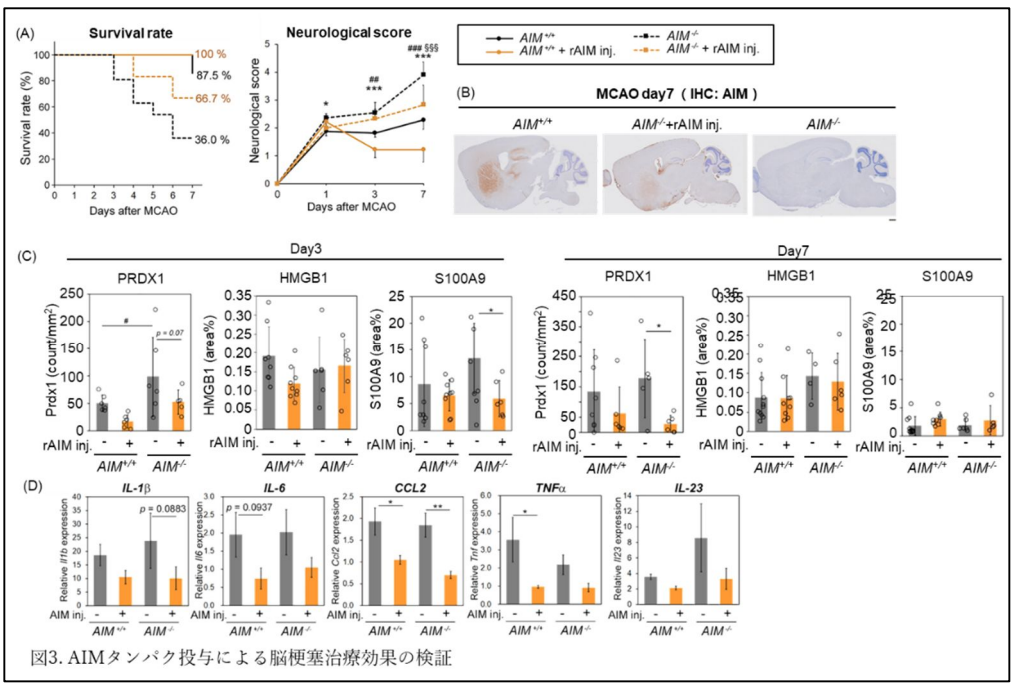

図3. AIMタンパク投与による脳梗塞治療効果の検証

ても、rmAIM を投与することにより、PRDX1 の蓄積量が減少することが明らかになった。この傾向は、MCAO day7 においても確認された。次に、HMGB1（図 3C 真ん中）については、AIM の有無による蓄積量の差は認められなかったが、WT マウスにおける蓄積量が、day3 から day7 にかけて減少する傾向にあった。S100A9（図 3C 右側）については、MCAOday3 において、WT マウスと比較して、AIM KO マウスにおける蓄積量が多い傾向にあった。特に、AIM KO マウスに rmAIM を投与することにより、その蓄積量は有意に減少した。また、MCAO day3 から day7 にかけて、S100A9 の蓄積量が減少していたが、AIM KO マウスにおいてもこの傾向は認められた。これは、day3 付近の時期において、多くの AIM KO が死亡したことが影響していると考えている。さらに、MCAO day4 における各種炎症性マーカーの発現量について、定量的 qPCR 法を用いて解析したところ、AIM の投与により、炎症性マーカーの発現は抑制された（図 3D）。

④　各種リコンビナント DAMPs（PRDX1、HMGB1、S100A9）に対するリコンビナントヒト AIM（rhAIM）または rmAIM の結合能について、ELISA 法を用いて解析した。その結果、両者が濃度依存的に結合することを示した（図 4A）。次に、各種 DAMPs と AIM の結合様式について解析した。AIM は血中において IgM 五量体と結合し、安定化する際に、SRCR3 の positive charge を介した電荷相互作用と、SRCR2 ドメインのシステインを介した二重結合を用いることが報告されている（図 4B、引用文献⑩）そこでまず、ΔSRCR3（図 4C 左側）や高ナトリウム濃度のバッファー（図 4C 右側）を用いることにより、電荷相互作用を阻害した条件下における、各種 DAMPs と AIM の結合を解析した。その結果、電荷相互作用を阻害することにより、DAMPs と AIM の結合が阻害されることを示した。さらに、二重結合の阻害条件として、還元剤である TCEP 添加（図 4D 左側）や、AIM の SRCR2 ドメインに存在するシステインをセリンに置換した 2CS タンパク（図 4D 右側）を用い、各種 DAMPs と AIM の結合を解析した。その結果、電荷相互作用と同様に、二重結合を阻害条件下において、DAMPs と AIM の結合力が低下することを示した。

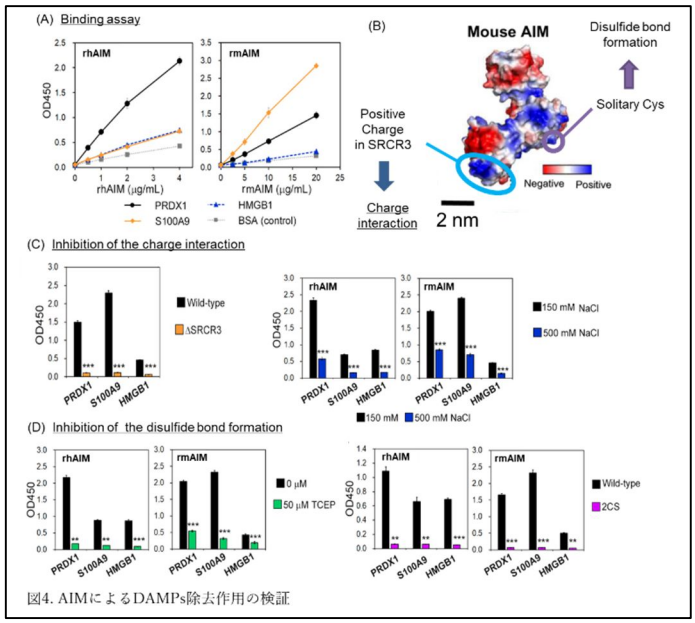

図4. AIMによるDAMPs除去作用の検証

以上の結果より、脳梗塞病態において、AIM は梗塞巣における死細胞塊および DAMPs のクリアランス促進作用を有しており、AIM の作用により脳内の異常が沈静化されることにより、炎症が抑制され、予後の改善効果が認められた。本研究成果を基盤とし、AIM を用いた新規脳梗塞治療法の開発が期待できる。

＜引用文献＞

① 厚生労働省，平成 29 年（2017）患者調査，② J. Hata et al., 2005，③ GBD 2016 Neurology Collaborators, 2019，④ T. Shichita et al., 2009，⑤ F. Konoeda et al., 2010，⑥ T. Shichita et al., 2012，⑦ E. H. Lo et al., 2003，⑧ N. Maehara et al., 2014，⑨ S. Arai et al., 2016，⑩ E. Hiramoto et al., 2018.

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

1．著者名 新井　郷子、前原　奈都美、宮崎　徹	4．巻 77
2．論文標題 マクロファージ由来分泌タンパク質AIMによるDAMPs除去を介した脳梗塞の病態改善	5．発行年 2022年
3．雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6．最初と最後の頁 610-616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Natsumi Maehara, Kaori Taniguchi, Ami Okuno, Hideaki Ando, Aika Hirota, Zhiheng Li, Ching-Ting Wang, Satoko Arai, Toru Miyazaki	4．巻 36
2．論文標題 AIM/CD5L attenuates DAMPs in the injured brain and thereby ameliorates ischemic stroke	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Cell reports	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109693.	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1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 Natsumi Maehara, Kaori Taniguchi, Ami Okuno, Hideaki Ando, Aika Hirota, Zhiheng Li, Ching-Ting Wang, Satoko Arai, Toru Miyazaki
2．発表標題 AIM/CD5Lによる脳梗塞病態の制御機構解明
3．学会等名 分子生物学会
4．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔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