2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ５ 月 １８ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１９４９７

研究課題名（和文）横紋筋融解症に続発する急性腎不全におけるマクロファージ由来クロマチン毒性の解析

研究課題名（英文）Cytotoxicity of chromatin from macrophages in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury

研究代表者

大久保　光修（Okubo, Koshu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：６０７４９１２５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：　横紋筋融解症は骨格筋の破綻とそれに続発する筋内容物の血中への流入が原因となり引き起こされる全身性症候群である。特に横紋筋融解症に引き続いて起こる急性腎障害(acute kidney injury, AKI)は患者予後を深刻に悪化させる合併症である。最近になって白血球の一つであるマクロファージがAKIの発症に重要な役割を持つ事が知られるようになったが、メカニズムについては不明な部分が多い。
本研究ではマクロファージ由来クロマチン放出(macrophage extracellular traps, METs)が病態の原因の一つであり、それを制御する事で病態を軽減させる可能性がある事を見出した。

研究成果の概要（英文）：Rhabdomyolysis is a serious syndrome caused by skeletal muscle injury and the subsequent release of breakdown products from damaged muscle cells into systemic circulation. The muscle damage can lead to acute kidney injury (AKI).Recently, macrophages were implicated in the disease pathogenesis of rhabdomyolysis-induced AKI, but the precise molecular mechanism remains unclear. In the present study, we show that macrophages released extracellular traps (ETs) comprising DNA fibers and granule proteins in a mouse model of rhabdomyolysis. Heme-activated platelets released from necrotic muscle cells during rhabdomyolysis enhanced the production of macrophage extracellular traps (METs). Here we report, this unanticipated role for METs and platelets as a sensor of myoglobin-derived heme in rhabdomyolysis-induced AKI. Also, we found a new therapeutic tool for prevention of AKI after rhabdomyolysis, which might rescue some sufferers of this pathology.

研究分野：内科学、腎臓学、透析医学

キーワード：横紋筋融解症　急性腎障害　白血球細胞外トラップ　Mac-1

１．研究開始当初の背景

地震、津波、戦争、原発・航空事故等の自然・人為的災害が世界中で被害を増大させている。地震以外にも台風・豪雨、津波等の自然災害、戦争、テロ、原発事故、列車・航空事故等の人為的災害(man-made disaster)が地球規模の環境変化、宗教・経済・技術的な変化を背景に頻発している。1995 年本邦の阪神・淡路大震災では犠牲者のうち窒息に続き 41%の多数を占める死因として挫滅症候群(Crush 症候群)が注目されてきた。Crush 症候群では外傷による筋血流遮断･壊死(横紋筋融解症)に急性腎障害(Acute kidney injury,AKI)が続発し患者生命予後を深刻に悪化させる (De Meijer AR et al. Intensive Care Med, 2003)。1988 年のアルメニア地震により多くの命が腎不全によって失われた反省から「Disaster Nephrology」介入の重要性(図 1)が叫ばれ International Society of Nephrology (ISN)のもとに Renal Disaster Relief Task Force (RDRTF)が設立、「災害」と「腎不全医療」を結び付け国際的に活躍している (Collins AJ et al. N Engl J Med,1989)。

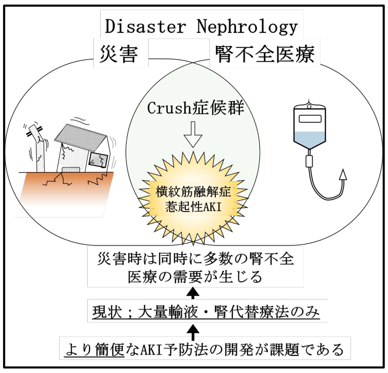

図 1. Disaster Nephrology の概念と現状

しかし横紋筋融解症の治療選択肢は大量輸液・腎代替療法等医療機関で施行すべき専門的なものに限られ被災現場で迅速・簡便に携帯･投与可能な AKI 予防法はないことから、横紋筋融解症に続発する AKI 発生機序の解明、さらに災害現場で簡便に実行可能な治療法の開発が重要な課題であった。横紋筋融解症においては、筋細胞内容物の Mb、ヘムが大量に循環血漿中に流入し鉄イオン及び活性酸素種(Reactive oxygen species, ROS)を過剰に産生させ、結果的に腎尿細管細胞壊死を引き起こす(Bosch X et al.N Engl J Med,2009)。2014 年、Mφが腎障害進展に中心的な役割を持つ (Belliere J et al.J Am Soc Nephrol,2014) ことが示された。しかし、Mφがどのように AKI 発症に関与しているのか、具体的な分子メカニズムは未解明であり、詳細な分子機構を解明することが重要な課題であった。

２．研究の目的

我々は予備実験の段階で横紋筋融解症惹起性 AKI の進展に重要となる分子を Mac-1 と呼ばれる Mφ表面に発現した接着因子(インテグリンファミリーの一つ)に絞り込んでいた。Mac-1 は好中球・Mφをはじめとした白血球細胞膜上に発現し、細胞接着機能だけでなく遊走や貪食等の基本的な白血球機能発現に重要な役割を持つ。我々の研究室では白血球細胞膜上に発現した Mac-1 が血小板表面の GPIba との相互作用を介して腎組織障害をもたらすことを示し(Hirahashi J et al. Circulation.2009)、自己免疫・血栓性疾患における Mac-1/GPIb を介した白血球・血小板相互作用の重要性を提唱してきた。さらに Mac-1 は新たな生体防御機構である白血球細胞外トラップ (Leukocyte) extracellular traps (ETs)を制御していることが見出されている。本研究では Mac-1 の制御下にある現象「Mφによる細胞外クロマチン放出(METs)」の病態への関与を明らかにし、その病態発生経路に対する抑制薬(我々が見出した白血球細胞外トラップ阻害剤)の治療選択肢としての可能性を探索することが目的である。

３．研究の方法

(1) <u>Glycerol 惹起性横紋筋融解症モデルにおける白血球細胞外クロマチン放出(ETs)の解析</u>

横紋筋融解症惹起性 AKI の解析には最も確立され広く用いられている Glycerol 惹起性横紋筋融解症モデルを採用した。

① 病態責任細胞の同定

Gr-1 抗体及び抗 Ly6G 抗体を用いた好中球除去マウス、clodronate liposome を用いた Macrophage 除去マウス、抗 Gp1ba 抗体を用いた血小板除去マウスに対して、Glycerol 惹起性横紋筋融解症を起こし腎機能(BUN,Cr)・組織(尿細管障害スコアリング)、血中遊離 dsDNA 濃度を測定した。

② 腎組織中 ETs 産生の証明

Glycerol 惹起性横紋筋融解症を引き起こしたマウスの腎組織凍結切片において抗 CitH3 抗体及び DNA の共局在する構造 ETs を共焦点顕微鏡下に検出した。また腎尿細管を lectin により同時に染色し ETs の腎組織における分布を検証した。病態への ETs の寄与に関しては ETs 阻害薬である DNase1 及び ETs 産生能欠損マウスである PAD4 ノックアウトマウスを用いて検証した(PAD4 の病態への関与については PAD4 阻害剤である CLA についても同様に検証した)。

(2) <u>シスプラチン惹起性急性腎障害モデル</u>

尿細管障害による急性腎障害を起こすことで知られるシスプラチン惹起性急性腎障害モデルにおいて、遺伝型の相違の腎障害に及ぼす影響を検証した。

(3) <u>ETs 形成の解析</u>

THP-1 由来分化型 Mφに対しヘム蛋白(ferriprotoporphyrin IX chloride)による刺激を行い ETs 産生を定量した。ETs 産生定量は免疫染色を行い、CitH3 及び DNA の共局在構造物を共焦点顕微鏡下に検出し、構造物

の数をカウントすることで定量した。スライドグラス上に固定したサンプルの免疫染色による解析に加え、ETs 定量の別法として細胞を生存させたまま蛍光プローブ(ROS 特異的蛍光色素 HySOx 及び細胞膜非通過性 DNA 染色剤 SytoxGreen)を用いて ETs 形成を Real time に共焦点顕微鏡で観察する実験系を用い定量した。

(4) <u>ETs 形成における Histone のシトルリン化修飾と ROS 産生の解析</u>

シトルリン化修飾の解析については、これまでに最も確立した方法である抗シトルリン化抗体を用いた Western Blotting 法によってヒストン修飾を検出し定量した。ROS 産生については、前述した蛍光プローブ HySOx を用い、生存を維持した細胞における ROS 産生を HySOx の蛍光波長をフローサイトメトリー(FACS)により検出した。

(5) <u>新規白血球細胞外クロマチン放出抑制剤の治療効果</u>

過去に我々の研修室で同定した白血球細胞外クロマチン放出抑制作用を発揮する断片化 12 アミノ酸配列 20 mg/kg を Glycerol 投与直前に i.v.し 24 時間後に横紋筋融解症惹起性 AKI モデルに保護的に働くか治療薬としての可能性を検証した。

以上のように、本研究の計画・方法を概観すると下図の通りである(図 2)

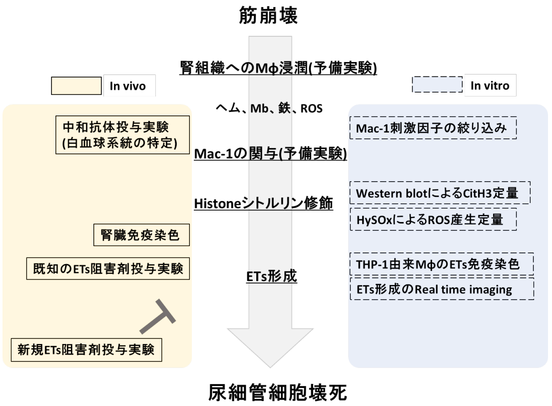

図 2．本研究計画・方法の概要

４．研究成果

(1) <u>Glycerol 惹起性横紋筋融解症モデルにおける急性腎障害(AKI)ではMφ由来の白血球細胞外クロマチン放出(ETs)が重要な役割を持つ</u>

Gr-1 抗体及び抗 Ly6G 抗体を用いた好中球除去マウスにおいて、未除去のマウスを比較し腎機能障害及び尿細管障害スコアは変化を認めなかったが、clodronate liposome を用いた Macrophage 除去マウス、抗 Gp1ba 抗体を用いた血小板除去マウスにおいてこれらの指標が抑制された。ETs 生体内における指標として確立された手法である血中遊離 dsDNA 濃度についても、腎機能障害の指標(BUN, Cr)と parallel に抑制されることが分かった。この結果は横紋筋融解症惹起性 AKI においては、白血球の最大の population を持つ好中球ではなく、Mφ及び血小板が重要な役割を持つ事を示唆する。血小板が横紋筋融解症惹起性 AKI を悪化させる要因であることは当初予期していなかった新規の知見であり、新たな病態発生機構の解明及び新規治療薬の開発ターゲットとして臨床医療応用への大きなインパクトを持つ。

Glycerol 惹起性横紋筋融解症を引き起こしたマウスの腎組織凍結切片において、Glycerol 投与による浸透圧差を利用した筋崩壊から 8 時間後、抗 CitH3 抗体及び DNA の共局在する構造 ETs を共焦点顕微鏡下に検出した(図 3)。

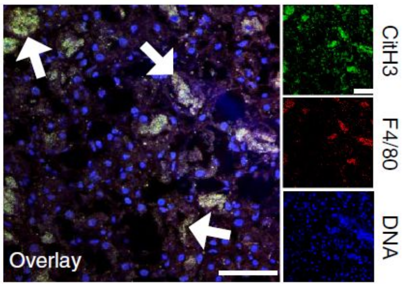

図 3．腎組織において検出された ETs(矢印)

また腎尿細管を lectin により同時に染色し ETs の腎組織における分布を検証し、ETs の分布は主として尿細管管腔であることが分かった。この結果から腎組織へ浸潤した Mφが ETs を放出し最終的には尿細管内において ETs が組織障害を引き起こすことが示唆された(図 4)。

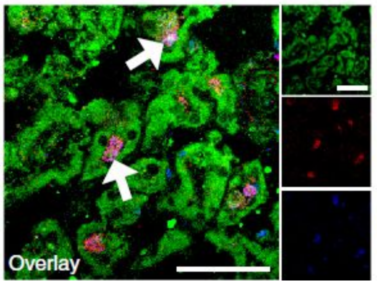

図 4．腎尿細管内への ETs(矢印)形成

病態への ETs の寄与に関して ETs 阻害薬である DNase1、ETs 産生能欠損マウスである PAD4 ノックアウトマウス(***Padi4***$^{-/-}$)、PAD4 阻害剤である CLA を用い腎機能・組織・血中遊離 dsDNA への影響を検証した。いずれの条件下においても腎機能・尿細管障害スコア・血中 dsDNA 濃度は低下したことから、ETs が横紋筋融解症惹起性 AKI において病因の一つとなる可能性が示唆された。

<u>(2)シスプラチン惹起性急性腎障害モデル</u>

尿細管障害による急性腎障害を起こすことで知られるシスプラチン惹起性急性腎障害モデルにおいても、Mac-1 欠損マウスの腎機能障害が軽減された。

<u>(3)ETs 形成の解析</u>

THP-1 由来分化型 Mφに対しヘム蛋白による刺激を行い ETs 産生を定量した。ヘム蛋白や鉄イオンはそれら単独では ETs の産生は惹起されなかったが、血小板との共培養系においては ETs 形成を惹起させることを見出した。この結果は固定化標本のみならず、生存を維持したまま使用可能な蛍光プローブを用い

た共焦点顕微鏡下 time-lapse analysis においても再現された。この ETs 形成は Mac-1 中和抗体、DSF(鉄イオンキレーター)、DPI(NADPH oxidase 抑制剤)、CLA(PAD4 阻害剤)により抑制されることから、Mac-1、ROS 産生及び PAD4 が ETs 産生に重要な役割を持つ事が示唆された(図 5)。活性化した血小板が好中球由来のクロマチン放出(NETs)を引き起こすことは過去に報告があるが、Mφにも同様の現象を惹起させることは知られておらず新規の知見である。

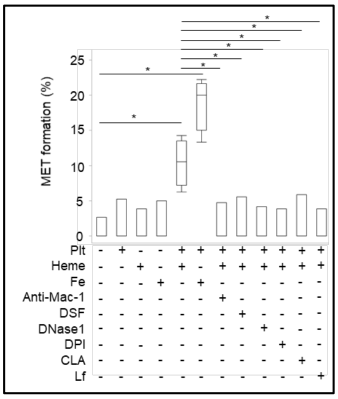

図 5. Mφによる ETs 形成(MET formation)と各抑制剤による影響

<u>(4)ETs 形成における Histone のシトルリン化修飾と ROS 産生の解析</u>

シトルリン化修飾の解析について抗シトルリン化抗体を用いた Western Blotting 法によって検出し定量した。ETs 産生と同様に Histone のシトルリン化修飾はヘムによって活性化された血小板によって促進されること、その過程は Mac-1、PAD4、ROS 依存性であること見出した(図 6)。

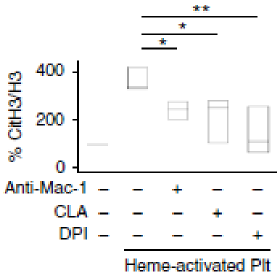

図 6. ETs 産生における histone のシトルリン化修飾

ETs 形成の過程において ROS 産生について蛍光プローブ HySOx を用い FACS により検出したところ、histone のシトルリン化修飾と同様に ROS 産生は活性化血小板の刺激によって増強した。

<u>(5)新規白血球細胞外クロマチン放出抑制剤の治療効果</u>

過去に我々の研修室で同定した白血球細胞外クロマチン放出抑制作用を発揮する生体内蛋白 lactofferin(Lf)を glycerol 投与直前に i.v.し 24 時間後に横紋筋融解症惹起性 AKI への影響を評価した。Lf 投与群においてはコントロール群と比較し腎機能、血中遊離 dsDNA 濃度ともに軽減した。また、図 5 でも示した通り、***in vitro*** における METs 形成に対しても Lf の持つ ETs 抑制作用は有効であり、***in vitro***, ***in vivo*** と一貫して Lf の ETs 抑制作用が認められた。

さらに本研究によって解明した横紋筋融解症惹起性 AKI の発症メカニズムがヒトにも共通して存在するのかについて、臨床応用を目指すうえで検証する必要があった。慶應義塾大学医学部救急外来を受診した横紋筋融解症患者(血清 CK > 1000 IU/mL の患者に限定)における血中遊離 dsDNA(生体内における ETs 産生の指標)を経時的に観察した(図 7)。

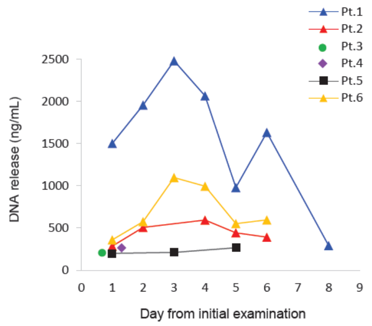

図 7. 横紋筋融解症患者における血中 dsDNA 濃度の経時的推移

横紋筋融解症惹起性 AKI モデルマウスにおいて観察された dsDNA 濃度の上昇は、ヒトにおいても同様に上昇していた。この dsDNA 濃度上昇は入院後治療を開始し、病勢が落ち着き腎機能障害が軽快するのと並行して軽減した。6 名の対象患者のうち特に著しく DNA 濃度上昇がみられたのは筋挫滅症候群(Crush 症候群)による横紋筋融解症患者であり、それ以外を原因とする横紋筋融解症患者(non-crush)と比較して統計学的有意に上昇がみられた(図 8)。

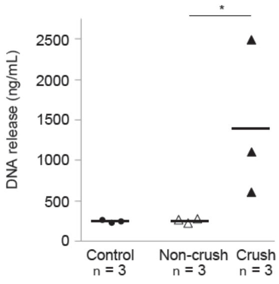

図 8. 横紋筋融解症患者における血中 dsDNA 濃度の比較

ヒトにおける ETs マーカーの上昇は、マウスで観察された横紋筋融解症惹起性 AKI の新たな発症機構であるヘム/血小板/Mac-1/METs 系がヒトにも同様に存在することを示すものであり、臨床医学的・創薬的観点から大きなインパクトを持つデータである。

我々は本研究によって、横紋筋融解症において大量に血中に流入したヘムが血小板を活性化させ、活性化血小板が Mφ由来 ETs 放出を促進させること、ETs が尿細管障害を増悪させる一因となっていること、この一連の過程は Mφ表面に発現した Mac-1 依存性であることを見出した (図 9)。また、我々の見出した新たな病態経路、ヘム/血小板/Mac-1/METs の一連の過程に対して Lf の投与が有効となる可能性が示唆された。

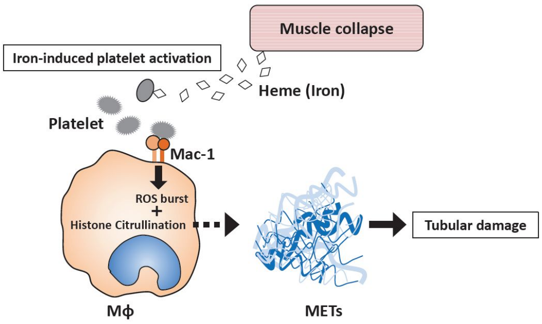

図 9.本研究成果の要約

本研究の今後の展望として最大の目標となるのが横紋筋融解症惹起性 AKI に対する新規治療法の開発である。研究背景に記載したように現在横紋筋融解症惹起性 AKI に対する治療は大量輸液及び腎不全に対する人工透析が主軸となっている。これらの治療は対症療法に過ぎず原因に対する根本的治療は現在のところ確立されていない。またこれら既存の対症療法でさえ災害現場においては困難であることが多く(医療物資が限られた状態となることや、物資の運搬が困難となることによる)、現在の医療は多くの腎不全患者を発生させ予後の改善に貢献できずにいる。

我々の新たに見出した一連の pathway は新たな創薬対象となる可能性があり、今後の災害医療に貢献することが期待される。

また本研究において観察された横紋筋融解症患者の ETs マーカー(dsDNA 濃度)の推移は病態と並行に変化していた。本研究を通して、この ETs マーカーの上昇が AKI 重症度と相関するのか、あるいは長期的な CKD への進展のリスクファクターとなり得るのか、病態の急性期に dsDNA 濃度を測定することで腎予後あるいは生命予後の予測が可能なのか、等のクリニカルクエスションが挙げられる。これらの疑問を臨床試験によって解明していくこともまた今後の展望として挙げたい。

〈引用文献〉

① De Meijer AR et al. Serum creatine kinase as predictor of clinical course in rhabdomyolysis: a 5-year intensive care survey. Intensive Care Med. 2003 Jul;29(7):1121-5

② Collins AJ. Kidney dialysis treatment for victims of the Armenian earthquake.N Engl J Med. 1989 May 11;320(19):1291-2.

③ Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. 2009 Jul 2;361(1):62-72.

④ Belliere J, Casemayou A, Ducasse L et al. Specific macrophage subtypes influence the progression of rhabdomyolysis-induced kidney injury. J Am Soc Nephrol. 2015 Jun;26(6):1363-77.

⑤ Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S et al. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. Circulation. 2009 Sep 29;120(13):1255-65.

⑥ Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M et al. Macrophage extracellular trap formation promoted by platelet activation is a key mediator of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. Nat Med, 24(2):232-238,2018
(図 1～9 は本論文より抜粋)

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　1　件）

1. 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. Nat Med, 24(2):232-238,2018
（査読有）
doi: 10.1038/nm.4462.

〔学会発表〕（計　1　件）

1. Okubo K, Hayashi M, Hirahashi J
Macrophage Extracellular Traps Induced by Mac-1 (CD11b/CD18) Dependent Platelet-Macrophage Interactions Promotes Acute Kidney Injury in Rhabdomyolysis
ASN Kidney Week 2016 (American Society of Nephrology) 2016 年 (oral)

〔図書〕（計　0　件）

〔その他〕

プレスリリース
横紋筋融解症（おうもんきんゆうかいしょう）による急性腎障害発症の新たなメカニズムを解明－発症予防の薬剤開発へつながる成果－
https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2018/1/9/28-39173/
慶應義塾大学医学部
2018 年 1 月 9 日

６．研究組織

(1)研究代表者
大久保　光修（OKUBO, Koshu）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研

　究員
　研究者番号：60749125

(2)研究分担者
　　　　　　　　(　　　)
　研究者番号：
(3)連携研究者
　　　　　　　　(　　　)
　研究者番号：

(4)研究協力者
　黒澤　美穂　(KUROSAWA, Miho)
　浦野　泰照　(URANO, Yasuteru)