

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82838

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05122

研究課題名（和文）炎症性組織レジリエンスにおける修復的マクロファージの役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the roles of restorative macrophages in inflammatory tissue resilience

研究代表者

新井 郷子 (Arai, Satoko)

一般社団法人AIM医学研究所・研究部門・副所長

研究者番号：60422276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、組織損傷を起因とした炎症の回復期に出現する修復的マクロファージの役割に注目し、その役割を明らかにすることで、炎症性組織レジリエンスにおける臓器横断的分子メカニズムの解明を目指した。特に修復的マクロファージが発現すると考えられるスカベンジングタンパク質AIM（遺伝子名CD5L）に着目し、脳梗塞、高眼圧症、自己免疫性関節リウマチ、腎障害等、様々な疾患におけるAIMとマクロファージの修復的役割について、損傷組織で発生するダメージ関連分子パターン（DAMPs）の貪食除去による組織の炎症収束の観点から解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症は外来病原体に対する生体防御システムとして、また非感染性炎症においては損傷組織の修復プロセスに重要なイベントであるが、その過程で炎症組織において起こる細胞死やそれにより放出されるDAMPsは炎症を遷延させ、組織修復を妨げると共に線維化の誘導にもつながることで、組織機能の損失を招く。従って、これらの死細胞由来炎症性物質の速やかな除去は疾患治癒の過程において重要である。この重要な役割を担う細胞である修復的マクロファージと分泌タンパク質AIMについて解析し、多様な組織に共通の炎症収束・組織修復メカニズムを明らかにすることは、炎症性疾患の制御の理解を深め、治療応用の基盤となる知見を与える。

研究成果の概要（英文）：We aimed to clarify the roles of restorative macrophages that emerge during the resolution phase of inflammation following tissue injury, to elucidate the trans-organ molecular mechanisms underlying inflammatory tissue resilience. In this study, we investigated the importance of the phagocytic removal of DAMP molecules by the scavenging protein AIM (gene name: CD5L) and restorative macrophages in resolving inflammation across various diseases, including ischemic stroke, ocular hypertension, autoimmune arthritis, and kidney diseases.

研究分野：疾患生命科学

キーワード：食細胞機構 修復的マクロファージ AIM

1. 研究開始当初の背景

組織損傷時、マクロファージを中心とした免疫細胞の動員により炎症反応が誘導される。しかし、組織のマクロファージは一様ではなく、炎症に伴い局所へ浸潤する単球由来マクロファージや、健常時から存在する組織固有の常在性マクロファージ、それらがさらに局所的な影響を受けて変容した多様なマクロファージサブセットがあり、それらは周囲と相互作用して正負両方の方向から炎症に関与する。近年、一細胞レベルの遺伝子発現解析により、傷害組織に集積する細胞集団の分類が可能になり、マクロファージの分類も進んだが、多様なマクロファージサブセットの実際の機能は十分に解明されておらず、また臓器横断的な知見はほとんどない。さらに、炎症収束後の組織においても、ある種のマクロファージを含む免疫細胞が炎症記憶として残存するが、その生理的意義には不明な点が多い。炎症収束後に正常な組織再生が誘導され健常時と同等まで回復するか、それとも再度炎症を誘発しダメージを蓄積して増悪化するかは、炎症収束の過程とその後の炎症記憶の状況に大きく依存するため、それらの分子メカニズムと予後の関係を理解することは、重要な疾患治療アプローチである。

本研究で注目する、健常時は肝臓や腹腔等の組織常在性マクロファージが発現する分泌型タンパク質 Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM; 遺伝子名 CD5L) は、Scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) スーパーファミリーに属し、C末端側の正電荷領域を介して、LPS等の病原体関連分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) や、死細胞デブリ・死細胞から放出されるダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns; DAMPs) 等の炎症性物質にブロードに結合し、同時に自らがスカベンジャー受容体に認識され貪食細胞に取り込まれることでこれらの除去を促進する。この機能は、死細胞が多量に発生する傷害急性期の炎症の鎮静化に寄与し、我々はこれまでに、脳梗塞 (Maehara N, *et al*, Cell Rep, 2021) や、急性腎障害 (Arai S, *et al*, Nat Med, 2016)、真菌性腹膜炎モデル (Tomita T, *et al*, Sci Rep, 2016) における AIM の組織回復への寄与を報告した。

2. 研究の目的

本研究では、炎症性疾患の回復期における修復的マクロファージ (Restorative macrophage) の出現と、それが産生する AIM の役割に焦点を置き、これまで臓器・疾患ごとに解析されてきた修復的マクロファージの存在を多様な疾患において検証し、その役割を明らかにすることで、炎症性組織レジリエンスにおける臓器横断的分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

修復的マクロファージおよび AIM とそれによる食細胞機構の組織の炎症収束における役割を臓器横断的に明らかにするために、下記に示す複数の炎症性疾患を病態モデルマウスを用いて解析した。

(1) 脳梗塞巣の修復的マクロファージの解析

健常時、マウスの脳内ミクログリアには AIM の発現はほとんど見られないが、マウスに中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion; MCAO) で病態を誘導すると、CD11b 陽性細胞において AIM の mRNA 発現が誘導されることを既に見出されていた (Maehara N, *et al*, Cell Rep, 2021)。しかしながら、その経時的变化や、発現する細胞種について、詳細は明らかにされていなかった。そこで、野生型マウスに MCAO 処置をして脳梗塞を誘導後、経時的 (0, 3, 7, 14, 28 日後) に脳梗塞組織から CD45 陽性細胞を単離し、single cell RNA-seq (scRNA-seq) を行うことで、脳梗塞におけるマクロファージサブセットの変化と AIM を発現する細胞サブセットの解析を行った。

(2) 高眼圧症における AIM およびマクロファージ、線維柱体細胞の役割の検討

さらに、マクロファージによる貪食が組織の恒常性維持に重要な器官として眼に注目した。前眼房を満たす房水は毛様体の血管から滲出され、シュレム管から外部へ流出するが、老化等を原因として食細胞機構が劣化して房水環流障害を引き起こすと高眼圧症を誘発する。そこで、野生型マウスの眼組織におけるマクロファージと AIM の局在を免疫組織化学染色により確認すると共に、それらの生理機能を解析した。また、ヒト線維柱体細胞の初代培養を行い、それによる虹彩色素上皮細胞デブリの貪食能を *in vitro* で解析した。

(3) 関節リウマチにおける AIM による炎症収束

自己免疫性関節リウマチは自己抗体の産生、関節の過形成と組織破壊を伴う滑膜の炎症を特徴とし、炎症期は、エフェクターリンパ球や自己抗体だけでなく、特に DAMPs によって促進される自然免疫の慢性的な活性化によって媒介される。AIM は DAMPs の除去による炎症抑制能を有す

るため、関節リウマチにおける AIM の病態抑制的役割を病態モデルを用いて検討した。本研究では、マウスに抗コラーゲン抗体のカクテル注射を行うことで関節炎を誘導し (collagen antibody-induced arthritis; CAIA)、組換え AIM タンパク質 (recombinant AIM; rAIM) の投与や AIM 欠損マウスと野生型マウスの比較を行い、関節炎のスコアリングや組織解析を行うことで、炎症制御における AIM の役割を解析した。

(4) 腎障害における AIM による炎症収束

AIM の腎障害における組織修復効果について、片側尿管結紮 (UUO) モデルにて検討を行った。野生型・AIM 欠損マウスに UUO を施術し、それぞれに AIM を 1 日おきに腹腔内投与して 12 日後に腎臓を採取して各種試験に供し、その効果を検証した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞巣の修復的マクロファージの解析

野生型マウスに MCAO 処置をして脳梗塞を誘導後、経時的 (0, 3, 7, 14, 28 日後) に脳梗塞組織から CD45 陽性細胞を単離し、scrRNA-seq を行った結果、その結果、まず、脳組織における CD11b 陽性マクロファージ系細胞は、脳梗塞の誘導とそれに伴う炎症とその後の炎症収束に伴い、その population の規模や質が大きく変遷することを明らかにした。さらに、興味深いことに AIM を発現する細胞は特定のサブセットに限られ、かつその中でもごく一部の細胞のみが AIM を発現していることが明らかになった。また、AIM 陽性 CD11b 陽性細胞 (AIM を発現するマクロファージ) において発現が見られる他の遺伝子群の解析を進め、脳梗塞時における修復的マクロファージの特性に関する知見を得た。

(2) 高眼圧症における AIM およびマクロファージ、線維柱体細胞の役割の検討

野生型マウスの眼組織を解析したところ、AIM は毛細血管、繊維柱体、網膜に局在し、それらは眼組織に存在する F4/80 陽性ミクログリアと共局在しており、AIM が生理的に眼の恒常性維持に関与していることを見出した。さらに、房水内の細胞デブリを処理すると考えられている線維柱体細胞における貪食能と AIM の関与を確認するため、ヒト線維柱体細胞の初代培養系を用い、当該細胞に虹彩色素上皮細胞のデブリを添加したところ、その貪食能を有し、さらに rAIM の添加がその貪食を増加させることを示した。これらのことから、前眼房において眼内ミクログリアが発現する AIM は繊維柱体による房水内の死細胞デブリの貪食除去に寄与し、炎症の抑制や組織の恒常性に寄与することが示唆された。

(3) 関節リウマチにおける AIM による炎症収束

マウスに CAIA で関節炎を誘導すると、AIM 欠損マウスは野生型マウスよりも滑膜過形成と骨びらんが大きく、多関節の腫れの悪化が持続的に見られた。また、CAIA を供した AIM 欠損マウスに rAIM を投与すると、関節炎進行に関与する主要な DAMPs である S100A8/9 や HMGB1 が疾患部位で減少したことを免疫組織化学染色で確認し、QPCR では各種炎症性サイトカインの発現が減少していたことから、rAIM の投与が DAMPs の貪食除去促進を介した炎症収束をもたらすことで関節炎の症状が著しく抑制されることが示された。

(4) 腎障害における AIM による炎症収束

野生型・AIM 欠損マウスに UUO を施術し、それぞれに rAIM を 1 日おきに腹腔内投与してその効果を検証した。12 日後、各遺伝子型、また AIM 投与の有無で腎組織の線維化の程度に差異はなかったものの、免疫組織化学染色の結果から、炎症性サイトカインや腎障害マーカー (KIM-1) が AIM 欠損マウスでより高発現し、AIM 投与群で抑制されていた。また、AIM の投与により酸化ストレスマーカー 4-HNE の低下がみられ、AIM による組織回復は食細胞機構活性化による炎症収束だけでなく、様々な経路を介して促進することが示唆された。

以上より、本研究では、組織損傷や組織機能劣化、自己免疫性等、多様な組織炎症において、DAMPs や死細胞デブリの除去による炎症収束はそれらの組織回復や恒常性維持に重要であることを示した。これらの炎症収束を担う分子の一つとして AIM が食細胞機構の活性化を介して関与し、またこれは、脳、眼、関節、腎臓等、臓器横断的な生理機能であることを示した。AIM は血中タンパク質であり、血流からの供給に加え、炎症組織に集積するマクロファージから産生されることで局所の炎症収束に寄与すると考えられるが、AIM を発現するマクロファージは一部のサブセットに限られ、それらは修復的機能を有するマクロファージであることが示唆された。これらの研究成果は、炎症性組織レジリエンス機構の分子メカニズム解明の一助となり、炎症性疾患に対する治療アプローチの基盤となる知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yasuda Keisuke, Shimodan Shieri, Maehara Natsumi, Hirota Aika, Iijima Ruka, Nishijima Akemi, Mori Haruka, Toyama Ran, Ito Atsumi, Yoshikawa Yuri, Arai Satoko, Miyazaki Toru	4. 巻 142
2. 論文標題 AIM/CD5L ameliorates autoimmune arthritis by promoting removal of inflammatory DAMPs at the lesions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 103149 ~ 103149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2023.103149	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 -

1. 著者名 Nemoto Hotaka, Honjo Megumi, Arai Satoko, Miyazaki Toru, Aihara Makoto	4. 巻 238
2. 論文標題 Apoptosis inhibitor of macrophages/CD5L enhances phagocytosis in the trabecular meshwork cells and regulates ocular hypertension	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 2451 ~ 2467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.31097	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 -

1. 著者名 新井郷子、宮崎徹	4. 巻 118
2. 論文標題 腎疾患におけるAIMの関与	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 アニムス	6. 最初と最後の頁 34-38
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 無
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 Matsuura Kyohei, Maehara Natsumi, Hirota Aika, Eguchi Ayaka, Yasuda Keisuke, Taniguchi Kaori, Nishijima Akemi, Matsunashi Nobuyuki, Shiga Yoshiyuki, Ishii Rumi, Iguchi Yasuhiro, Tanabe Kazunari, Arai Satoko, Miyazaki Toru	4. 巻 5
2. 論文標題 Two independent modes of kidney stone suppression achieved by AIM/CD5L and KIM-1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03750-w	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 -

1. 著者名 Wang CT, Tezuka T, Takeda N, Araki K, Arai S, Miyazaki T	4. 巻 16
2. 論文標題 High salt exacerbates acute kidney injury by disturbing the activation of CD5L/apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0260449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0260449	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13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Toru Miyazaki, Satoko Arai
2. 発表標題 Facilitation of disease repair through phagocytic removal of different inflammatory elements by AIM/CD5L
3. 学会等名 3rd RESOLUTION DAYS (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井郷子
2. 発表標題 血中タンパク質AIMの炎症性疾患における役割とその治療・診断応用
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toru Miyazaki, Satoko Arai
2. 発表標題 Facilitation of disease repair through phagocytic removal of different inflammatory organic wastes by AIM/CD5L
3. 学会等名 IUIS 2023, 18th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井和浩, 新井郷子, 宮崎徹
2. 発表標題 AIM/CD5L分子表面ネガティブ・チャージ・クラスターの機能解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井郷子
2. 発表標題 腎結石症改善に向けた最新知見 - 血中タンパク質AIMの結石抑制における新たな役割の発見 -
3. 学会等名 第14回日本臨床一般検査学会、第20回スキルアップ講習会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井郷子
2. 発表標題 血中タンパク質AIMによる炎症収束
3. 学会等名 第3回炎症収束研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 新井郷子
2. 発表標題 A role of the phagocytic removal system in resolution of inflammation and its therapeutic implication
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新井郷子
2. 発表標題 血中タンパク質AIMを用いた難治性慢性疾患に対する治療的・診断的応用
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoko Arai
2. 発表標題 Impact of circulating AIM on self-pathogen removal and its potential clinical applications
3. 学会等名 2022 Japanese-French Frontiers of Science Symposium (JFFoS) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Miyazaki, Satoko Arai
2. 発表標題 Phagocytic removal of body-derived inflammatory elements and disease repair promoted by AIM
3. 学会等名 EMBO Workshop; Phagocytosis of dying cells: Molecules, mechanisms, and therapeutic implications (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前原奈都美, 谷口香織, 新井郷子, 宮崎徹
2. 発表標題 AIM/CD5LによるDAMPsの除去を介した脳梗塞の病態改善
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ching Ting Wang, 手塚哲史, 竹田直樹, 荒木喜美, 新井郷子, 宮崎徹
2. 発表標題 高塩負荷は血中タンパク質AIM/CD5Lの活性化を妨げることにより急性腎障害を悪化させる
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井郷子
2. 発表標題 マクロファージ由来タンパク質AIMのセルフ・パソジェン除去機能を介した炎症収束～急性腎障害から脳梗塞まで～
3. 学会等名 千葉大学リーディング研究育成プログラム「希少・難治性疾患に対する革新的治療創生研究シンポジウム」(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腎臓結石の治療または予防剤	発明者 宮崎徹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/025598	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

学術変革領域B 炎症収束 https://www.ensho-shusoku.jp/

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
研究協力者	宮崎 徹 (Miyazaki Toru) (30396270)	一般社団法人A I M医学研究所・研究部門・所長 (82838)	
研究協力者	前原 奈都美 (Maehara Natsumi)	一般社団法人A I M医学研究所・研究部門・シニア・リサーチフェロー (82838)	
研究協力者	工藤 海 (Kudo Kai)	一般社団法人A I M医学研究所・研究部門・リサーチフェロー (82838)	
研究協力者	安田 圭佑 (Yasuda Keisuke)	一般社団法人A I M医学研究所・研究部門・リサーチフェロー (82838)	
研究協力者	根本 穂高 (Nemoto Hotaka)	東京大学・医学部附属病院 (12601)	
研究協力者	本庄 恵 (Honjo Megumi)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究協力者	相原 一 (Aihara Makoto)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	

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
---------	---------