

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461237

研究課題名(和文) IgA腎症におけるCX3CR1/FKN/AIM axisの役割の解明

研究課題名(英文) Clarification of the role of CX3CR1/FKN/AIM axis in IgA nephrology

研究代表者

中田 純一郎 (NAKATA, Junichiro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20365638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM/CD5L)が動脈硬化や肥満関連の自己免疫疾患脂肪分解やインスリン抵抗性、動脈硬化ばかりか、自己免疫疾患や肝癌のクリアランスに深く関わるのが最近の研究で明らかになってきた。さらに、最新では急性腎障害の病態に深く関わる事が判明した。我々は近年、早期に100%腎症を発症するモデルマウスを樹立した(grouped ddY; gddY)。今回、gddYマウスおよびAIM KOマウスを実験に用いて検討し、AIMはIgA腎症において沈着後の起炎性を規定する重要な分子であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Recent papers revealed that apoptosis inhibitor of macrophage (AIM; also called CD5L), plays important roles in atherosclerosis, obesity-associated autoimmunity, and clearance in hepatocellular carcinoma. Furthermore, the most recent investigated features are that AIM is involved in renal tissue repair, and pathology of acute kidney injury [AKI]. In this study, we found that AIM contributes to the pathogenesis of IgAN.

研究分野：腎臓内科

キーワード：IgA腎症 AIM マクロファージ 起炎性 gddY

## 1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は、腎系球体メサンギウム領域に IgA が優位に沈着するメサンギウム増殖性糸球体腎炎である。世界で最も頻度の高い原発性糸球体腎炎であり、本邦では毎年約 6000 人が腎生検により新規に診断される。本邦を含む東アジア地域に特に多い疾患である。また、IgA 腎症は未治療の場合、約 4 割は末期腎不全に至る予後不良の疾患であり、2015 年より指定難病の一つに追加された。約 30 万人の透析患者のうち、IgA 腎症に起因する患者は 10 万人以上いる可能性があり、年間 5000 億円以上の医療費が、IgA 腎症由来の透析患者に使われていることになる。病理組織学的定義は単純であるが、その臨床および組織像は多彩であり、病因は未だ不明であるため根治治療は存在しない。糸球体 IgA 沈着や血尿の出現が疾患の特徴であるものの、糸球体 IgA 沈着度合と疾患重症度は必ずしも相関しないことや、糸球体 IgA 沈着が果たして血尿を直接惹起しているのかなど、未だ不明な点は多い。

我々は近年、ddY マウスに腎生検を行い IgA 腎症を発症している個体を 20 代以上選択的に交配することで、より早期に 100%腎症を発症するモデルマウスを樹立した (grouped ddY; gddY) (Okazaki K. J Am Soc Nephrol. 2012)。gddY マウスの血清 IgA を正常マウスに投与すると、静注後 2 時間目で確認されるメサンギウム領域の IgA 免疫複合体は 24 時間後に消失するが、そのクリアランス機序も不明である。この gddY マウスは、patrolling monocyte (Gr1<sup>-</sup>/CD115<sup>+</sup>) という分画の monocytosis が生じていることがわかっている。興味深いことに、抗 APRIL 抗体を投与して糸球体 IgA の沈着を抑制すると、patrolling monocyte の割合が抑制された (Kim YG. PLoS One. 2015)。これらの結果より、糸球体 IgA 沈着は持続的に patrolling monocyte を誘導しており、これが monocytosis をきたしているということが示唆された。

一方、IgA 腎症における免疫細胞のホーミングが近年注目されている。ケモカインとそのケモカイン受容体は特定の免疫細胞のホーミングにおいて重要な役割を担っている。フラクタルカイン (FKN) は CX3CR1 の唯一のリガンドであり、このケモカインは化学誘引物質として作用するばかりでなく、CX3CR1<sup>+</sup> 細胞に対して細胞接着分子としても機能する。

組織マクロファージの一部は内皮細胞を這いながらパトロールを行い、炎症や感染制御に関わることが知られている (Frank L. Immunity. 2010)。このパトロール行動は CX3CR1 に依存していることが判明した。

IgA 腎症の肉眼的血尿出現時には糸球体内皮・上皮細胞の CX3CR1 のリガンドである FKN の発現が増強していることも判明している (Sharon N. Kidney Int. 2012)。この CX3CR1

陽性パトローリングモノサイトは、マウスでは LY6c(Gr1<sup>-</sup>)/CCR2/L-セレクチン、ヒトでは CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> という表現型を有することが知られている。

近年、apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) というタンパクがマクロファージを介して我々の全身で様々な働きを担っていることが注目されている。AIM は様々なアポトーシス誘発刺激からマクロファージを守る apoptosis inhibitor として 1999 年に宮崎らによって報告された (Miyazaki T. J Exp Med. 1999)。Scavenger receptor cysteine-rich superfamily の一つであり、liver X receptor/retinoid X receptor 二量体の核受容体による転写調節のもとマクロファージが特異的に産生する分子量約 50kDa の分泌型タンパク質である。

脂肪分解やインスリン抵抗性、動脈硬化ばかりか、自己免疫疾患の発症に深く関わることが最近の研究で明らかになってきた。さらに、IgA 腎症モデルマウスの腎組織において糸球体 IgA と一致してメサンギウム領域および内皮細胞領域に AIM の過剰な共沈着が認められており、IgA 腎症との深い関連が示唆される。

## 2. 研究の目的

以上より「糸球体上皮下/内皮下に focal/segmental に恒常的に供給・沈着する糖鎖異常 IgA および免疫複合体は FKN/CX3CR1 axis において起炎症あるいは除去が決定され、AIM はその制御分子として働いている」と考える。

本研究では、IgA 腎症における IgA の糸球体沈着後の炎症・進展機序への CX3CR1/FKN/AIM axis の関与を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 【概要】

#### (1) IgA 腎症モデルを用いた CX3CR1/FKN/AIM axis の解明

AIM KO マウス (Kurokawa J. Cell Metab. 2010) と、IgA の沈着により腎症を来することが知られている 6-19 Tg (Otani M. J Am Soc Nephrol. 2012) マウスを用いる。両マウスを交配させ、AIM KO かつ 6-19 Tg のマウス (AIM 非存在下 IgA 腎症モデル) を作製する。腎組織での病変および血清を評価する。

さらに、AIM KO マウスに我々が近年樹立した IgA 腎症自然発症マウス (gddY マウス) の血清および B 細胞より作成した hybridoma 由来の腎炎惹起性 IgA を投与し、腎症の進展を評価する。

#### (2) IgA 腎症患者における CX3CR1/FKN/AIM axis の解明

扁桃摘出およびステロイドパルス治療前後における末梢血での CX3CR1、血中・

尿中での FKN および AIM の相関を検討する。また、IgA 腎症疾患活動性(臨床データ)と末梢血 CX3CR1+/CD14lowCD16+単球量の相関性の検討や、IgA 腎症組織重症度と腎 CX3CR1+/CD14lowCD16+の関連性の検討を行う。

#### 【動物実験研究】

##### 1 AIM KO かつ 6-19 Tg マウス による解析

AIM KO マウスと腎臓への IgA 沈着により腎炎を起こし IgA 腎症モデルの一つである 6-19 IgA transgenic マウスを交配し、F2 以降で AIM KO/6-19 Tg マウスを作製する。AIM, 6-19 Tg の発現有無はそれぞれのプロトコールに従いゲノムタイピングを行う。

各週齢で sacrifice を行い、下記評価を行い AIM の役割を解析する。

##### 1-1. 腎組織の形態学的観察

- i. 光学顕微鏡：PAS・PAM・ASAN・Masson-Trichrome 染色における継時的な腎組織像の変化を観察する。また、CX3CR1 および FKN の染色も確認し、発現部位および経過を評価する。
- ii. 免疫染色：IgA および IgM の沈着を評価する。

##### 1-2. 末梢血における蛋白発現の評価

全血から peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を分離し、単球における Gr1-/CD11b+, CX3CR1 の発現を FACS およびリアルタイム PCR で解析をする。

##### 1-3. 血清学的評価

血清 Cre および FKN、尿中 FKN、潜血および蛋白を継時的に観察し、AIM の有無による相違を解析する。

##### 2 AIM KO マウスへの IgA 打ち込みによる評価

##### 2-1 ddY マウス血清の打ち込み

我々は ddY マウスの中で 100% IgA 腎症を発症する grouped ddY 系を樹立した。中でもより早期に腎症を発症し、腎予後がより不良な系(B line)も樹立しており同マウスの血清を利用する(Okazaki K. J Am Soc Nephrol. 2012)。

- ・ Grouped ddY B line マウスの血清を AIM KO マウスおよび AIM WT (B6) マウスへ静脈内投与する。
- ・ 投与前に 1 匹、2・4・8・12・24 時間後にそれぞれ 2 匹ずつ sacrifice を行い、腎組織を評価する。

光学顕微鏡・免疫染色：前頁 1-1. と同様の項目を評価する。

電子顕微鏡：deposit の沈着を評価する。

##### 2-2. IgA 産生 hybridoma の上清の投与

- ・ 我々は grouped ddY マウスの脾臓 B 細胞から、腎炎惹起性 IgA 産生 hybridoma クローンを複数作成した。同 hybridoma から

産生される上清の IgA を使用する。この実験により、ddY マウスの血清投与よりも純度の高い起炎性 IgA を投与することができる。

- ・ 上記 2-1 と同様の手法で AIM KO マウスおよび AIM WT (B6) マウスに投与し、解析を行う。

##### 2-3. IgA 産生 hybridoma の腹腔内投与

- ・ 2-2 で用いた hybridoma を腹腔内に投与する。この実験により、糖鎖異常 IgA の持続的投与が実現し、慢性経過を評価できる。単回投与にあたる上記 2-1.2-2 と比較検討する。

#### 【臨床研究】

平成 26 年～28 年度内に当院にて IgA 腎症と診断された患者で扁桃摘出やステロイドパルスなどの治療前の患者(n=15)の血液・尿サンプルを採取する。同患者を追跡し、治療終了後の血液・尿サンプルも採取する。

##### 1. IgA 腎症患者に対する扁桃摘出・ステロイドパルス治療前後における血中および尿中 FKN・AIM、末梢血中 CX3CR1+/CD14lowCD16+単球の解析

治療前後の血清・尿を凍結保存する。これを用いて血清中・尿中 FKN・AIM を ELISA で測定する。また、採血直後に PBMC を分離し、FACS およびリアルタイム PCR で CX3CR1+/CD14lowCD16+単球の解析を行う。

##### 2. 臨床データ(疾患活動性)とパトリージングモノサイト量との相関性の検討

上記 1. で得た CX3CR1+/CD14lowCD16+単球の程度と血尿・蛋白尿・腎機能など疾患活動性の相関性を検討する。

##### 3. 組織重症度と腎 CX3CR1・CD16・CD14 の関連性の評価

当院で行った腎生検組織標本を参照し、総糸球体数、硬化病変、癒着病変、半月体病変の数、予後分類を抽出する。腎生検時のパラフィン未染切片を用いて、酵素抗体法で CXCR1 の発現を評価する。両者の関連性の有無を解析する。

##### 4. 研究成果

- ・ gddY マウスならびにヒト IgA 腎症の腎組織において、糸球体 IgA と一致して AIM の過剰な共沈着を認めた。さらに、IgA・AIM 沈着部位に AIM+マクロファージの遊走像を確認した。
- ・ gddY マウス由来腎炎惹起性 IgA を WT および AIMKO マウスに静脈内注射すると、AIMKO マウスでは沈着が明らかに遷延した (Fig.1)。
- ・ また、WT では AIM+マクロファージが糸球体毛細血管腔に遊走・増加し、逆に WT で macrophage を枯渇させると糸球体 IgA 沈着が遷延したことから、マクロファージが AIM を介してクリアランスに深く関わ

ることが示唆された。なお、IgA の単発投与では炎症へは進展しなかった。

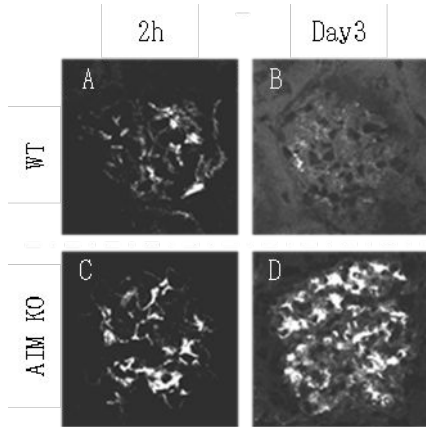


Fig.1 AIM 欠失マウスの糸球体では IgA が除去されないことを発見 (写真 D)。

- ・ 当初、AIM KO マウスと 6-19Tg マウスを掛け合わせ、AIM KO かつ 6-19 Tg のマウス (AIM 非存在下 IgA 腎症モデル) を作成する予定であったが、CRISPR/Cas9 法により AIMKO gddY マウスの作成に成功したため、現在同マウスの樹立・解析を優先している。上記の通り、AIM がこの沈着後の除去過程の鍵を握る分子であることを見出している。AIMKO gddY の解析をさらに進めることで、炎症起点における AIM の役割さらには AIM の治療応用についてさらに検討していく。

## 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)

Arai S, Kitada K, Yamazaki T, Takai R, Zhang X, Tsugawa Y, Sugisawa R, Matsumoto A, Mori M, Yoshihara Y, Doi K, Maehara N, Kusunoki S, Takahata A, Noiri E, Suzuki Y, Yahagi N, Nishiyama A, Gunaratnam L, Takano T, Miyazaki T. AIM/CD5L enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury. Nat Med. 2016 Feb;22(2):183-93. doi: 10.1038/nm.4012. Epub 2016 Jan 4.

### [学会発表](計 4 件)

Akiko Takahata, Kento Kitada, Chieko Nogi, Satoko Arai, Yuko Makita, Hitoshi Suzuki, Junichiro Nakata, Satoshi Horikoshi, Toru Miyazaki, Yusuke Suzuki. Key role of Apoptosis Inhibitor of Macrophage in Phlogogenic Action of Glomerular Nephritogenic IgA in IgA Nephropathy. ASN Kidney Week 2015 Annual Meeting. San Diego. 2015.11.5-8

Akiko Takahata, Kento Kitada, Chieko Nogi, Satoko Arai, Yuko Makita, Hitoshi Suzuki, Junichiro Nakata, Satoshi Horikoshi, Toru Miyazaki, Yusuke Suzuki. AIM (CD5L) Regulates Glomerular IgA Deposition and Its Phlogogenicity in IgA Nephropathy. 53rd ERA-EDTA. VIENNA. 2016.5.21-24  
Akiko Takahata, Kento Kitada, Chieko Nogi, Satoko Arai, Yuko Makita, Hitoshi Suzuki, Junichiro Nakata, Satoshi Horikoshi, Toru Miyazaki, Yusuke Suzuki. Key role of Apoptosis Inhibitor of Macrophage in Phlogogenic Action of Glomerular Nephritogenic IgA in IgA Nephropathy. 15th APCN Annual Scientific Meeting. Perth. 2016.9.17-21

高畑 暁子、北田 研人、禾千 絵子、新井 郷子、牧田 侑子、鈴木 仁、中田 純一郎、堀越 哲、宮崎 徹、鈴木 祐介. AIM/CD5L は IgA の沈着と起炎性を制御する. 第 59 回 日本腎臓学会学術総会. 横浜. H28.6.17-19

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 純一郎 (NAKATA, Junichiro)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20365638

### (2) 研究分担者

鈴木 祐介 (SUZUKI, Yusuke)  
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 70372935

### 富野 康日己 (TOMINO, Yasuhiko)

順天堂大学・医学部・名誉教授  
研究者番号: 60130077

### (3) 研究協力者

新井 郷子 (ARAI, Satoko)  
宮崎 徹 (MIYAZAKI, Toru)  
高畑 暁子 (TAKAHATA, Akiko)