

論文の内容の要旨

【論文題目】 血中 AIM と IgM 間の結合・解離性の腎疾患における重要性に関する研究

【氏名】 杉澤 良一

急性腎障害 (AKI: acute kidney injury) は対症療法によって治療可能ではあるものの、高い致死率と慢性腎臓病 (CKD: chronic kidney disease) へのリスクファクターとして知られる病態である。現状では腎疾患に対する根治療法は存在せず、従って AKI に対する新規治療法の開発は単に致死率の高い AKI への治療に貢献するのみに留まらず、CKD の抑制につながることも期待される。

我々は近年 AIM (Apoptosis inhibitor of macrophage) がヒトやマウスにおいて AKI 時における自己治癒機構を担っていることを見出した。AKI の特徴的な病理学的所見は、尿細管上皮細胞の障害によって生じた、脱落した壊死細胞塊による尿細管管腔の閉塞である。この閉塞は糸球体濾過量の減少や尿細管上皮細胞の二次的な炎症、間質の線維化へと繋がり、病態を増悪させる。AIM は血中に存在するタンパク質であり、健常時は IgM 五量体と結合して安定化し、単量体ではほぼ存在しない。この複合体は分子量が大きく糸球体濾過膜を通過できないため、AIM は尿中に移行せず血中濃度が維持される。AKI を発症すると、未知のメカニズムによって AIM は IgM から解離して Free AIM (IgM から解離して単量体の状態で存在する AIM) となって糸球体濾過膜を通過して尿細管管腔内へと到達し、管腔中に蓄積した壊死細胞塊へと付着する。障害を受けた尿細管上皮細胞は KIM-1 (Kidney injury molecule -1) を尿細管管腔側の細胞表面に発現するが、この KIM-1 は AIM のリガンドであり、KIM-1 は AIM の認識を通じて、尿細管上皮細胞による壊死細胞塊の貪食を促進する。この結果、壊死細胞塊の早期除去が進み、尿細管上皮細胞の再生が促され、早期回復が生じる。実際に、野生型マウスに両側腎動静脈虚血再灌流法 (IR: ischemia / reperfusion) によって AKI を誘導すると自己治癒によって回復し、高い生存率を維持できる。一方で、AIM 欠損マウスに IR によって AKI を誘導すると、野生型マウス以上に腎障害の増悪が認められ、そのほとんどが致死に至る。また、この AIM 欠損マウス AKI モデルに対して AIM を静脈注射によって投与すると、野生型マウスと同様の回復と生存率の改善が認められた。以上から、AIM が腎障害からの自己治癒機構を担うことが示され、さらには AIM を標的とした新規治療法の開発が有望であることが示唆された。

AIM は組織マクロファージが産生する分泌タンパク質であり、N 末端におけるシグナルペプチドと、3つの SRCR (scavenger receptor cysteine-rich) ドメインをもつことを構造上の特徴とし、SRCR superfamily に属している。これまでに腎疾患の他、肥満やインスリン抵抗性、動脈硬化症、自己免疫疾患、非アルコール性脂肪肝などへの関与が明らかとなっている。

本研究では、腎疾患の好発動物として知られるイエネコに着目した。ネコは加齢に伴い

30% 以上が CKD に罹患すると言われるが、その好発原因は不明であり、ヒト同様に根治療法は存在しない。ネコにおける原因不明の好発疾患として、腎疾患の他に肥満や脂肪肝なども挙げられるが、これらは AIM と関わりの深い疾患であり、ネコにおける疾患発症と AIM の関連性が疑われた。

これまでにネコの AIM に着目した研究は行われておらず、AIM のアミノ酸配列も不明であった。このため、ネコ脾臓由来 cDNA を用いてネコ AIM のクローニングを行った。また、得られた配列を用いてリコンビナント AIM (rAIM) タンパク質を作製し、これを抗原とすることで抗ネコ AIM 抗体を作製した。得られた抗体を用いて健常ネコ血中の AIM を検出した結果、ネコでは分子量の異なる 2 種類の AIM が見出された。すなわちネコでは通常の 3 つの SRCR ドメインをもつ 3-SRCR AIM の他に、SRCR1 ドメインを 2 つ繰り返し、計 4 つの SRCR ドメインをもつ 4-SRCR AIM が存在することが明らかとなった。

腎疾患と AIM の関連性を明らかにするため、まず作製した rAIM を用いて機能解析を行った。腎疾患における AIM の機能性で重要な点は、壊死細胞塊に付着して、KIM-1 を介した尿細管上皮細胞による壊死細胞塊の貪食を促進し、早期の除去を促すことである。*in vitro* 実験において、AIM を壊死細胞塊に付着させ、KIM-1 を強制発現させた尿細管上皮細胞由来株化細胞における貪食を比較した結果、ネコの AIM は 3-SRCR、4-SRCR のいずれもマウス AIM と同等の貪食促進機能を有することが示された。同様にネコ KIM-1 についても AIM を認識して貪食をする機能性を有すると考えられた。また、ネコ AIM とマウス KIM-1 といった動物種の異なる組み合わせにおいても、その機能性は保全されていた。

次に、ネコ *in vivo* における AIM と AKI の関与を検討するため、IR によってネコに AKI を誘導し、解析を行った。まず血中 AIM の動態を検討した結果、ネコではマウス・ヒトと異なり AKI 時に AIM が IgM から解離せず、Free AIM の増加が認められなかった。さらには腎組織における検討から、ネコでは AIM が尿細管管腔内に到達しておらず、管腔内に蓄積した壊死細胞塊への AIM の付着も認められなかった。ネコ AKI モデルでは AKI からの回復傾向も認められず、以上の結果からネコでは AIM を介した自己治癒機構が欠損していることが示唆された。また血中での AIM の IgM からの不解離性は AKI を自然発症したネコにおいても確認されており、AKI の原因に依存するものではないと考えられた。なお、AKI を発症したネコの腎臓では KIM-1 は正常に発現しており、AIM が尿細管管腔内に到達すれば自己治癒機構が働く可能性も示唆された。

ネコのみにおいて AKI 時に AIM が IgM から解離しない原因を明らかにするため、AIM と IgM 間の親和性 (結合の強さ) を検討した。AIM は、IgM の Fc 領域に結合することが知られている。このため表面プラズモン共鳴 (SPR : surface plasmon resonance) 法によって AIM と IgM-Fc 五量体との親和性を測定し、ネコとマウスで比較を行った。この結果、ネコ AIM とネコ IgM-Fc 間の親和性は、マウス間の親和性に比べて、約 1000 倍強かった。これは 3-SRCR、4-SRCR のいずれにおいても同様であり、ネコでは AIM と IgM 間の結合が非常に強力であることが示された。また、この高親和性はネコ AIM とマウス IgM-Fc 間

の結合でも認められたことから、ネコ AIM に起因して高親和性が生じていると考えられた。すなわち、ネコ特異的に生じる AIM と IgM 間の高親和性が、AKI 時において AIM が IgM から解離しない要因と考えられた。

別の研究結果より AIM は IgM に対して SRCR3 ドメインを介して結合することが示唆されている。ネコ特異的な AIM と IgM 間の高親和性について、より詳細な解析を行うため、ネコ・マウス・ヒトそれぞれの SRCR3 ドメインのホモロジーモデリングを行い検討した。アミノ酸による電荷の分布を比較したところ、ネコではマウスやヒトでは存在しない正電荷クラスターを形成することが見出された。AIM 同様に IgM-Fc に結合することが知られている補体 C1q では正電荷クラスターが結合に関与していることが知られている。このため、ネコ AIM における正電荷クラスターが結合に及ぼす影響を検討するため、SRCR3 ドメインをネコからマウスに置き換えたキメラ AIM と、正電荷クラスターを形成する 3 つのアルギニンをそれぞれ対応するマウスのアミノ酸に置換したネコ AIM 変異体を作製し、親和性の検討を試みた。SPR 法では非特異反応が大きく測定できなかったため、代替法として IgM-Fc への結合量を比較した結果、キメラ AIM、AIM 変異体いずれも野生型のネコ AIM と比べて結合量が半減し、親和性の減弱が認められた。従って、ネコ AIM では SRCR3 ドメインにおける特異的な正電荷クラスターによって IgM に対する高親和性を獲得していると考えられた。

このネコ AIM 特異的な高親和性が *in vivo* において腎疾患の増悪に結びつくのか、マウスを用いて検討した。マウス AIM プロモーター下でネコ AIM を発現する遺伝子改変マウスを作成し、これを AIM 欠損マウスと交配することで、マウス AIM を欠損し、ネコ AIM のみを発現する AIM ネコ化マウスを作成した。AIM ネコ化マウスに IR によって AKI を誘導すると、ネコ同様に血中での AIM の IgM からの解離は認められず、尿細管腔内への AIM の到達も認められなかった。すなわち、ネコでの表現型が再現された。この AIM ネコ化マウス AKI モデルでは、野生型マウスとは異なって AKI からの回復は認められず、day3 までに全ての個体が死亡した。これは AIM 欠損マウスと同様の結果である。このことから、AIM と IgM の高親和性は、AKI 時における AIM の IgM からの不解離性の要因となり、その結果 AIM を介した腎障害からの自己治癒機構を欠損させることが示された。ネコにおいても同様に治癒機構が欠損していると考えられる。

最後に AIM ネコ化マウス AKI モデルに対し、AIM の投与による治療効果を検討した。AIM ネコ化マウスに AKI を誘導した後、day1, day2, day3 に静脈投与によって AIM の投与を行った結果、野生型マウスと同等の水準まで腎障害からの改善と生存率の回復が認められた。これは尿細管腔中に到達する AIM を補うことで、自己治癒機構を働かせることができることを意味しており、ネコにおいても AIM の投与によって同様の治療効果を期待できる。

以上から本研究では、ネコ AIM の特異的な性質に起因した、ネコにおける腎疾患自己治癒機構の欠損を新たに見出した。その原理は AIM と IgM 間の高親和性によって、AKI 時

に AIM が腎臓の尿細管に到達しないことに起因する。すなわち、腎障害時には AIM が IgM から解離し、十分量の AIM が尿細管管腔内に到達することが、この自己治癒機構において必須であることを示唆している。これらの結果は、ネコにおいて腎疾患が好発する要因の一つとして、腎障害からの十分な回復が促されにくくリスクが増大している可能性を示している。加えて、本研究で示した AIM の IgM からの解離の重要性はヒト AKI においても、AIM の投与に加えて、内在性の AIM の解離を促すことが治療に繋がる可能性を示唆し、IgM から AIM の解離を誘導することによる新規根治療法開発の可能性を提示するものである。