

第 38 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞記念講演 1

Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice

北田 研人*^{1,2} 新井 郷子*¹ 宮崎 徹*¹

Kento KITADA, Satoko ARAI, and Toru MIYAZAKI

はじめに

Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM)は組織マクロファージにより発現・分泌される血中蛋白質である。われわれは、いまだ確固たる治療法が存在しない急性腎障害(AKI)に対して、AIMがAKI後の腎組織障害の治癒を誘導する重要な因子であることを見出した¹⁾。特に、AIMによる死細胞の除去誘導機能は腎臓病治療薬開発のブレイクスルーとなる可能性がある。

AIM

AIMは、マクロファージの細胞死を抑制する作用を持つ分子として同定された血中蛋白質である²⁾。われわれはこれまでの研究により、さまざまな現代病の発症・進展にAIMが関与しており、血中AIM量をコントロールすることで疾患の予防や治療が実現できる可能性を報告している。例えば、生体内においてAIMが不足すると、肥満³⁾、脂肪肝⁴⁾、肝臓癌⁴⁾などを増悪させる可能性がある。また、肥満などの代謝異常がベースにあるうえでAIMが過剰に存在すると、動脈硬化⁵⁾、糖尿病⁶⁾、自己免疫疾患⁷⁾などの原因となる可能性が示唆されている。一方、腎臓におけるAIMの機能・役割は不明である。本研究では、腎虚血再灌

流(ischemia/reperfusion : I/R)モデルマウスおよびAKI患者の検体を用いて、AKIにおけるAIMの役割を検討した。

AIMはAKI後の腎組織修復を誘導する重要な因子

まず、AIM欠損マウスおよびその野生型マウスに対して、I/Rモデル(両腎動静脈虚血:30分)を作製し、AKIの発症・進展過程におけるAIMの役割を検討した。急性障害期である再灌流1日後において、腎機能の低下(血中尿素窒素および血中クレアチニンの上昇)や尿細管壊死を主とする腎組織障害は、両マウス間に差は認められなかった。よって、I/Rによる腎障害の急性期では、AIMは腎障害に影響を与えないものと考えられる。AKI後の修復・再生期において、野生型マウスは、再灌流3日後から7日後まで腎機能の回復、尿細管壊死領域の減少、およびそれに伴う腎組織障害の改善などが継続して認められた。これに対してAIM欠損マウスでは、再灌流3日後から7日後において腎機能の回復および尿細管壊死領域の減少がみられず、生存率も著しく低下し、AKIからの回復・再生が認められなかった。これらの実験結果より、AIMは、AKIからの修復・再生を誘導する重要な因子である可能性が考えられた。

AKIにより、血中AIMはIgM五量体から解離し、尿中へ排泄され、尿細管腔内の死細胞領域に集積

AIMによるAKIからの修復・再生メカニズムを解明するために、AKI時の腎臓におけるAIMの作用部位を免疫染色

*¹ 東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター分子病態医科学部門、*² 現所属: Division of Clinical Pharmacology, Vanderbilt University Medical Center

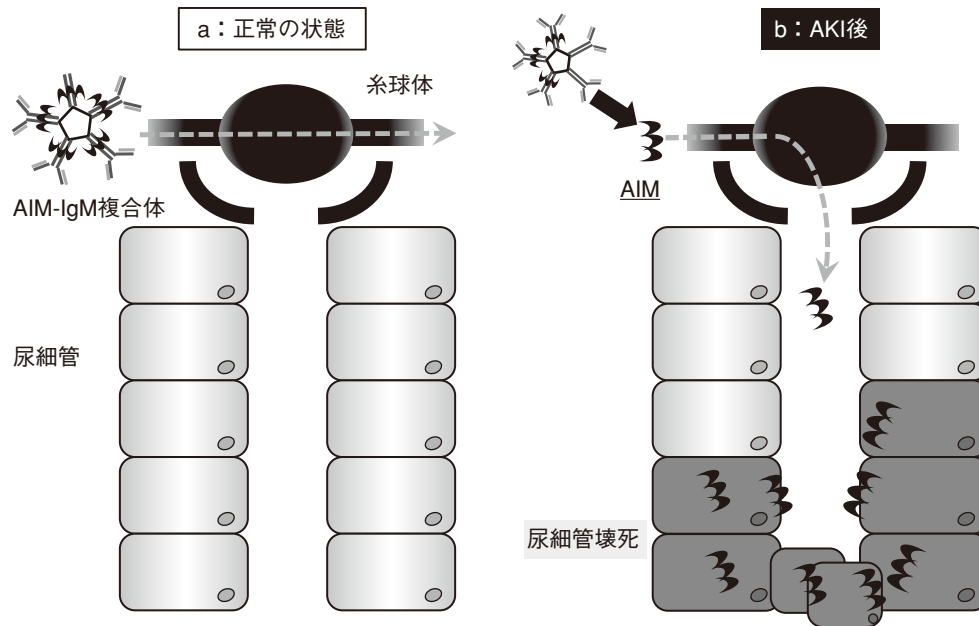


図1 血中 AIM は AKI 後に IgM 五量体から解離する

a: 正常の状態。血中 AIM は IgM 五量体と複合体を形成, AIM は尿中に排泄されない。
b: AKI 後。血中 AIM は IgM 五量体から解離, AIM は尿中に排泄され死細胞に集積

により検討した。I/R 後のマウスの腎臓において、AIM は尿細管の管腔内に蓄積している死細胞領域に集積していることが明らかとなった。ヒトにおいても同様であり、AKI 患者の腎臓の検体において、尿細管管腔内の死細胞領域で AIM が陽性となることがわかった。

一方、AIM がどのように尿細管管腔内の死細胞領域に到達するのか、そのメカニズムについても検討を行った。通常、ヒトおよびマウスの血中 AIM は、IgM 五量体に結合し、巨大な蛋白質複合体を形成しているため(分子量 > 600 kDa)、腎臓の糸球体で濾過されず、尿中へ排泄されない⁷⁾。IgM がいないマウスでは、AIM は IgM 五量体と蛋白質複合体を形成できないため、血中で AIM は free AIM (分子量約 40 kDa) として存在し、腎糸球体から濾過され、尿中へと排泄される⁷⁾。AKI が血中 AIM へ与える影響を Western blot 法によって解析したところ、正常マウスの血中では、AIM のほとんどは IgM と結合しており、600 kDa 以上のバンドとして検出された。これに対して AKI 後の血中では、IgM と結合していない分子量約 40 kDa である free AIM のバンドが増加することがわかった。したがって、AKI 発症により血中の AIM は IgM 五量体から解離し、free AIM となって尿中へ排泄されている可能性が考えられた。実際に、尿中 AIM 濃度を ELISA 法によって測定したところ、正常マウスと比較して、I/R を施したマウス(再灌流 1 日後)では尿中

AIM 濃度が顕著に増大していた。また、回復期(再灌流 7 日後)においては、尿中 AIM 濃度が正常値レベルまでに減少した。なお、ヒトにおいても同様の結果が得られており、健常人の血中 AIM は IgM との複合体として検出され、血中 free AIM および尿中 AIM はほとんど検出できなかったのに対し、AKI 患者では、血中 free AIM および尿中 AIM 濃度の顕著な増大が認められた。これらの実験結果から、AKI により、何らかの理由で血中 AIM は IgM 五量体から解離し、尿中へ排泄され、尿細管管腔内の死細胞領域に AIM が集積することが示唆された(図 1)。

AIM による AKI の治癒誘導メカニズム—AIM は KIM-1 のリガンドとなり、死細胞の除去を誘導—

AKI の特徴の一つに、壊死した尿細管細胞が尿細管基底膜から剥離・脱落し、尿細管管腔を閉塞させ、腎機能を低下させることがあげられる。AIM は、AKI 後の腎臓において尿細管壊死領域に集積していることから、われわれは、死細胞に付着した AIM が貪食細胞への目印となり、死細胞の除去を誘導することで腎臓組織障害からの修復・再生を促しているのではないかと考えた。一方、Bonventre らの研究グループは、障害を受けた尿細管細胞は、kidney injury molecule-1 (KIM-1) を発現し、尿細管細胞がセミプロ

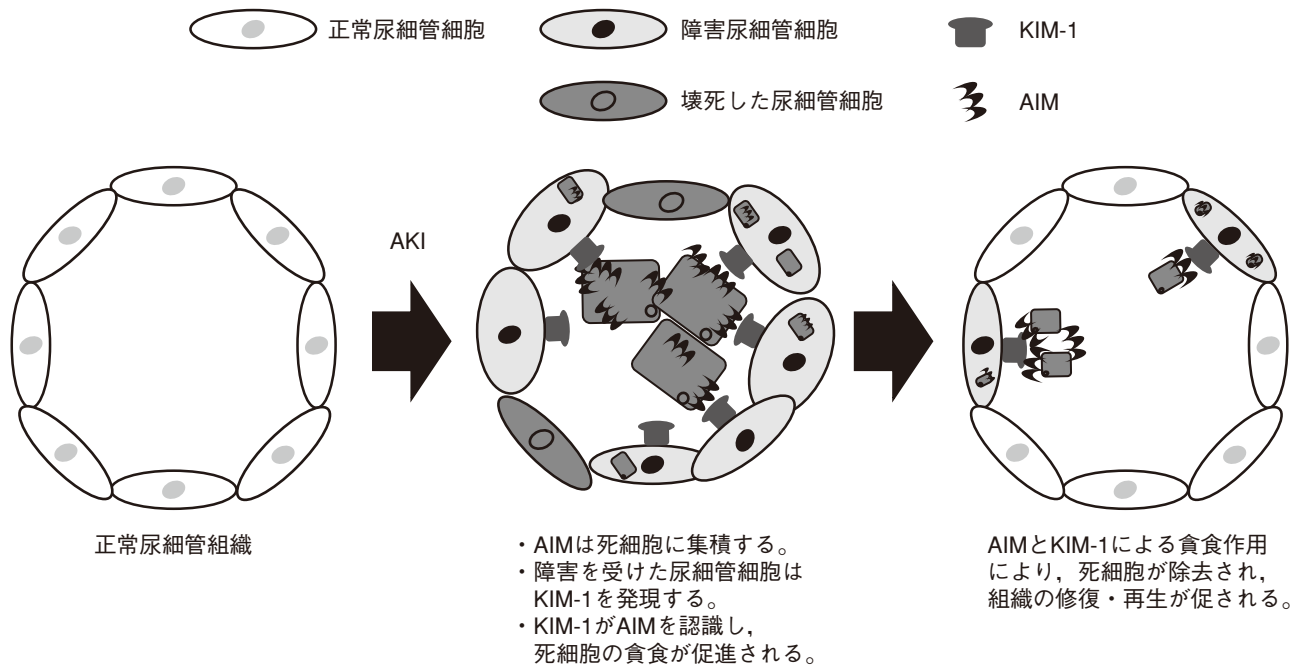


図2 AIMとKIM-1による死細胞の除去

フェッショナルな貪食細胞へ変化し、KIM-1を介して尿細管管腔内の死細胞を phagocytosis により除去していることを報告している^{8,9)}。そこでわれわれは、AIMが貪食細胞の phagocytosis を亢進させるか、また、KIM-1と相互作用があるかについて検討を行った。まず、免疫染色により AIM および KIM-1 の局在を確認したところ、AIM が付着した尿細管管腔内の死細胞を KIM-1 陽性細胞が取り囲み、さらに、AIM が付着した死細胞が KIM-1 を介して取り込まれている様子が見られた。なお、本現象は AKI 患者の腎臓検体においても認められた。これらの結果より、AKI によって障害を受けた尿細管細胞は KIM-1 を発現し、KIM-1 と AIM の相互作用を介して、管腔内の死細胞を貪食している可能性が考えられた。

さらに詳細な KIM-1 と AIM の相互作用を解析するため、*in vitro* の実験を行った。KIM-1 を強制発現させた HEK293T 細胞を作製し、AIM との相互作用を検討したところ、AIM は KIM-1 と結合すること、さらに、AIM が KIM-1 を介して細胞内へ取り込まれることがわかり、AIM が KIM-1 のリガンドとして作用することが明らかとなった。次に、AIM が KIM-1 による死細胞の phagocytosis を亢進させるかどうかについて検証した。培養マウス近位尿細管細胞である mProx24 細胞に KIM-1 を強制発現させ、そこへ蛍光標識した死細胞(mProx24 細胞を加熱・粉碎し壊死させたもの)を

加え、KIM-1 発現 mProx24 細胞の死細胞に対する貪食能を解析した。AIM のない死細胞に比べ、あらかじめ AIM を付着させておいた死細胞を加えた場合は、mProx24 による死細胞の貪食効果が著しく上昇することが明らかとなった。さらに、rAIM 投与による AKI の治療効果は(後述)、KIM-1 欠損マウスでは認められなかったことから、AIM による死細胞の除去およびそれに伴う AKI の治癒には、KIM-1 が必須であることが示唆された。以上の結果より、AIM は KIM-1 のリガンドとして作用すること、また、死細胞に AIM が付着することで、KIM-1 を介した死細胞の貪食効率が增大することが示された(図2)。

AIM 投与による AKI の治療効果

最後に、リコンビナント(r)AIM を投与することで死細胞の除去を誘導し、AKI の治療が可能かどうか検討した。I/R を施した AIM 欠損マウスに対して、再灌流 1~3 日後に rAIM(1mg/日、i.v.)を投与したところ、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)投与群と比較して腎機能の回復、尿細管管腔内の死細胞の除去およびそれに伴う腎組織障害の修復・再生が見られ、生存率も約 60% から 100% に改善した。野生型マウスにおいては、より重篤な AKI モデルを作製し(両腎動脈虚血:36分)、再灌流 1~3 日後における rAIM 投

与(1 mg/日, i.v.)の治療効果を検証した。PBS 投与群と比較して, rAIM 投与群では, 生存率は0%から80%に劇的に改善し, また, 死細胞の除去も促進され, AKI後の腎組織障害が軽減されていることが観察された。これらの結果より, AIM 投与による死細胞の除去誘導作用がAKIに対する新しい治療標的となる可能性が考えられた。

おわりに

AIMは, AKI時に血中のIgM五量体から解離してfree AIMとなって尿中へ排泄され, 尿管管腔内の壊死細胞に集積することが明らかとなった(図1)。また, 死細胞に付着したAIMは, KIM-1発現尿管細胞の目印となり, AIMがKIM-1のリガンドとなることで死細胞のphagocytosisを亢進させ, 死細胞を速やかに除去することで, AKIからの腎組織修復および腎機能回復を促すことが示された(図2)。死細胞除去の遅延・不全は, 組織に二次的な炎症や線維化を惹起し, 腎障害の修復・再生を減弱させる可能性がある。よって, AIMによる死細胞の認識・除去機構を標的としたAKIに対する全く新しい治療法の開発が期待できる。また, free AIMや尿中AIM濃度が, 新しいAKIの発症および予後予測マーカーとなる可能性も考えられ, 今後の臨床研究が期待される。

利益相反自己申告: 申告すべきものなし

文献

1. 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. Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice. *Nat Med* 2016 ; 22 : 183-193.
2. Miyazaki T, Hirokami Y, Matsuhashi N, Takatsuka H, Naito M. Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily. *J Exp Med* 1999 ; 189 : 413-422.
3. Kurokawa J, Arai S, Nakashima K, Nagano H, Nishijima A, Miyata K, Ose R, Mori M, Kubota N, Kadowaki T, Oike Y, Koga H, Febbraio M, Iwanaga T, Miyazaki T. Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. *Cell Metab* 2010 ; 11 : 479-492.
4. Maehara N, Arai S, Mori M, Iwamura Y, Kurokawa J, Kai T, Kusunoki S, Taniguchi K, Ikeda K, Ohara O, Yamamura K, Miyazaki T. Circulating AIM prevents hepatocellular carcinoma through complement activation. *Cell Rep* 2014 ; 9 : 61-74.
5. Arai S, Shelton JM, Chen M, Bradley MN, Castrillo A, Bookout AL, Mak PA, Edwards PA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, Miyazaki T. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpa/Api6 in atherosclerosis development. *Cell Metab* 2005 ; 1 : 201-213.
6. Kurokawa J, Nagano H, Ohara O, Kubota N, Kadowaki T, Arai S, Miyazaki T. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 12072-12077.
7. Arai S, Maehara N, Iwamura Y, Honda S, Nakashima K, Kai T, Ogishi M, Morita K, Kurokawa J, Mori M, Motoi Y, Miyake K, Matsuhashi N, Yamamura K, Ohara O, Shibuya A, Wakeland EK, Li QZ, Miyazaki T. Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells. *Cell Rep* 2013 ; 3 : 1187-1198.
8. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 1657-1668.
9. Yang L, Brooks CR, Xiao S, Sabbisetti V, Yeung MY, Hsiao LL, Ichimura T, Kuchroo V, Bonventre JV. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J Clin Invest* 2015 ; 125 : 1620-1636.