

# 横紋筋融解症による急性腎障害における DNA を介した炎症の制御

駒田敬則 Chintogtokh Baatarjav 高橋将文

自治医科大学分子病態治療研究センター炎症・免疫研究部

key words : 横紋筋融解症, 急性腎障害, マクロファージ, AIM2, パイロトーシス

## 要 旨

横紋筋融解症による急性腎障害 (rhabdomyolysis-induced acute kidney injury; RIAKI) では、二本鎖 DNA が血液中に遊離して腎障害を起こす。本研究ではマウス RIAKI モデルを用い、二本鎖 DNA を感知する absent in melanoma 2 (AIM2) と炎症性細胞死であるパイロトーシスの、RIAKI への関与を検討した。細胞外二本鎖 DNA は RIAKI の炎症・尿細管傷害に関与していることがわかった。しかし AIM2 欠損マウスを用いた検証では、AIM2 は尿細管傷害には関与せず、回復期の炎症と線維化に関与していた。野生型マウスでは、マクロファージのパイロトーシスが示唆された。AIM2 欠損マウスでは、RIAKI 後のマクロファージ細胞死が少なく、浸潤マクロファージの増加に関与すると考えられた。二本鎖 DNA で誘導されるパイロトーシスはマクロファージで広範に起きうるが、マクロファージの分化状態によっては、必ずしも炎症性サイトカインを放出しない。マクロファージ細胞死が RIAKI 回復期の炎症沈静化に関わる可能性があり、AIM2 が RIAKI の治療標的として期待される。

## 1 目 的

急性腎障害 (acute kidney injury; AKI) は、急激に腎機能が低下し、窒素含有老廃物が全身に貯留して生命に関わる症候群である。わずかな血清クレアチニンの上昇が患者の予後悪化に関わり、重症 AKI や繰り返す AKI が慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD)

に移行し、末期腎不全に至りうるということが明らかになっている<sup>1)</sup>。横紋筋融解症は AKI の原因の一つであり、横紋筋融解症による AKI (rhabdomyolysis-induced AKI; RIAKI) は市中 AKI の 5~15% を占める。横紋筋の死細胞内容物であるヘム蛋白が流出して腎に到達することで、尿細管腔を閉塞して AKI が惹起されると考えられてきたが、近年、血液中に遊離した二本鎖 DNA が、RIAKI の病態に関与することが報告された<sup>2)</sup>。この二本鎖 DNA が、遠隔臓器である腎にどのように傷害を起こすかは未だ明らかではない。

生体内の危険信号を感知する細胞質内パターン認識受容体 (PRR) は、CKD を含めた無菌性炎症の病態に関与する<sup>3)</sup>。PRR のうち NLRP3 や AIM2 は、アダプター分子 ASC とカスパーゼ 1 と共にインフラマソームと呼ばれる蛋白質複合体を形成する。これによるカスパーゼ 1 活性化が、強力な炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  を活性化・分泌して炎症を誘導する。同時に、ガスダーミン D (gasdermin D; GSDMD) を切断して N 末端断片が細胞膜に孔を形成することで細胞死 (パイロトーシス; pyroptosis) が誘導される。

我々はこれまで、NLRP3 インフラマソームが AKI・CKD に関与することを報告してきた<sup>4,5)</sup>。さらに二本鎖 DNA センサーである AIM2 についても、浸潤したマクロファージが、壊死細胞 DNA を取り込んで AIM2 インフラマソームを活性化し、CKD 進展に働くことを見出した<sup>6)</sup>。そこで我々は、壊死横紋筋から遊離した二本鎖 DNA が AIM2 インフラマソームを活性化する危険信号として働いて RIAKI に関与すると

いう仮説を立て、それを検証した。

## 2 方法

### 2-1 動物実験

RIAKI における AIM2 の役割を明らかにするために、8~10 週の雄性マウス (C57BL/6J) に対し、24 時間絶飲後 50% グリセロール 5 mL/kg を両側大腿筋に筋注し、RIAKI の病態を解析した。野生型 (WT), AIM2 ノックアウト (AIM2<sup>-/-</sup>) について両者を比較した。また WT マウスにおいて、グリセロール投与 2 時間前に DNase-I (Sigma) を 10 KU, グリセロール投与後からは 12 時間ごとに 50 KU を腹腔内投与した。マウスを屠殺後、血液と腎臓を採取し、解析した。

### 2-2 細胞実験

マウスから骨髄細胞を分離して 15% L929 馴化培地で 7 日間培養し、骨髄由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophage; BMDM) を得た。二本鎖 DNA は、poly (dA:dT) (Invivogen) 2  $\mu$ g/mL を Lipofectamine 2000 (Thermo) で導入した。

## 3 結果と考察

- ① グリセロール誘導性 RIAKI モデルにおいて、投与 1・3 日後の腎機能 (血清 BUN, クレアチニン) および血清 LDH を測定した (図 1)。1 日目で腎機能低下と LDH 上昇を認めたが、血中二本鎖 DNA を分解する DNase-I を投与したところ、LDH に差を認めず、腎機能低下が有意に抑制された。腎尿細管傷害マーカーである KIM-1 染色、およびマクロファージマーカーの F4/80 染色にて、DNase-1 は有意に尿細管傷害とマクロファージ浸潤を抑制した。したがって、血中二本鎖 DNA は腎尿細管傷害と炎症両方に関与することが示唆された。
- ② 細胞質内で二本鎖 DNA を感知する AIM2 に着目し、その欠損マウス (AIM2<sup>-/-</sup>) と野生型マウスに RIAKI を誘導し、その表現型を比較した (図 2)。筋障害を示す LDH と血中二本鎖 DNA 濃度、早期の腎機能低下に有意差を認めなかった。しかし腎機能回復期である 3~7 日目の BUN 回復は、AIM2<sup>-/-</sup> で有意に遅れることがわかった。腎

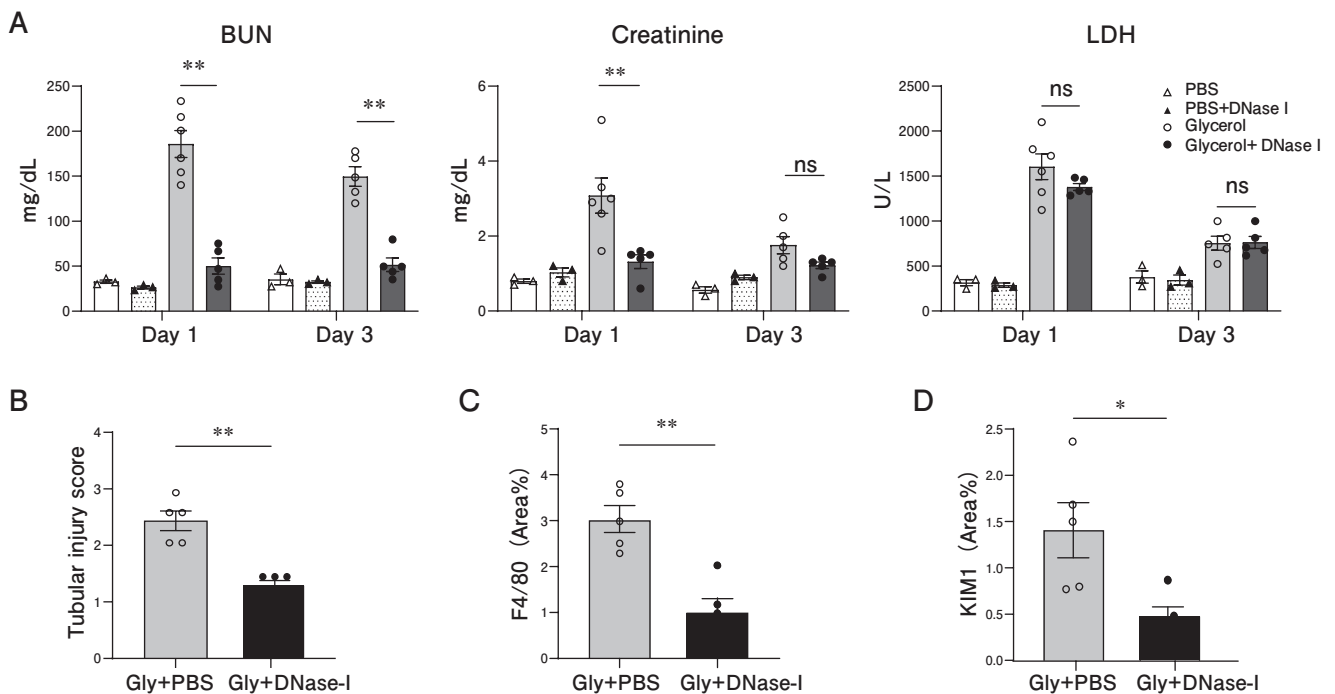


図 1 DNase-1 は RIAKI を改善する

野生型マウス RIAKI モデルにおいて、DNase-1 をグリセロール (Gly) 投与前、後から 12 時間毎に投与した。A) 血清 BUN (mg/dL), クレアチニン (mg/dL), LDH (U/L) を測定した (n=3-6)。B) 3 日目の腎組織を PAS 染色し、腎傷害スコアを算出した (n=5)。C) 腎組織でマクロファージの免疫染色を行い (F4/80), その面積を算出した (n=5)。スケールは 20  $\mu$ m。データは平均  $\pm$  SD で、one-way ANOVA もしくは t 検定で比較した。

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

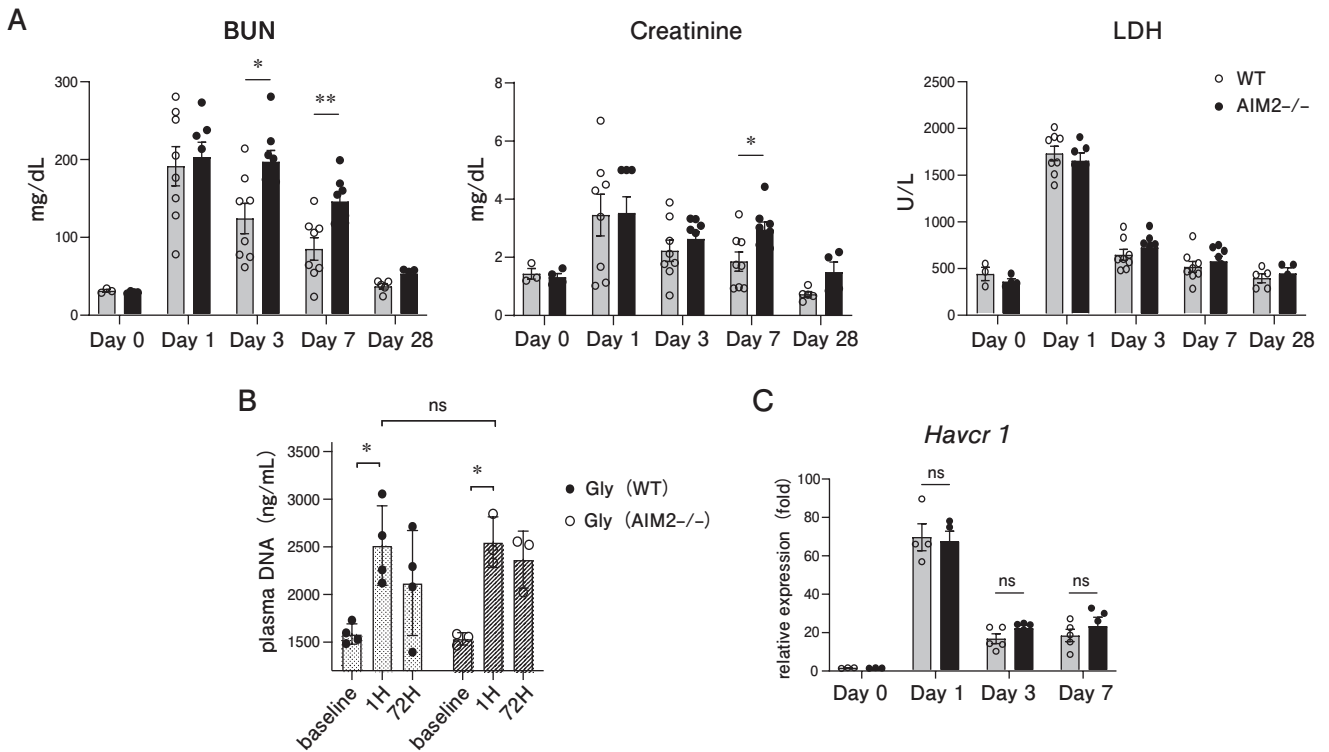


図2 AIM2欠損で回復期の腎機能回復が遅延する

RIAKI モデルにおいて、野生型 (WT) と AIM2<sup>-/-</sup> を比較した。A) 血清 BUN (mg/dL), クレアチニン (mg/dL), LDH (U/L) を測定した (n=3-8)。B) 血漿中 DNA を測定した (n=3)。C) リアルタイム RT-PCR にて、RIAKI 腎の *Havcr1* (KIM-1) 遺伝子発現を測定した (n=3-5)。データは平均±SD で、one-way ANOVA もしくは t 検定で比較した。\* p<0.05, \*\* p<0.01。

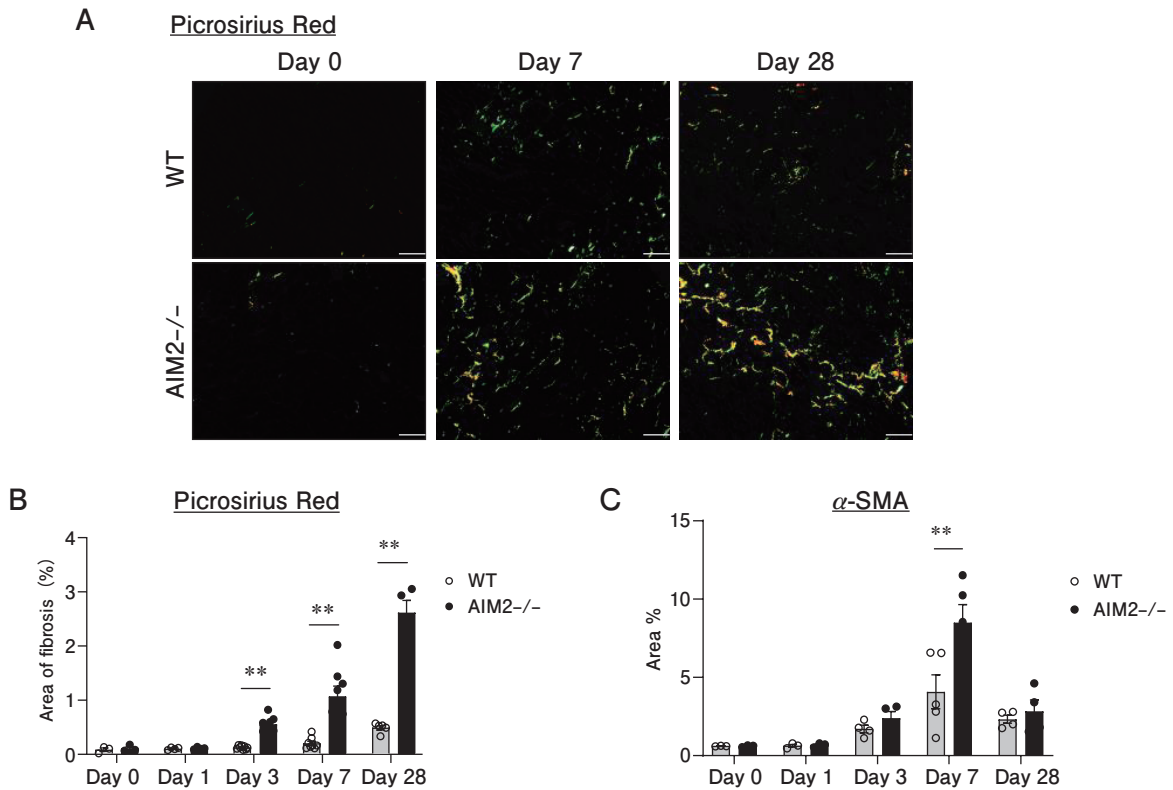


図3 AIM2欠損でRIAKI後の線維化が増悪する

A) RIAKI モデルの腎組織を Picosirius red 染色し、偏光顕微鏡で観察した。スケールは 50 μm。B) Picosirius red 染色の線維化面積を算出した (n=3-8)。C) 筋線維芽細胞のマーカーである α-SMA の免疫染色を行い、その面積を算出した (n=3-5)。データは平均±SD で、one-way ANOVA もしくは t 検定で比較した。\* p<0.05, \*\* p<0.01。

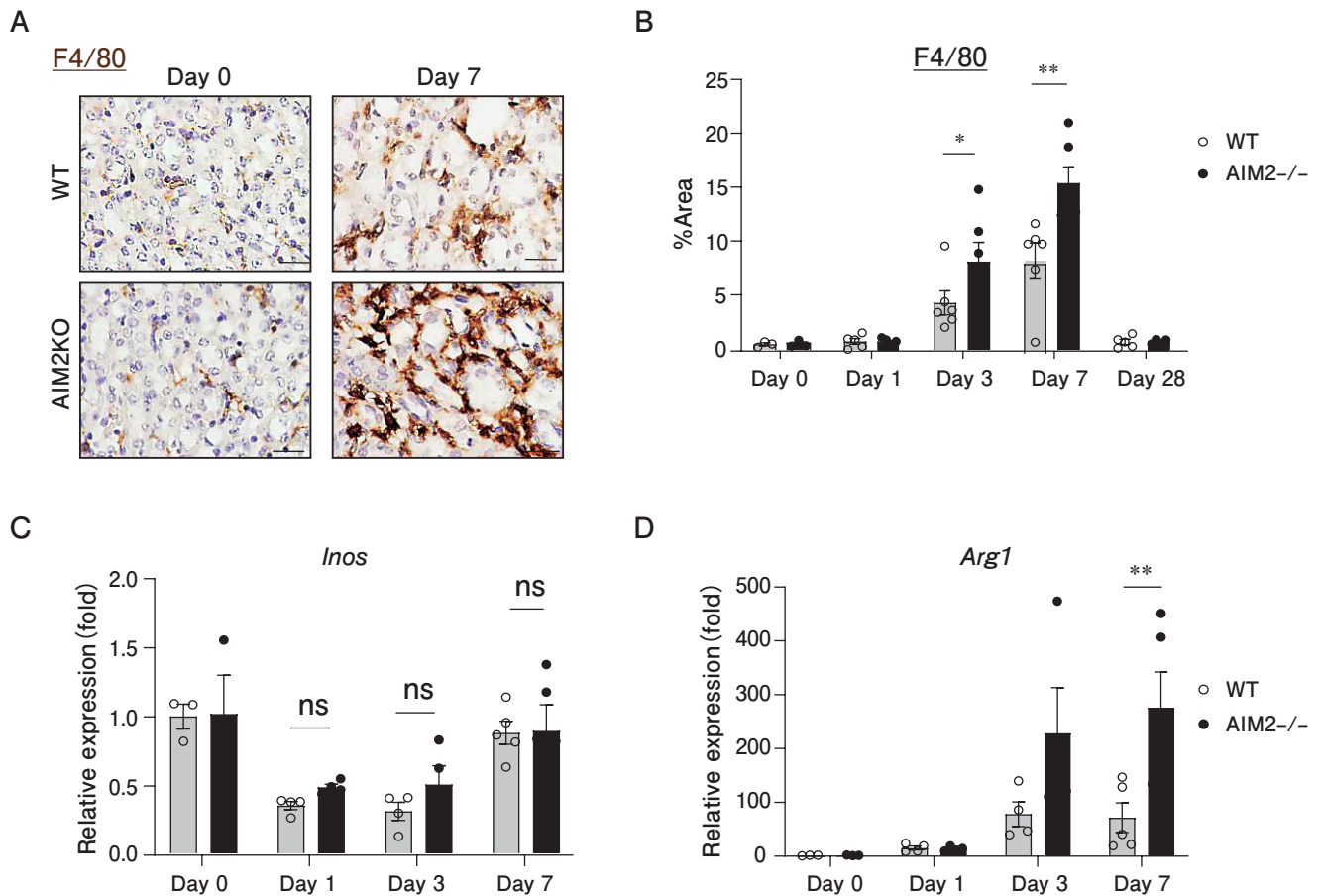


図4 AIM2欠損でRIAKI後の浸潤マクロファージが増加する

A) RIAKIモデルの腎組織でマクロファージの免疫染色を行った (F4/80)。スケールは20 $\mu$ m。B) F4/80陽性細胞の面積を定量化した (n=3-6)。C) D) 腎のInosおよびArg-1の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRにて測定した (n=3-5)。データは平均 $\pm$ SDで、one-way ANOVAもしくはt検定で比較した。\* p<0.05, \*\* p<0.01。

KIM1 (遺伝子名: *Hacvr1*) に差は認められず、AIM2は尿管管傷害に関与せずに腎機能回復期に関わることが示唆された。

- ③ 尿管管間質の線維化を評価するため、Picosirius Red染色と $\alpha$ -SMA (筋線維芽細胞マーカー)染色を行ったところ、AIM2<sup>-/-</sup>では有意に線維化が悪化することが判明した (図3)。
- ④ RIAKI回復期におけるマクロファージ浸潤変化を評価するため、F4/80染色を行った (図4)。3~7日目のマクロファージ浸潤はAIM2<sup>-/-</sup>で著明に増加しており、これが線維化に影響しうると考えられた。炎症性マクロファージであるM1マーカーの*iNos*、炎症後の組織修復に関わるM2マーカーの*Arg1*の遺伝子発現を解析したところ、7日目でM2マクロファージが増加していることがわかった。これはフローサイトメトリーでも確認された。以上より、AIM2が炎症細胞浸潤とM2マクロファージ分化に寄与することが示唆さ

れた。

- ⑤ 炎症細胞は傷害臓器に浸潤するが、局所で増殖・細胞死をすることでも制御される<sup>7,8)</sup>。マクロファージ細胞死をフローサイトメトリーで評価したところ、5日目で有意に野生型で細胞死が増えることが判明した (図5)。腎では主としてマクロファージで発現するGSDMDのプロセッシングをウェスタンブロットティングで確認したところ、AIM2<sup>-/-</sup>よりも野生型でGSDMDが活性化されることがわかった。細胞死で非特異的に検出されるTUNEL染色を行ったところ、マクロファージの細胞死が野生型で多く認められた。以上よりRIAKI回復期において、GSDMD依存的なパイロトーシスが野生型のマクロファージで見られるものの、AIM2<sup>-/-</sup>では抑制されていることが示唆された。
- ⑥ マクロファージを含めた骨髄性細胞において、パイロトーシスは周囲に炎症を誘導すると考えら

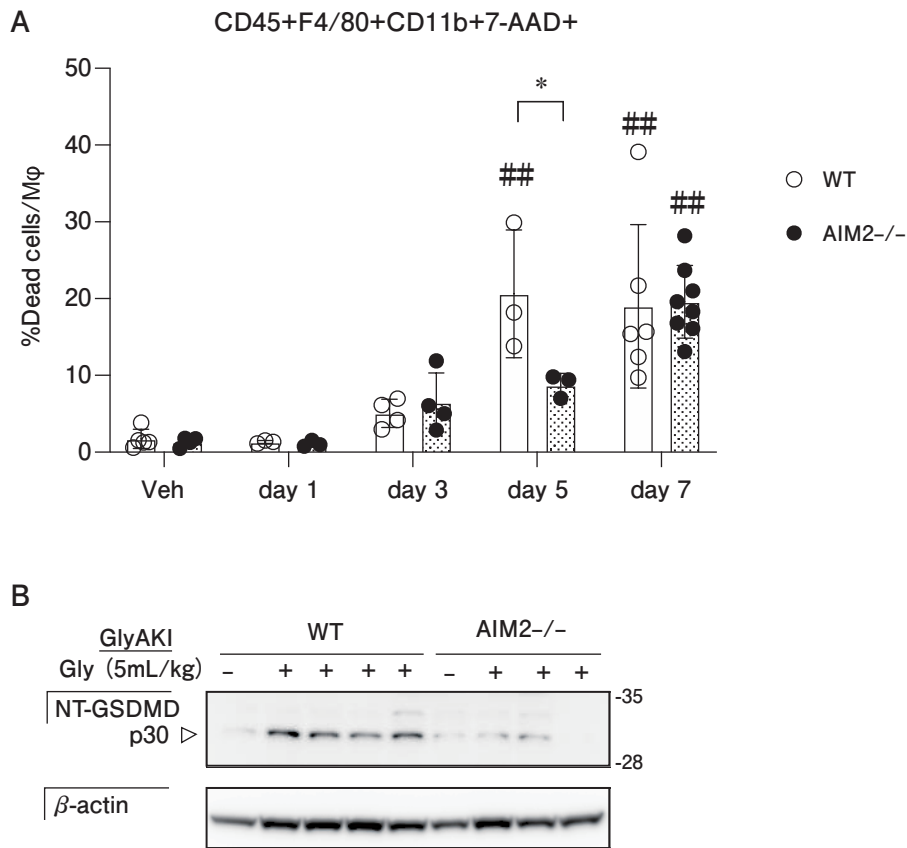


図5 AIM2欠損でRIAKI後のマクロファージでパイロトーシスが抑制される

A) RIAKI腎で炎症細胞を抽出し、フローサイトメトリーで解析した。CD45+F4/80+CD11b+のマクロファージのうち、死細胞(7-AAD+)の割合を算出した。データは平均±SDで、one-way ANOVAで比較した。B) RIAKI腎組織のアミノ末端ガスダーミンD (NT-GSDMD)をウェスタンブロッティング法で解析した。\* p<0.05, \*\* p<0.01, ## p<0.01 vs コントロール (Veh)。

れている<sup>9)</sup>。死細胞内容物が分解されずにそのまま流出するのみならず、活性化されたIL-1 $\beta$ が放出されることで、周囲に炎症を惹起する。マウスBMDMを用いて二本鎖DNAを導入し、細胞死を誘導した(図6)。二本鎖DNA導入に反応して野生型BMDMでは細胞死が誘導されたが、AIM2-/-では細胞死が抑制された。その細胞死は未分化マクロファージ(M0)でも、M1・M2マクロファージでも同様に誘導された。一方で、IL-1 $\beta$ 流出はM1でのみ認められ、M0およびM2マクロファージでは認められなかった。この細胞死とIL-1 $\beta$ 放出はAIM2依存性であった。以上より、二本鎖DNAによるパイロトーシスはマクロファージ全般に起きるものの、その炎症惹起性はM1マクロファージに限定している可能性が示唆された。

#### 4 結論

我々はマウスRIAKIモデルを用いて、AIM2インフラマソームとパイロトーシスの寄与を検討した。本研究により、細胞外二本鎖DNAがRIAKIの炎症・尿細管傷害に関与していることがわかった。しかしAIM2は尿細管傷害には関与せず、回復期の炎症(M2マクロファージ分化)と線維化に関与していた。RIAKIではAIM2依存のマクロファージ細胞死が認められ、パイロトーシスが示唆された。二本鎖DNAで誘導されるパイロトーシスはマクロファージで広範に起きうるが、マクロファージ細胞死がRIAKI回復期の炎症沈静化に関わる可能性がある。

本研究により、RIAKI後のCKD進展過程にAIM2が寄与することがわかり、治療標的として期待される。

平成30年度日本透析医会公募研究助成によって得られた成果は、原著論文として学術誌に投稿予定であ

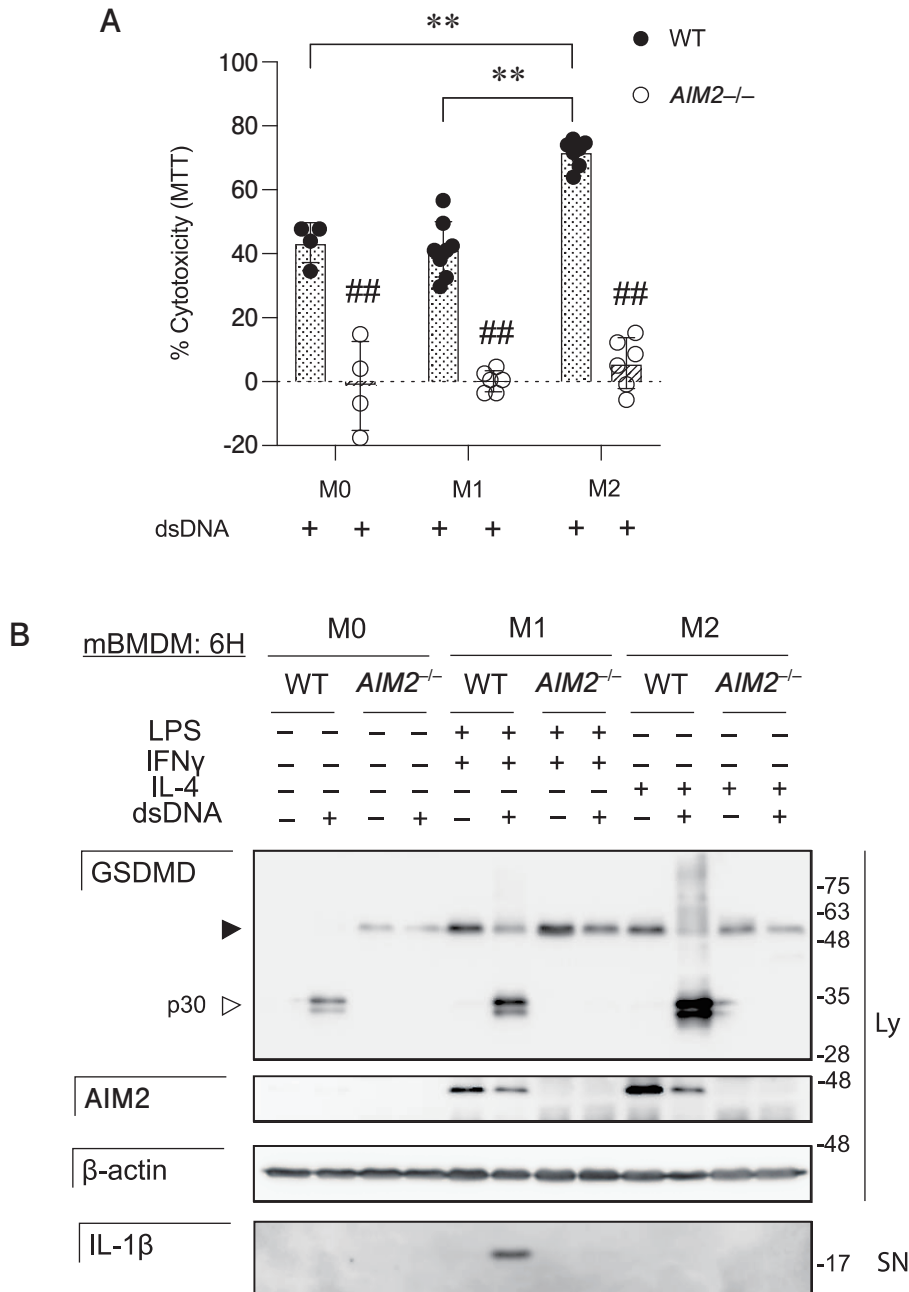


図6 DNAは様々に分化したマクロファージでパイロトーシスを誘導する

WT, AIM2<sup>-/-</sup>マウスから骨髓細胞を分離してマクロファージ (BMDM) を得た (M0)。さらに LPS/インターフェロン $\gamma$  で M1 様に, インターロイキン-4 で M2 様に分化させた。A) BMDM に二本鎖 DNA を導入して細胞死を誘導し, MTT アッセイで評価した。B) BMDM に二本鎖 DNA を導入し, 細胞溶解液 (Ly) と培養上清 (SN) を得て, ウェスタンブロットング法でガスターミン D (GSDMD), AIM2, インターロイキン-1 $\beta$  を検出した。内部標準として  $\beta$ -actin を用いた。データは平均 $\pm$ SD で, one-way ANOVA で比較した。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , ##  $p < 0.01$  vs WT.

る。二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を記載した。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1) Okusa MD, Chertow GM, Portilla D, et al. : The Nexus of Acute Kidney Injury, Chronic Kidney Disease, and World Kid-

ney Day 2009. Clin J Am Soc Nephrol 2009; 4 : 520-522.

2) 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 2018; 24 : 232-+.

3) Komada T, Muruve DA : The role of inflammasomes in kidney disease. Nat Rev Nephrol 2019; 15 : 501-520.

4) Komada T, Usui F, Shirasuna K, et al. : ASC in renal collecting duct epithelial cells contributes to inflammation and injury

- after unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol* 2014; 184 : 1287-1298.
- 5) Komada T, Usui F, Kawashima A, et al. : Role of NLRP3 Inflammasomes for Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury. *Sci Rep* 2015; 5 : 10901.
  - 6) Komada T, Chung H, Lau A, et al. : Macrophage Uptake of Necrotic Cell DNA Activates the AIM2 Inflammasome to Regulate a Proinflammatory Phenotype in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29 : 1165-1181.
  - 7) Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, et al. : Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19 : 1166-1172.
  - 8) Martinet W, Coornaert I, Puylaert P, et al. : Macrophage Death as a Pharmacological Target in Atherosclerosis. *Front Pharmacol* 2019; 10.
  - 9) Rothlin CV, Hille TD, Ghosh S : Determining the effector response to cell death. *Nat Rev Immunol* 2020.