

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 腎線維化を誘導する M2 マクロファージの極性化機構の解析

氏名 篠田 祥希

論文内容の要旨

マクロファージは組織の微小環境の変化に応じて、大きく分けて M1 型と M2 型の 2 種類のサブタイプに極性化し、炎症や感染防御もしくは恒常性の維持に関与する。慢性腎臓病において生じる組織硬化を伴う線維化は M2 マクロファージにより誘導され、腎臓の機能低下と密接に関係する。病態の悪化を抑制するためには線維化の制御が重要であるが、線維化の誘導に関わる M2 マクロファージの極性化機構の詳細は未だ明らかでなく、有効な治療法が存在しない。近年の研究において、M2 マクロファージの誘導機構の解析が進められているものの、ヒトとマウスでは遺伝子発現の変動が異なることから、病態モデルマウスを用いて得られた知見をヒトへ適用することには困難が伴う。Martinez らはトランスクリプトームやプロテオームの相互解析から、ヒトとマウスで唯一共通する M2 マクロファージのマーカーとしてタンパク質架橋化酵素 Transglutaminase 2 (TG2) を見出した。TG2 は哺乳類では全身に発現しており、TG2 によるタンパク質の架橋修飾は様々な生命現象に関わる。マクロファージにおいては死細胞の貪食やサイトカイン分泌、細胞遊走に関わるものが過去に報告されているが、M2 極性化における機能は明らかでない。本研究では M2 マクロファージの極性化における TG2 の機能を解明すると共に、マクロファージの TG2 が腎線維化の病態形成に与える影響を検証することを目的とした。

まず初めに、一側尿管結紮法 (UUO) により線維化を誘導したマウスを用いて TG2 の発現とマクロファージ誘導の相関性を検証した。蛍光免疫染色の結果から、病変部に存在する一部のマクロファージは TG2 を発現することが分かった。UUO 処置 12 日後の腎臓のマクロファージ浸潤量を調べると、野生型 (WT) と比較して TG2 欠損 (KO) マウスでは顕著に減少していた。このマクロファージのサブタイプをフローサイトメトリーにて解析したところ、 $CD45^+CD11b^+F4/80^{hi}CD206^+Ly6C^{int}$ の M2 マクロファージ集団が有意に減少することが分かった。線維化の病態解析において、TG2KO

マウスでは α -smooth muscle actin の発現やコラーゲンの蓄積が WT と比較して有意に減少しており、線維化の抑制が確認された。同様に、TG2 の活性阻害剤を投与した WT マウスにおいても M2 マクロファージの減少と線維化の抑制が見られた。以上の結果から、TG2 は M2 マクロファージの誘導と腎線維化の病態形成を促進することが示唆された。

では、線維化した腎臓で増加する M2 マクロファージはどこから来るのだろうか？ 全身で GFP を発現する GFP トランスジェニックマウスから骨髄を単離し、WT マウスに移植してその由来を検証したところ、CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺ M2 マクロファージの 90%以上は骨髄細胞に由来した。この結果を踏まえ、WT と TG2KO マウスの骨髄を入れ替えて腎線維化を誘導したところ、TG2KO マウス由来の骨髄細胞が移植されたマウスでは腎線維化の病態形成が顕著に抑制された。一方、WT マウスの骨髄が移植された TG2KO マウスでは逆に病態が悪化した。さらに、WT マウスの骨髄由来マクロファージ (BMDM) から M2 マクロファージを誘導した後、UUO 処置した TG2KO マウスの腎被膜下に移植したところ、やはり腎線維化の病態は悪化した。一方で TG2KO マウス由来の M2 マクロファージの移植では、腎線維化の病態に影響は見られなかった。以上の結果から、TG2 を介して誘導される骨髄由来マクロファージが線維化の病態進展に必須であることが証明された。

次に、M2 マクロファージの極性化における TG2 の役割を調べるため、マウスおよびヒト由来マクロファージを IL-4 により処理して M2 マクロファージを誘導した。BMDM を TG2 阻害剤で処理すると、極性化における M2 マーカーの発現増加が有意に抑制された。また、ヒト単球細胞株 (THP-1) 由来マクロファージにおいても、TG2 の発現抑制や活性阻害は極性化を抑制した。これらの結果から、TG2 の架橋活性にはヒトとマウスに共通した分子機構により M2 マクロファージの極性化を促進する役割があることが示唆された。

TG2 が M2 マクロファージの極性化を誘導する分子機構を解明するため、TG2 の架橋活性に依存して発現が変動する因子をトランスクリプトーム解析により網羅的に探索した。IL-4 処理下で TG2 依存的に 55 個の遺伝子が発現増加し、35 個が減少することを見出したが、中でも Arachidonate-15-Lipoxygenase (ALOX15) の発現は IL-4 処理による増加率が最も大きく、TG2 の活性阻害により顕著に減少した。ALOX15 による M2 マクロファージの極性化制御について検証するため、ALOX15 の活性阻害剤を処理したところ、M2 マーカーの発現は抑制された。一方で ALOX15 の代謝物である 15(S)-HETE を処理すると M2 マーカーの発現が増加した。これらの結果から、TG2 は ALOX15 の発現誘導を介して M2 極性化を促進することが示唆された。また、線維化した腎臓での ALOX15 発現マクロファージの細胞数は TG2KO マウスにおいて顕著に減少したことから、ALOX15 を介した TG2 の M2 マクロファージ極性化の誘導はマウスの腎線維化モデルでも再現された。

以上のように本研究では、TG2 が ALOX15 の発現誘導と M2 マクロファージの極性化制御を介して線維化の病態形成を促進することを明らかにした。これまで、腎線

維化において **TG2** は細胞外基質の架橋による安定化や **TGF- β** の活性化を介して病態進展に関わることが報告されていた。これに対し、本研究では **TG2** が **M2** マクロファージの極性を促進し、線維化の病態進展に関わる新たな知見を見出した。さらに、このような **TG2** を介した極性の制御機構はヒトとマウスで共通する現象であり、腎線維化の病態分子機構の更なる理解や新規治療法開発への貢献が期待される。