

主論文の要旨

**Apoptosis inhibitor of macrophage ameliorates
fungus-induced peritoneal injury model in mice**

アポトーシス抑制因子 AIM は
マウスの真菌誘導型腹膜傷害モデルを改善させる

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

富田 貴子

【緒言】

腹膜透析 (Peritoneal Dialysis (PD))における腹膜炎は離脱原因として重要な一因子である。中でも真菌性腹膜炎の腹膜障害は、重篤かつ死に陥る率も高く、最も予後が悪いと報告されている。我々は、真菌の菌体成分であるzymosanを腹膜擦過後に投与し、補体の活性から高度炎症を惹起させたヒト真菌性腹膜炎の臨床病理像に合致したモデル (zymosanモデル)を報告した。しかし本真菌性腹膜炎モデルの発症には、補体の活性化が関与するものの、この抑制のみでは炎症を完全に抑えることができず、他の因子の関与が推察された。近年、Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)というマクロファージの産生する分泌型蛋白質が同定され、細菌への付着、凝集等、新たな機能が報告され注目されている。我々は、AIMが細菌を凝集させる働きのある点、さらに急性腎不全において、AIMが尿細管壊死物質に付着しクリアランスし易くなる点に着目した。本研究では、zymosanモデルにおけるAIMの防御効果及びPD関連腹膜炎におけるAIMの腹膜炎発症制御に関わる役割について検討した。

【対象および方法】

野生型 ($AIM^{+/+}$)及び $AIM^{-/-}$ マウスの腹壁を擦過後、zymosan を 5 日間腹腔内投与して真菌性腹膜炎モデル (zymosan モデル)を誘導。1、2、3、4 週時点の腹膜組織、血清を採取し、免疫染色 (F4/80、iNOS、CD206、Ly6B2、AIM)と real-time PCR (IL6、TNF α 、F4/80、iNOS、CD206、AIM)、western blotting (AIM)で、炎症の状態、AIM について検討した。

$AIM^{-/-}$ マウスに zymosan モデルを作成後、1 週目より recombinant AIM (rAIM) 200 μ g/回を週 3 回で静脈注射し、4 週時点の腹膜組織を採取し、免疫染色 (F4/80、iNOS、CD206、Ly6B2)と real-time PCR (IL6、TNF α)で、rAIM により炎症像が改善するかを検討した。

In vitro 実験では、どの細胞がより貪食するのか、また AIM との関連性について調べた。 $AIM^{-/-}$ マウスに zymosan モデルを作成後、1 週目の腹膜組織を採取し、腹膜の構成細胞を調整。また培養ヒト中皮細胞株 (Met-5A)を熱処理にて死滅させ debris にし、rAIM と PBS を添加した。その debris と腹膜細胞を一緒に incubate し、0、10、30 分後における貪食状態を FACS で解析した。腹膜細胞のうち F4/80 陽性細胞の貪食状態を共焦点顕微鏡で観察した。またマウスの骨髄から誘導した M1/M2a マクロファージに、上記と同様に debris を加え、貪食の割合を比較した。rAIM の有無により、その貪食が促進されるかについても検討した。

最後に、腹膜表面にみられる腹膜中皮細胞について、zymosan モデルにおける局在を免疫染色 (cytokeratin)と電子顕微鏡で検討した。またマウスの腹膜から誘導した腹膜中皮細胞に、上記と同様に debris を添加し、その貪食状態と rAIM の有無で貪食の促進されるかについて FACS と共焦点顕微鏡で解析した。

【結果】

Zymosan モデルにおいて、 $AIM^{+/+}$ 群では day7-14 にかけて壊死を伴う高度炎症が惹

起されたが、day21-28にかけて炎症は軽減した。一方、*AIM*^{-/-}群では day28 まで壊死像、高度炎症が持続した。高度炎症部には F4/80 陽性マクロファージが浸潤していた (Figure 1)。iNOS 陽性マクロファージや Ly6B2 陽性好中球は、*AIM*^{+/+}群と *AIM*^{-/-}群の両群で day14 にかけて優勢となり、その後共に減少するも、day28 では *AIM*^{-/-}群で有意に浸潤を認めた。一方、CD206 陽性マクロファージは、*AIM*^{+/+}群で day21-28 にかけて出現し、day28 では有意に浸潤を認めた (Figure 2)。IL6 や TNF α 、F4/80 の mRNA は、day28 において *AIM*^{-/-}群で有意に高値を示した (Figure 3)。腹膜炎発症と共に、*AIM*^{+/+}群で血清中 AIM 濃度は上昇し、組織においては、壊死部に AIM が検出された。腹壁における AIM mRNA 発現も上昇し、主にマクロファージが AIM を発現していた (Figure 4)。rAIM 追加実験において、rAIM 群は PBS 群に比べ、day28 で有意に炎症を改善した (Figure 5)。In vitro 実験では、F4/80 陽性マクロファージが Gr1 陽性好中球に比べ、10、30 分で有意に貪食し、rAIM 添加により貪食が促進された。M2a マクロファージは M1 マクロファージと比較して有意に debris を貪食したが、両マクロファージ共に rAIM 添加でその貪食が促進された (Figure 6)。腹膜中皮細胞は *AIM*^{+/+}群の zymosan モデルで day21-28 にかけて腹膜表面に出現した。In vitro 実験で腹膜中皮細胞は debris を貪食し、*AIM*^{-/-}群由来の細胞に比べて *AIM*^{+/+}群由来で有意に貪食能が高く、どちらも rAIM 添加で貪食が促進された (Figure 7)。

【考察】

急性炎症は好中球やマクロファージの浸潤で特徴づけられ、死細胞由来の有害因子が除去されないと組織障害は改善せず、炎症が慢性化すると報告されている。Zymosan モデルの初期では、マクロファージや好中球浸潤、壊死像を認めた。この時期において *AIM*^{+/+}群と *AIM*^{-/-}群に炎症の差は認めなかったが、day28 では *AIM*^{-/-}群で炎症が持続した。このことから AIM が欠乏すると、壊死 debris のクリアランスが十分なされず、腹膜の炎症は持続すると考えられた。我々の研究から、debris を貪食する細胞は F4/80 陽性マクロファージが中心であり、特に M2 マクロファージが M1 マクロファージより死細胞を貪食すると確認できた。しかし rAIM 投与により、M2 マクロファージだけでなく、M1 マクロファージにおいても炎症の改善を認めたことから、AIM が debris の貪食を効率的に促進することが重要であると考えられた。

腹膜中皮細胞は *AIM*^{+/+}群 zymosan モデルの day21 から出現し debris を貪食して、そのクリアランスに補助的に関わっていると考えられた。そして腹膜中皮細胞も AIM により貪食が促進された。腹膜中皮細胞は、PD 中の腹膜において、AIM をオプソニンとして debris や細菌をクリアランスすることで、炎症腹膜だけでなく、健康な腹腔を維持するのに関係しているかもしれない。

AIM は壊死部位に検知され、zymosan モデルの腹膜組織の AIM mRNA も上昇したことから、循環している AIM と同様、局所で作られた AIM が一部壊死組織に付着し、炎症の改善を促進している可能性が考えられた。AIM が壊死部位にどのように付着しているかは分かっていないため、今後の研究課題としたい。

【結論】

AIM が PD 関連の真菌性腹膜炎に対して修復的、発症予防的に働く可能性が示唆された。これは新しい治療戦略の発展の基礎になりうるかもしれない。