

主論文の要旨

C-type lectin Mincle mediates cell death-triggered inflammation in acute kidney injury

C型レクチン Mincle は急性腎障害において
細胞死が惹起する炎症を遷延させる

名古屋大学大学院医学系研究科 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)

田中 まりえ

【緒言】

急性腎障害（AKI: acute kidney injury）は、集中治療領域の発達、造影剤の使用や癌症例の増加、人口の高齢化等に伴って増加しており、長期的には高い確率で慢性腎臓病（CKD: chronic kidney disease）や末期腎不全に至る（AKI to CKD）。急性腎障害では、広範な細胞死、マクロファージを代表とする免疫担当細胞の浸潤と活性化、炎症性サイトカインなどが病態形成に重要な役割を果たす。

マクロファージの細胞膜上に発現する Ca^{2+} 依存型レクチンの Mincle (macrophage-inducible C-type lectin) は、結核菌や真菌に対する自然免疫センサーとして感染防御に働く一方、死細胞センサーとしても働くことが示唆されている。即ち、Mincle は、非感染性炎症において死細胞を認識し、炎症の増悪をもたらす可能性が考えられる。そこで本研究では、虚血再灌流による急性腎障害モデルを用いて、非感染性の急性炎症における Mincle の意義を検討した。

【方法】

(1) 麻酔下の Mincle 欠損および野生型マウスの右腎を摘出し、30 分間左腎の血流を遮断後、血流を再開し、腎虚血再灌流障害を惹起した。急性期（～1 日）、修復期（3～5 日）、慢性期（7～14 日）にサンプリングし、腎機能（血清 BUN, クレアチニンなど）、腎組織像（尿細管障害、炎症細胞浸潤、健常尿細管残存度）、遺伝子発現プロファイルを解析し、腎障害に及ぼす Mincle の関与を検討した。

(2) フローサイトメトリーを用いて障害腎における Mincle 発現細胞を単離し、表面抗原や遺伝子発現プロファイルを解析し、Mincle 発現細胞の特徴を検討した。

(3) Mincle が死細胞クリアランスに及ぼす影響を検討する目的で、貪食アッセイを行った。Mincle 欠損および野生型マウス由来の腹腔内マクロファージを、既知の外來性 Mincle リガンドである TDM (trehalose-6,6'-dimycolate) で刺激し、pH インジケータでラベルしたマウス胸腺死細胞を添加して、貪食された死細胞の割合を評価した。

(4) Mincle 活性化に伴い GFP が発現する Mincle-NFAT-GFP レポーター細胞システムを用いて、内因性 Mincle リガンドを探索した。障害腎より抽出した総脂質を極性に従って分画し、Mincle 活性化成分を含む脂質画分より Mincle リガンド本体を同定した。

【結果】

(1) 野生型マウスに腎虚血再灌流障害を惹起すると、急性期から慢性期まで障害腎において Mincle は持続的に発現上昇した。Mincle 欠損マウスを用いたところ、急性期（1 日目）における障害レベルは野生型マウスと同程度であったが、野生型マウスが 6 日目までに約 4 割が死亡した一方、Mincle 欠損マウスは全匹が生存した (Fig. 1A)。修復期（3 日目）では、野生型マウスに比較して Mincle 欠損マウスでは、腎機能や尿細管障害が軽度であり、炎症性マーカーの遺伝子発現が顕著に低下した (Fig. 1B-D)。慢性期（14 日目）では、野生型マウスの障害腎は萎縮し、健常な近位尿細管のマーカーである LTL (lotus tetragonolobus lectin) の染色範囲が減少したが、Mincle 欠損マウ

スでは、これらの変化が抑制された (Fig. 1E, F)。

(2) 障害腎における浸潤マクロファージをフローサイトメトリーで解析したところ、Mincle は炎症促進性の F4/80^{lo} マクロファージ (マクロファージマーカー F4/80 の発現が低いマクロファージサブタイプ) に高発現していた。F4/80^{lo} マクロファージから Mincle 発現細胞を採取して遺伝子発現を検討すると、Mincle 発現マクロファージは、炎症マーカーのみならず、抗炎症マーカーも高発現していた (Fig. 2A)。障害腎における Mincle 発現マクロファージの局在を検討したところ、Mincle は壊死尿細管の周囲に集積していた (Fig. 2B)。

(3) TDM により野生型マウス由来の腹腔内マクロファージの Mincle を活性化させると、従来から知られていた炎症性サイトカインの発現誘導に加え、死細胞貪食能が著しく低下した (Fig. 3A)。

(4) Mincle-NFAT-GFP レポーター細胞システムを用いて、壊死尿細管に由来すると想定される内因性 Mincle リガンドを探索した。リガンド活性が認められた脂質画分を用いて (Fig. 4A) ノンターゲットリピドミクス解析を行うと、障害腎で増加する脂質がいくつか認められ、その中で、 β -glucosylceramide に Mincle リガンド活性が認められた。 β -glucosylceramide は、既に報告のある Mincle リガンドであり、単体でも Mincle を活性化しうるが、コレステロールと共存することで Mincle 活性化能が著増した (Fig. 4B)。質量顕微鏡により、障害腎の障害部位 (皮髄境界部) において β -glucosylceramide が増加することを確認した (Fig. 4C)。コレステロール染色 (Filipin 染色) により、尿細管細胞由来の debris にコレステロールが蓄積すること、その周囲にマクロファージが集積することを確認した (Fig. 4D)。

【考察】

近年、生体内での細胞死が情報の発信源となって多彩な生体応答を誘導することが明らかになりつつある。生体内で細胞死が生じると、マクロファージにより速やかに認識・貪食されることで組織の恒常性が保たれるが、この過程が障害されると、死細胞を起点として炎症が遷延すると想定される。我々は、肥満の脂肪組織において、細胞死に陥った脂肪細胞を M1 マクロファージが取り囲む特徴的な組織学的構造 (crown like structure: CLS) に Mincle が限局して存在すること、CLS が脂肪組織の炎症や線維化の起点となることを報告している (*Nat. Commun.* 2014; *Diabetes.* 2011)。本研究では、腎虚血再灌流障害モデルにおいて、急性期には Mincle 欠損マウスと野生型マウスに障害の差は認められないが、修復期および慢性期では野生型マウスに比較して Mincle 欠損マウスで障害が軽減することを見出した。そのメカニズムとして、Mincle と死細胞貪食の関係に着目したところ、Mincle 活性化により死細胞貪食が抑制され炎症の収束が遅延する可能性と、Mincle 活性化成分の存在が示唆された。そこで、内因性リガンドを探索したところ、壊死尿細管由来の β -glucosylceramide とコレステロールが共存して Mincle を活性化することを見出した。また、障害腎では β -glucosylceramide、コレステロール、マクロファージが共存する CLS 様の微小環境が形成され、炎症遷延

化の起点となる可能性を見出した。 β -glucosylceramide やコレステロールの産生機構、相互作用の詳細が明らかになることで、AKI to CKD の分子機構解明の一端が明らかになり、急性腎障害の診断や治療に貢献すると考えられた。

【結果】

腎虚血再灌流モデルにおいて、Mincle は、壊死尿細管に由来する内因性リガンドを認識し、炎症の増悪と組織修復の遅延をもたらすことが明らかになった。