

179. 死にゆく細胞の細胞内代謝変容と炎症慢性化機構の解明

田中 都

名古屋大学 環境医学研究所 分子代謝医学分野

Key words : マクロファージ, 細胞死, 炎症, 内因性リガンド, Mincle

緒 言

近年、死細胞自身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、炎症慢性化における細胞死の意義が注目を集めている。従来、細胞死は、アポトーシスとネクローシスに大別されてきたが、近年、ネクローシスに加え、ネクロプトーシスやフェルトーシスなど、新たな非アポトーシス型のプログラム細胞死の存在やその制御機構が明らかになってきた。また、細胞死に伴って放出される **damage-associated molecular patterns (DAMPs)** が周囲の細胞に作用し、様々な病態形成に寄与することも広く受け入れられている。通常、細胞死が誘導されると、死細胞はマクロファージに代表される貪食細胞に速やかに処理されることで、体内に蓄積されず恒常性が保たれる。この時、貪食したマクロファージは、主に抗炎症サイトカインを分泌し、炎症を収束に導くと考えられてきた。しかしながら近年、死細胞貪食や死細胞クリアランスを担うシグナルが、動脈硬化や非アルコール性脂肪肝炎 (**non-alcoholic steatohepatitis : NASH**) の病態を増悪させる可能性が指摘されている。そこで、死細胞から放出された **DAMPs** が貪食細胞に感知・処理されて、どのような細胞応答につながるのか、その全貌を明らかにする必要がある。さらに、疾患や臓器における特異性、死細胞を取り巻く微小環境の実態も不明である。

我々はこれまでに、死細胞を核としてマクロファージが集積し、組織リモデリングに働く特徴的な微小環境(細胞死に陥った実質細胞をマクロファージが貪食、処理する像：**crown-like structure (CLS)**と称される)に着目して、肥満(脂肪組織)、**NASH**(肝臓)、急性腎障害(腎臓)における炎症遷延化機構の解明に成果を挙げた[1~6]。この過程で、結核菌や真菌を認識して感染防御に働く病原体センサーの **macrophage-inducible C-type lectin (Mincle)** が、病態の鍵を握る死細胞センサーであること[1, 6]、特に、急性腎障害モデルでは、壊死尿細管に蓄積する糖脂質の **β -glucosylceramide (β -GlcCer)** と遊離コレステロールが内因性 **Mincle** リガンドとして働くことを見出した。遊離コレステロールは細胞膜構成成分であるため、細胞内外に様々な影響を及ぼすことが想定されるが、 **β -GlcCer** は主に細胞内に存在する物質であるため、細胞死に伴い放出された **β -GlcCer** が **DAMPs** として **Mincle** に認識され、炎症遷延化をもたらしたと考えられる。興味深いことに、対照腎に比較して障害腎において **β -GlcCer** は増加する。即ち、細胞が死に陥る際に、細胞内代謝に何らかの変容がもたらされ、**DAMPs** 産生が増加する可能性が示唆される。実際に、細胞がアポトーシスに陥る際に、細胞内代謝を変容させて特殊な代謝物を産生し、周囲に働きかけ炎症を収束させることが報告されている。即ち、死にゆく細胞は、単に死を受容するのではなく、能動的に活動していることが示唆される。しかしながら、アポトーシス以外の細胞死様式について細胞内代謝が検討された例はない。そこで、本研究では、障害を受けて死にゆく細胞の細胞内代謝変容に着目し、**Mincle** 内因性リガンドである **β -GlcCer** 産生機構を明らかにすることを目的とした。

方法および結果

1. **β -GlcCer** 産生機構の解明

β -GlcCer は、ゴルジ体の細胞質側でセラミドから生合成された後、ゴルジ体内腔側にフリップされ、ラクト

シルセラミド (LacCer) に代謝されるが、その量は、合成酵素や糖転移酵素、ATP などで制御されている。そこで、急性腎障害 (腎虚血 - 再灌流障害) における β -GlcCer 蓄積に関与する酵素を明らかにする目的で、虚血 - 再灌流障害 3 日目の障害腎と対照腎のマイクロアレイデータを用いて、 β -GlcCer 代謝関連酵素の発現変動を検討した。その結果、 β -GlcCer を LacCer に変換する β -1,4-Galactosyltransferase 5 (B4GalT5) が障害腎で低下することを見出し、本酵素に着目した。虚血 - 再灌流障害 1 日目 ~ 14 日目の障害腎における B4GalT5 の発現を real-time PCR で確認したところ、持続的に発現低下することを見出した。さらに、別の腎障害モデルであるシスプラチン投与モデル (15 mg/kg, i.p.)、葉酸投与モデル (250 mg/kg, i.p.) においても、B4GalT5 の発現が低下することを見出した (図 1)。また、培養尿細管上皮細胞の B4GalT5 のノックダウンや β -GlcCer をセラミドに変換する酵素 (glucocerebrosidase : GBA) の阻害により、 β -GlcCer が蓄積することを確認した。

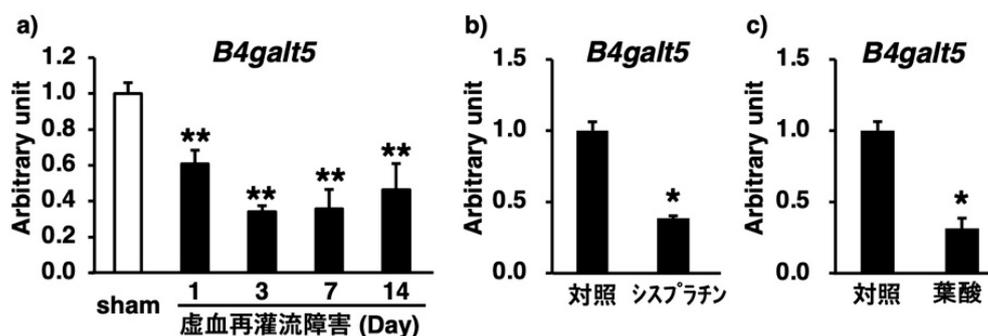


図 1. 種々の急性腎障害モデルにおける B4GalT5 の発現変化

- 腎虚血再灌流モデルにおける B4GalT5 の遺伝子発現。障害腎では持続的に発現が低下した。 $n=4\sim 5$, $**P<0.01$ vs. sham (One-way ANOVA, Dunnett's test)。
- シスプラチン誘導性腎障害モデルにおける B4GalT5 の遺伝子発現 (腎障害惹起 3 日後)。障害腎で B4GalT5 の発現が低下した。 $n=5\sim 6$, $*P<0.05$ vs. 対照 (Student's t-test)。
- 葉酸誘導性腎障害モデルにおける B4GalT5 の遺伝子発現 (腎障害惹起 3 日後)。障害腎で B4GalT5 の発現が低下した。 $n=5\sim 6$, $*P<0.05$ vs. 対照 (Student's t-test)。

2. β -GlcCer とコレステロールが腎障害に及ぼす影響

β -GlcCer は、通常は細胞内に存在するため、細胞死に伴い細胞外に放出され Mincle を活性化し、炎症遷延化をもたらすと想定される。そこで、実際に、外来性に β -GlcCer を投与すると腎障害が惹起されるどうかを検討した。即ち、 β -GlcCer (100 μ g/100 μ l) 含有エマルジョン、コレステロール (5,000 μ g/100 μ l) 含有エマルジョン、 β -GlcCer (100 μ g/100 μ l) とコレステロール (5,000 μ g/100 μ l) を含むエマルジョンを野生型マウスと Mincle 欠損マウスの腎皮膜下に投与し、3 日後に腎障害を検討した。その結果、野生型マウスにおいて、 β -GlcCer 単独エマルジョンでは腎障害を起こさなかったが、コレステロールと共存することで、Mincle や TNF α などの炎症性サイトカインの発現が著増した。一方、Mincle 欠損マウスでは、そのような変化は認められなかった (図 2)。

3. 尿細管特異的 B4GalT5 欠損マウスの作出および表現型

1. において、 β -GlcCer 蓄積における B4GalT5 の関与が明らかになったため、時期特異的・尿細管上皮細胞特異的に標的遺伝子を欠損させる Ndr $g1$ -CreERT2 マウス (京都大学の柳田素子博士より分与) と B4GalT5 floxed マウス (京都大学の浅野雅秀博士より分与) を用い、尿細管特異的 B4GalT5 欠損 (Ndr $g1$ -CreERT2 : B4GalT5 flox/flox) マウスを作出した。また、タモキシフェン投与により腎 B4GalT5 発現が著減し、 β -GlcCer

が蓄積することを予備的に見出した。本マウスは、腎虚血再灌流後に浸潤する Mincle 発現マクロファージが過剰な β -GlcCer を認識し、活性化することで腎障害が増悪すると想定される。そこで、本マウスに、X 線照射を施し、野生型マウスまたは Mincle 欠損マウスの骨髓細胞を移植し、骨髓細胞特異的 Mincle 欠損 *Ndr1-CreERT2:B4GalT5 flox/flox* を作り出した。今後、本マウスに腎虚血再灌流障害を惹起し、腎障害の程度を検討していく。

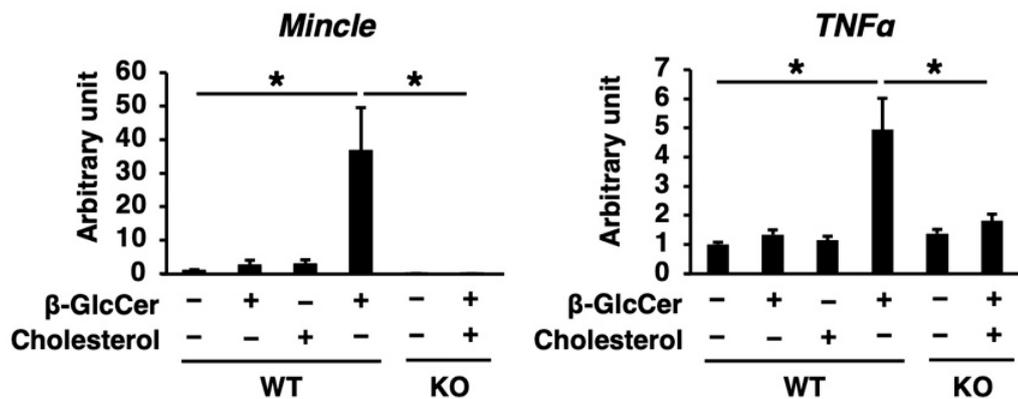


図 2. β -GlcCer とコレステロールが腎障害に及ぼす影響

β -GlcCer 単独エマルジョンを腎皮膜下に投与しても、ほとんど変化が認められないが、コレステロールが共存することで、Mincle を介して炎症が惹起された。

$n=4\sim 5$, * $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey-Kramer test)。

考 察

これまで急性腎障害は一過性の障害だと考えられていたが、最近では、一定の割合で慢性腎臓病に移行することが指摘されている。一方、そのメカニズムは不明な点が多く、現在、多くの研究者が分子機構の解明に取り組んでいる。我々は、自然免疫センサーであり死細胞センサーでもある Mincle が、急性腎障害により増加する β -GlcCer とコレステロールを認識して、炎症の増悪と死細胞クリアランスの抑制を介して、炎症遷延化をもたらすことを明らかにしたが [6]、 β -GlcCer が増加するメカニズムや、実際に β -GlcCer が腎障害をもたらすのかについては不明なままであった。本研究により、障害腎における β -GlcCer 蓄積に B4GalT5 の持続的な低下が重要であることが明らかとなった。これまで、 β -GlcCer の蓄積はゴーシェ病やパーキンソン病を誘発することが知られているが、その原因は、 β -GlcCer をセラミドに変換する酵素である GBA の活性低下や欠損によるものとされている。我々の急性腎障害モデルにおいても GBA の発現は低下するが、その程度は、B4GalT5 より軽微であることから、腎においては B4GalT5 の発現低下が β -GlcCer 蓄積に重要であると考えられる。また、本研究において、 β -GlcCer とコレステロールが直接腎障害をもたらすことが改めて明らかになり、今後、腎障害の予防や治療の標的となることが示唆される。そのために、コレステロールがどのように β -GlcCer の Mincle リガンド活性を増強するか、 β -GlcCer がどのように Mincle に結合するのか、などを明らかにすることが、今後の重要な検討課題となる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学微生物病研究所分子免疫制御分野の山崎晶博士、名古屋大学大学院医学系研究科分子生物学の郷詩織博士、名古屋大学環境医学研究所分子代謝医学分野の菅波孝祥博士である。

文 献

- 1) Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T, Kimura K, Inoue H, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat Commun.* 2014 Sep 19;5:4982. doi: 10.1038/ncomms5982. PMID: 25236782
- 2) Ichioka M, Suganami T, Tsuda N, Shirakawa I, Hirata Y, Satoh-Asahara N, Shimoda Y, Tanaka M, Kim-Saijo M, Miyamoto Y, Kamei Y, Sata M, Ogawa Y. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. *Diabetes.* 2011 Mar;60(3):819-26. doi: 10.2337/db10-0864. Epub 2011 Jan 31. PMID: 21282371
- 3) Komiya C, Tanaka M, Tsuchiya K, Shimazu N, Mori K, Furuke S, Miyachi Y, Shiba K, Yamaguchi S, Ikeda K, Ochi K, Nakabayashi K, Hata KI, Itoh M, Suganami T, Ogawa Y. Antifibrotic effect of pirfenidone in a mouse model of human nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep.* 2017 Mar 17;7:44754. doi: 10.1038/srep44754. PMID: 28303974
- 4) Kawakubo M, Tanaka M, Ochi K, Watanabe A, Saka-Tanaka M, Kanamori Y, Yoshioka N, Yamashita S, Goto M, Itoh M, Shirakawa I, Kanai S, Suzuki H, Sawada M, Ito A, Ishigami M, Fujishiro M, Arima H, Ogawa Y, Suganami T. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition prevents nonalcoholic steatohepatitis-associated liver fibrosis and tumor development in mice independently of its anti-diabetic effects. *Sci Rep.* 2020 Jan 22;10(1):983. doi: 10.1038/s41598-020-57935-6. PMID: 31969650
- 5) Itoh M, Suganami T, Nakagawa N, Tanaka M, Yamamoto Y, Kamei Y, Terai S, Sakaida I, Ogawa Y. Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2011 Nov;179(5):2454-63. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.014. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21906580
- 6) Tanaka M, Saka-Tanaka M, Ochi K, Fujieda K, Sugiura Y, Miyamoto T, Kohda H, Ito A, Miyazawa T, Matsumoto A, Aoe S, Miyamoto Y, Tsuboi N, Maruyama S, Suematsu M, Yamasaki S, Ogawa Y, Suganami T. C-type lectin Mincle mediates cell death-triggered inflammation in acute kidney injury. *J Exp Med.* 2020 Nov 2;217(11):e20192230. doi: 10.1084/jem.20192230. PMID: 32797195