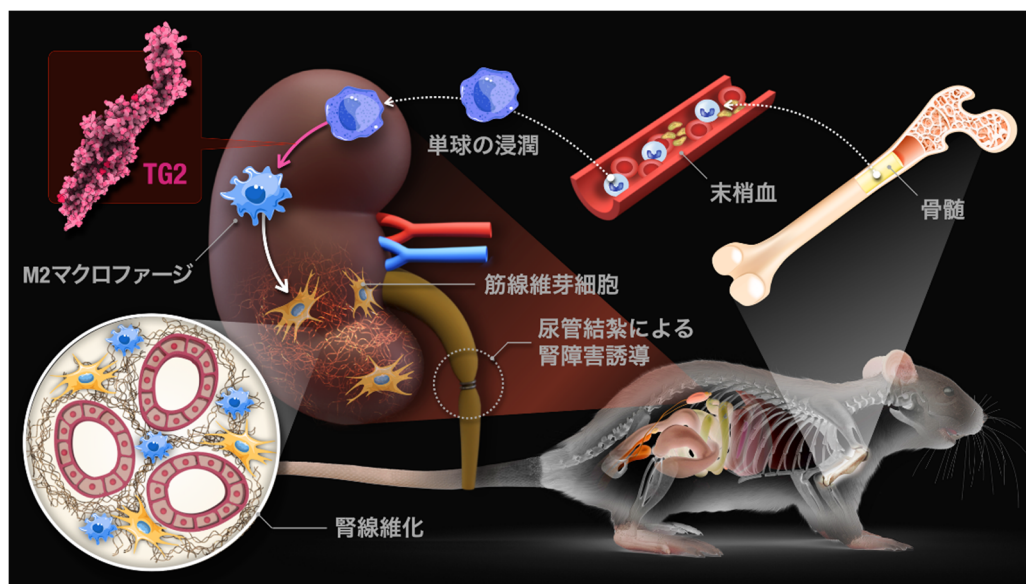




腎臓の機能不全を引き起こすマクロファージの制御因子を発見 ～線維化、癌、動脈硬化などの新たな治療法開発に繋がることが期待～

【本研究のポイント】

- ・腎臓の線維化^{注 1)}に関わる特定のマクロファージの誘導に架橋酵素が重要な働きを持つことを示した。
- ・架橋酵素が骨髄細胞から動員されるマクロファージの形質を変化させることが分かった。
- ・ヒトとマウスの種間に共通して、架橋酵素がアラキドン酸^{注 2)}の酸化酵素の発現を誘導し、これが線維化促進マクロファージへの形質変化と腎線維化を引き起こすことを見出した。

【研究概要】

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院創薬科学研究科の辰川 英樹 助教、篠田 祥希 博士後期課程学生、人見 清隆 教授らの研究グループは、同大学環境医学研究所の菅波 孝祥 教授、田中 都 講師との共同研究により、炎症を抑制するマクロファージの一種が、「タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ」により誘導され、腎線維化を引き起こす病態発症メカニズムを新たに発見しました。

線維化は腎臓、肝臓、肺などの多種の臓器の慢性炎症や機能不全を引き起こす疾患ですが、現在のところ有用な治療法は確立されていません。また、マクロファージは、生体恒常性や炎症反応を制御する重要な細胞ですが、特定のマクロファージを標的とした疾患の治療法は開発されていません。

本研究では、架橋酵素 TG2 が特定のマクロファージを制御し、腎線維化を誘導することを示しました。また、ヒトとマウスの種間に共通して、架橋酵素がアラキドン酸の酸化酵素の発現を制御し、線維化促進マクロファージの形質変化を誘導する新たな分子機構を発見しました。

本研究成果は、線維化ならびに癌や動脈硬化など、炎症の促進と抑制のバランスの破綻による種々の疾患の治療法開発に繋がることが期待されます。

本研究成果は、2023 年 3 月 3 日午前 0 時(日本時間)付イギリス科学雑誌「Cell Death & Disease」にオンライン掲載されました。

【研究背景と内容】

マクロファージは生体恒常性や炎症反応を調節する重要な細胞であり、微小環境変化に応じて、炎症促進(M1)と炎症抑制(M2)の異なる性質の細胞に形質変化(極性化)します。M2 マクロファージは過剰な炎症反応の収束に関わる一方で、持続的に炎症が続くような慢性炎症時には修復反応に伴う細胞外マトリックス^{注 3)}の過剰な産生を促し、臓器の硬化(線維化)を特徴とした病態悪化を引き起こします。

腎障害や線維化モデルにおいて、マクロファージを除去すると病態が改善することから、疾患の治療標的として重要視されています。しかしながら、線維化に関わるマクロファージの極性化機構の理解は未だ十分でなく、特定のマクロファージを標的とした治療法も開発されていません。その理由の一つとして、極性化の分子機構がマウスとヒトで共通性が少なく、マウスで得られた研究成果をすぐにヒト疾患に適用できない問題があります。

本研究では、線維化疾患の発症原因となる「タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ(TG2)」が特定の M2 マクロファージの極性化^{注 4)}を誘導し、細胞外マトリックスを産生する筋線維芽細胞の誘導を介して腎線維化を引き起こすことを見出しました。

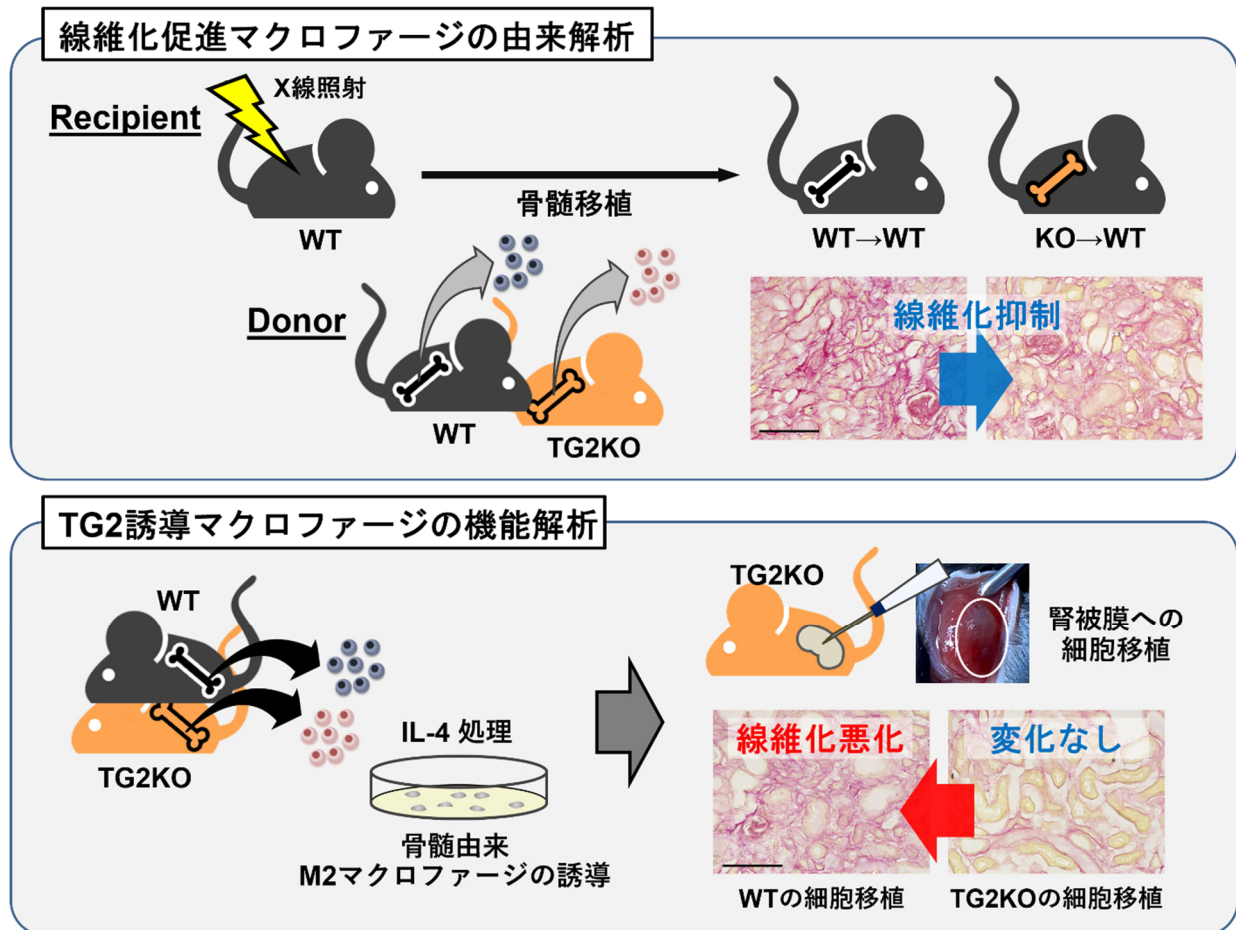


図1 TG2 により極性化誘導される M2 マクロファージの由来と機能解析

野生型(WT)マウスに致死量の X 線を照射して骨髄細胞を破壊した後、WT もしくは TG2 遺伝子欠損(TG2KO)マウスから単離した骨髄を移植した。これらのマウスを用いて尿管結紮処置により腎線維化を誘導したところ、TG2KO の骨髄移植マウスは WT に比べて線維化が抑制された。線維化の程度は赤色で染色されたコラーゲンの発現領域を定量して評価した。

次に、WTおよびTG2KOの骨髄からマクロファージを調製し、IL-4 によりM2型へと極性化させた。線維化が抑制される TG2KO マウスの腎臓の被膜にそれぞれ WT および TG2KO 由来の上記細胞を移植したところ、WT 由来の細胞移植群では線維化の病態がさらに悪化した。TG2KO由来の細胞移植群では病態に変化は見られなかった。

TG2 はタンパク質のグルタミン残基とリジン残基の間に不可逆的な架橋結合を形成する酵素であり、腎線維化への関与が知られています。腎線維化が起こる際に、TG2 が特定の M2 マクロファージの極性化を誘導することを見出したので、TG2 により極性化されるマクロファージの由来と M2 マクロファージの機能について、骨髄移植や腎臓へのマクロファージの移植実験により検証しました(図1)。その結果、骨髄由来の細胞でTG2 が欠損すると腎線維化が抑制されることが分かりました。さらに、線維化が抑制される TG2 欠損マウスにおいて、通常の野生型マウスの骨髄から調製した M2 マクロファージを腎臓に移植すると、線維化の病態が悪化しました。これらの結果から、腎線維化モデルでは、骨髄細胞由来の血液を循環する単球^{注 5)}が腎臓の障害部位に浸潤し、単球から分化したマクロファージが TG2 により M2 型に極性化され、筋線維芽細胞の誘導を介して腎線維化を引き起こすことが示唆されました。

次に、M2 マクロファージの極性化に関わる TG2 の役割を解明するため、RNA シーケンス^{注 6)}を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、TG2 の架橋活性がアラキドン酸リポキシゲナーゼ(アラキドン酸の酸化酵素: ALOX15)の発現を誘導することを発見しました(図2)。これまでに、ALOX15 は M2 マクロファージの誘導に関わることが知られていますが、その発現制御メカニズムの詳細は分かっていませんでした。さらに、腎線維化のモデルマウスを使った実験でも同様な結果が得られ、TG2 欠損マウスにおける腎臓のマクロファージでは ALOX15 の発現がほとんど見られませんでした。これらの結果から、TG2 の架橋活性は ALOX15 の発現上昇を介して M2 マクロファージを極性化することにより、腎線維化を悪化させることが明らかとなりました。

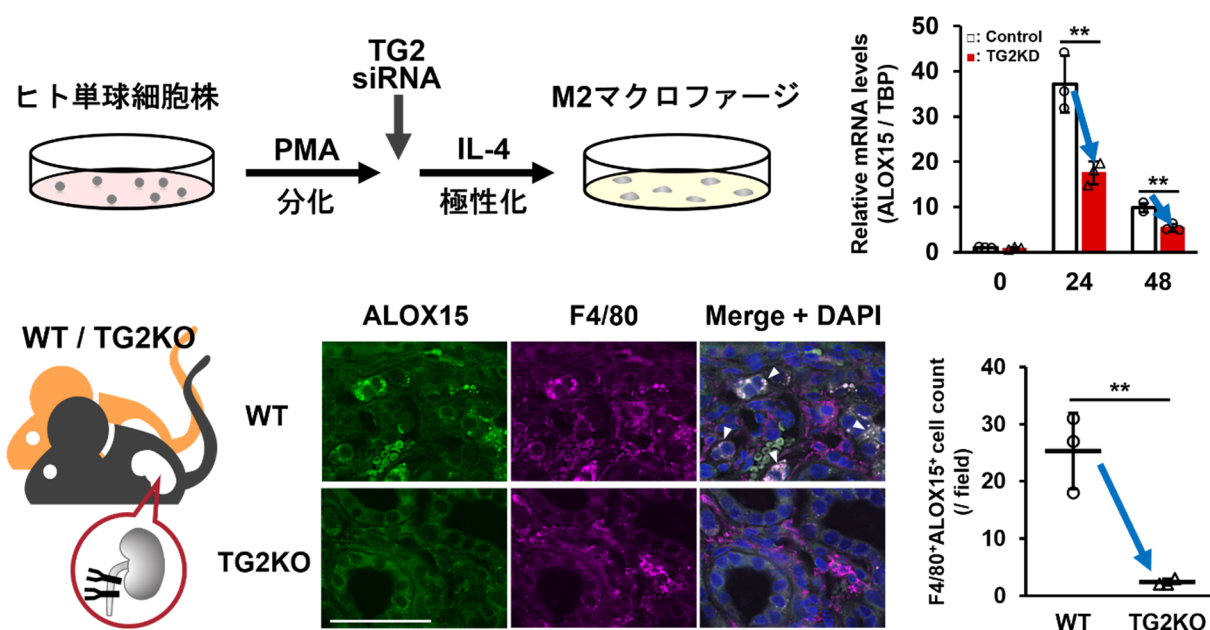


図2 TG2 が M2 マクロファージ極性化に関わる分子機構の解析

ヒト単球細胞株をホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート(PMA)処理し、マクロファージに分化させた後に、IL-4 添加により M2 型に極性化させた。この際に siRNA を用いて TG2 の発現を抑制したところ、ALOX15 の発現量が顕著に低下すると共に M2 マクロファージのマーカー遺伝子の発現も減少した。

WT およびTG2KOマウスに腎線維化を誘導し、凍結組織切片を作製した。ALOX15の発現分布を抗体による免疫染色により評価したところ、WTではALOX15とマクロファージ(F4/80 陽性細胞)が共染色される Merge 画像の白色シグナル(矢頭)が見られたが、TG2KOマウスではALOX15の発現が低く、共染色された細胞はほとんど見られなかった。共染色細胞の数を調べたところ、TG2KOではWTに比べて 1/10 程度であった。

本研究では、腎線維化が誘導される病態メカニズムに M2 マクロファージの極性化が大きく寄与していること、TG2 がマウスやヒト由来の M2 マクロファージの極性化に重要な役割を担っていることを明らかにしました。また、TG2 が極性化誘導する M2 マクロファージの由来は、骨髓細胞からの血液循環する単球であることを見出しました。さらに、TG2 が ALOX15 の発現誘導に重要であり、これを介して M2 マクロファージが極性化されることを明らかにしました。本研究は、腎線維化のみならず、癌や動脈硬化、骨粗鬆症などのマクロファージが関与する疾患ならびに様々な炎症性疾患、神経変性疾患、自己免疫疾患などの新しい治療標的の開発に役立つことが期待されます。

【成果の意義】

線維化は腎臓、肝臓、肺などの多種の臓器の慢性炎症や機能不全に関わる病態学的特徴であり、現在のところ有用な治療法は確立されていません。線維化に関わるマクロファージの極性化の分子機構はマウスとヒトで共通性が少なく、マウスで得られた研究成果をすぐにヒト疾患に適用できない問題があります。本研究において解明した架橋酵素による線維化促進マクロファージの極性化機構は、ヒトとマウスの種間で誘導機構が類似することから、マクロファージの機能制御を標的とした線維化ならびに癌や動脈硬化など、炎症の促進と抑制のバランスの破綻による種々の疾患の治療法開発に繋がることが期待されます。

【用語説明】

注 1) 線維化:

結合組織が異常増殖し、線維芽細胞により産生される細胞外マトリックス(コラーゲンなどの膠原線維)が過剰蓄積する現象。細胞外マトリックスの産生は障害組織の修復機構として必要であるが、慢性的な炎症疾患など長期に渡る障害が続くと、過剰に沈着して臓器が硬化し、重篤な機能不全を引き起こす。腎臓、肺、肝臓、心臓、皮膚、骨などの重要な臓器や組織で起こる疾患であるが、根本的な治療薬は開発されていない。腎臓の線維化に関連する慢性腎臓病の国内患者数は 1,330 万人(成人のおよそ 7 人に 1 人)に及ぶ。

注 2) アラキドン酸:

多価不飽和脂肪酸の一つ。食事から摂取するリノール酸から合成され、必須脂肪酸に分類されている。体内のアラキドン酸は主に脂質二重膜に含まれるが、刺激に応じて遊離して代謝され、様々な生理活性脂質に変換されて生理的・病理的機能に関与する。

注 3) 細胞外マトリックス:

細胞外基質とも呼ばれ、すべての組織や臓器中に存在する非細胞性の構成成分。細胞が位置を保つための物理的な足場となるだけでなく、細胞増殖や分化、組織の形態形成や恒常性維持に重要な生化学的・生物力学的なシグナルを出す働きがある。代表的な細胞外マトリックスとしてコラーゲンがあり、主に線維芽細胞により産生される。

注 4) 特定の M2 マクロファージの極性化:

細胞膜に発現する様々なタンパク質の違いにより、マクロファージは単一の細胞ではなく、異なる性質を持つ多様なサブタイプに分類される。TG2 が誘導する M2 マクロファージは $CD45^{+}CD11b^{+}F4/80^{hi}CD206^{+}Ly6C^{int}$ のような細胞表面抗原を発現する性質を持つ細胞集団であることが分かった。

注 5) 単球:

白血球の一種であり、感染に対する防衛の開始に重要な働きを持つ。骨髄で産生されて血液中に入り、血流中の白血球数の約 1~10% を占める。必要に応じて様々な組織に浸潤し、マクロファージや樹状細胞に分化して、体の免疫反応の誘導や恒常性の維持に関わる。

注 6) RNA シーケンス:

細胞内の mRNA から cDNA を作製し、次世代シーケンサーを用いて全ての配列を読み取ることにより、全遺伝子の発現量を網羅的かつ定量的に解析する手法。

【謝辞】

本研究は日本学術振興会科研費の基盤研究費(課題番号:19K08675 [辰川]、26292192・18H02134 [人見])、日本応用酵素協会応用酵素助成(辰川)、天野エンザイム酵素研究助成奨励研究助成(辰川)、愛知腎臓財団研究助成(辰川)、立松財団一般研究助成(辰川)、武田科学振興財団薬学系研究助成(辰川)、テルモ生命科学振興財団Ⅲ研究助成(辰川)を受けたものです。

【論文情報】

雑誌名: Cell Death & Disease

論文タイトル: Tissue transglutaminase exacerbates renal fibrosis via alternative activation of monocyte-derived macrophages

著者: Yoshiki Shinoda¹, Hideki Tatsukawa^{1,*}, Atsushi Yonaga¹, Ryosuke

Wakita¹, Taishu Takeuchi¹, Tokuji Tsuji¹, Miyako Tanaka²⁻⁴, Takayoshi Suganami²⁻⁴, Kiyotaka Hitomi¹

*責任著者

¹Cellular Biochemistry Lab., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University

²Department of Molecular Medicine and Metabolism, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

³Department of Immunometabolism, Nagoya University Graduate School of Medicine

⁴Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University

DOI: 10.1038/s41419-023-05622-5

URL: <https://www.nature.com/articles/s41419-023-05622-5>