

博士論文

血中 AIM と IgM 間の結合・解離性の
腎疾患における重要性に関する研究

杉澤 良一

【論文のタイトル】

血中 AIM と IgM 間の結合・解離性の腎疾患における重要性に関する研究

【所属】 東京大学大学院 医学系研究科

平成 25 年 4 月 入学

医学博士課程 分子細胞生物学専攻

疾患生命工学センター 分子病態医科学部門

【指導教員】 宮崎 徹 教授

【申請者名】 杉澤 良一

要旨

急性腎障害は可逆的に回復することが知られているが、その治癒機構は不明であった。近年、通常血中 IgM に結合しているタンパク質 AIM (Apoptosis inhibitor of macrophage) が急性腎障害時に IgM から解離し、腎臓の尿細管管腔内に到達することで、この自己治癒機構を担うことが明らかとなった。私は、腎不全好発動物であるネコが AIM を介した自己治癒機構を欠損していること、この原因がネコ AIM 特異的な構造上の特性によって AIM が IgM から解離しないことに起因することを明らかにし、AIM の IgM からの解離が腎疾患において重要であることを見出した。こうした AIM の結合・解離性の検討は、AIM を標的とした創薬に向けて重要な知見をもたらすものである。

目次

| | | |
|-------|----------|-----|
| 要旨 | ・・・・・・・・ | 1 |
| 目次 | ・・・・・・・・ | 2 |
| 序文 | ・・・・・・・・ | 3 |
| 材料と方法 | ・・・・・・・・ | 16 |
| 結果 | ・・・・・・・・ | 41 |
| 第一章 | ・・・・・・・・ | 41 |
| 第二章 | ・・・・・・・・ | 84 |
| 考察 | ・・・・・・・・ | 100 |
| 結語 | ・・・・・・・・ | 110 |
| 謝辞 | ・・・・・・・・ | 111 |
| 引用文献 | ・・・・・・・・ | 113 |

序論

腎疾患

腎疾患はその症状の経過により、大きく急性腎障害 (AKI : acute kidney injury) と慢性腎臓病 (CKD : chronic kidney disease) に大別される。AKI は急性腎不全 (ARF : acute renal failure) として従来複数の基準により診断・分類されてきたが、2004 年に ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative) が提唱した RIFLE (Risk・Injury・Failure・Loss・End Stage Kidney Disease) 基準 [1, 2] を皮切りに、国際的な統一基準の作成がはじまった。同年に設立された AKIN (the Acute Kidney Injury Network) が ARF に代わって、より早期の腎障害を含めた AKI という概念を提唱、2007 年には RIFLE 基準を修正し、AKIN 基準を発表した [3]。2012 年には KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) が RIFLE 基準と AKIN 基準を統合した KDIGO 基準 [4] を提唱している。AKI は可逆的であり治療可能とされるが、高い罹患率と死亡率に繋がる複雑な疾患であり、増加傾向にあるという意見もある [5, 6]。KDIGO 基準 [4] に基づけば、AKI は血清クレアチニン値が 48 時間以内に 0.3 mg/dL 以上上昇した場合か基礎値 (測定日以前 7 日以内) より 1.5 倍以上の上昇があった場合、あるいは尿量が 6 時間にわたって 0.5 mL/kg/hour 以下に減少した場合と定義される。

一方、CKD は「蛋白尿などの腎障害の存在を示す所見」もしくは「腎機能低下」が3か月以上続く状態と定義されている。厚生労働省が実施している「患者調査」の平成26年調査によると、慢性腎不全の総患者数は29万6,000人とされ、平成23年調査の34万3,000人より減少に転じたが、平成23年までは年々増加傾向にあった。また平成27年の人口動態統計によれば、平成26年から変わらず腎不全は死因の第7位であり、死亡総数の1.9%を占める。同じく厚生労働省の平成26年度の国民医療費の概況からは、総額40兆8,071億円のうち、糸球体疾患、腎尿細管間質性疾患および腎不全の医療費は1兆5,346億円となっており、いずれの指標も腎不全研究と創薬の重要性を物語っている。特にCKDは根治療法が存在せず、その開発が切に望まれるものである。

AKIがCKDの発症要因になりうるかについては未だ議論の余地はあるものの[7-10]、AKIがCKDやESRD(末期腎不全：end-stage renal disease)の素因となることが明らかになりつつある[11-18]。従って、AKIのメカニズムに基づいた新規治療法の開発は単に致死率の高いAKIへの治療に貢献するのみに留まらず、CKDの抑制につながることも期待される。一方で、様々な治療戦略・治療法が新たに試されつつも、臨床応用できた事例は近年存在していない。

AKI の病態

AKI を発症すると障害を受けた近位尿細管上皮細胞が壊死を起し、剥がれた壊死細胞は塊となって尿細管中に蓄積し、管腔内を物理的に閉塞する [19-21]。いわば、ゴミ詰まりのような状態となることが知られている。これは AKI 症例にみられる重要な病理学的所見の一つであり、特に皮髄境界部において顕著に見られる。この閉塞の結果として、糸球体濾過の減少や障害された上皮細胞・浸潤した血球細胞による炎症メディエーターの産生促進が起こり、さらなる障害の悪化と、尿細管の変性が生じる [19]。こうした尿細管障害に起因して、間質の線維化が進み CKD が続発すると考えられている [17]。

KIM-1 (kidney injury molecule -1 ; TIM-1、HAVCR1 と呼ばれる) は、障害された尿細管上皮細胞に強く発現する分子であり、腎障害マーカーとしても知られている [22-24]。これまでに様々な組織 (肺や心臓、乳腺や肝臓) で組織障害のために生じた壊死細胞塊を早期に除去することによって、回復が促されることが知られているが [25-29]、腎臓においても KIM-1 を発現した尿細管上皮細胞が貪食能を獲得し、主にアポトーシスによって生じた死細胞塊の除去をしていると報告されている [30]。アポトーシスを起こした細胞は細胞膜表面にホスファチジルセリンを表出するが、KIM-1 はこのホスファチジルセリンに対する受容体として働き、その結果として上皮細胞に貪食能を獲得させる [30]。通常、

壊死細胞の除去は貪食能に特化したプロフェッショナルであるマクロファージや樹状細胞、顆粒球が担うとされるが、上皮細胞が貪食能を獲得して、いわばセミプロフェッショナルな細胞として壊死細胞の除去を担う事例も、腎臓以外において報告されている [26, 28]。腎臓の尿細管の内腔にはマクロファージや樹状細胞は少ないことが知られており、AKI 時には貪食能を獲得した上皮細胞がこの役割を担っていると考えられている [31]。

ネコにおける腎疾患

近年の少子高齢化に伴い、愛玩動物の飼育数は世界的に増加傾向にあり、その中でもネコ（イエネコ：*Felis silvestris catus*）は最も人気のある愛玩動物である [32, 33]。ネコは他の動物と比べても、加齢とともに CKD の発症率が高いことがよく知られている [34-37]。しかしながら、この好発原因は未だ不明であり、この原因究明ならびに根治療法の開発は獣医学の中でも最大の課題の一つである。現状の治療法はヒト同様に対症療法にとどまり、根治療法は存在しない。

実験動物としての観点では、ネコはこれまでに 1 例しか全ゲノム解析の報告がなく、2014 年ようやく詳細が明らかになったに過ぎない [38, 39]。現状では十分に確立されたモデルであるとは言い難い状況ではあるものの、腎疾患や AIDS（後天性免疫不全症候群：*Acquired Immune Deficiency Syndrome*）の観点か

らは研究対象として着目されている。腎疾患の研究例としては、症例の大部分が *PKDI* 遺伝子の変異によって生じる ADPKD (常染色体優性多発性嚢胞腎 : Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease) について、ネコでも同じ *PKDI* 遺伝子変異に伴って、ヒト同様の症状を示すことが報告されている [40]。CKD モデルマウスが樹立されていないことを鑑みても、今後の研究対象として有用なモデルになりうると考えられる。

AIM (Apoptosis inhibitor of macrophage)

AIM (CD5L、*Api6*、*Sp α* と呼ばれる) は、組織マクロファージによって特異的に産生・分泌される糖タンパク質であり、マウスでは 352 アミノ酸から構成され、その分子量は約 40 kDa である。その構造は多数のシステイン残基を含む SRCR (scavenger receptor cysteine-rich) ドメインを 3 つ連ねたことを特徴とし、SRCR superfamily に属している [41, 42]。多数のシステイン残基は分子間でジスルフィド結合によって架橋構造をなし、複雑な立体構造を形成している。AIM の遺伝子発現はマクロファージにおいて、核内受容体である LXR/RXR (liver X receptor / retinoid X receptor) ヘテロダイマーによって制御されている [43-45]。また同様に LXR / RXR によって制御される転写因子 MafB によっても発現が調節されていることが報告されている [46]。

AIM はマウス・ヒトにおいて血中で豊富に存在しており、IgM (immunoglobulin M) 五量体と結合して安定化している。IgM 五量体は、分子量が約 900 kDa の巨大な分子であり、その大きさゆえに糸球体濾過膜を通過できず尿中への移行が阻害されるため、IgM に結合している AIM の血中濃度も維持される [47, 48]。AIM は IgM [47, 49] の他にも様々な分子・制御因子と結合して複合体を形成することが知られており、その代表的なものとして LPS (lipopolysaccharide) [50] や脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase) [51]、IgA (immunoglobulin A) [47] などがある。加えて、CD36 などのスカベンジャー受容体 (scavenger receptor) を介してマクロファージ、脂肪細胞、肝細胞など様々な細胞にエンドサイトーシスによって取り込まれることが知られている [51-54]。

AIM はその名の通り、マクロファージのアポトーシスの抑制作用をもつことが最初に同定された [41]。その後、上述したような様々な因子や細胞との関わりから、多くの疾患との関連性が明らかとなった。肥満 [51] やインスリン抵抗性 [55]、動脈硬化症 [41, 46]、自己免疫疾患 [47]、非アルコール性脂肪肝 [48, 52, 56] などが該当する。最近では、AKI 時における自己治癒機構に関与していることが明らかとなった [57]。肥満や脂肪肝、自己免疫疾患や腎疾患はネコにおける原因不明の好発疾患でもあり、ネコにおけるこれらの疾患と AIM の関連性を強く疑わせるものであった。

IgM と AIM

IgM は抗体のアイソタイプの一つであり、血中では主に五量体を形成して存在している [58]。Ig (immunoglobulin) は、2 つの軽鎖 (Light chain) と 2 つの重鎖 (Heavy chain) の計 4 つのサブユニットがジスルフィド結合した構造をもち、IgM では、軽鎖は 2 つ (VL, CL)、重鎖は 5 つ (VH, CH1, CH2, CH3, CH4) のドメインからなる [58]。Ig のうち、N 末端側のドメイン (VL, VH) は、個々の Ig ごとにアミノ酸配列が異なることから可変領域と呼ばれ、抗原認識を担う。その他のドメインは共通したアミノ酸配列をもち、定常領域と呼ばれる (図 1A)。また IgG の場合、重鎖は 4 つのドメイン (VH, CH1, CH2, CH3) から構成されるが、重鎖の CH1 と CH2 の間は自由に折り曲がる性質をもつことからヒンジ領域と呼ばれ、パパインによって切断される [59]。切断された Ig のうち、可変領域を含む側を Fab (fragment antigen binding) 領域と呼び、含まない側を Fc (fragment crystallizable) 領域と呼ぶ (図 1B)。IgM の CH2 ドメインはヒンジ領域に該当する。

IgM が五量体を形成するには、5 つの Ig の他、IgJ という分子が 1 つ必要であり、この IgJ がジスルフィド結合によって結合することで、IgM 五量体の構造安定化に寄与している (図 1C) [58, 60-62]。IgJ を含まない IgM の多量体は、六量体を形成することが知られている [60, 61]。このうち、AIM は IgJ が結合

した IgM 五量体に結合し、IgJ が結合していない IgM には結合しない [63]。

また、AIM は IgJ に直接結合しているわけではなく、IgM の Fc 領域 (CH2-CH4) に結合することが知られている [63]。

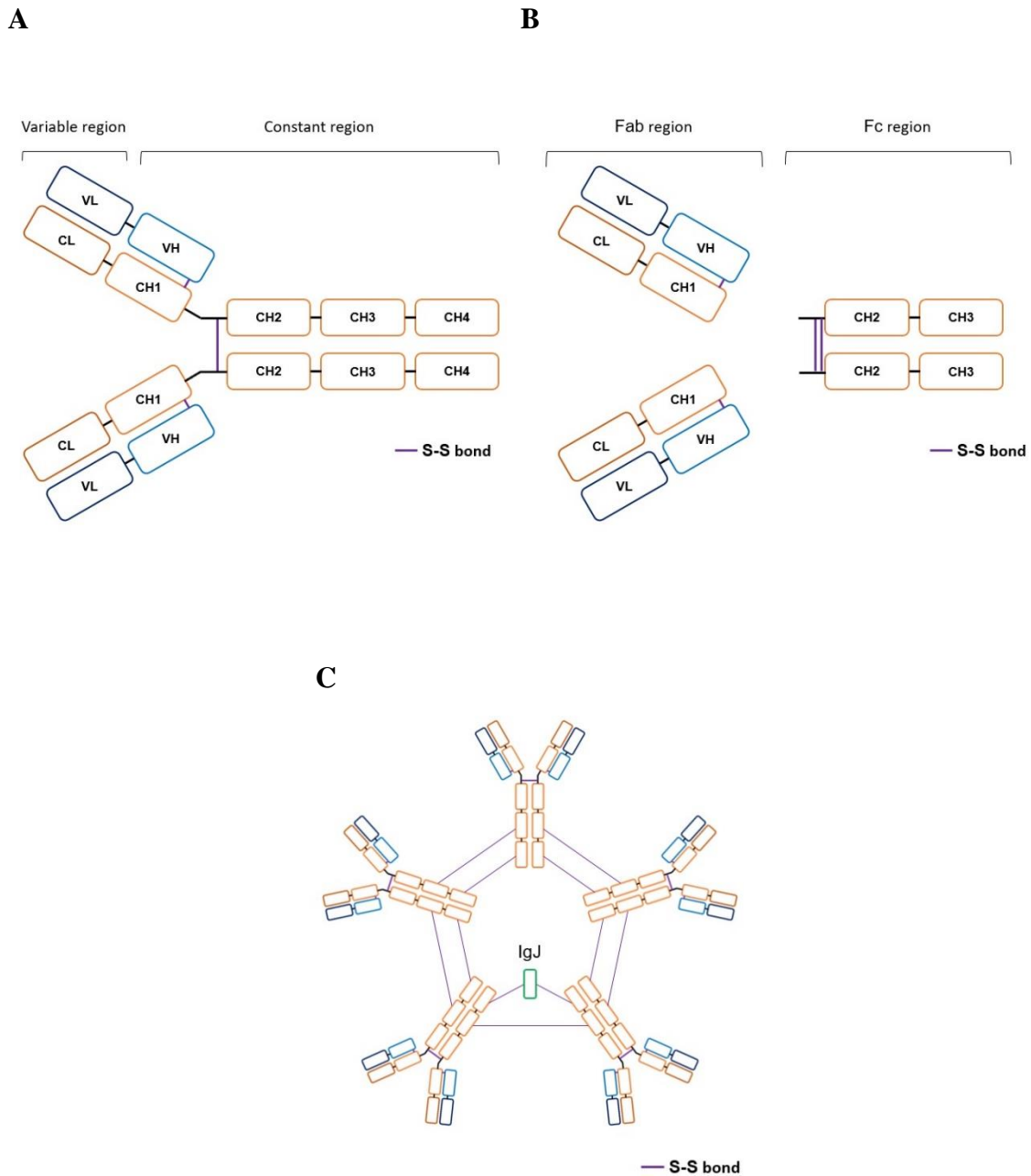


図1 IgM 構造の模式図

(A) Ig は2つの軽鎖と2つの重鎖からジスルフィド結合を介して形成される。IgM 五量体を形成する Ig は、軽鎖に2つ、重鎖に5つのドメインをもつ。可変領域 (Variable region) と定常領域 (Constant region) を示した。(B)パepsinで処理すると Ig は2つの Fab 領域 (Fab region) と1つの Fc 領域 (Fc region) に切断される。(C) IgM 五量体は5つの Ig と1つの IgJ から形成される。

AIM の AKI 時における役割

近年、AIM が AKI 時における自己治癒機構を担っていることが見出された [57]。AKI を発症すると、未解明のメカニズムによって血中で AIM は IgM から解離し、遊離した AIM として単量体の状態で血中に存在する量が増加する (以後、この IgM からの解離によって生じた単量体の AIM を Free AIM と呼称する)。Free AIM は IgM 結合時とは異なり、腎臓の糸球体濾過膜を通過して尿中へと移行し、尿細管管腔中に蓄積した壊死細胞塊に付着する。先に述べたように、障害を受けた尿細管上皮細胞は KIM-1 を発現しているが、この KIM-1 はスカベンジャー受容体の一種であり AIM のリガンドであることが明らかになった。すなわち、KIM-1 は AIM を認識することで尿細管上皮細胞による壊死細胞塊の取り込みを促進し、その結果として尿細管上皮細胞の早期回復が促されることが示された [57]。AKI 時における AIM の役割を図 2 にまとめた。

こうした機構から、AIM が治療薬となる可能性も示唆されている。AIM 欠損マウス ($AIM^{-/-}$ マウス) に両側腎動静脈虚血再灌流法 (IR : ischemia/reperfusion) による AKI を誘導すると、野生型マウスと異なり自己治癒機構が働かないため、尿細管管腔中の壊死細胞塊が除去できずに腎障害が増悪され、ほとんどのマウスが死に至る。このマウスに過剰量の AIM を静脈投与すると、AIM は尿中へと移行して尿細管管腔中の壊死細胞塊に付着する。その結果、壊死細胞塊の除去

が促進されて尿細管上皮細胞の早期再生が起こり、全身状態の改善が見られ、生存率も野生型マウスと同等にまで回復する [57]。

また、AIM を介した早期回復が CKD の抑制につながる可能性もまた示唆されている [57]。野生型マウスおよび AIM 欠損マウスに IR 処置を施し、28 日後のマウスを比較解析した結果、AIM 欠損マウスでは CKD の主な所見である線維化の増悪が認められた [57]。

WT Mouse

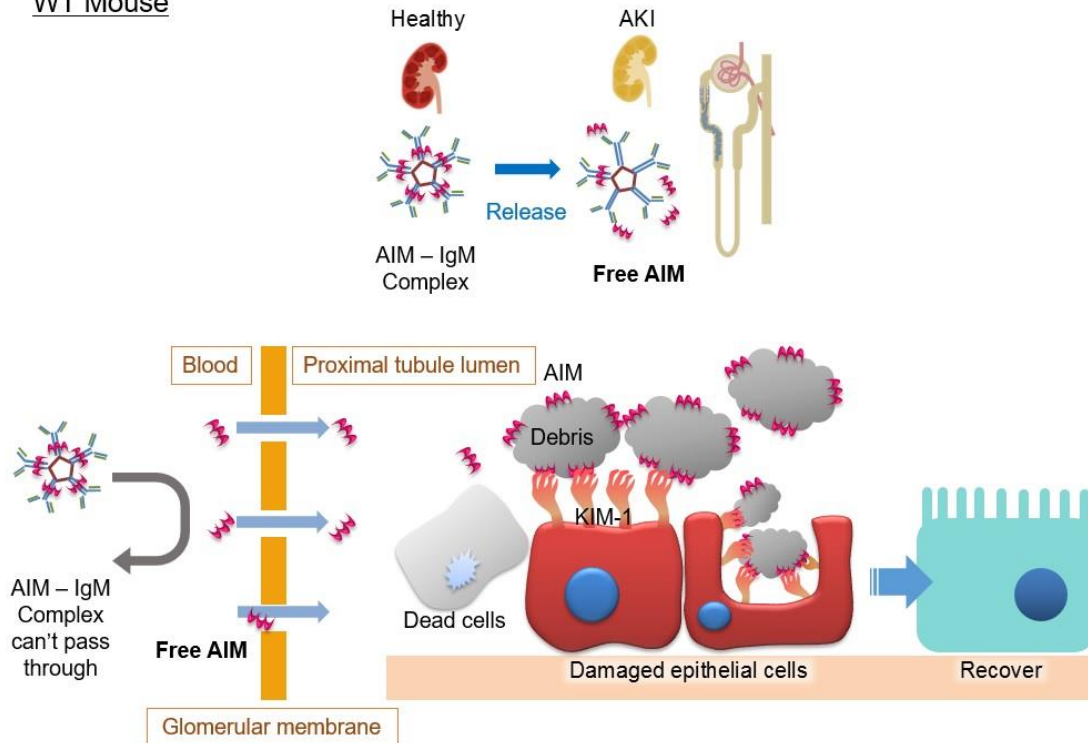


図2 AKI 時における AIM の役割

野生型マウスにおける AKI 時の AIM の役割を示した模式図。健常時では AIM は血中で IgM と結合して安定化しており、この状態では糸球体濾過膜を通過できないため、AIM は腎臓の尿細管管腔内に到達しない。一方、AKI を発症すると AIM は IgM から解離し、Free AIM となって糸球体濾過膜を通過して尿細管管腔内に移行する。障害によって尿細管管腔内には壊死細胞塊が蓄積しており、これがさらに腎障害を増悪させる。Free AIM はこの壊死細胞塊に付着する。障害を受けた尿細管上皮細胞は KIM-1 を発現するが、KIM-1 は AIM のリガンドであり、AIM を認識することで尿細管上皮細胞による壊死細胞塊の貪食を促進する。その結果、早期に壊死細胞塊が除去されることで尿細管上皮細胞の再生が促され、AKI から回復する。

本研究の目的

本研究では腎不全の好発動物であるネコに着目し、AIM と疾患との関連性を解明することを目的に、将来的な創薬を見据えた基盤的研究を行った。AKI に起因して CKD へ移行することが示されつつある昨今、CKD の好発動物であるネコをモデルとすることは、CKD モデルマウスが確立されているとは言い難い現状において、医学における腎疾患研究において新たなアプローチを提示するものである。

特に腎疾患は根治療法が存在せず、その創薬の意義は非常に大きい。今回の標的である AIM は本来の生体内における役割として腎疾患の自己治癒機構を担うことから、安全性の高い治療薬となることが期待できる。創薬研究において、マウスのみから得られる知見では不十分な点は否めず、AIM に限らず将来的なヒト創薬を目指す様々な研究上で大きなハードルとなっている。これまでにヒト創薬に先行させる形で動物用医薬品の開発に取り組んだ事例は少なく、本研究は新たな観点から、アカデミア創薬実現への軌跡を模索するものでもある。

材料と方法

試薬および抗体

試薬類について特に言及のないものは Wako 社から購入したものを使用した。合成オリゴヌクレオチドについては Sigma 社もしくは Thermo Fisher Scientific 社の受託合成サービスを利用し購入した。

使用した抗体とその用途は以下の通りである。一次抗体：抗マウス AIM 抗体 (rab2 : rabbit polyclonal, #36 : rat monoclonal. 当研究室にて作製 [43]) (rab2 : ウェスタンブロット法、免疫染色に使用。#36 : AIM タンパク精製に使用)、抗ネコ AIM 抗体 (PAC-11 : rabbit polyclonal, clone #33, #56 : mouse monoclonal. 当研究室にて作製。詳細後述) (PAC-11 : 還元条件でのウェスタンブロット法に使用。#33 : 非還元条件でのウェスタンブロット法、免疫染色、AIM タンパク精製、ELISA 法に使用。#56 : ELISA 法に使用)、抗ネコ IgM 抗体 (goat polyclonal : Bethyl 社) (ウェスタンブロット法に使用)、抗 HA 抗体 (clone 3F10 : Roche 社) (ネコ AIM-HA タンパクの精製に使用)、抗 FLAG 抗体 (clone M2 : Sigma 社) (ウェスタンブロット法および IgM-Fc タンパクの精製に使用)、抗 c-Myc 抗体 (QED Bioscience 社) (ウェスタンブロット法に使用)。抗体は以下のように作製した。抗ネコ AIM マウスモノクローナル抗体は、後述する方法で作製したネコ AIM-HA タンパク質

をマウスに免疫し、得られた B 細胞からマウス抗体産生 Hybridoma 細胞を樹立し、作製した。抗ネコ AIM ウサギポリクローナル抗体は、還元処理を行ったネコ AIM タンパクをウサギに免疫して作製した。動物への免疫と細胞融合は日本バイオテスト社に委託した。

二次抗体とその他関連試薬：抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 HRP conjugated (Thermo Fisher Scientific 社)、抗ウサギ IgG Light chain 抗体 HRP conjugated (Jackson ImmunoResearch Laboratories 社)、抗マウス IgG 抗体 HRP conjugated (Jackson ImmunoResearch Laboratories 社)、ペルオキシダーゼ標識用キット (NH₂ 基) (LK11：同仁化学社) (抗ネコ AIM 抗体 #33 に HRP を標識)、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(MULTI) (ニチレイバイオサイエンス社)、ヒストファイン マウスステインキット (ニチレイバイオサイエンス社)、ヒストファイン シンプルステイン マウス MAX-PO(R) (ニチレイバイオサイエンス社) (免疫組織化学用)、Cat IgM ELISA Quantification Set (Bethyl 社) (ネコ IgM 濃度の測定、ネコ IgM 産生 Hybridoma の選択)。

その他、使用した試薬などは以下の通りである。TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific 社)、SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific 社)、Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific 社)、TaKaRa Taq™ (TaKaRa 社)、GENECLEAN II Kit (MP Biomedicals 社)、各種制限酵素 (全

て TaKaRa 社)、Rapid DNA Ligation kit (Roche 社)、LB Broth, Lennox (BD 社)、QIAfilter Plasmid Midi Kit、QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN 社)、D-PBS(-) (ナカライテスク社)、ワンステップ CBB 染色液 (BIO CRAFT 社)。特に記載のないものについては、付属のプロトコルに従って使用した。

動物 (マウス)

$AIM^{-/-}$ マウスの作製は既報の通り、C57BL/6J と 15 世代以上戻し交配したものを使用した [41]。Feline $AIM^{+/+}$, Mouse $AIM^{-/-}$ マウス (以下、AIM ネコ化マウスと定義する)は、後述する方法によって作出した AIM プロモーター下にネコ AIM を組み込んだ遺伝子改変マウスを $AIM^{-/-}$ マウスと交配させることで作出し、使用した。また野生型マウス ($AIM^{+/+}$ マウス) は日本クレアより C57BL/6J マウスを購入したものを使用した。全てのマウスは東京大学動物施設において、特定病原体不在 (SPF : specific pathogen free) 環境下において、12 時間の明暗周期、自由食餌下で飼育した。飼料は CE-2 (CLEA Japan 社) を給餌した。本研究におけるマウスを用いた動物実験は、東京大学医学系研究科動物実験倫理委員会の承認 (承認番号 : P10-143) を受け、同委員会の定める動物実験規定を順守して行った。

動物（ネコ）

健常ネコおよび AKI 症例ネコの血清・血漿は、各動物病院においてオーナーの同意を得た上で供与していただいたものを使用した。AKI 症例の検体は各動物病院において、臨床症状および血液生化学検査等から AKI と診断された。健常ネコの腎組織は日本獣医生命科学大学の盆子原誠先生より供与していただいた。また実験に使用したネコはオリエンタル酵母工業社より購入し、北里大学動物施設において、SPF 環境下で飼育した。本研究におけるネコを用いた動物実験は、共同研究先である日本獣医生命科学大学（承認番号：#27-1 および #s27-1）および北里大学（承認番号：#15-056）の各倫理委員会において、それぞれ承認を受けて、各規定を遵守し実施した。

ネコ AIM cDNA のクローニング

SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 社) を用いた RACE 法によって、ネコ脾臓由来 RNA から 5' 側の cDNA 配列を得た。プライマーは kit に同梱された Universal Primer を forward primer とし、reverse primer はネコ *cd5l* mRNA 予想配列 (XM_11291200.1; GI:755808687) を参考に設計したものを使用した。5'側の配列を得た後、この結果を参考に設計した forward primer と予測配列をもとに作製した reverse primer を用いて、ネコ脾臓組織 cDNA (Zyagen 社) を

鋳型に PCR 法によってネコ *AIM* mRNA 全長を増幅し配列を得た。この cDNA から得られたネコ *AIM* は 3-SRCR 型のみであった。

4-SRCR 型のネコ *AIM* mRNA 全長配列は、ウエスタンブロット法によって、後に 4-SRCR 型と判明する 3-SRCR 型とは異なる分子量の *AIM* の存在が示唆されていたネコの脾臓由来 RNA を鋳型に作製した cDNA から PCR 法によって得た。プライマーは 3-SRCR 型の配列をもとに開始コドン (ATG) を含む forward primer と終止コドン (TAG) を含む reverse primer を用いた。

以下に、使用した primer 配列を列記する。

fSRCR1_rev AACTCCACACGACCTTCACAGCGG

fAIM_5_f_EcoRI GCGGAATTCTCGCCTGGCTCATGGCGCTACTCT

fAIM_3_r_XhoI GCGCTCGAGAGCATCAGGTAGGCCAGACTGCTG

発現ベクターの構築

マウス *AIM* 発現ベクター (pCAGGS-mAIM) については既報の通りである [41]。ネコ *AIM* およびネコ *AIM*-HA 発現ベクターは、クローニングしたネコ *AIM* cDNA 断片を pCAGGS ベクター、pCAGGS-HA ベクターに挿入することで構築した。各種ネコ *AIM* 組換え体は、PCR 法によって組換えたネコ *AIM* 変異 cDNA 断片を pCAGGS ベクターに導入した。(それぞれ pCAGGS-fAIM (3-SRCR)、

pCAGGS-fAIM (4-SRCR)、pCAGGS-fAIM-HA、pCAGGS-fAIM- Δ SRCR3、pCAGGS-fAIM-SR3m、pCAGGS-fAIM-SR3mutant と表記する。)

IgM-Fc 五量体の発現には、IgM Fc 領域 (図 1B) と IgJ を発現するベクターがそれぞれ必要である [63]。マウス脾臓及びネコ脾臓から抽出した RNA を鋳型に cDNA を合成し、既報のヒト IgM-Fc 発現ベクター [63] を参考に、マウスおよびネコの IgM 配列をもとに設計した primer によって IgM-Fc をクローニングした。得られた cDNA 断片の N 末端には Ig κ の分泌シグナルと FLAG タグを付与した。この Ig κ - FLAG - IgM-Fc 断片を pCAGGS ベクターに挿入し、マウスおよびネコ FLAG - IgM-Fc 発現ベクターを構築した。(それぞれ pCAGGS-FLAG-mIgM-Fc、pCAGGS-FLAG-fIgM-Fc とする。)

同様にマウスおよびネコの IgJ をクローニングし、C 末端に c-myc タグを付与し、これを pCAGGS ベクターに導入することで、マウスおよびネコ IgJ-Myc 発現ベクターを構築した。(それぞれ pCAGGS-mIgJ-Myc、pCAGGS-fIgJ-Myc とする。)

マウス KIM-1 発現ベクター (mKIM-1-IRES-EGFP) については既報の通りである [57]。ネコ KIM-1 発現ベクターは、後述するネコ AKI モデルの腎臓から RNA を抽出して合成した cDNA を鋳型にネコ KIM-1 をクローニングし、マウス KIM-1 同様に pIRIS2-EGFP ベクターに挿入して構築した (fKIM-1-IRES-EGFP)。

ウエスタンブロット法 (WB [Western blot] 法)

還元条件の WB 法は、まずサンプルに 2 × Sample buffer (0.1M Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 0.02% BPB, 10% 2-Mercaptoethanol) を混合し、95°C、5 分間の条件で処理することで還元を行ってサンプルを調整した。非還元条件の WB 法は、サンプルに還元剤である 2-Mercaptoethanol を加えていない 2 × Sample buffer を混合して調整した。それぞれの調整処理を行ったサンプルを e-PAGEL (10% または 5-20%、ATTO 社) にロードし、SDS-PAGE 法によって分離した。SDS-PAGE 後、タンパク質を PVDF 膜 (Immobilon-P, Merck 社) に転写し、5% スキムミルク /TBST により室温、1 時間の条件でブロッキングした。PAC-11 を一次抗体に用いる際は、1% BSA、5% スキムミルク /TBST をブロッキング溶液とした。一次抗体反応はブロッキング溶液で一次抗体を希釈し、4°C、overnight の条件で行った。反応後、TBST にて 3 回洗浄した。HRP conjugate ではない一次抗体を反応させた場合は、5% スキムミルク /TBST にて二次抗体を希釈して室温、2 時間の条件で二次抗体反応を行った。反応後、TBST にて 3 回洗浄した。検出試薬は Luminata Forte Western HRP substrate (Merck 社) を用い、シグナルの検出・撮影は ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare 社) を用いた。

使用した抗体の希釈条件は以下の通りである。抗ネコ AIM 抗体 PAC-11 (1:1000)、抗ネコ AIM 抗体 #33 HRP conjugate (1:1000)、抗マウス AIM 抗体 rab2

(1:2500)、抗ネコ IgM 抗体 HRP conjugate (1:5000)、抗 FLAG 抗体 HRP conjugate (1:10000)、抗 c-myc 抗体 HRP conjugate (1:20000)、抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 HRP conjugate (1:5000)、抗ウサギ IgG Light chain 抗体 HRP conjugate (1:20000)、抗マウス IgG 抗体 HRP conjugate (1:5000)。

免疫沈降法および糖鎖の切断

10 μ L の抗ネコ AIM 抗体 #33 をあらかじめ結合させた NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare 社) に 5 μ L のネコ血漿を加え、4°C、overnight の条件で抗原抗体反応を行った。反応後 Wash buffer (1% Nonidet P-40, 20mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, Protease 阻害剤) にて 5 回洗浄した。Elution buffer (0.1 M Glycine-HCl, pH 2.0) 40 μ L を用いて溶出し、溶出液を直ちに 1M Tris-HCl, pH 8.5 にて中和を行った。糖鎖修飾の切断には Enzymatic Protein Deglycosylation Kit (Sigma 社) を用い、付属のプロトコルに従って酵素反応処理を行った。産物を 2 \times Sample buffer と混合し、95°C、5 分間の条件で還元を行って SDS-PAGE に供し、WB 法にて検出した。

細胞培養

HEK293T 細胞は、10% FBS (Thermo Fisher Scientific 社)、0.2% Gentamicin

reagent solution (Thermo Fisher Scientific 社)を加えた DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (Thermo Fisher Scientific 社) 培地 (以後、この培地を 10% FBS DMEM と表記する) を用いて 37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞は 90%コンフルエントの状態まで培養後、0.25% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific 社) 処理によって細胞培養ディッシュまたはフラスコから剥離し、適正数を継代した。

抗ネコ AIM マウス抗体産生 Hybridoma 細胞 (#33, #56) は R-HAT 培地 (15% FBS, RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, 1mM Sodium Pyruvate, HAT supplement, 100U/mL Penicillin-Streptomycin [いずれも Thermo Fisher Scientific 社]) を維持培地とし、抗マウス AIM ラット抗体産生 Hybridoma 細胞 (#36) は 10% FBS、RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, 0.2% Gentamicin reagent solution を維持培地とした。抗体の精製を目的とした培養には Hybridoma SFM 培地 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。

IgG (Immunoglobulin G) の精製

抗体 (抗ネコ AIM マウス IgG #33, #56 または抗マウス AIM ラット抗体 #36) を産生させた Hybridoma SFM 培養上清を 1400rpm、4℃、5 分間の条件で遠心分離し、Rapid filter Max (BM 社) によって濾過して細胞を完全に取り除いた。HiTrap

Protein G HP (GE Healthcare 社) を用いて IgG を精製した。Binding buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0) によってカラムを平衡化した後、培養上清をカラムにロードし、IgG を Protein G に結合させた。gel bed volume の 15 倍量 (以降、bed を単位として表記する) の Binding buffer を用いてカラムを洗浄後、8 bed の Elution buffer (0.1 M glycine-HCl, pH 2.8) を用いて溶出した。IgG を含む溶出液は直ちに 1M Tris-HCl, PH8.5 を用いて中和した。中和後の溶出液は Amicon Ultra (Merck 社) を用いて濃縮し、PBS に置換した。CBB 染色にて IgG の純度を確認した後、分光光度計 (BioPhotometer Spectrophotometer UV/VIS、Eppendorf 社) を用いて吸光度 (280 nm) を測定して抗体濃度を概算した。抗体濃度 (mg/ml) = 吸光度 (280 nm, 1 cm 光路長セル) ÷ 1.4 とした。特に言及のないものについては、1 mg/mL の濃度に調整し、各実験に用いた。

AIM 精製用アフィニティーカラムの作製

精製した抗ネコ AIM 抗体 #33 または抗マウス AIM 抗体 #36 を、HiTrap NHS-activated HP (GE Healthcare 社) に付属のプロトコルに従って結合させ、抗 AIM アフィニティーカラムを作製した。精製した抗体を Amicon Ultra を用いて、Coupling buffer (0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3) に置換し約 10 mg/mL に濃縮した。カラムを 6 bed の氷冷した 1mM HCl で洗浄した後、1 bed の抗体液をロー

ドした。4°Cで一晩静置して抗体を結合させた後、buffer A (0.5M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.3)を 6 bed、buffer B (0.1 M sodium acetate, 0.5 M NaCl, pH 4)を 6 bed ロードして洗浄し、再び buffer A を 6 bed ロードした後、室温で 1 時間静置した。その後、buffer B を 6bed、buffer A を 6 bed、buffer B を 6 bed と順にロードして洗浄し、Equilibration buffer (20mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.1mM EDTA, pH7.5) にて平衡化した後、4°Cにて保管した。

ゲルろ過クロマトグラフィー

血清のゲルろ過クロマトグラフィーは AKTApurifier (GE Healthcare 社) を使用し、Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare 社) を用いて行った。付属のマニュアルに従ってカラムをシステムに接続し、またサンプルループを PBS で洗浄後、血清 200 μ L をセットした。流速を 0.5 mL/min にて、超純水 0.5 bed、脱気した PBS 1.5 bed を送液してカラムを洗浄した。その後、流速を 0.25 mL/min に設定して血清を送液し、続けて PBS を 1 bed 送液して溶出した。フラクションは 1 mL 単位で回収し、波長 280 nm でタンパクの溶出を記録した。カラムはさらに 1bed の PBS で洗浄後、20% EtOH に置換して保管した。

細胞の Transfection

HEK293T 細胞への Transfection は、Gene Pulser Xcell™ エレクトロポレーションシステム (Bio-rad 社) を用い、電気穿孔法によって行った。導入条件は 400V 125 μ F とし Gene Pulser® cuvette 0.4 cm を用いた。

AIM 定常発現細胞の樹立

マウス AIM またはネコ AIM (3-SRCR) を定常発現する HEK293T 細胞を樹立した。pCAGGS-AIM vector を制限酵素で切断して直鎖状にし、同じく直鎖状にした Hygromycin 耐性遺伝子と共に電気穿孔法によって HEK293T 細胞に導入した。10% FBS DMEM にて培養し 80%コンフルエントまで増殖させた後、Hygromycin 500 μ g / mL を添加した 10% FBS DMEM に培地交換した。24 時間毎に培地交換を続け、耐性遺伝子の導入された一細胞由来のコロニーを形成させた。各コロニーを 48 well plate に継代し、以降は 10% FBS DMEM にて培養した。培養上清中の AIM の発現を WB 法で検出し、AIM を発現している株を選択し、定常発現細胞を樹立した。

組換え蛋白質の作製

ネコ AIM-HA : pCAGGS - fAIM-HA を HEK293T 細胞に Transfection し、5%

FBS DMEM にて 3 日間培養し、リコンビナント AIM-HA (rAIM-HA) を発現した培養上清を回収した。回収した上清は 1400rpm、4℃、4 分間の条件で遠心分離を行った後、Rapid filter Max (BM 社) によって濾過し、細胞残渣を除去した。精製に使用する HA アフィニティーカラムは gel bed volume を 3ml になるように Anti HA Affinity matrix (Roche 社) を空カラムに充填して作製した。精製はまず Equilibration buffer (20mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.1mM EDTA, pH7.5) を用いてカラムを平衡化し、次に上清をカラムにロードして rAIM-HA を matrix に結合させた。その後 20 bed の Wash buffer (20mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.1mM EDTA, 0.05% tween20, pH7.5) にて洗浄し、続けて tween 20 を除去するために 10 bed の Equilibration buffer を用いて、洗浄した。溶出は 5.4 bed の Elution buffer (0.1M Glycine-HCl, pH3.0) にて行い、溶出液は直ちに Neutralization buffer (1M Tris-HCl, pH8.5) を用いて中和した。中和後の溶出液は Amicon Ultra を用いて濃縮し、PBS に置換した。タンパク濃度の定量には Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。保管は -80 °C にて行った。

マウス AIM: マウス AIM 定常発現細胞を 5% FBS DMEM にて 3 日間培養し、ネコ AIM-HA 同様に培養上清を回収した。別途作製した抗マウス AIM アフィニティーカラムを用い、精製を行った。精製は Equilibration buffer によってカラムを平衡化した後、培養上清をカラムにロードして rAIM をカラムに結合させた。

30 bed の Wash buffer にて洗浄後、10 bed の Equilibration buffer を用いて tween 20 を除去、洗浄した。溶出には Elution buffer (0.1M Glycine-HCl, pH2.3) を用い、6 bed をロードして溶出液を回収し、直ちに Neutralization buffer にて中和した。中和後の溶出液は Amicon Ultra を用いて濃縮し、PBS に置換した。タンパク濃度の定量には Pierce BCA Protein Assay Kit を用いた。また、リムルスカラーKY テストワコー (Wako 社) を用いてエンドトキシン量を測定した。

ネコ AIM (3-SRCR) : ネコ AIM 定常発現細胞を 5% FBS DMEM にて 3 日間培養し、マウス AIM 同様に培養上清を回収し、別途作製した抗ネコ AIM アフィニティーカラムを用いて精製を行った。Elution buffer に 0.1M Glycine-HCl, pH2.0 を用いた他は、マウス AIM 同様に精製した。

その他のネコ AIM : pCAGGS-fAIM (4-SRCR)、pCAGGS-fAIM-SR3m、pCAGGS-fAIM-SR3mutant をそれぞれ遺伝子導入した HEK293T 細胞を 5% FBS DMEM にて 3 日間培養し、得られた培養上清から精製した。それぞれの培養上清を用いた他はネコ AIM (3-SRCR) と同様の方法・条件で精製した。

IgM-Fc : IgM-Fc (IgJ の結合した IgM-Fc 五量体) は、pCAGGS-FLAG-IgM-Fc、pCAGGS-IgJ-Myc を HEK293T 細胞に co-transfection し、5% FBS DMEM にて 3 日間培養することで発現させた。AIM 同様に培養上清を回収し、ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel (Sigma 社) を gel bed volume 1ml になるように充填して作製した

カラムを用いて精製した。精製に使用した各 buffer ならびに精製条件は付属の
プロトコルに従い、Elution buffer は 0.1M Glycine-HCl, pH3.0 を用い、溶出液を
直ちに 1M Tris-HCl, pH 8.5 にて中和した。AIM 同様に濃縮・定量を行い、4℃
に保管した。

IgM の精製

HiTrap IgM Purification HP Column (GE Healthcare 社) を用いてネコ IgM の精
製を試みた。ネコ IgM を産生させた Hybridoma SFM 培養上清を 1400rpm、4℃、
5 分間の条件で遠心分離し、Rapid filter Max によって濾過して細胞を完全に取
り除いた。上清に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (硫酸アンモニウム) を加え、最終濃度が 0.8 M に
なるように調整し、再度濾過滅菌を行った。Binding buffer (20 mM sodium
phosphate, 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.5) によってカラムを平衡化した後、上清をカラ
ムにロードし、IgM をカラムに結合させた。15 bed の Binding buffer を用いてカ
ラムを洗浄後、12 bed の Elution buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.5) を用い
て溶出した。溶出液を CBB 染色にて IgM の純度を確認した。

AIM および IgM 血中濃度の測定

ネコおよびネコ化マウスの血中 AIM 濃度は、WB 法によって、作製したネコ

rAIM の濃度希釈系列から標準曲線を作成して測定した。抗体は PAC-11 を用いた。また検出限界は 2.5 ng であった。

ネコの尿中 AIM 濃度の検出は抗ネコ AIM 抗体 (#33, #56) による ELISA 法によって実施した。ネコ AIM を用いた検出限界は 1.9531 ng/mL であった。また、ネコの血中 IgM 濃度の測定には Cat IgM ELISA Quantification Set (Bethyl 社) を使用した。尿は 10 倍希釈、血清は 3000 倍希釈したものを ELISA 法に用いた。ELISA 法は各サンプルにつき 2 連で解析を行った。

***In vitro* Phagocytosis assay**

In vitro Phagocytosis assay は既報に基づき行った [57]。実験に用いた mProx24 細胞 (C57BL/6 マウス腎臓由来近位尿細管上皮細胞株 [64]) は聖マリアンナ医科大学の菅谷健客員教授よりご提供いただいた。まず壊死細胞塊の作製を以下のように行った。すなわち、mProx24 細胞を PBS 中で 65°C、20 分間、熱処理することで壊死させ、その後、Fixable Viability Dye (FVD, eBioscience 社) eFluor® 780 を用いて蛍光標識した。標識した壊死細胞は、洗浄後、無血清の DMEM/F12 (1:1) に懸濁した後、100 回以上ピペッティングすることにより破碎することで壊死細胞塊とした。このようにして調整した蛍光標識壊死細胞塊に、マウス AIM、ネコ AIM (3-SRCR または 4-SRCR) を 100 µg/mL にて、また陰性対照として等量

の PBS を加え、37°C、1 時間静置することで AIM を付着させた。次に KIM-1 発現細胞を以下のように調整した。すなわち、マウスまたはネコ KIM-1-IRES-EGFP、コントロールとして EGFP 発現ベクター (pCAGGS-EGFP) を mProx24 細胞に Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて遺伝子導入した。EGFP 発現細胞が KIM-1 を発現していることは、抗 KIM-1 抗体を用いたフローサイトメトリー (LSRII, BD 社) により確認した。遺伝子導入後、24 時間の培養を行った KIM-1 発現細胞を、上記にてあらかじめ調整した AIM を付着させた eFluor[®] 780 標識壊死細胞塊に加え、インスリン 5 µg/mL、トランスフェリン 5 µg/mL、亜セレン酸 5 ng/mL を含む無血清 DMEM /F12 (1:1) 中で混合し 37°C、30 分間の静置し、壊死細胞塊を KIM-1 発現細胞に貪食させた。その後、細胞を直ちに氷冷した PBS 中に回収し、さらに氷冷した PBS を用いて 3 回の洗浄を行った。最後に、DAPI を加えた PBS 中に再懸濁した後、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。DAPI 陰性細胞を生細胞とし、生細胞のうち EGFP 陽性細胞を KIM-1 発現生細胞とした。KIM-1 発現生細胞のうち、eFluor[®] 780 陽性の割合を、壊死細胞塊を取り込んだ細胞の割合として算出した。本実験は、1 回の実験において各サンプルにつき 3 連で解析を行った。

マウス AKI モデルの作製 (両側腎動静脈虚血再灌流法)

両側腎動静脈虚血再灌流法 (IR : ischemia/reperfusion) によるマウス AKI モデルの作製は参考文献に基づいて行った [57,65]。マウスは 8~12 週齢のオスを用い、麻酔は Avertin (0.5 g tribromoethanol, 0.25 g 2-methyl 2-butanol / 40 ml H₂O) を 20 mL/kg bodyweight の腹腔内投与によって行った。脇腹切開によって両側の腎臓を確認し、左右それぞれの腎動静脈を同時にクランプによって封鎖して、虚血を誘発した。虚血後にクランプを外して血液の再灌流を確認し、閉創した。外科処置は、ヒーターマットを用いてマウスの体温を 37°C に維持しながら行った。採血は尾動脈から行い、microtainer (BD 社) を用いて血清を得た。

ネコ AKI モデルの作製

ネコの AKI モデルの作製はマウスの IR を基本に確立し、北里大学の倫理委員会の承認を得て実施した。近年、ネコにおける IR の報告もあり、これもプロトコル確立の参考にした [66]。

ネコに導入前投薬としてアトロピン (Mitsubishi Tanabe Pharma 社) を 0.05 mg/kg bodyweight で皮下投与し、プロポフォール (Mylan Pharmaceutica 社) を 10 mg/kg bodyweight で静脈内投与して麻酔導入した。その後、イソフルランの吸入麻酔にて維持した。ネコを仰臥位に保定し、剣状突起から臍部までを正中切開し

て、左右の腎臓を確認した。腎動静脈を周囲組織から分離し、左右それぞれの動静脈を、サテンスキー鉗子を用いて同時に鉗圧し、虚血を誘発した。この状態で1時間静置した。虚血後、サテンスキー鉗子の鉗圧を解除し、腹壁筋層、皮下織、皮内を4-0吸収性縫合糸 (Johnson & Johnson 社) にてそれぞれ単純結紮した。その後、皮膚を4-0非吸収性縫合糸 (Johnson & Johnson 社) で閉創した。抗生物質はアンピシリンナトリウム (Meiji Seika 社) を術前と術後に 20 mg/kg bodyweight で静脈内投与した。また、疼痛管理にブプレノルフィン (Otsuka Pharmaceutical 社) 20 µg/kg bodyweight を静脈内投与した。観察期間終了日には、75mg/kg bodyweight のペントバルビタールナトリウム (Kyoritsu Seiyaku 社) を静脈内投与した後、飽和塩化カリウム液を静脈内投与して、安楽死した。

腎機能の評価

マウス血清のクレアチニン濃度 (Cre) は Lab-Assay™ Creatinine Kit (Wako 社) を使用して測定した。ネコの Cre および血中尿素窒素 (BUN) は SIMENS Dimension RXL Max System (SIEMENS 社) または JCA-BM2250 (JEOL 社) を用いて測定した。

Periodic acid-Schiff (PAS) 染色および免疫組織化学

10% ホルマリン中で 48 時間固定を行ったネコの腎臓および 4% パラホルムアルデヒド/PBS 中で 24 時間固定を行ったマウスの腎臓をパラフィン包埋し、ブロックを作製した。切片は 4 μm の厚さに薄切し、染色を行った。キシレンとエタノールを用いて脱パラフィン処理を行った後、流水で 5 分間水洗した。その後、1% 過ヨウ素酸液 (武藤化学社) を室温、10 分間の条件で酸化し、1 分間の流水水洗を経て、コールド・シッフ試薬 (武藤化学社) で 15 分間反応させた。反応後、亜硫酸水 (武藤化学社) を 2 分間の条件で 3 回処理し、続けて 5 分間の流水水洗を行った。マイヤーヘマトキシリン (武藤化学社) 3 分間の条件で核染色を行い、流水水洗 3 分を経てから、70% エタノール、80% エタノール、90% エタノール、99.5% エタノール、無水エタノール、キシレンの順に置換して組織の脱水を行った。脱水後、Malinol 750cps (武藤化学社) を用いて封入した。

免疫組織化学による AIM の検出は各種 Histofine の付属プロトコルに準拠しながら、以下のように行った。マウス AIM の検出には抗 AIM ウサギポリクローナル抗体 (rab2) を用い、二次抗体には Histofine Simple Stain Mouse MAX-PO (R) (NICHIREI 社) を 30 分の条件で使用した。ネコ AIM の検出には抗ネコ AIM マウスモノクローナル抗体 (#33) を用いた。ネコ組織における検出の二次抗体には Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI) (NICHIREI 社) を 30 分の条件で使用

し、ネコ化マウスでのネコ AIM の検出には Histofine Mouse Stain Kit (NICHIREI 社) を使用した。それぞれ DAB を用いて発色した後、ヘマトキシリンによるカウンター染色を行った。染色像は倒立顕微鏡 (FSX-100; Olympus 社) を用いて観察・撮影した。

リアルタイム PCR (定量 PCR [qPCR : quantitative polymerase chain reaction])

mRNA の qPCR は QuantStudio 3 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific 社) を使用し、 $\Delta\Delta CT$ 法にて解析した。内在性コントロールには GAPDH を用いた。検出に使用した primer は以下の通りである。

f-feline GAPDH AAGGGTGGGGCCAAGAGG

r-feline GAPDH AGAGGGGCCAGGCAGTTG

f-feline KIM-1 ACCTCAAGCCAGCTACTTCATCTT

r-feline KIM-1 TGGTGTCTCGTCTCCTGTG

f-feline AIM TCAAGTGCTCGGGGAAGGAG

r-feline AIM TCTTCACAGACCACAGCCACA

f-mouse GAPDH AGAACATCATCCCTGCATCC

r-mouse GAPDH CACATTGGGGGTAGGAACAC

表面プラズモン共鳴法 (SPR : Surface Plasmon Resonance)

AIM と IgM-Fc 五量体の結合親和性は Biacore T100 (GE Healthcare 社) を用いた SPR 測定により評価した。CM5 sensor chip (GE Healthcare 社) のフローセルに、酢酸バッファー (pH 4.5) に溶解した IgM-Fc 五量体を流速 10 μ L/min で注入し、アミンカップリング法により固定化した。固定化量は 1000 RU (resonance unit) 程度になるように注入時間を調整した。リファレンスフローセルには、同様の手法で BSA (Bovine Serum Albumin、Sigma 社) を 1000 RU 程度固定化し、非特異結合の寄与の減算に用いた。AIM は running buffer (PBS, pH 7.4) に溶解して注入した。測定は single-cycle kinetic analysis 法に従って行い、50 nM から 5 μ M までの濃度範囲で 5 段階の AIM 希釈系列を作成し、流速 30 μ L/min の条件で 120 秒間のコンタクトタイムと 60 秒のインターバルを繰り返し、最後に、30 分間の待ち時間を設定して AIM の解離速度を測定した。データの解析は Biacore T100 evaluation software を使用し、heterogeneous ligand model を適用して反応速度定数と結合解離定数を算出した。

タンパク質ホモロジーモデリング

AIM SRCR3 ドメインのホモロジーモデリングには、Swiss-Model server (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL>) を使用した [67, 68]。Blast [69] と

HHBlits [70] を用いた SWISS-MODEL template library (SMTL version 2016-04-06, PDB release 2016-04-01) の検索結果で最もホモロジーの高かった human CD6 の X 線結晶構造 (5a2e.1.A; PDB ID: 5A2E) をテンプレートとして、AIM の立体構造モデルを構築した。配列間のアライメントは Promod-II [71] を用いた。AIM と CD6 間で保存された配列は CD6 結晶構造の原子座標を利用し、挿入および欠失部分はフラグメントライブラリーを基に構築した。モデル構造のジオメトリは分子力場計算により整えた。得られた QMEAN4 スコア [72] はネコ、マウス、ヒト、ネコ変異体でそれぞれ -1.95、-2.36、-2.34、-2.36 であった。分子モデルの画像は UCSF Chimera package (Computer Graphics Laboratory, supported by NIH P41 RR-01081) [73] を用いて描出した。

AIM ネコ化マウスの樹立

AIM (*cd5l*) 遺伝子上流 7 kb のマウスゲノム DNA 断片をプロモーター領域とし、PCR 法によって C57BL/6 マウスのゲノム DNA から得た。プロモーター領域とネコ AIM (3-SRCR) の cDNA 断片をウサギ β -globin non-coding exon/intron カセットに挿入してベクターを構築した。ベクター領域を制限酵素処理によって除去し、得られた導入遺伝子を C57BL/6 マウス受精卵の前核に注入して、遺伝子改変マウスを作出した。この遺伝子改変マウスと AIM^{-/-}マウスを交配するこ

とで AIM ネコ化マウスを樹立した。

腎障害の評価 (ATN [Acute tubular necrosis : 急性尿細管壊死] スコア)

腎組織における障害度を示す ATN スコアは既報を参考に以下の通り算出した [74]。個体ごとに腎組織の異なる 5 つの領域について PAS 染色を行い、以下の定義に基づいて障害のある尿細管の割合を算出した。すなわち、各組織像において尿細管の拡張、刷子縁の障害、タンパク円柱、間質の肥大、壊死などを認めた近位尿細管を障害のある近位尿細管とした。全近位尿細管数のうち、障害のある近位尿細管が占める割合を求め、以下の指標でスコア化した (0, none; 1, < 11%; 2, 11–25%; 3, 26–45%; 4, 46–75%; 5, > 75%) [54]。5 つの領域について、それぞれスコアを算出し、その平均をその個体におけるスコアとした。評価は盲検法で行った。各群最低 3 匹検討した。

統計解析

標本数を事前検討するための検出力計算は行わなかった。また ATN スコアの算出を除き、サンプルやマウスのランダム化は行わなかった。ATN スコアの算出は盲検法で実施した。各 *in vitro* 実験は最低 3 回以上実施し検討した。解析は BellCurve for Excel (Social Survey Research Information 社) を使用し、特に記載が

ない場合は平均値 ± 標準誤差 (s.e.m.) で示した。対にした結果については、Student's t-test 等によって検定した。複数の集団間における比較には Bonferroni のポストホックテストとしての多重比較検定 (two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-hoc test) を用いた。 Kaplan-Meier 曲線における P 値はログランク検定で算出した。特記時を除き、有意差は各図に示した。

結果

第一章 ネコ急性腎障害時における AIM の動態

AIM はこれまでに、肥満 [51] や動脈硬化症 [41, 46]、自己免疫疾患 [47]、非アルコール性脂肪肝 [48, 52, 56]、さらには腎疾患 [57] といった様々な疾患への関与が明らかとなってきた。これらの疾患群はネコにおける原因不明の好発疾患群と類似しており、ネコ AIM の特性がこれらの疾患群へ影響していることが予想された。特に腎疾患はネコにおける最大の疾患の一つであり、その機序の解明と新規治療法の開発による社会的意義は非常に大きいものである。同時に、ヒト医薬品創薬に先駆けた新規動物用医薬品の開発は、未来の創薬を考える上でも貴重な示唆をもたらすと考えられる。

しかしながら、これまでにネコの AIM に着目した研究は行われておらず、ネコ AIM の配列も不明であった。従って本研究では、まずネコ AIM cDNA のクローニングとその cDNA を用いて AIM タンパク質の発現を行って、既知のマウス AIM との機能の比較解析を行った。次にネコ AKI モデルを作製し、AIM の動態を検討した。

ネコは 3-SRCR 型と 4-SRCR 型の 2 つの AIM 型が存在する

まず、ネコ AIM のアミノ酸配列を得るため、市販のネコ脾臓 cDNA からクローニングを行った。得られたネコ AIM の配列は、既知のマウス・ヒト AIM と同様に 3 つの SRCR ドメインをもち、その全長もほぼ同様であった。アミノ酸配列のマルチプルアライメント解析を行い、比較した (図 3)。アミノ酸の相同性は、ネコ - ヒト間で 63.6%、マウス - ヒト間で 67.6%であった。

次に、血中の AIM タンパクの検出を試みた。これまでに樹立した抗マウス AIM ウサギポリクローナル抗体 (rab2) はマウスの他、ヒト・イヌの AIM ともに交差性が認められ、ウエスタンブロット法 (WB 法) にてそれぞれの AIM の検出が可能であったが、ネコ AIM との交差性は認められなかった (図 4A, イヌはデータ省略)。このため、抗ネコ AIM 抗体を樹立することにした。まず、得られたネコ AIM アミノ酸配列をもとに、C 末端に HA タグを付与したネコ AIM-HA 発現ベクター (pCAGGS-fAIM-HA) を樹立し、これを HEK293T 細胞に遺伝子導入して、ネコリコンビナント AIM-HA (ネコ rAIM-HA) を発現させた。AIM は分泌シグナルを有するため、rAIM-HA は培養上清中に放出される。ネコ rAIM-HA の培養上清中の発現を、抗 HA 抗体を用いた WB 法で確認し、発現の認められた培養上清から抗 HA カラムを用いてタンパクの精製を行った (データ省略)。抗ネコ AIM 抗体を作製するため、得られたネコ rAIM-HA をマウスに

免疫し、免疫したマウスの B 細胞とマウスミエローマ細胞を融合して、Hybridoma 細胞を樹立した。抗体のスクリーニングは、まずネコ rAIM-HA を固相化し、Hybridoma 細胞の上清と反応させる ELISA 法にて行った。この結果、50 クロンの候補が得られた。次に、マウス IgG が含まれる Hybridoma 細胞の上清を一次抗体として、ネコ rAIM を発現させた培養上清に対し、WB 法による検出を試みた。この結果、候補を 12 クロンの絞った。選択した各抗体での検討結果を図 4B に示した。なお、還元条件では全ての抗体で交差性が認められなかった (データ省略)。

還元条件での WB 法でネコ AIM を検出可能な抗体を樹立するため、還元処理を行ったネコ rAIM をウサギに免疫することとした。まずネコ rAIM の発現ベクターを樹立し、HEK293T 細胞に遺伝子導入してネコ rAIM を発現させ、培養上清を得た。上記で得られた抗ネコ AIM マウスモノクローナル抗体 (#33) を結合させたアフィニティーカラムを作製して、ネコ rAIM を精製した。得られた rAIM を還元剤と加熱処理によって還元した後、ウサギに免疫した。免疫したウサギ血清を一次抗体として、ネコ、マウス、ヒトの AIM を還元条件の WB 法で検出を試みた (図 4C)。得られた抗体はネコ AIM との交差性は認められたが、マウスやヒト AIM との交差性は認められなかった。ウサギの全血を採取し、得られた血清を抗ネコ AIM ウサギポリクローナル抗体 (PAC-11) とした。

次に、PAC-11 を用いて健常ネコの血漿から還元条件での WB 法で血中のネコ AIM の検出を試みた。検出されたネコ AIM は、個体によって 3 つのパターンに分かれた (図 5A)。すなわち 37 kDa の AIM のみをもつ群、37 kDa と 49 kDa の AIM を両方とももつ群、49 kDa の AIM のみをもつ群である。これまでに、マウスとヒトの AIM は糖鎖修飾の違いから、異なる分子量で検出されることが分かっている [75]。今回ネコで認められた、これらの大きさの違いが糖鎖修飾によるものかを検討した。それぞれのバンドパターンを示したネコの血漿から AIM を免疫沈降法によって抽出し、得られた AIM の糖鎖修飾の切断を行って還元条件下の WB 法でバンドの大きさを比較した (図 5B)。この結果、糖鎖の切断を行っても異なる 2 本のバンドが認められた。このことは、これらのバンドパターンの差異は糖鎖修飾によるものではないことを示している。

このため、49 kDa の AIM を発現するネコ脾臓から RNA を抽出して cDNA を合成し、AIM のクローニングを行った。一般的に AIM は 3 つの SRCR ドメインをもつが [41]、クローニングの結果 SRCR ドメインを 4 つもつ、4-SRCR 型の AIM 配列が得られた。この 4-SRCR 型 AIM は、SRCR1 ドメインを 2 つ繰り返しもつ構造をしていた (図 6A)。また今回の検討から、3-SRCR 型、4-SRCR 型それぞれについて SRCR1 ドメインと SRCR2 ドメイン間をつなぐヒンジ部に minor variants があることが認められた (図 6B)。糖鎖修飾についてもネコ

AIM のアミノ酸配列からは、N 結合型の糖鎖修飾は 1 箇所が SRCR2 ドメインに存在することが予想された (図 6C)。マウスは 2 箇所、ヒトは 0 箇所であり [75]、こうした差異は各種 rAIM の還元条件での WB 法の結果からも示唆される (図 4A, C)。すなわち、最も多い 2 つの糖鎖修飾をもつマウス AIM のバンドは、糖鎖修飾をもたないヒト AIM より大きな分子量で検出される。また糖鎖修飾を 1 つだけもつネコ AIM は分子量マーカーの位置から、マウス AIM とヒト AIM の中間の大きさであり、予測と一致した結果となっている。

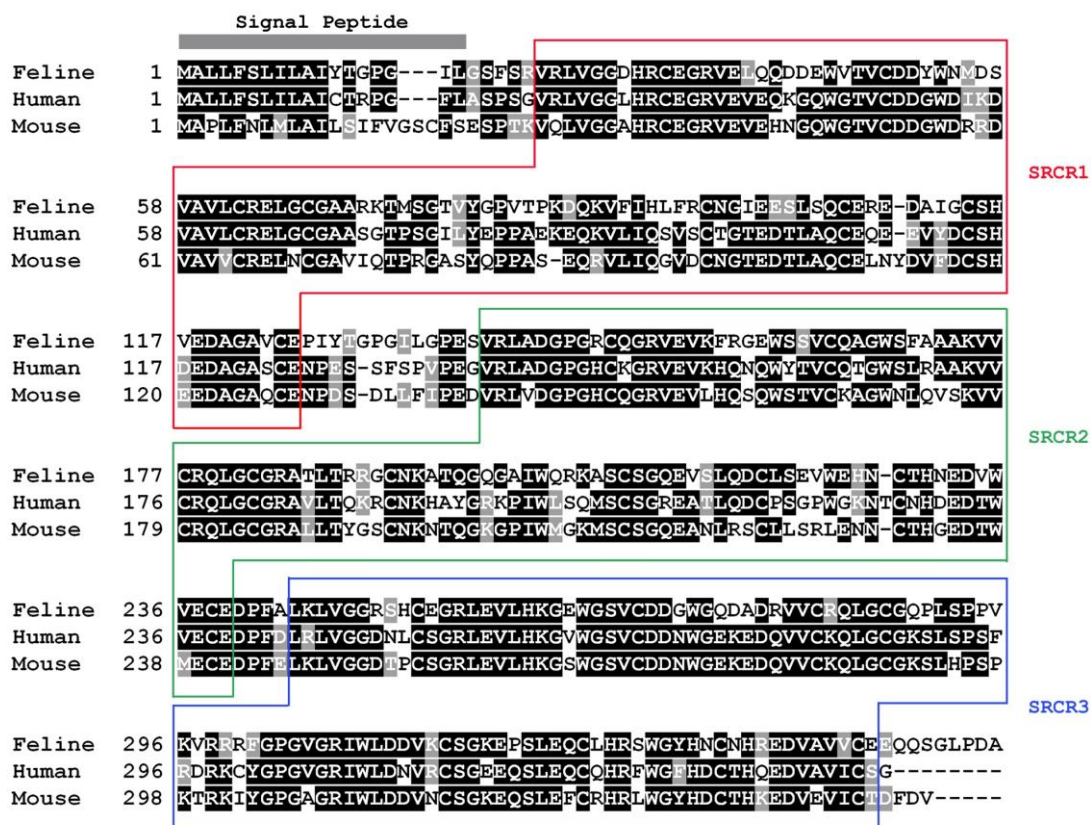


図3 AIM アミノ酸配列のマルチプルアライメント解析

ネコ AIM のアミノ酸配列とヒト・マウス AIM アミノ酸配列のアライメント解析。一致するアミノ酸を背景色黒、類似するアミノ酸を背景色灰で示した。また3つの SRCR ドメイン (SRCR1, SRCR2, SRCR3) をそれぞれ枠で示した。

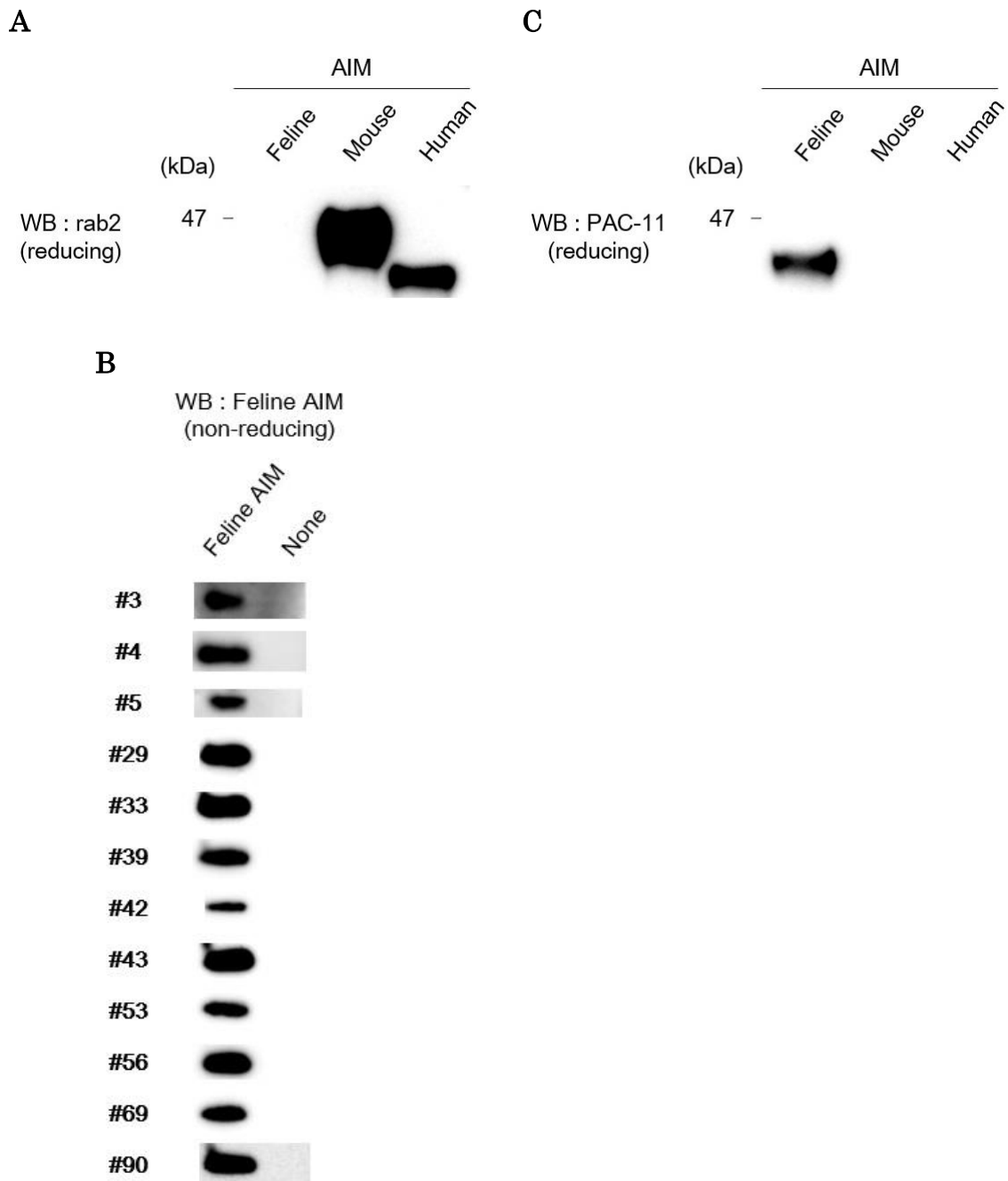
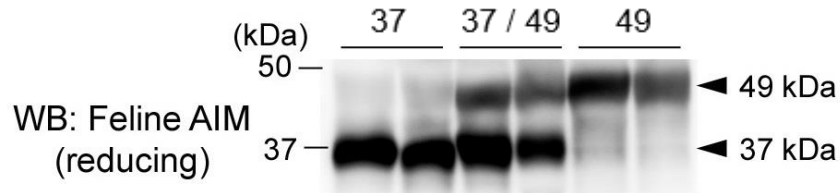


図 4 抗ネコ AIM 抗体の作製

(A) rab2 による還元条件の WB 法での AIM の検出。rab2 はマウス、ヒトに交差性をもつが、ネコとの交差性は認められなかった。rAIM (20 ng) を検体とした。(B) 新規に樹立した抗ネコ AIM マウスモノクローナルによる非還元条件の WB 法によるネコ AIM の検出。ネコ AIM を強制発現させた HEK293T 細胞の培養上清 (Feline AIM) と陰性対照として HEK293T 細胞の培養上清 (None) を検体とした。(C) 新規に樹立した抗ネコ AIM ウサギポリクローナル (PAC-11) による還元条件の WB 法による AIM の検出。rAIM (20 ng) を検体とした。

A



B

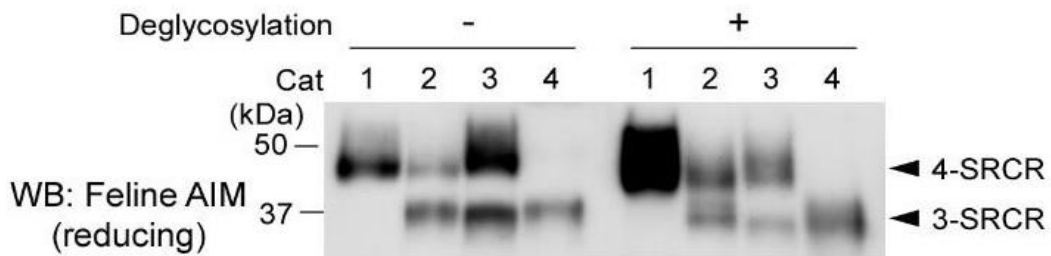


図5 ネコは異なる2つの型のAIMをもつ

(A) ネコ血漿の還元条件での WB 法による、ネコ AIM の検出。抗体は新規に作製した抗ネコ AIM ウサギポリクローナル抗体 (PAC-11) を用いた。37 kDa と 49 kDa の2つの型の AIM が検出された。37 kDa のみをもつ例 (37)、37 kDa と 49 kDa を両方もつ例 (37 / 49)、49 kDa のみをもつ例 (49)。各例につき 2 検体ずつ示した。(B) ネコ AIM の糖鎖切断による検討。ネコ血漿を新規に樹立した抗ネコ AIM マウスモノクローナル抗体 (#33) を用いて免疫沈降法によって抽出し、産物に酵素 (PNgase F、O-Glycosidase、 α -2(3,6,8,9)-Neuraminidase) による糖鎖の切断を行って (Deglycosylation +) 還元条件の WB 法でネコ AIM を検出した。対照群には酵素を加えなかった (Deglycosylation -)。

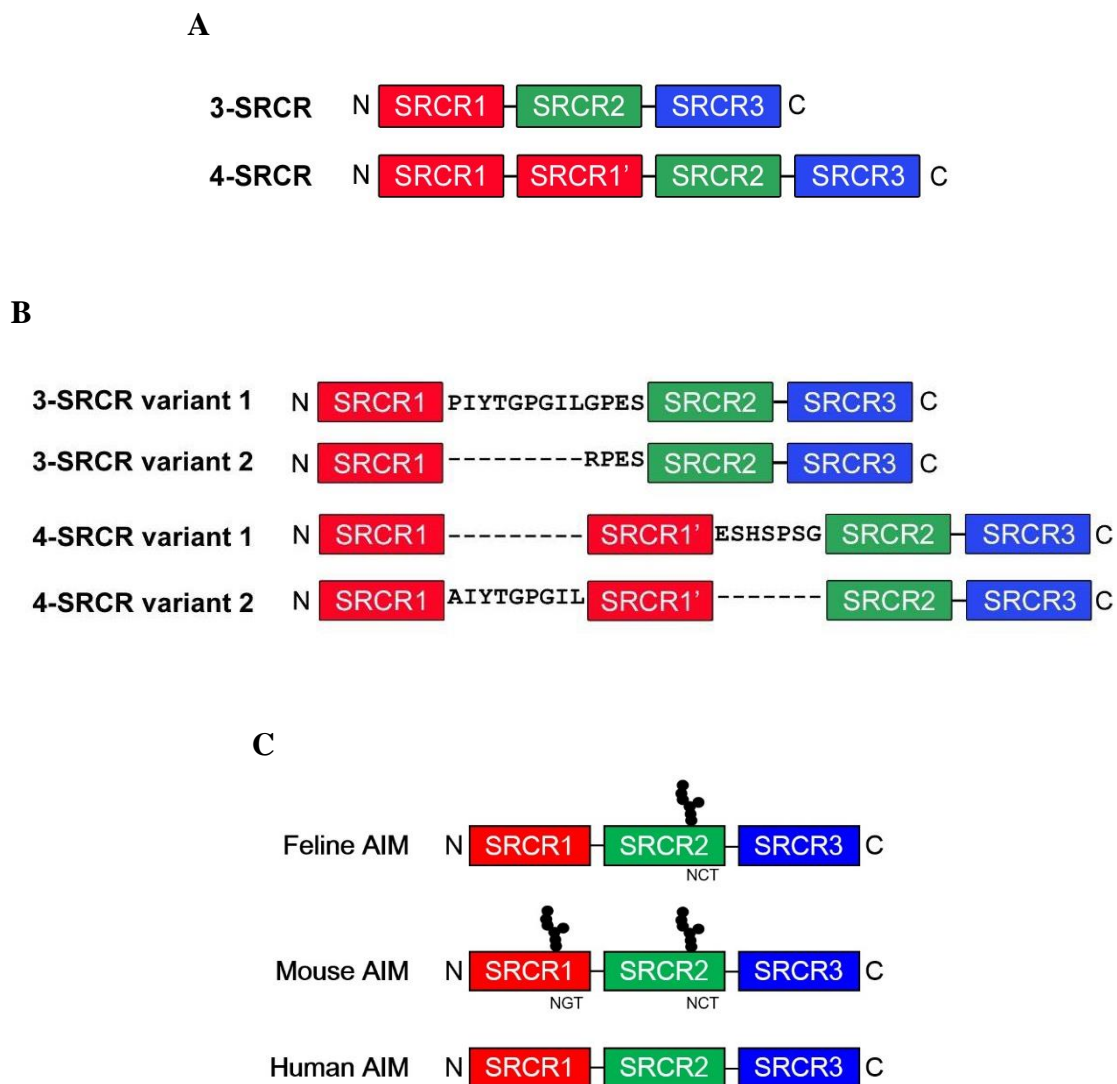


図 6 ネコ AIM には 3-SRCR 型と 4-SRCR 型が存在する

(A) 3-SRCR 型、4-SRCR 型の AIM の模式図。4-SRCR 型では、SRCR1 ドメインの配列が 2 回繰り返される構造をしていた。(B) ネコ AIM は 3-SRCR 型、4-SRCR 型それぞれにドメイン間のヒンジ部に遺伝子多型 (variant) が見られた。それぞれ variant 1 が優性である。3-SRCR 型では 18 検体中 17 検体が、4-SRCR 型では 4 検体中 3 検体が variant 1 に該当した。これらの配列の詳細は GenBank に報告を行っている。登録番号 (accession number) はそれぞれ以下の通りである。LC149874 (3-SRCR variant 1)、LC149875 (3-SRCR variant 2)、LC149876 (4-SRCR variant 1)、LC149877 (4-SRCR variant 2)。(C) AIM における N 結合型の糖鎖修飾部位の模式図。

ネコ AIM は IgM に結合する

これまでの研究からマウス・ヒト AIM は血中で IgM 五量体と結合していることが知られている [47,49]。IgM との結合は、AIM の血中濃度の維持に関わるとともに、腎疾患時における AIM の動態を考える上での前提条件となる。このため、ネコにおいても同様に AIM が IgM に結合しているかについて検討を行った。

まず健常ネコ血漿を非還元条件で WB 法を行い、AIM と IgM をそれぞれ検出した (図 7)。この結果 3-SRCR 型、4-SRCR 型のいずれをもつネコにおいても、AIM は単量体の大きさでは検出されず、IgM と同等の大きさのバンドのみが検出された。すなわち、AIM の IgM への結合が示唆された。また、この実験系では陰性対照を用意できないため、別法として健常ネコ血清をゲルろ過クロマトグラフィーによって、血中タンパクを分子量で分離し、得られたフラクションをそれぞれ還元条件の WB 法で検出することで、AIM と IgM の結合を検討した (図 8)。この結果においても、AIM は IgM と同じ、高分子量のフラクションのみから検出され、ネコの血中で AIM は IgM と結合しているものと考えられた。

次に、*in vitro* 条件でネコ AIM と IgM の結合を検討した。まず、他のタンパクと結合していない純粋なネコ IgM を得るため、ネコ IgM 産生 Hybridoma 細胞の樹立を試みた。ネコ脾臓由来の B 細胞をマウスミエローマ細胞と融合して

Hybridoma 細胞を樹立し、ELISA 法によって IgM を産生する細胞をスクリーニングした。限界希釈法によって Hybridoma 細胞のモノクローン化を行った後、培養上清中での IgM の発現および五量体の形成を確認するため、非還元条件での WB 法によって検討を行った (図 9A)。IgM の発現が認められたため、上清から IgM の精製を試みたが、溶出液中の IgM は構造が崩れ、四量体以下のものが多く占めることが示唆された (図 9B)。このように精製時にネコ IgM が分解されてしまうため、Hybridoma 細胞を培養し、ネコ IgM を発現させた無血清培地の上清とネコ AIM-HA を混合し、37°C、1 時間静置した後、非還元条件の WB 法で結合を検討した。この結果、AIM と IgM の結合が認められた (図 9C)。以上から、ネコ AIM はマウスやヒト同様に IgM に直接結合すると考えられた。

また、AIM は IgM の Fc 領域に結合することが知られている [63]。ネコでもこの特性を確認するため、IgM-Fc 領域と IgJ が結合した IgM-Fc 五量体への結合を調べた。ネコ AIM とネコ IgM-Fc 五量体をそれぞれ強制発現させた HEK293T 細胞を共培養し、培養上清中での AIM と IgM-Fc 五量体の結合を、非還元状態での WB 法にて検出した (図 10)。この結果、ネコ AIM は 3-SRCR 型、4-SRCR 型ともに IgM の Fc 領域に結合することが示された。

厳密には、この AIM と IgM-Fc 五量体の結合には、IgM 五量体の構造安定化に寄与するとされる IgJ の IgM-Fc への結合が必須である。IgJ を発現させ

ずに IgM-Fc のみを発現させた場合では、IgM-Fc は五量体のほか、六量体を形成する [58, 60-62]。こうした IgJ を結合していない IgM 五量体や六量体と、AIM との結合は認められておらず、また IgJ 単独と AIM の結合も認められていない [63]。ネコにおいても検討した結果、同様に IgJ が結合していない IgM-Fc と AIM の結合は認められなかった (図 11 左)。また、IgJ 単独とも結合しなかった (図 11 右)。以上の検討結果から、ネコにおいてもマウスやヒトと同様の結合様式で、血中で AIM と IgM が結合していることが示唆された。

血中での AIM と IgM の結合は、AIM 血中濃度の維持と深く関わっており、マウスやヒトでは IgM 濃度に AIM 濃度が正比例することが知られている。また疾患によって血中濃度が変化するため、バイオマーカーとしての活用も期待されている [47, 48]。このため、健常ネコにおける AIM 血中濃度の測定を試みた。32 匹の健常ネコ血漿中の AIM を還元条件の WB 法にて検出し、ネコ rAIM の希釈系列を用いて標準曲線を作成することで血中濃度を算出した (表 1)。ネコにおける AIM 血中濃度は平均 $21.72 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($8.48 \sim 36.39 \mu\text{g}/\text{mL}$) であり、この値は既知のマウス ($2 \sim 3 \mu\text{g}/\text{mL}$) [50, 51] やヒト (約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$) [48] に比べて明瞭に高い値であった。ネコ AIM が高濃度である原因を探るため、ネコの血中 IgM 濃度を測定したが、 $1\text{-}2 \text{ mg}/\text{mL}$ 前後であり、ヒトやマウスと同等であった。従って、ネコにおける AIM 血中濃度の高値は IgM 濃度によるものではないと考

えられた。すなわち、マウスやヒトと比べてネコでは **IgM** に対して、より多くの **AIM** が結合していると考えられる。

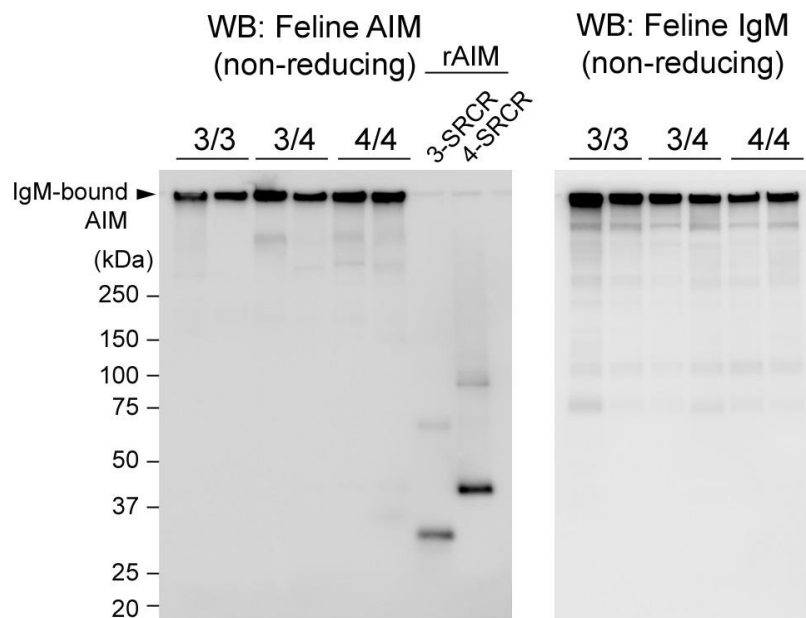


図7 ネコ AIM は血中で IgM と結合する

非還元条件の WB 法による健常ネコ血漿中 AIM (左) と IgM (右) の検出。血漿は 3-SRCR 型 (3/3)、3-/4-SRCR 型 (3/4)、4-SRCR 型 (4/4) のそれぞれを用いて検討した。AIM の陽性対照にはそれぞれの rAIM (20 ng) を用いた。

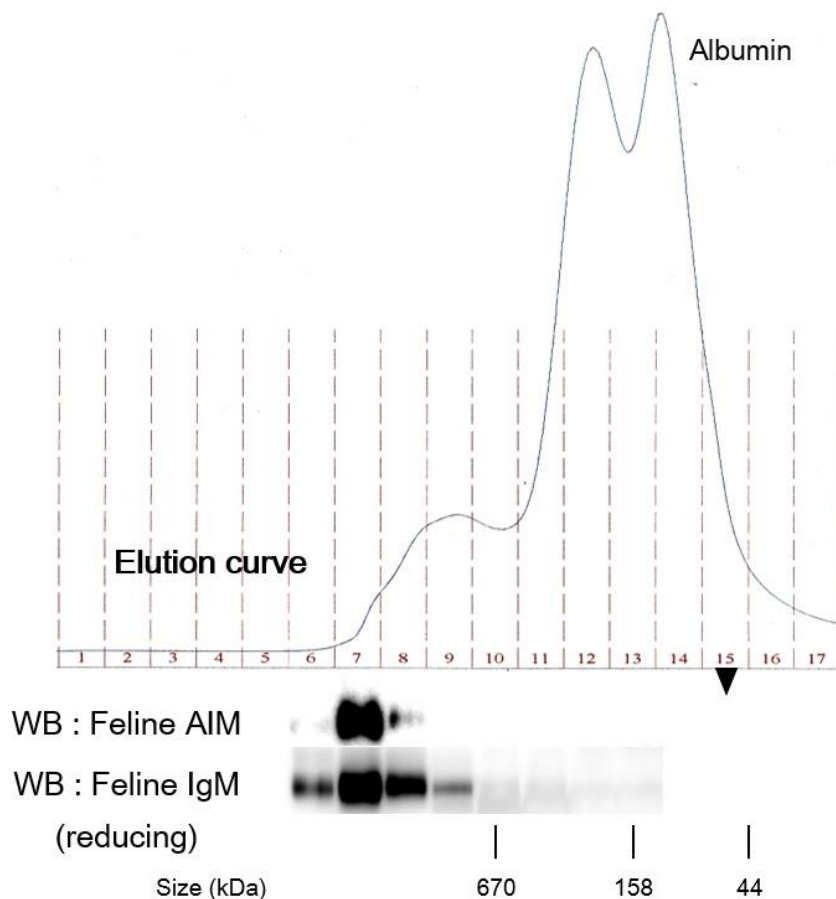
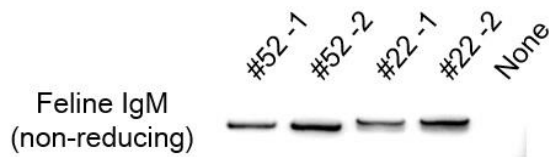


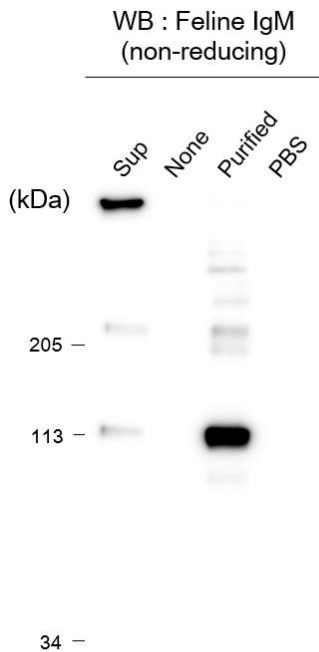
図8 ネコ AIM は血中で IgM と結合する

健常ネコの血清 200 μ L をゲルろ過クロマトグラフィーによって分離した。Elution curve は波長 280 nm での測定結果を示す。得られたフラクションごとに還元条件での WB 法にて AIM (6~17) と IgM (6~13) を検出した。AIM は IgM が含まれる高分子量のフラクションのみから検出された。Free AIM が検出される場合のフラクションを ▼ で示した。

A



B



C

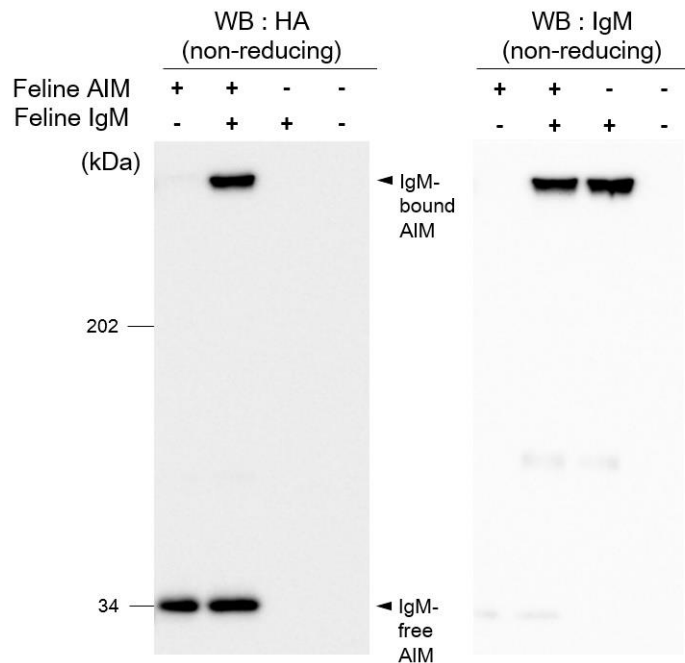


図9 ネコ AIM は *in vitro* 条件で IgM に結合する

(A) ネコ IgM 産生 Hybridoma 上清中の IgM 五量体を非還元条件の WB 法にて検出した。得られた 2 クローン (#22, #52) を限界希釈した後、それぞれ 2 検体ずつ検討した。None は陰性対照。(B) (A) で得られた #22 の培養上清から IgM の精製を行い、非還元条件の WB 法にて検出した。精製前の上清 (Sup) では IgM 五量体が認められたが、精製後 (Purified) では五量体では検出されなかった。None, PBS は陰性対照。(C) ネコ IgM 産生 Hybridoma 上清とネコ AIM-HA を混合して静置した後、結合を非還元条件の WB 法にて検出した。IgM の陰性対照には培地、AIM の陰性対照には PBS を用いた。

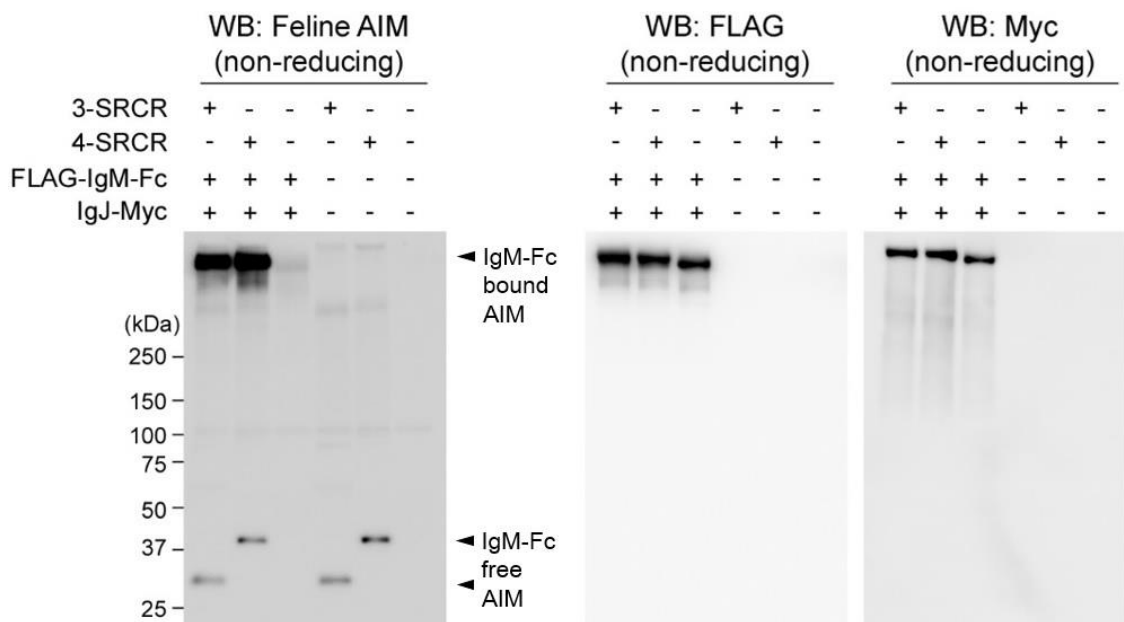


図 10 ネコ AIM は IgM-Fc 五量体に結合する

3-SRCR 型ないし 4-SRCR 型のネコ AIM を強制発現させた HEK293T 細胞と、FLAG タグを付与したネコ IgM-Fc (IgM 定常領域) および Myc タグを付与したネコ IgJ の両方を強制発現させた HEK293T 細胞を 16 時間共培養した後、その培養上清を回収して非還元条件での WB 法で AIM (左)、IgM-Fc (中央)、IgJ (右) をそれぞれ検出した。

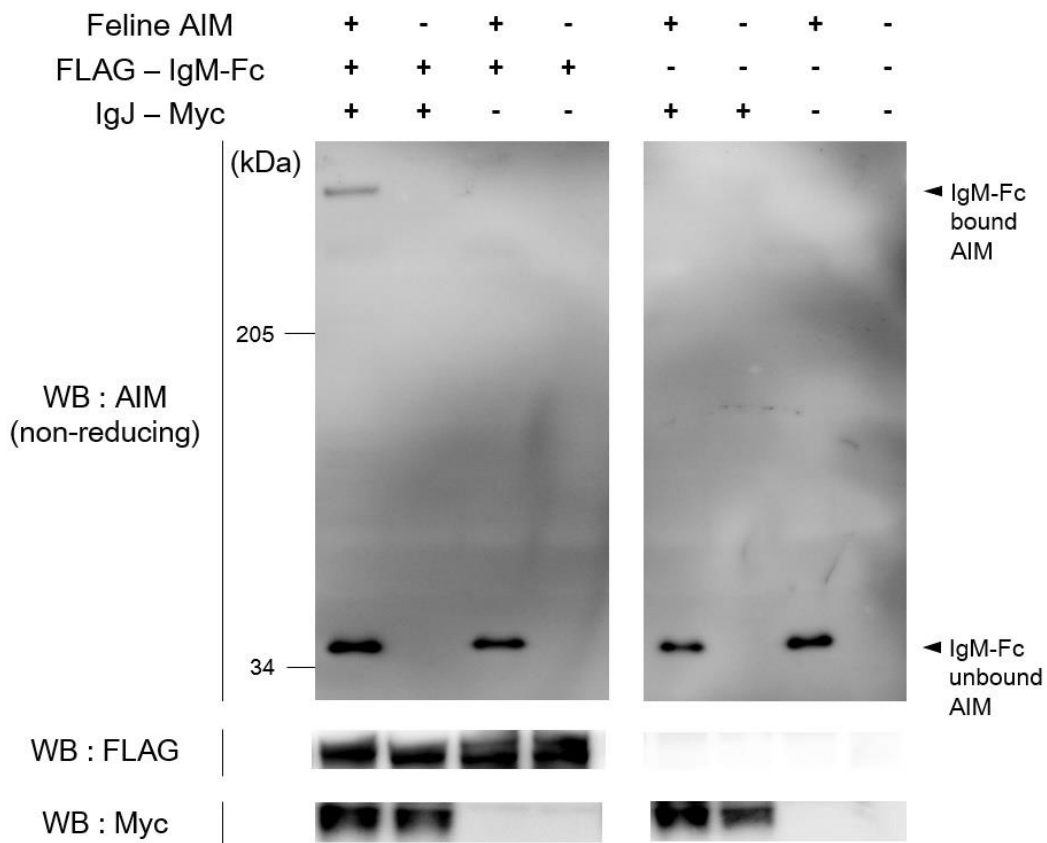


図 11 AIM の IgM-Fc への結合には、IgJ が必要である

3-SRCR 型のネコ AIM を強制発現させた HEK293T 細胞と、FLAG - IgM-Fc および IgJ - Myc の両方または片方を強制発現させた HEK293T 細胞を 16 時間共培養した後、その培養上清を回収して非還元条件での WB 法で検出した。AIM (上)、IgM-Fc (中央)、IgJ (下)。

表 1 健康ネコにおける AIM 血中濃度

| Age | Sex | Breed | AIM type | AIM ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------|-----|--------------------|-----------|--------------------------|
| 0y 6m | F | Mixed | 3-/4-SRCR | 22.73 |
| 0y 6m | F | Mixed | 3-/4-SRCR | 15.25 |
| 0y 6m | M | Mixed | 4-SRCR | 22.91 |
| 0y 7m | M | Mixed | 3-SRCR | 14.72 |
| 0y 7m | F | Mixed | 3-/4-SRCR | 10.54 |
| 0y 8m | M | Mixed | 3-SRCR | 16.97 |
| 0y 8m | M | Mixed | 3-SRCR | 10.27 |
| 0y 8m | F | Mixed | 3-/4-SRCR | 14.08 |
| 2y 3m | M | Mixed | 3-/4-SRCR | 23.74 |
| 3y 4m | F | Munchkin | 3-SRCR | 23.29 |
| 3y 4m | M | Somali | 4-SRCR | 23.62 |
| 4y 0m | M | Mixed | 3-/4-SRCR | 19.98 |
| 4y 2m | M | Mixed | 3-SRCR | 12.85 |
| 4y 5m | M | Mixed | 3-SRCR | 24.87 |
| 5y 6m | F | Mixed | 4-SRCR | 20.32 |
| 5y 8m | M | Turkish angora | 4-SRCR | 27.01 |
| 6y 2m | F | Mixed | 3-SRCR | 23.24 |
| 6y 6m | F | Mixed | 3-/4-SRCR | 17.26 |
| 6y 7m | M | Munchkin | 3-SRCR | 8.48 |
| 7y 1m | F | Mixed | 3-SRCR | 30.88 |
| 7y 4m | F | Mixed | 3-SRCR | 26.93 |
| 7y 5m | F | Mixed | 3-SRCR | 36.39 |
| 7y 6m | F | Mixed | 3-/4-SRCR | 27.80 |
| 7y 6m | M | Mixed | 4-SRCR | 23.98 |
| 7y 9m | M | Chinchilla | 4-SRCR | 27.81 |
| 9y 8m | M | Mixed | 3-SRCR | 22.49 |
| 11y 6m | M | Mixed | 3-/4-SRCR | 24.33 |
| 11y 8m | F | Mixed | 3-SRCR | 31.21 |
| 12y 6m | F | American shorthair | 3-/4-SRCR | 15.89 |
| 13y 0m | F | Mixed | 3-/4-SRCR | 30.16 |
| 14y 2m | M | American curl | 3-/4-SRCR | 15.37 |
| 14y 4m | F | Mixed | 4-SRCR | 29.60 |

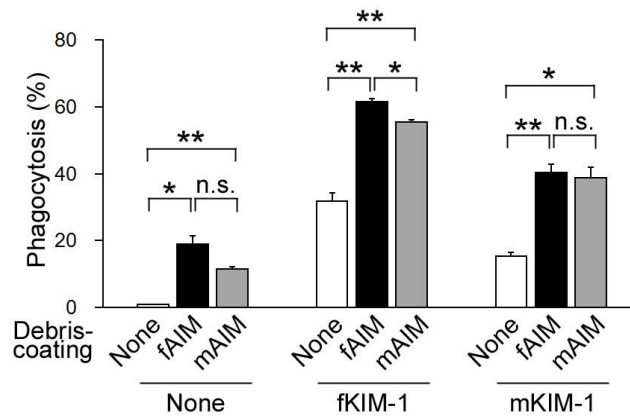
ネコ AIM は KIM-1 を介した死細胞除去を促進する機能を有する

AIM における機能性の中で、腎障害からの回復に寄与する最大の特徴は、尿細管中に蓄積した壊死細胞塊に付着し、その除去を促進することである [57]。

AKI を発症すると、アポトーシスやネクローシスによって尿細管上皮細胞の細胞死が引き起こされる。この障害は特に皮髄境界部の近位尿細管において顕著であり、尿細管基底膜から切り離された壊死細胞塊は管腔内を物理的に閉塞する [19-21]。KIM-1 は障害された尿細管上皮細胞の管腔側にて強く発現する [22-24]、AIM のリガンドでもあり、AIM を介して尿細管上皮細胞による壊死細胞塊の取り込みを促進する [57]。これまでにマウスおよびヒトの AIM は *in vitro* 条件下においても、壊死細胞塊に付着して、尿細管上皮細胞の KIM-1 を介した除去を促進する機能を有することが示されている [57]。このことから、ネコ AIM においても同様の除去機能を有するかを調べるため、既報同様に *In vitro* Phagocytosis assay を行った。まず mProx24 細胞 (マウス近位尿細管上皮細胞株) を用いて壊死細胞塊を作り蛍光標識をしたものに、AIM を混合することで付着させた。次に壊死細胞塊を KIM-1 を強制発現させた mProx24 細胞と共に静置して貪食させ、フローサイトメトリーを用いて壊死細胞塊の取り込みを評価した (図 12)。この結果、ネコ AIM はマウス AIM 同様に除去機能を有することが示された (図 12A)。またネコ AIM の 3-SRCR 型、4-SRCR 型のいずれにおいて

も機能が認められた。同様に、ネコ KIM-1 についても AIM を認識して食食をする機能を有すると考えられた。従って、ネコにおいても AIM と KIM-1 による壊死細胞塊の除去機構は正常に働きうることが示唆された。また興味深いことに、ネコ AIM とマウス KIM-1、マウス AIM とネコ KIM-1 といった動物種の異なる組み合わせにおいても同等の機能が示された (図 12B)。

A



B

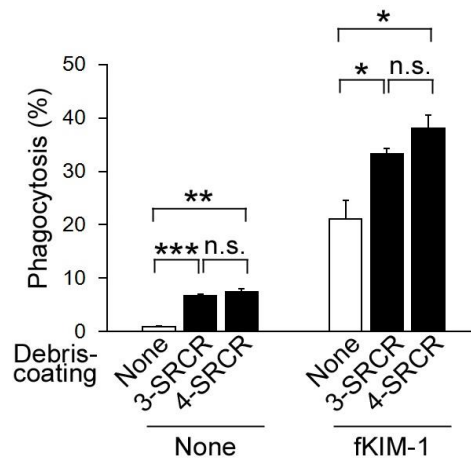


図 12 *In vitro* での KIM-1 を介した AIM による壊死細胞塊取り込みの促進 (A, B) KIM-1 を強制発現させた mProx24 細胞による AIM を付着させた壊死細胞塊の取り込みの評価。(A)では、壊死細胞塊に対して AIM 付着なし (None)、ネコ AIM 付着 (fAIM; 3-SRCR)、マウス AIM 付着 (mAIM) のそれぞれについて、KIM-1 強制発現なし (None)、ネコ KIM-1 強制発現 (fKIM-1)、マウス KIM-1 強制発現 (mKIM-1) の mProx24 細胞による取り込みを評価した。(B) ではネコ 3-SRCR 型 AIM と 4-SRCR 型 AIM による差をネコ KIM-1 強制発現 mProx24 細胞での取り込みによって比較した。eFluor[®] 780 陽性 mProx24 細胞の割合 (averages \pm s.e.m : 平均 \pm 標準誤差) を”Phagocytosis”(取り込み)(%) としてグラフに示した。各サンプルにつき三連に行って解析した。

ネコ AKI モデルでは AIM が IgM から解離しない

これまでの検討結果から、ネコは血中 AIM 濃度がマウスやヒトより高濃度で存在し、また AIM そのものも腎障害時における壊死細胞塊の除去促進機能を有することが示唆された。これらの結果は、ネコでは AKI 時に AIM による自己治癒機構がより効果的に働くような印象を与えるものであった。

そこでネコにおける腎障害と AIM の関連性を調べるため、IR によるネコ AKI モデルを作製した。モデルの作成は共同研究先である北里大学において、同大学の倫理委員会の承認を経て、適切な倫理的配慮のもとに実施した。今回実施した 4 例のネコでは、血清クレアチニン濃度 (Cre) および血中尿素窒素 (BUN) から程度の異なる AKI が誘導されたことが示唆された (図 13)。それぞれの個体情報は表 2 の通りである。このうち 1 例は 2 日目、1 例は 3 日目、残り 2 例は 7 日目に安楽死し、サンプリングを行って種々の解析に供した。2 日目に安楽死した個体は当初 3 日目の安楽死を予定していたが、腎障害が大きく倫理上の判断から 2 日目に実施した。4 例すべてにおいて、マウスとは異なり、AKI からの回復傾向は認められなかった。

AIM は健常時には血中で IgM と結合しているため、腎臓の糸球体濾過膜を通過できず、尿細管には到達しない。一方、ヒト・マウスでは AKI 時には IgM から解離し、単量体として存在する AIM (Free AIM) となって糸球体濾過膜を通

過して、尿細管に到達する。尿細管に到達した Free AIM は尿細管管腔内に蓄積した壊死細胞塊に付着し、KIM-1 を介した尿細管上皮細胞による壊死細胞塊の除去を促進する [57]。従って AIM が IgM から解離すること、そして尿細管中の壊死細胞塊に AIM が付着することが、この機構が働く上で必須である。

ネコ AKI モデルにおける AIM の働きを調べるため、まず AIM が IgM から解離しているかを確認するために、IR 前、IR 後 1 日、2 日の血清を非還元条件の WB 法にて AIM を検出した (図 14A)。IR による野生型マウス AKI モデルでは、IR 前後で Free AIM の増加が認められたが (図 14B)、ネコではこうした増加が認められなかった。なお 4-SRCR 型 AIM をもつ 3 例において、IR 前から Free AIM が長時間の露光による強撮影条件において検出されたが、これらは IR 後も増加せず、腎障害の前後で AIM 量の変動は認められなかった (図 14C)。従って、IR 前後において変化はないと考えられた。

また、尿管結石などに起因する自然発症の AKI ネコの血清においても、非還元条件の WB 法にて AIM の検出を行った (図 15)。これらの症例においてもネコ AKI モデル同様に Free AIM は検出されなかった。これら自然発症例における症例データは表 3 の通りである。

以上の結果から、ネコでは AKI を発症してもヒトやマウスとは異なり、AIM が IgM から解離しないことが示唆された。

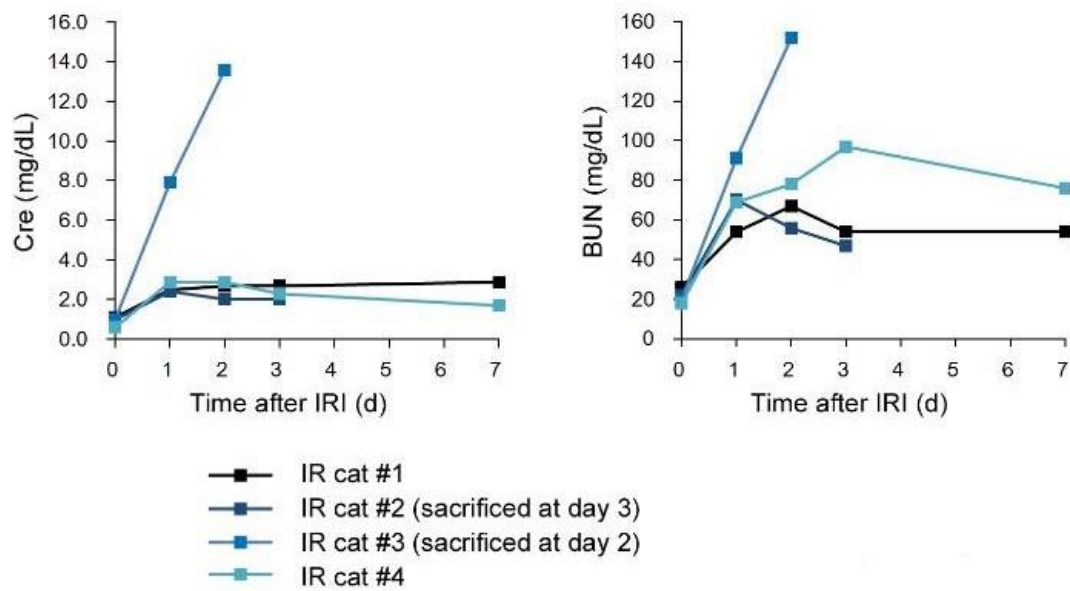


図13 ネコ AKI モデルの腎機能評価

血清クレアチニン濃度 (Cre: 左) と血中尿素窒素 (BUN: 右)。#3 の個体は腎障害が著しく、倫理上の観点から day2 に安楽死した。いずれの個体においても野生型マウスのような回復傾向は認められなかった。

表 2 ネコ AKI モデルの個体情報

| No. | Age | Sex | Breed | AIM type |
|------------|----------------|------------|--------------|-----------------|
| 1 | 5 years | Female | Mixed | 3-/4-SRCR |
| 2 | 8 years | Female | Mixed | 3-/4-SRCR |
| 3 | 9 years | Male | Mixed | 3-SRCR |
| 4 | 7 years | Male | Mixed | 4-SRCR |

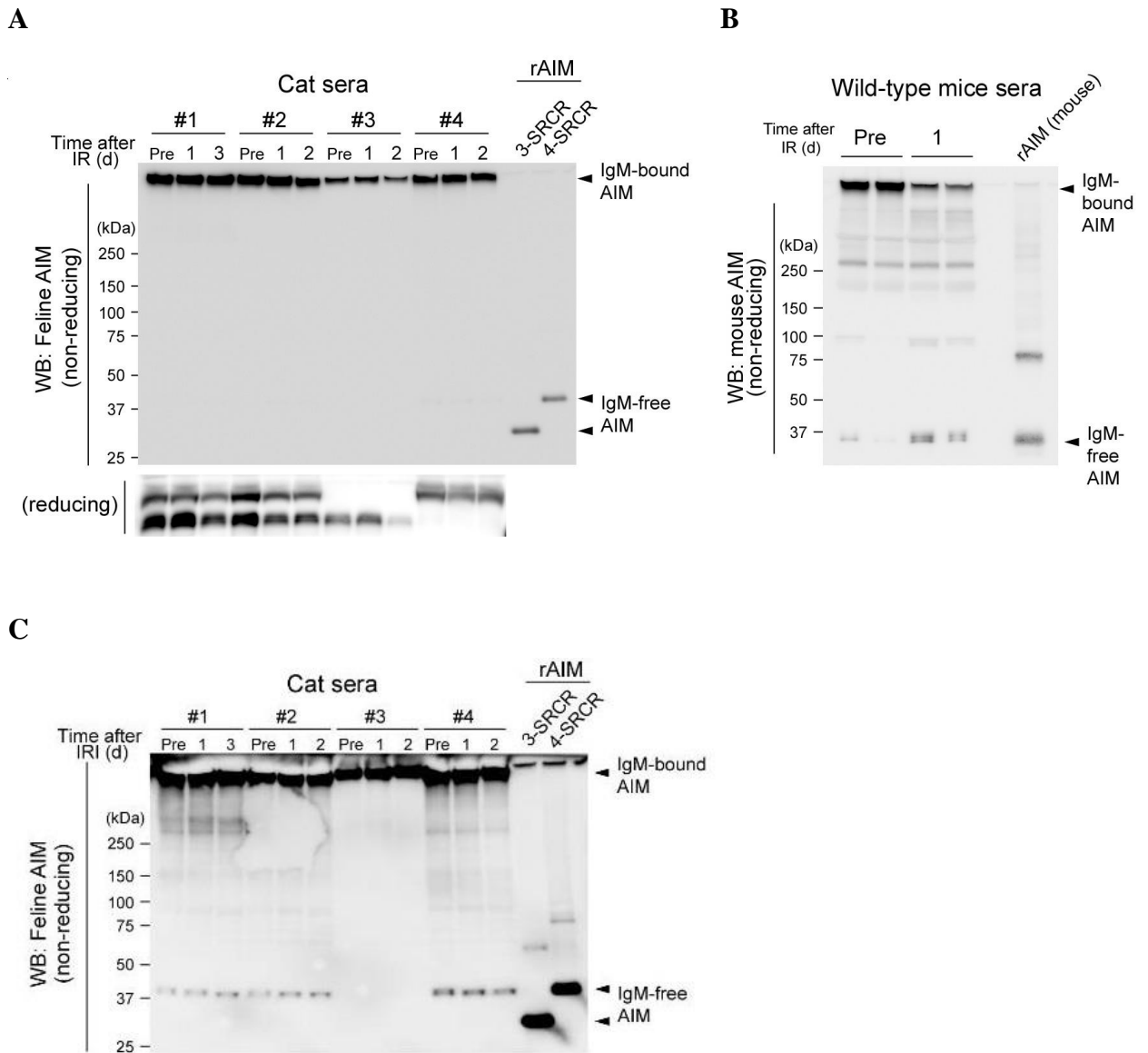


図 14 ネコ AKI モデルでは AIM が IgM から解離しない

(A) IR ネコ血清中の AIM を非還元条件 (上段) および還元条件 (下段) の WB 法にて検出した。Pre は IR 前の血清である。#1 と #2 は 3-/4-SRCR 型、#3 は 3-SRCR 型、#4 は 4-SRCR 型であった。AIM の陽性対照には rAIM (15 ng) を用いた。(B) IR 野生型マウス血清中の AIM を非還元条件の WB 法で検出した。rAIM は 20ng 泳動した。(C) (A) のプロットを長時間撮影した像。少量の Free 4-SRCR AIM が IR 前から検出されているが、IR 後もその量は増加しなかった。

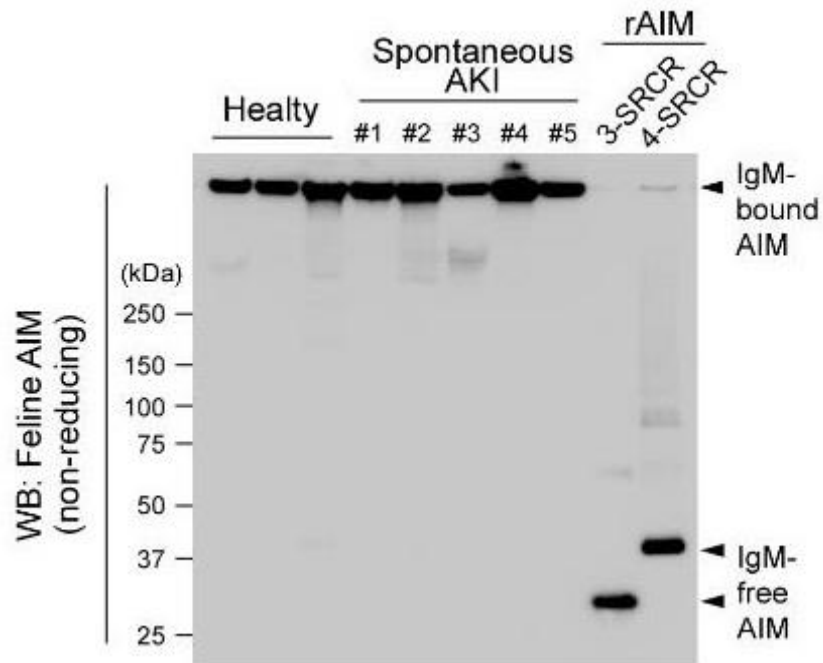


図 15 自然発症の AKI ネコにおいても AIM は IgM から解離していない
 3 匹の健常ネコと 5 匹の自然発症 AKI ネコの血清について、非還元条件の WB
 法にて AIM を検出した。陽性対照は rAIM を 15 ng 泳動した。自然発症 AKI
 ネコの詳細は表 3 に示した。

表 3 自然発症 AKI ネコの患者情報

| No. | Cre (mg/dL) | Age | Sex | Breed | AIM type | Cause(s) of AKI |
|-----|-------------|----------|--------|----------------------|-----------|-------------------------------|
| 1 | 4.18 | 3 years | Male | Scottish fold | 3-SRCR | Ureteric stone |
| 2 | 6.21 | 2 years | Male | Norwegian forest cat | 3-/4-SRCR | Ureteric stone, Urethra stone |
| 3 | 6.82 | 5 years | Male | Somali | 3-SRCR | Ureteric stone |
| 4 | 7.52 | 12 years | Male | American shorthair | 3-/4-SRCR | Ureteric stone |
| 5 | 7.80 | Unknown | Female | Chartreux | 3-SRCR | Kidney stone |

ネコ AKI モデルでは、AIM が腎臓・尿細管管腔内に到達しない

AKI を発症したネコにおいて、血中で AIM が IgM から解離していないのであれば、AIM が尿細管管腔内に到達できず、壊死細胞塊への AIM の付着が認められないことが想定される。これを確かめるため、まずネコ AKI モデルにおける壊死細胞塊の蓄積を確認するために、腎臓組織の PAS 染色を行った (図 16)。いずれの例においても、尿細管管腔内における壊死細胞塊の蓄積が認められた。次に同組織の連続切片を用い、免疫組織化学によって、壊死細胞塊へのネコ AIM の付着を検討した (図 16)。その結果、いずれの例においても壊死細胞塊において AIM は検出されなかった。間質においては AIM が微弱に検出されているが、間質には栄養血管が走行しているため、この血管由来の IgM と結合している AIM が検出されていると考えられる。なお、ネコ組織での AIM 免疫組織化学の陽性対照には、同ネコの肝臓組織を用いた (図 16)。肝臓のクッパー細胞は主要な AIM 産生細胞の一つである。

また、AKI モデルマウスにおいて AIM が腎臓・尿細管管腔内に到達している証拠の一つとして、尿中においても AIM が検出される点が挙げられる [57]。ネコ AKI モデルでも同様に ELISA 法による AIM の検出を試みた (図 17) が、IR 前後で変化は認められず、いずれの例においても検出限界以下であった。

以上から、ネコでは AIM が IgM から解離せず、AIM が尿細管管腔内に到達し

ないために、AIM を介した自己治癒機構が欠損している可能性が考えられた。

他に着目すべき点として、AKI を発症したネコにおける KIM-1 の発現が挙げられる。KIM-1 は障害を受けた尿細管上皮細胞において顕著に発現するが [22-24]、ネコにおいても発現が増強されることが示唆されていた [76]。今回、ネコ AKI モデルの腎臓における *KIM-1* mRNA 発現量を健常ネコの腎臓と qPCR 法によって比較を行った (図 18)。その結果、ネコ AKI モデルにおいても、KIM-1 の発現増強が認められた。*in vitro* 実験での検討からネコ AIM が KIM-1 を介しての取り込み促進機能を備えている点 (図 12) を踏まえれば、AIM が尿細管管腔内に到達しない点を除けば、ネコにおいても腎臓の自己治癒機構が備わっているものと考えられる。すなわち、何らかの方法で AIM を尿細管管腔内に到達させ、管腔内の壊死細胞塊に付着させることが新規治療法になり得ることを示唆している。

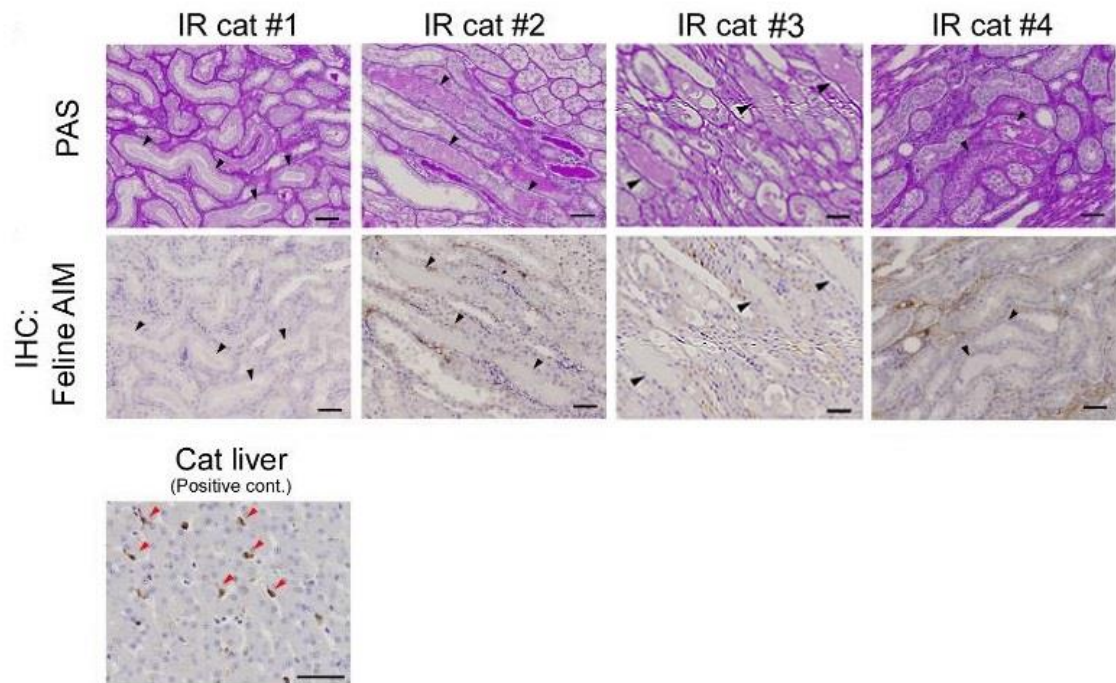


図 16 ネコ AKI モデルでは AIM が尿細管管腔内に到達していない

IR ネコ#1 (day7)、#2 (day3)、#3 (day2)、#4 (day7) における腎臓の皮髄境界部の PAS 染色像 (上段) と免疫組織化学によるネコ AIM の染色像 (中段)。免疫組織化学は HRP/DAB によって発色した。スケールバーは 50 μ m。PAS 染色で同定される尿細管管腔中の壊死細胞塊は AIM によって染色されない。免疫組織化学の陽性対照は肝臓を用いた (下段)。黒矢印：壊死細胞塊 赤矢印：肝臓のクッパー細胞 (AIM 陽性対照)。

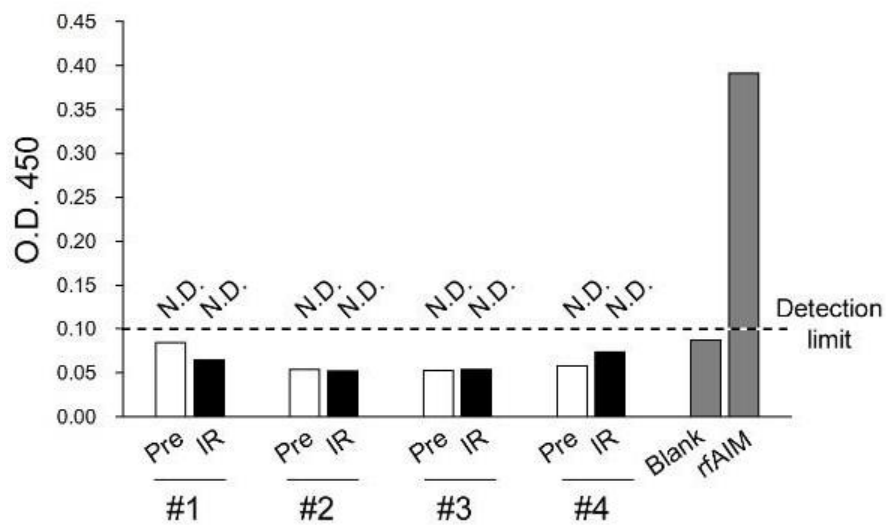


図 17 ネコでは AKI 時に尿中 AIM が増加しない

IR 前 (Pre) および IR 後 day1 (IR) の尿中 AIM を ELISA 法で検出した。O.D.値は全ての検体で検出限界を下回った。Blank (陰性対照) および rAIM 3.1275 ng/mL(陽性対照) をそれぞれ示した。ELISA 法は各サンプルにつき 2 連で解析を行った。

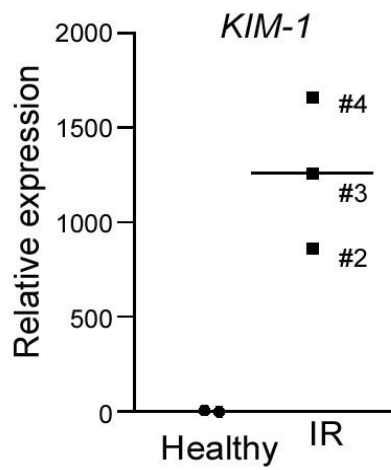


図 18 ネコの障害腎では **KIM-1** が正常に発現する
 IR ネコの腎臓中の *KIM-1* mRNA 発現量を相対値で示した。#2 (day3)、#3 (day2)、
 #4 (day7)。健常ネコ 2 匹 (26 ヶ月齢、オス) のうち 1 匹を基準値に用いた。

ネコ AIM は IgM に強力に結合する

これまでの結果から、ネコでは腎障害時に AIM が IgM から解離せず、AIM を介した自己治癒機構が欠損していることが示唆された。ここにおける最大の疑問は、なぜ AIM が IgM から解離しないかという点である。

この疑問を明らかにするため、AIM と IgM 間の結合の親和性 (結合の強さ) を比較することにした。先に述べたように、AIM は IgM-Fc 五量体に結合する。SPR (Surface plasmon resonance) 法を用い、マウス AIM とマウス IgM-Fc 五量体間の親和性、ネコ AIM とネコ IgM-Fc 五量体間の親和性をそれぞれ測定した (図 19)。この結果、ネコ間 (3-SRCR 型ネコ AIM とネコ IgM-Fc 五量体) では結合速度定数 (k_a) が 9461 / Ms (molar second ; モル秒)、結合の離れやすさを示す解離速度定数 (k_d) は 5.65×10^{-5} /s であり、結合の親和性を意味する解離定数 (K_D) は 5.97×10^{-9} M であった。一方マウス間では k_a が 3828 / Ms、 k_d が 2.23×10^{-2} /s、 K_D が 5.82×10^{-6} M であった。すなわち、ネコ間の親和性はマウス間の親和性に比べて、およそ 1,000 倍強力であることが示された。この特異的な高親和性が、ネコにおいて AIM が IgM から解離しない要因であると考えられる。

また、ネコは 3-SRCR 型と 4-SRCR 型が存在するため、4-SRCR 型についても検討を行った。興味深いことに、4-SRCR 型のネコ AIM とネコ IgM-Fc 五量体間の結果は、結合のしやすさを意味する k_a が 9.519 / Ms と 3-SRCR 型と比べて

顕著に低い一方で、 k_d が 4.38×10^{-5} と 3-SRCR 型とほぼ同等であった。これは、一度 AIM と IgM が結合した後は、3-SRCR 型も 4-SRCR 型もマウスと比べ約 1000 倍強力に結合する点は同じであることを示している。一方で、 k_a の値が低いことは結合が起こりにくいことを意味する。この結果をまとめると、4-SRCR 型の AIM は IgM に対して結合するまでに時間がかかるが、一度結合してしまえば解離しにくいことを示唆している。実際にネコ AKI モデルにおいて、Free 4-SRCR AIM が微量検出されているが (図 14C)、IR 前後での変化は認められなかった。今回の SPR 法の結果より、4-SRCR AIM は k_a 値が低いことから、産生されて血中に流入した後、IgM に未結合の状態のまま存在する AIM が一定量存在するものと推察される。反面、ひとたび IgM に結合すると、その低い k_d 値から解離は起こりにくく、AKI を生じても 3-SRCR AIM 同様に解離しないものと考えられる。

こうしたネコ AIM と IgM-Fc 五量体間の高親和性が、AIM に起因するのか、IgM-Fc 五量体に起因するのかを明らかにするため、ネコの AIM とマウスの IgM-Fc 五量体の組み合わせにおいて、SPR 法によって親和性を測定した (図 19)。この結果、 k_a が 7219/Ms であり、 k_d が 1.06×10^{-4} /s、 K_D が 1.46×10^{-8} M と、マウス間の結合と比べても明瞭に高親和性であることが示された。すなわち、ネコにおける AIM と IgM 間の高親和性はネコ AIM に起因するものと考えられた。

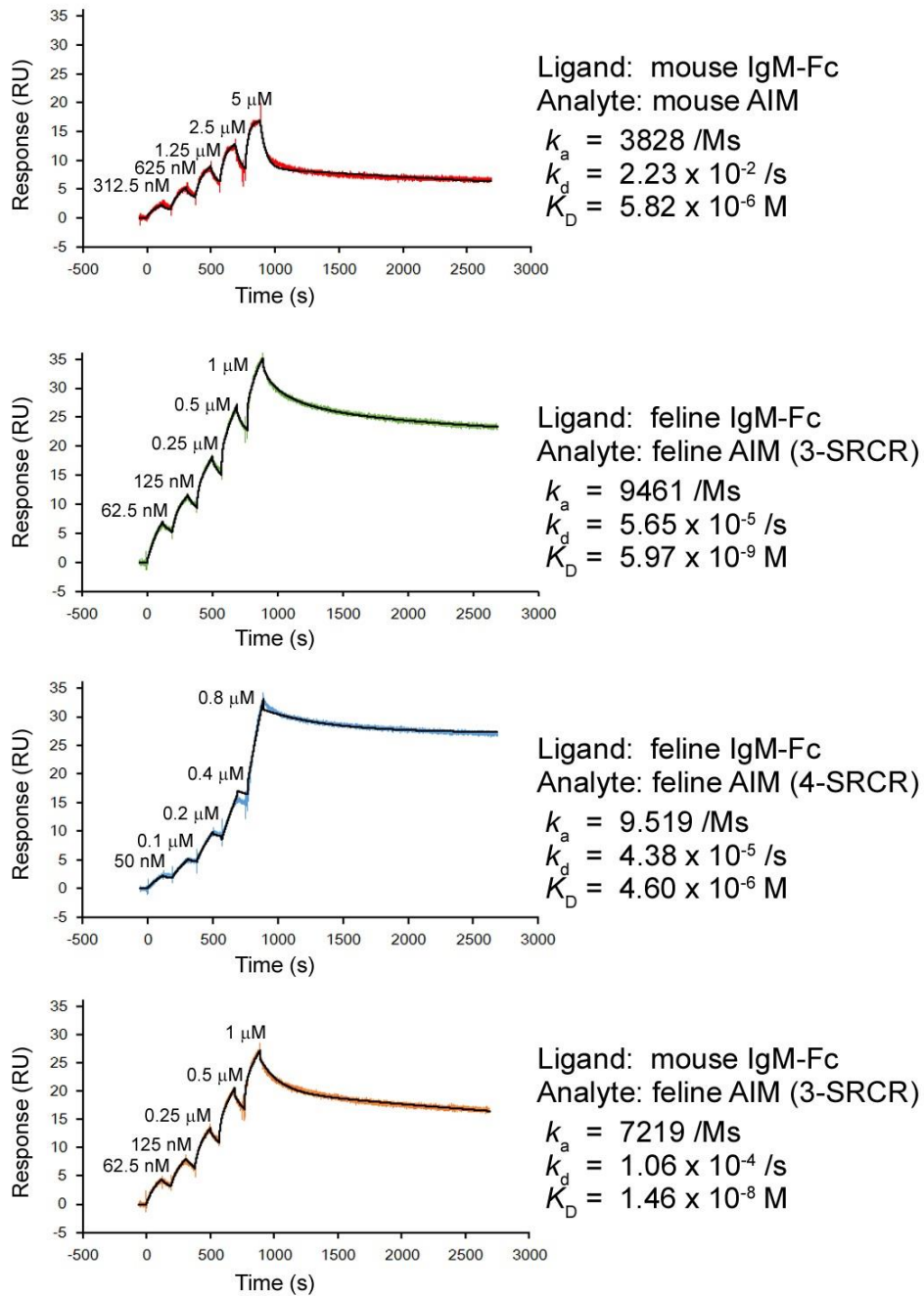


図 19 ネコ AIM は IgM に強力に結合する

IgM-Fc 五量体を固相化 (Ligand) し、AIM を Analyte として SPR 解析を行った。各実験は 3 回行い、いずれも類似した結果が得られている。

ネコ AIM は SRCR3 ドメインに特異的な正電荷クラスターをもつ

既に述べた通り、AIM は IgM の Fc 領域に結合することが明らかになっている [63]。一方で別の研究結果からマウス AIM は SRCR3 ドメインが IgM との結合に関与していることが明らかとなった [77]。この研究結果によると野生型マウスに過剰量の AIM を投与すると、血中において IgM に結合できなかった AIM はプロテアーゼによって切断され、より小さな分子量となって糸球体濾過膜を通過し、速やかに尿中に排泄される。この AIM の切断は SRCR3 ドメインで生じており、N 末端から切断部位である 264 番目のリシン残基まで発現させたマウス AIMK264 は IgM への結合が認められなかった [77]。すなわち、AIM の IgM への結合には SRCR3 ドメインが必要であると考えられた。

ネコでも同様に IgM への結合部位を確かめるため、ネコ AIM の SRCR3 ドメイン欠損体 (Δ SRCR3) を作製し、IgM-Fc 五量体との結合を検討した。ネコ IgM-Fc 五量体強制発現 HEK293T 細胞と、ネコ AIM (3-SRCR 型) もしくは、ネコ AIM Δ SRCR3 をそれぞれ強制発現させた HEK293T 細胞を共培養し、培養上清中での両者の結合を非還元条件での WB 法にて検出した (図 20)。この結果、ネコ AIM Δ SRCR3 は IgM-Fc 五量体との結合が認められず、ネコでも SRCR3 ドメインが IgM-Fc との結合に必要な部位であることが示唆された。

このため、AIM と IgM 間の親和性の動物種差は SRCR3 ドメインに起因す

るものと考えられた。動物種間の比較のため、ネコ、マウス、ヒトの **SRCR3** ドメインのホモロジーモデリングを行い、正電荷を帯びた領域を青、負電荷を帯びた領域を赤で示した (図 21A)。モデルからは、ネコではマウスやヒトではみられない特異的な正電荷のクラスターが存在していることが示された (図 21A 枠内)。補体 C1q は IgM の Fc 領域に対して正電荷のアミノ酸を介して結合することが知られている [78]。今回、ネコにおいてのみ認められたこの正電荷クラスターが、C1q 同様に Fc 領域との結合に関与している可能性を検討することとした。

まず、ネコ AIM の **SRCR3** ドメインをマウス **SRCR3** ドメインに組換えたキメラ AIM と、正電荷クラスターを形成する原因アミノ酸である 3 つのアルギニンを、マウス **SRCR3** ドメインにおいて対応するアミノ酸に置換したネコ AIM 変異体 (R299K, R300I, R338K) をそれぞれ作製した (図 21A, B)。rAIM を精製し、得られた AIM とネコ IgM-Fc 五量体との親和性を SPR 法によって検討を行ったが、センサーチップへの非特異的な反応が大きく、正確な値を算出することは叶わなかった (図 22A)。次に代替法として、これらの rAIM とネコ rAIM (3-SRCR 型) の IgM-Fc 五量体への結合量を比較することとした。IgM-Fc 五量体強制発現 HEK293T 細胞と各種 AIM 強制発現 HEK293T 細胞の共培養を行い、得られた培養上清における結合量を非還元条件の WB 法にて解析した (図

22B)。この結果、キメラ AIM、ネコ AIM 変異体ともに結合量がおよそ半分に減少し、親和性が弱まったことが示唆された。すなわち、ネコ AIM における高親和性は、ネコ AIM 独自の正電荷クラスターが大きな要因であると考えられた。

以上から、ネコ AIM はマウスやヒトとは異なった構造上の特異性をもち、その特性が IgM との高親和性を生じさせ、AKI 時においても AIM が IgM から解離しないものと考えられた。

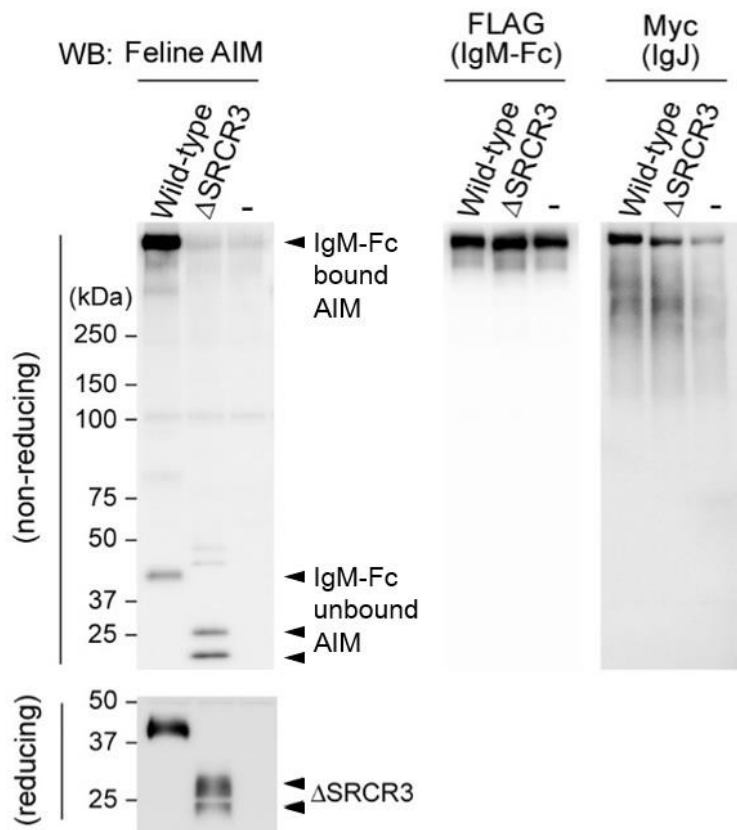
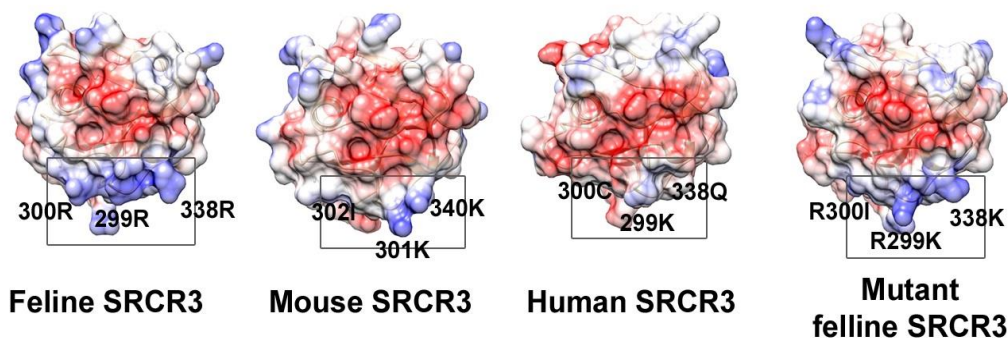


図 20 ネコ AIM においても SRCR3 ドメインが IgM 結合部位である
 非還元条件 (上段) および還元条件 (下段) の WB 法による AIM (左)、IgM-Fc (FLAG : 中央)、IgJ (Myc : 右) の検出。 Δ SRCR3 は異なる 2 つのサイズが検出された。それぞれ矢印で示した。

A



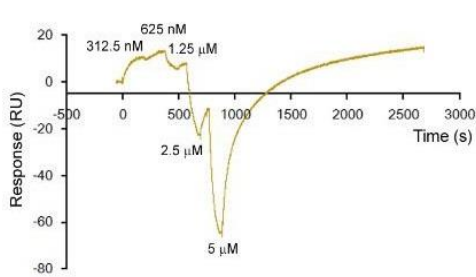
B

| | | | | | | |
|--------|-----|-------------|------------------|-------------------------|------------------|----------------------|
| Feline | 246 | LVGGRSHCEGR | LEVLHKGEWGSVCDDG | WGQDADR | VVCRQLGCGQPLSPFV | |
| Mouse | 248 | LVGGDTPCSGR | LEVLHKGSWGSVCDDN | WGEKEDQVVCKQLGCGKSLHPSF | | |
| Human | 246 | LVGGDNLCSGR | LEVLHKGVWGSVCDDN | WGEKEDQVVCKQLGCGKSLSPSF | | |
| | | | 299 300 | | 338 | |
| Feline | 296 | KVRRR | FGPGVGR | IWLDDVKCSGKEPSLEQCLH | RSWGYHNCNHR | EDVAVVCEEQQSGLPDA |
| Mouse | 298 | KTRKI | YGPAGR | IWLDDVNCSGKEQSLEFCRHL | WGYHDC | THKEDVEVICTDFDV----- |
| Human | 296 | RDRK | CYGPVGR | IWLDNVRCSGEEQSLEQCQHR | FWGFHDC | THQEDVAVICSG----- |

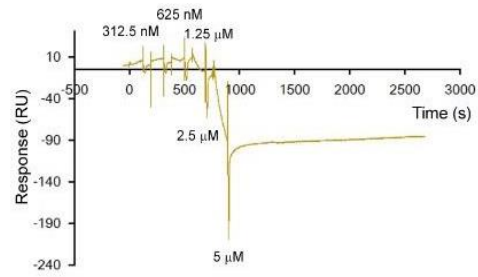
図 21 ネコ AIM SRCR3 ドメインは特異的な正電荷クラスターを形成する

(A) 各アミノ酸の電荷分布を示した SRCR3 ドメインの 3D 像。ネコの SRCR3 ドメインには特異的な正電荷クラスターが認められる (枠内)。この正電荷クラスターを構成するアミノ酸であるアルギニン (R) と、それに対応するアミノ酸をそれぞれ、ネコ、マウス、ヒト、ネコ AIM 変異体において示した。青：正電荷領域 赤：負電荷領域 白：中性領域 (B) ネコ、マウスおよびヒトの SRCR3 ドメインのアライメント。正電荷クラスターを構成するアミノ酸であるアルギニン (R) と、ヒト・マウスにおいて対応するアミノ酸を背景色青で示した。ネコ AIM 変異体では、赤矢印で示したネコ特異的なアルギニンを、マウスにおいて対応するアミノ酸に置換した。

A

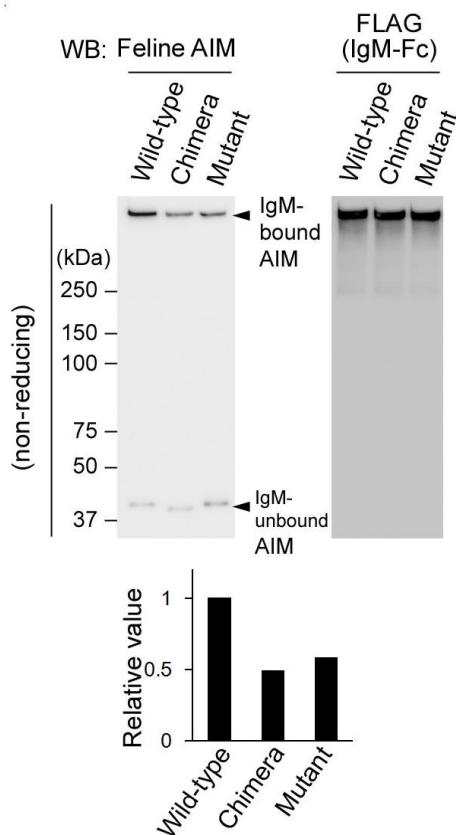


Ligand: feline IgM-Fc
Analyte: chimera



Ligand: feline IgM-Fc
Analyte: mutant

B



C

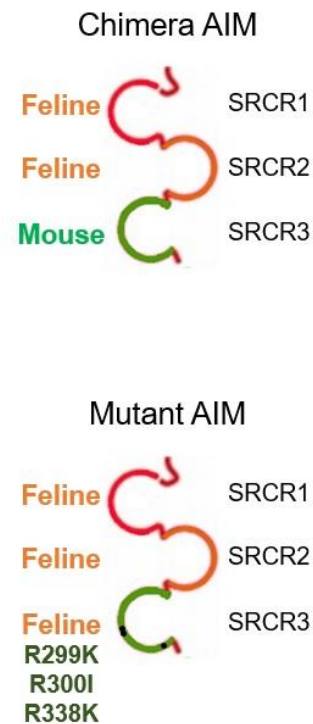


図 22 ネコ AIM 特異な正電荷クラスターは、IgM との親和性を増強する
 (A) キメラ AIM (左) と AIM 変異体 (右) の SPR 法センサーグラムの結果。いずれもリファレンスフローセルにおける強度の非特異反応に伴う減少が認められる。BSA およびエタノールアミンのいずれを用いても、非特異反応を抑制できなかった。
 (B) 3-SRCR (Wild-type)、キメラ、変異体の IgM-Fc 五量体への結合を非還元条件の WB 法にて検出した (上段)。IgM-Fc への結合量を NIH ImageJ software を用いて定量し、3-SRCR 型に対する比を示した。
 (C) キメラ、変異体の模式図。

第二章 血中 AIM の不解離性が急性腎障害自己治癒機構に及ぼす影響

第一章では、腎不全好発動物であるネコは、AIM の特異な性質に起因して IgM との高親和性をもち、AKI 時には AIM が IgM から解離しないことを示した。このため、AKI を発症したネコでは AIM が腎臓・尿細管管腔内に到達できない状態にある。以上の結果から、ネコでは AIM が尿細管に到達して以降の腎障害に対する自己治癒機構が働いていない可能性は示唆されたが、実際に AKI を生じた際の生理的条件下において AIM が IgM から解離しないことに起因して、AIM を介した自己治癒機構が働かなくなるかについては、十分に明らかにはなっていない。

ここでは、マウス AIM を欠損させ、代わりにネコ AIM を発現させた遺伝子改変マウス (AIM ネコ化マウスと呼称する) を用いて、AKI 時におけるネコ AIM (IgM 高親和性 AIM) の *in vivo* での動態を検討した。すなわち、AIM ネコ化マウスにおいて AKI を生じた場合に、ネコ AIM は IgM から解離するのかという点、解離しない場合に腎障害に対する自己治癒機構が働くのかという点について検証した。

AIM ネコ化マウスの作出

ネコ AIM の動態を *in vivo* 下で検討するために、マウス AIM をネコ AIM に置換した AIM ネコ化マウスを作出した。まず AIM の発現条件を揃えるために、ネコ AIM をマウス AIM プロモーター下に組み込んで、遺伝子改変マウスを作製することとした。AIM のマクロファージにおける遺伝子発現は、核内受容体である LXR / RXR (liver X receptor / retinoid X receptor) ヘテロダイマーによって制御されている [43, 44]。LXR の応答配列が AIM プロモーターの -5404 の位置に存在することから [44]、AIM 遺伝子上流 7 kb の遺伝子断片をクローニングし、導入遺伝子を設計した。また、これまでの結果からネコ AIM の 3-SRCR 型、4-SRCR 型に機能差は認められなかったため、3-SRCR 型を組み込むこととした (図 23)。こうして作出したネコ AIM 発現マウスと、AIM^{-/-} マウスを交配させることで、Feline AIM^{+/-}、Mouse AIM^{-/-} となる AIM ネコ化マウスを作製した。

AIM ネコ化マウスにおける AIM 発現が、野生型マウスと同等であることを調べるため、各臓器におけるネコ AIM の mRNA 発現量を qPCR 法で、組織発現を免疫組織化学にてそれぞれ検討した (図 24A, B)。野生型マウスでは脾臓と肝臓において AIM mRNA が強く発現することが知られている [41]。また、肝臓において AIM はクッパー細胞が発現している。いずれの結果も、野生型マウスと同様にネコ AIM を発現していること示していた。また、AIM ネコ化マウス血中における、ネコ AIM のマウス IgM との結合を非還元条件での WB 法で検

討した (図 25A)。AIM は IgM の他、IgA と結合することが知られている [46]。ネコ化マウスでの血中においても、AIM のほとんどが IgM へ結合していたが、一部 IgA との結合も示唆された。また Free AIM は認められなかった。次に rAIM の希釈系列を用いた標準曲線を使用し、還元条件での WB 法での検討から、ネコ化マウスにおける AIM の血中濃度を測定した。ネコ化マウスにおけるネコ AIM の血中濃度は、野生型マウスと同等の $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ 前後であった (図 25B)。

以上から、作出された AIM ネコ化マウスでは、AIM がネコ型に置換された他は野生型マウス同様の条件で AIM が存在しているものと考えられた。

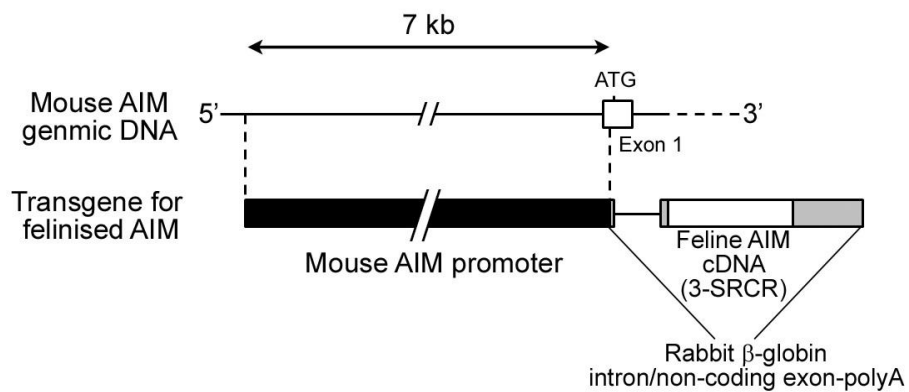
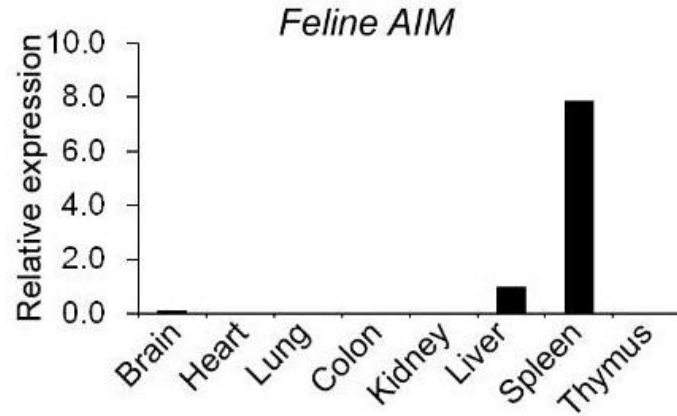


図 23 ネコ AIM 導入遺伝子の模式図

マウス AIM 遺伝子の上流 7kb をプロモーター領域とし、3-SRCR 型のネコ AIM を Rabbit β-globin intron/non-coding exon-polyA に組み込んだカセットを下流に繋げたものを導入遺伝子とした。

A



B

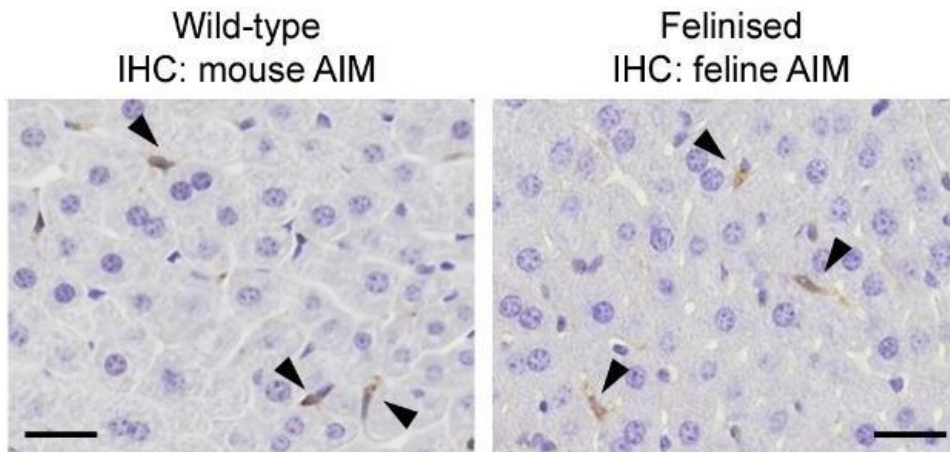
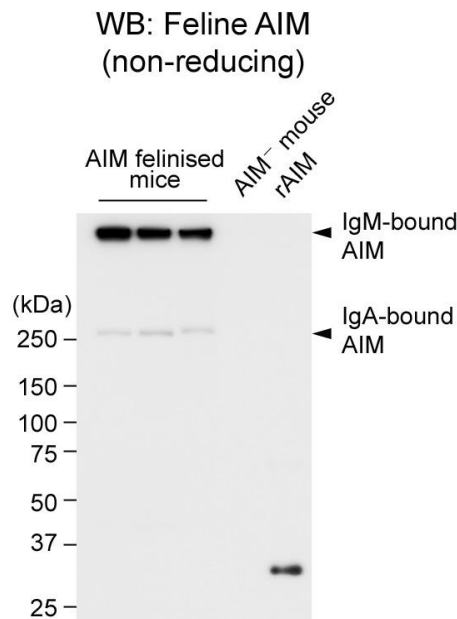


図 24 AIM ネコ化マウスにおける、ネコ AIM の発現

(A) AIM ネコ化マウスの全身組織における AIM mRNA の発現量を qPCR 法で解析した。肝臓におけるネコ AIM mRNA 発現量を基準に示した。解析は 3 匹のマウスで行い、類似した結果が得られている。代表的な結果を示した。(B) ネコ化マウスの肝臓・クッパー細胞におけるネコ AIM の発現を免疫組織化学で検出した (右)。野生型マウスにおけるマウス AIM の発現を対照として示した (左)。検出された AIM を矢印で示した。それぞれ 3 匹のマウスで検討し、類似した結果が得られた。

A



B

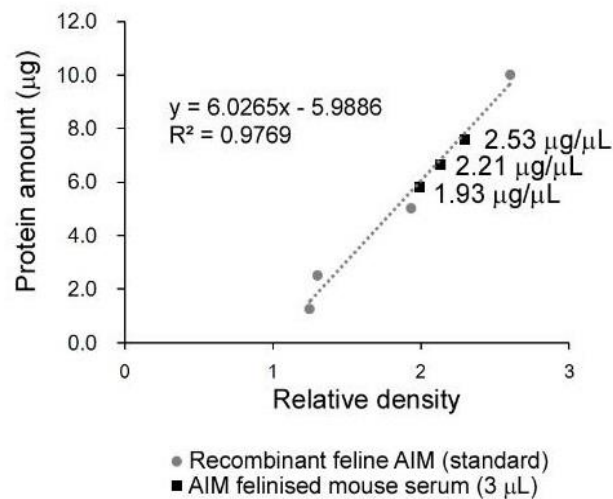


図 25 AIM ネコ化マウスにおけるネコ AIM の血中動態

(A) 非還元条件の WB 法による、ネコ化マウス血清中のネコ AIM の検出。 $AIM^{-/-}$ マウス血清と rAIM (10ng) を対照に用いた。IgM および IgA に結合した AIM が認められる。(B) AIM ネコ化マウスにおける血清中のネコ AIM 濃度の定量。rAIM を用いた希釈系列および 3 匹のネコ化マウス血清 (3 μl /匹) を還元条件の WB 法で検出し、NIH ImageJ software を用いて定量した。標準曲線を作成し、AIM 濃度を算出した。

AIM ネコ化マウス AKI モデルでは、AIM が IgM から解離しない

ネコにおける AKI 時の特徴は AIM が血中で IgM から解離しない点である (図 14A, 15)。AIM ネコ化マウスでも同様の表現型が再現されるかについて検討を行った。

AIM ネコ化マウスおよび野生型マウスに対して、IR によって AKI の誘導を行った。野生型マウスでは IR 処置後に血中での Free AIM の増加と、腎障害からの回復が見られる (図 14B) [57]。IR 前後の AIM ネコ化マウスの血清を用いて非還元条件での WB 法で AIM を検出し比較した (図 26)。その結果、ネコ化マウスではネコ同様に Free AIM の増加は認められなかった。

また、腎組織での免疫組織化学からも、野生型マウスでは尿細管中の壊死細胞塊に対して AIM の付着が認められるのに対し、ネコ化マウスではネコ同様に AIM の付着は認められなかった (図 27)。以上から、ネコ化マウスでは AKI を発症しても、AIM が IgM から解離せず、腎臓にも到達しないネコの表現型が再現された。すなわち、ネコにおける AKI 時の血中で、AIM が IgM から解離しない原因は、解離に必要な因子がネコで欠乏している可能性に加えて、ネコ AIM の構造上の特性に起因した IgM との高親和性によると考えられた。

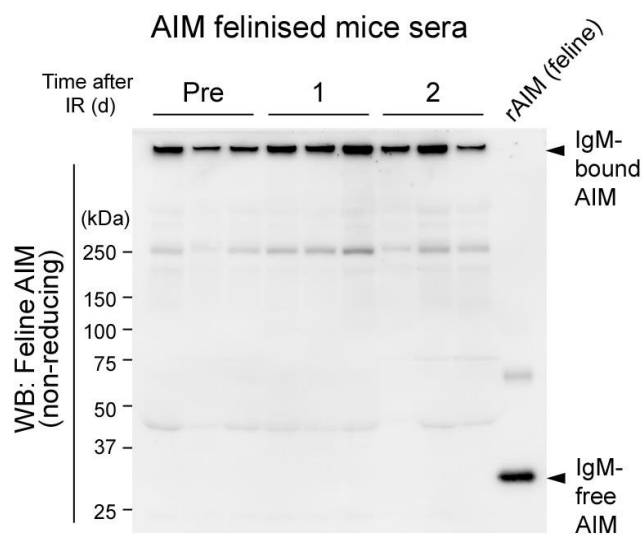


図 26 AIM ネコ化マウス AKI モデルでは、AIM が IgM から解離しない
 ネコ化マウス AKI モデルにおける血中ネコ AIM を非還元条件の WB 法で検出した。rAIM (15 ng) をコントロールに用いた。Pre : IR 前

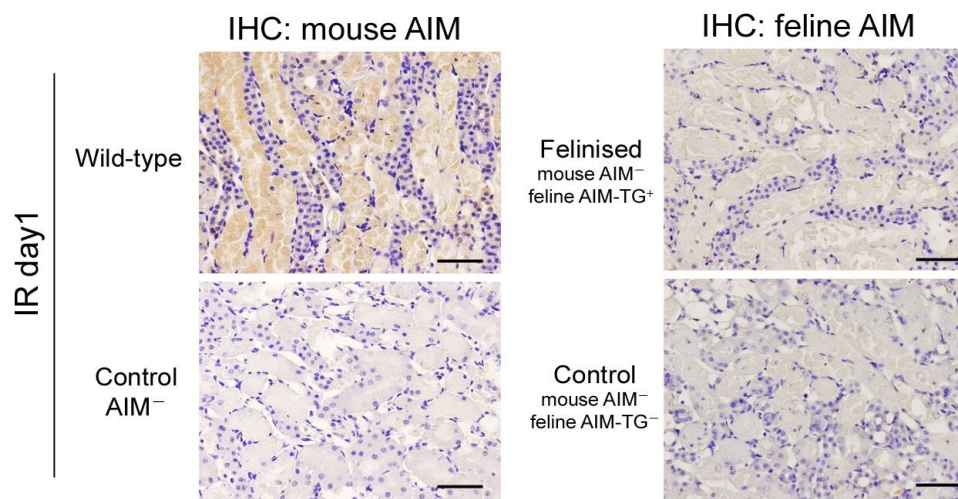


図 27 AIM ネコ化マウス AKI モデルでは、AIM が尿細管管腔内に到達しない IR day1 における腎臓の免疫組織化学。野生型マウスにおいてマウス AIM を、AIM ネコ化マウスにおいてはネコ AIM をそれぞれ検出した。AIM は HRP/DAB によって発色させた。陰性対照には *AIM*^{-/-}マウスを用いた。野生型マウスでは尿細管中の壊死細胞塊に AIM の付着が認められるが、ネコ化マウスでは認められない。それぞれ 5 匹について検討し、同様の結果を得た。

AIM ネコ化マウスでは、AKI が増悪される

野生型マウスでは、IR 後の day1 に腎障害が最も悪化し、その後に回復傾向を示すことが分かっている [57]。AIM が腎臓の尿細管管腔内に到達しない AIM ネコ化マウスでの AKI 時における障害と比較を試みた。まず腎障害のマーカーとして、Cre を測定し、AIM ネコ化マウスと野生型マウスで比較した (図 28A)。野生型マウスでは既報同様に、day2 以降に回復傾向が認められるのに対し、ネコ化マウスでは day2 以降にさらなる増悪が認められた。また、それぞれの生存率を比較した (図 28B)。野生型マウスが 75 %の生存率を示すのに対し、ネコ化マウスでは day3 までに全てのマウスが死亡した。このことから、ネコ化マウスでは AKI が増悪されていることが示唆された。この AIM ネコ化マウスにおける AKI の増悪・表現型は、AIM^{-/-} マウスにおける表現型と同様であった [57]。

次に腎組織での障害を確認するため、day3 においてサンプリングを行い、得られた腎臓の組織切片について PAS 染色を行った (図 29A)。野生型マウスでは尿細管の回復像として壊死細胞塊の減少と刷子縁の増生が認められるのに対し、ネコ化マウスでは尿細管中での壊死細胞塊の蓄積が認められ、また刷子縁の再生像は認められなかった。腎組織の障害度の指標である、急性尿細管壊死スコア (ATN スコア) [57, 74] を算出し、比較を行った (図 29B)。ATN スコアは値が大きいほど障害が大きいことを意味する。ネコ化マウスは野生型マウスと比べ、有

意に腎障害が大きいことが示された。これらの結果も *AIM*^{-/-}マウスの表現型と同様である。すなわち、血中 AIM が IgM から解離せず、尿細管管腔内に到達しない状態では、*AIM*^{-/-}マウスと同様に、AIM を介した自己治癒機構が働かないことが示唆された。

この結果は、ネコにおいても AKI 時に同様の現象が起こっていることを示唆するものである。すなわち、ネコ AIM は AKI 時に腎臓の尿細管管腔内に到達せず、AIM を介した自己治癒機構が働いていないことを意味し、同時にネコでは AKI がより増悪されているものと考えられる。

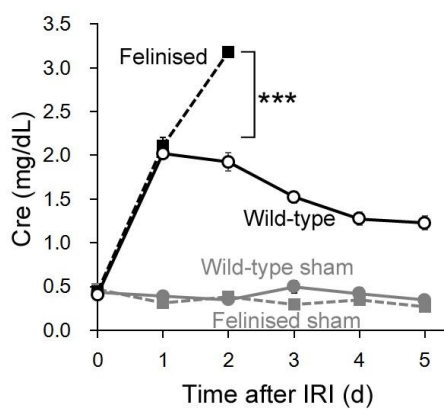
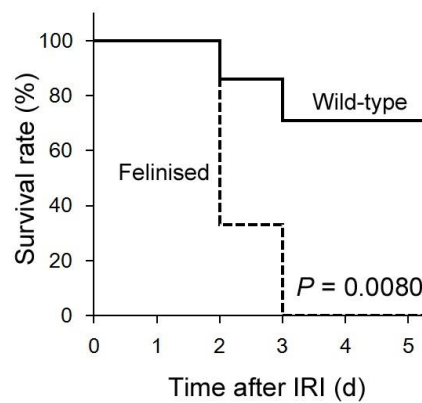
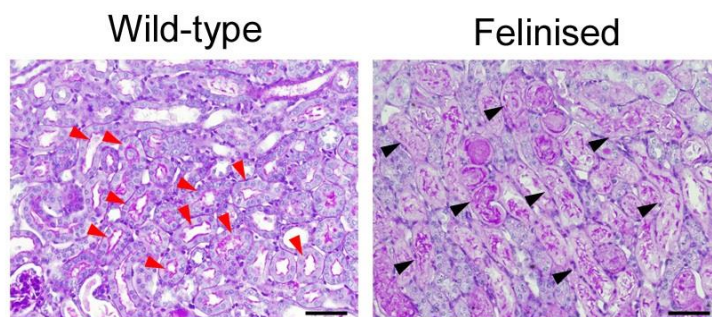
A**B**

図 28 AIM ネコ化マウスでは AKI が増悪される

(A) IR を行って AKI を誘導したマウスにおける Cre の推移。野生型マウスと AIM ネコ化マウスについて IR 群 (それぞれ n=8, n=6) および sham 群 (各 n=3) を示した。***P<0.001 (B) 野生型マウスと AIM ネコ化マウス IR 群 (n=8, n=6) の生存率 (カプランマイヤー曲線)。

A



B

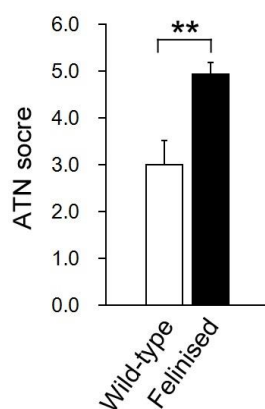


図 29 AIM ネコ化マウス AKI モデルでは、腎組織の回復が認められない

(A) 野生型マウスと AIM ネコ化マウス (各 n=3) IR day3 における腎臓の PAS 染色像。皮髄境界部を示した。野生型マウスでは刷子縁 (赤矢印) の再生が認められるのに対し、ネコ化マウスでは壊死細胞塊 (黒矢印) が蓄積しており、回復は認められない。スケールバー : 50 μ m (B) 野生型マウスと AIM ネコ化マウス (各 n=3) IR day3 における ATN スコア。ネコ化マウスにおいて有意に障害が大きいことが示された。

AIM ネコ化マウス AKI モデルは AIM 投与によって治療できる

最後に、AIM ネコ化マウス AKI モデルに対し、AIM 投与による治療効果を検討した。これまでの結果から、AIM ネコ化マウスにおける AKI の増悪は、腎臓に AIM が到達しないことに起因すると考えられる。AIM^{-/-} マウスにおいても AIM 投与によって治療効果が認められており [57]、同様に AIM 投与を行うことで AIM を尿細管管腔内に到達させれば、治療効果があるものと考えられた。

AIM ネコ化マウスに IR による AKI を誘導し、day1, 2, 3 にそれぞれ 1mg のマウス AIM の投与を行った。対照群は非投与とした。投与群と非投与群の生存率 (図 30A) および Cre (図 30B) を示した。AIM 投与群では野生型マウス同様に、day2 以降の Cre の減少と、生存率の改善が認められた。すなわち、AIM 投与による治療効果が認められた。実際に AIM 投与群の腎組織における免疫組織化学から、投与した AIM が尿細管管腔内に到達していることが確認できており (図 31A) 投与した AIM によって回復が促されたと考えられる。また、腎組織における障害度も、ATN スコアによる検討から、AIM 投与群は非投与群と比較して有意な回復が認められた (図 31B)。

以上から、AIM ネコ化マウスにおける AKI の増悪は、AIM が尿細管管腔内に到達しないことに起因することが示された。同時に、この機能欠損は尿細管管腔内に到達する AIM を補うことで回復を促すことができる可能性を示した。

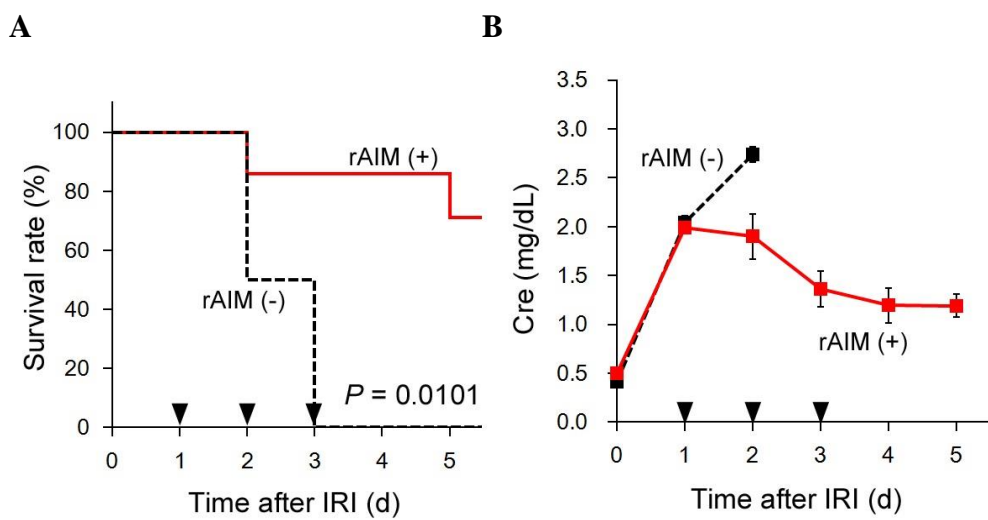
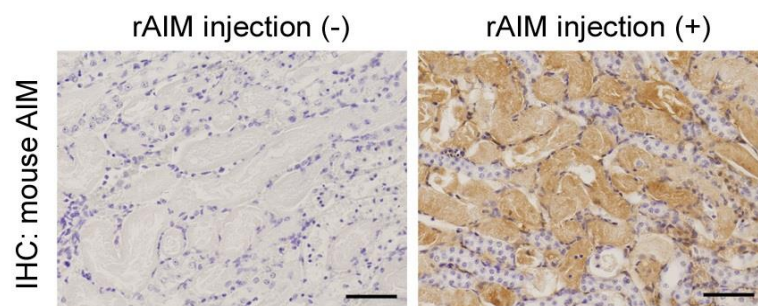


図 30 AIM ネコ化マウス AKI モデルは、AIM 投与によって治療できる
 (A) IR を行った AIM ネコ化マウスにおける生存率 (カプランマイヤー曲線)。AIM 投与群 (rAIM (+), n=7) と非投与群 (rAIM (-), n=4) (B) ネコ化マウス AKI モデルにおける Cre の推移。AIM 投与群 (rAIM (+), n=7) と非投与群 (rAIM (-), n=4) ▼ : rAIM 投与日

A



B

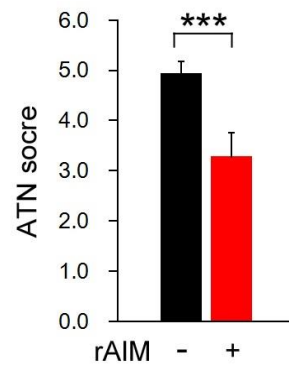


図 31 AIM の投与によって、腎組織の回復が促進される

(A) AIM ネコ化マウス IR day1 における免疫組織化学によるマウス AIM の検出。HRP/DAB によって発色させた。AIM 投与群 (rAIM injection [+]) では壊死細胞塊への AIM の付着が認められる。スケールバー : 50 μm (B) AIM ネコ化マウス AKI モデル AIM 投与群と非投与群 (各 n=3) IR day3 における ATN スコア。AIM 投与群における有意な回復が認められる。

考察

本研究の結果から、ネコでは AIM の特異的な立体構造上の特徴によって IgM と高親和性であり、AKI 時においても AIM が IgM から解離しないため、自己治癒機構が働かずに腎障害が増悪されることが示唆された。また、この腎障害は腎臓の尿細管管腔内に到達する AIM を投与によって補うことで回復を促すことができる可能性を見出した。特に AIM ネコ化マウスを用いた検討から、AIM - IgM 間の高親和性が *in vivo* においても AKI を増悪させるという点は、ネコに限らず、血中での AIM と IgM の結合・解離性が腎疾患を考える上で重要であることを意味している。これまでに得られた AIM と AKI の知見を図 32 にまとめた。

ここでは、血中での IgM からの AIM 解離についての意義と、AIM を介した自己治癒機構欠如と慢性腎不全 (CKD) との関連、そして AIM を標的とした新規治療法の開発について考察する。

AKI 時における IgM からの AIM 解離についての意義

これまで *AIM*^{-/-}マウスおよび野生型マウスによる検討から、AKI 時に働く AIM を介した自己治癒機構には、IgM から AIM が解離し、腎臓の糸球体濾過膜を通過して、尿細管管腔内に到達することが必要と考えられてきた [57]。しかしながら、これまでこの仮説について直接的に証明する結果は得られておらず、本研究の結果は、改めてこの説を強く裏付けるものである。AIM ネコ化マウスでは、野生型マウスと同様の AIM 血中濃度を維持している (図 25B) にも関わらず、AKI 時には AIM が解離せず (図 26)、尿細管管腔内への AIM の移行は認められなかった (図 27)。さらには *AIM*^{-/-}マウス同様の腎障害の増悪が認められた(図 28, 29)。ネコにおいても同様の現象が起こっているものと推察される。

この要因はネコ AIM 特異的な IgM との高親和性にあると考えられた。一点、SPR 法においてネコ 4-SRCR 型 AIM においてベースラインの上昇が見られていることは検討の余地を残している。これは不可逆的な結合が起こっていることを示すものであり、AIM のセンサーチップ上での凝集が起こった可能性が挙げられる。今回 SPR 法に用いた AIM は精製にあたり低 pH 処理を含む工程を経ており、4-SRCR 型 AIM に対して構造の安定性などへ影響を及ぼしていた可能性がある。キメラ AIM や変異 AIM が非特異反応を生じたことも含め、精製条件の見直しは今後の課題として挙げられる。

一方、AKI 時における AIM の IgM からの解離機構については、その詳細は未だ明らかになっていない。ネコの AKI 症例およびモデルから、ネコにおいても AIM が IgM から解離しないこと (図 14, 15) は明らかとなったが、ネコにおいて AIM を IgM から解離させる機構が AKI 時に働いているのか、欠如しているのかについては不明である。解離機構の解明とともに、今後の課題と言える。もともと、マウス体内においては AKI 時に AIM を IgM から解離させる機構は働いているため、その環境下にあっても、AIM ネコ化マウス AKI モデルでは AIM の解離が認められていないことから、ネコ AIM 独自の高親和性が解離機構に相反していることは疑いようがない。従って、ネコ SRCR3 ドメインの特異的構造 (特徴的な正電荷クラスター : 図 21) は、解離機構を考える上でも興味深い検討対象であると考えられる。

AIM を介した自己治癒機構欠如と慢性腎不全との関連

ヒトやイヌの CKD の進行に糸球体の障害が関与することに対して、ネコの CKD は尿細管間質障害が関与することが報告されている [79]。AKI が 間質性の障害に関連した CKD のリスクファクターであるとの考えが主流となってきた中では [11-18]、AIM を介した自己治癒機構の欠如は、間質性の障害が多く見られるネコの CKD 発症の重大なリスクファクターになると考えられる。

これまでの研究結果から、*AIM*^{+/+}マウスに軽度の IR によって弱い腎障害を誘導し長期的に観察を続けた結果、このマウスでは野生型マウスと比べて *KIM-1* mRNA の発現量が多いまま維持され、慢性炎症と線維化の亢進が認められている [57]。AIM を介した早期回復が、CKD への続発を抑制していると考えられる。一般にネコの CKD に関しては、リスク要因として AKI を引き起こす尿管結石や腎石、泌尿器系への感染、さらには腎毒性物質として一部の抗生物質や抗炎症剤などが知られている [80-82]。こうした要因による AKI を AIM 投与によって根治することは、CKD の抑制に貢献するものと考えられる。

また、ネコにおける CKD 好発の特徴に、加齢とともに増加する点が挙げられる。この要因の一つとして、代表的な腎マーカーである Cre や BUN は腎臓の大部分 (約 75%) の機能欠如があってもようやく検出されるものであり、見えないレベルでの軽度な腎障害については不明である点が挙げられる。腎疾患には限らないものの、獣医療においては、ネコ自身が体調不良を訴えることなく、オーナーが異常に気付いて初めて来院するため、診察時には既に疾患が進行し、重篤化していることも多い。このため、診察時に腎マーカーによって腎臓の異常が検出された時点で既に CKD が進行しており、手遅れになっているケースもよく知られている。仮説として AIM による自己治癒機構が見えないレベルでの腎臓の恒常性維持も担っており、ネコではこの維持機構も損なわれてい

る可能性を挙げる。AKI についても腎マーカーの異常が認められてはじめて診断されることが多く、マーカーで検出されない軽微な障害については見過ごされている可能性が高いと考えられる。こうした見えない AKI を生じた際に、ヒトやマウスでは AIM を介した自己治癒機構が働き、正常な回復が起こるのに対し、ネコでは回復せずに障害が蓄積する。こうした障害の蓄積の結果、腎障害が認められた時点で CKD に陥っている可能性が考えられる。直接的な腎疾患ではないものの、ネコでは猫下部尿路疾患 (FLUTD : feline lower urinary tract disease) として、特発性の炎症や尿石症、下部尿路感染症などによって生じる泌尿器症状を呈する病態を総称するが、これらの疾病では壊死細胞塊が尿路閉塞を引き起こすとされる [83]。こうした事例が AKI や CKD を続発する可能性を示唆するとともに、疾患の要因に AIM を介した自己治癒機構の欠損が関連している可能性も考えられる。この他、AKI が認められないまま CKD に陥るネコについて、肥満や糖尿病を含めた肥満関連疾患が腎疾患のリスクになるという意見もあり、実際に肥満のネコも増加傾向にある [84-86]。こうした背景を考慮すると環境要因としても、腎障害が起こりやすい状況にあると考えられる。

AIM と IgM の高親和性が他疾患とも関連する可能性

上述したように、CKD と肥満の関連性について指摘をしたが、一方で AIM

は抗肥満効果も知られている [51]。その機構は Free AIM が脂肪細胞に取り込まれて、脂肪酸合成酵素の活性を抑制することで脂肪的融解を促進するというものである [51, 53]。AIM^{-/-}マウスに高脂肪食を負荷すると、脂肪細胞の肥大がより豊富に起こって内臓脂肪の質量は増大し、野生型マウス以上に高度に肥満となる [51]。従って IgM 非解離性の AIM をもつネコでは、AIM による抗肥満効果も損なわれており、これが肥満の好発要因、さらには CKD 発症へとつながっている可能性も考えさせられる。

今回作製した AIM ネコ化マウスは、IgM 高親和性 AIM 化マウスとみなすことができる。これまでに *in vitro* 実験においてネコ AIM がマウス骨髄由来マクロファージに取り込まれることは確認できており (データ省略)、おそらく KIM-1 同様に他のマウスのスカベンジャーレセプターもネコ AIM を認識できるものと考えられる。より詳細な予備検討は必要であるものの、AIM ネコ化マウスを用いることで、ネコにおける肥満や脂肪肝の好発とネコ AIM 特異的な IgM との高親和性の関連を検討できる可能性がある。AIM の IgM に対する高親和性が、結果的に脂肪細胞への AIM の取り込みを抑制するのであれば、AIM ネコ化マウスにおいても AIM^{-/-}マウス同様の肥満となることが予想される。これらの観点からも、AKI 発症時の治療のみならず、AIM の予防的投与がネコの肥満や CKD の発症率抑制に寄与するか、興味深い点である。

一方で AIM と IgM の結合体が存在することで、自己抗体の産生が促され、自己免疫疾患のリスクを増大することが報告されている [47]。FcR (Fc receptor) は Ig の Fc 領域を認識する受容体であり、中でも IgM と IgA の Fc 領域を認識する Fc α / μ R は B 細胞や FDC (Follicular dendritic cell : 濾胞樹状細胞) に発現することが知られ、IgM の細胞内への取り込みを誘導し、細胞表面への IgM 蓄積を抑制している [87, 88]。IgM は血中で自己抗原と免疫複合体を形成し、リンパ組織の胚中心において未熟な B 細胞に抗原提示をすることで自己抗体の産生を促すことが知られているが、IgM に結合した AIM は Fc α / μ R による細胞内への取り込みを抑制し、IgM 免疫複合体の FDC 表面での蓄積を助長する。この結果、IgM に結合した自己抗原の抗原提示が促進され、自己抗体を産生する B 細胞の成熟が促進されることで自己免疫疾患の発症に関与することが知られている [47]。これは AIM が血中で IgM と結合して存在することの負の側面であるが、ネコにおいてはインスリン治療をしていないにも関わらず抗インスリン自己抗体を産生しているなど、自己抗体産生が多いことが知られている [89, 90]。先に述べた FLUTD もそうであるが、ネコには特発性の炎症疾患が存在することから、こうした側面についても、AIM と IgM の高親和性が影響を及ぼしている可能性がある。ネコの脾臓組織の免疫組織化学からも、AIM – IgM 複合体が FDC が存在する胚中心への集積が確認できており (データ省略)、AIM

と IgM 間の高親和性が Fc α / μ R による IgM の取り込みをより阻害し、自己抗体の産生を助長していることも考えられる。

AIM を標的とした新規治療法の開発

これまで得られてきた知見は創薬の観点からも複数の示唆を与えてくれる。まず本研究では治療法として最も単純に AIM を直接投与することで補い、Free AIM を腎臓の糸球体濾過膜を通過させて、尿細管管腔内に到達させるという方法を選んだ。しかしながら、血中には IgM に結合した AIM が存在しており、これを人為的に解離させることができれば、直接 AIM を投与しなくても治療法となることが期待される。特にネコにおいては AIM 血中濃度がマウスやヒトと比べて高い (表 1) ため、解離機構を明らかにし、その機序に基づいて解離を誘導できればより効果的である可能性がある。将来的なヒト創薬を考える上でも、確かに AKI 時にヒトでは AIM の解離が認められるが、IgM に結合したまま保持されている AIM も存在しており同様に有効な治療法になると考えられる [57]。

一方で、ネコ AIM 独自の high affinity によって解離機構を働かせても解離を誘導できない可能性も考えられる。またヒト創薬の観点からも、IgM からの AIM 解離誘導薬では、AIM 血中濃度が低い患者への効果は期待しにくい。従って、

AIM を補う治療法の確立は重要である。

AIM を投与によって補う場合、血中に投与された AIM の一定量は IgM へ結合してしまうことから、治療薬としての効率あるいはコスト面を考慮すると、さらなる改良が必要である。今回明らかになった SRCR3 ドメインを介した高親和性の機構 (図 21, 22) をより詳細に検討することで、IgM との親和性のみを下げ、他の機能を保持した変異 AIM を作製することは、一つの解決策であろう。その意味でも、改めて AIM タンパク質の構造・機能をより詳細に解析していくことが重要になると考えられる。

いずれの方法にせよ、今回得られた知見に基づけば、生理機構に基づいた新規治療法の開発が期待できる。従来疾患の治療は異常のみに着目し、その改善を主眼におく傾向があり、副作用を伴うことが多かった。これは本来生体には存在しない因子を薬として用いるために、異常の改善作用を生み出す反面、他の生理機構に逆らうことによる。生体内機序に準じた方法での治療法確立であれば、生体内での動態の予測がしやすく、副作用のリスクを下げることができ、その安全性は高いと考えられる。この点は実用化への課題の一つに対して有利に望めると考えられる。

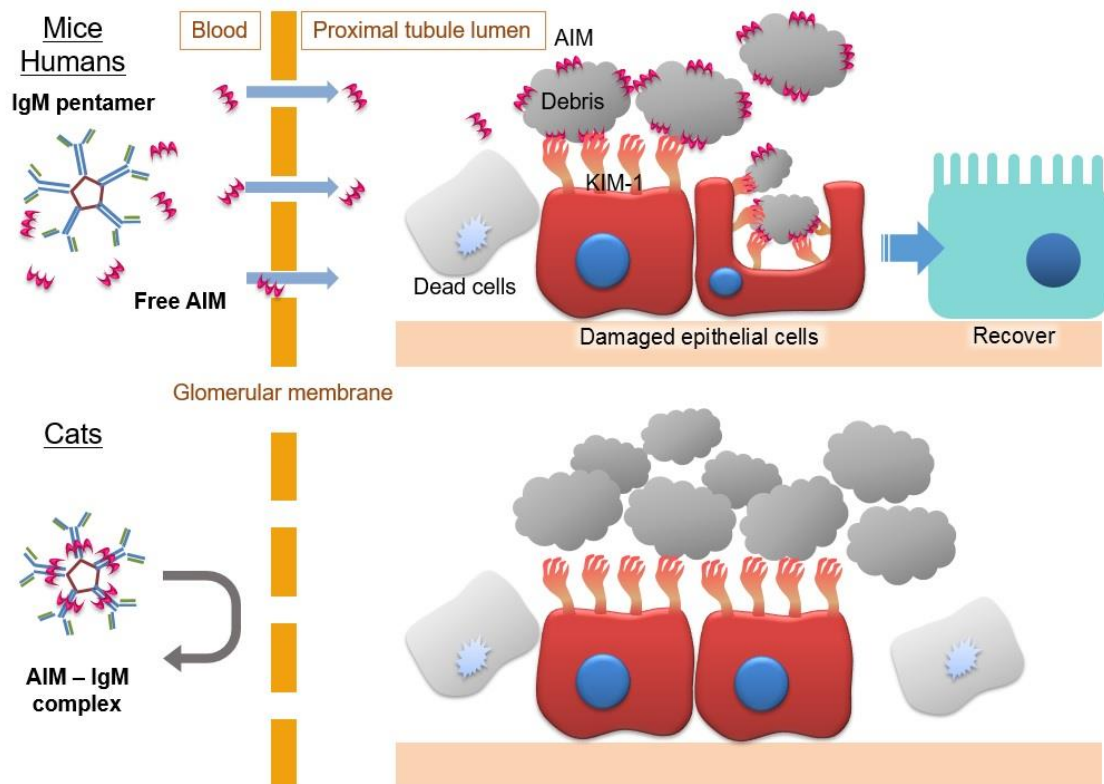


図 32 AIM と IgM 間親和性の差異がもたらす腎疾患への影響

AKI が生じると、マウスおよびヒトでは血中にて IgM から AIM が解離し、Free AIM となって腎臓・尿細管管腔内に移行して早期回復が促される。ネコにおいては、血中に十分な AIM が存在するにも関わらず、ネコ AIM 特異的な構造によって生じる IgM との高親和性によって、AKI 時にも AIM が IgM から解離しない。このため AIM が尿細管管腔内に移行できず、*AIM*^{-/-}マウス同様に腎臓の回復は起こらない。

結語

本研究では、ネコにおける AIM を介した急性腎障害の自己治癒機構の欠損を見出し、その原因を明らかにするとともに、新規治療法開発の基盤となりうる知見を得た。ネコ AIM 特異的な構造に基づいた IgM との高親和性と、それに起因する解離性の欠如は、単にネコにおける現象のみにとどまらず、今後の創薬を考える上でも様々な示唆を提示するものである。

今後、本研究より得られた AIM と IgM 間の結合・解離性に関する知見が、より詳細な AIM の特性解析・解明に貢献するとともに、腎疾患に対する新規治療法・根治療法の開発に繋がること、さらには早期の創薬の実現へ貢献することを切に願うものである。

謝辞

本研究全般について、多大な御指導御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 疾患生命工学センター 分子病態医科学部門の宮崎徹教授に心より深く感謝致します。

当研究室において本研究の遂行にあたり、新井郷子准教授には多大な御指導を賜りました。深く感謝致します。当研究室修士課程の平本絵美莉さんには、IRマウスの作製および治療実験に尽力していただき、本論文に研究内容を含めることを承諾頂きました。心より感謝致します。また共同研究からお世話になり、その後当研究室に所属となられ、様々な御助言を頂きました松岡茂先生、森伸子助教に深く御礼の意を表します。

北里大学獣医学部 小動物第二外科学研究室の岩井聡美先生、日本獣医生命科学大学基礎獣医学部門 形態機能学分野の新井敏郎教授には、ネコの実験について多岐にわたりご協力いただき、また本論文において共同研究内容を含めることを同意頂きました。心より感謝致します。

本研究で行った SPR 解析は東京大学大学院薬学系研究科 ワンストップ創薬共用ファシリティセンターにて行われました。また AKTA 装置を国立国際医療研究センター 脂質シグナリングプロジェクトの清水孝雄研究所理事・プロジェ

クト長、進藤英雄先生、菱川大介先生よりご指導いただきながらお借りしました。熊本大学生命資源研究・支援センターの山村研一シニア教授、竹田直樹先生にはネコ AIM 遺伝子改変マウスの作出にご協力頂きました。聖マリアンナ医科大学 医学部医学科 腎臓・高血圧内科の菅谷健客員教授には mProx24 細胞をご提供頂きました。成城こぼやし動物病院の小林元郎先生、廣瀬友亮先生には小動物臨床の観点からの御助言を頂きました。また日本獣医生命科学大学獣医学総合教育部門 獣医学教育推進室の岡田ゆう紀先生、同大学臨床獣医学部門 治療学分野 I の盆子原誠教授、麻布動物病院の武内雅道先生、龍敬美先生からはネコの症例検体・組織などをご提供頂きました。深く感謝の意を表します。

最後に、本研究を進めるにあたり様々なご支援をいただきました高井亮輔君、山崎智子さん、そして分子病態医科学部門の皆様へ深く感謝致します。

引用文献

1. Kellum JA, Levin N, Bouman C, Lameire N. Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr Opin Crit Care*. 8, 509-14 (2002).
2. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 8, R204-12(2004).
3. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 11, R31 (2007).
4. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements* (2012).
5. Hsu, R. K., McCulloch, C. E., Dudley, R. A., Lo, L. J. & Hsu, C. Y. Temporal changes in incidence of dialysis-requiring AKI. *J. Am. Soc. Nephrol*. 24, 37–42 (2013).
6. Lameire, N. H. *et al.* Acute kidney injury: an increasing global concern. *The Lancet* 382, 170–179 (2013).
7. Bedford, M., Farmer, C., Levin, A., Ali, T. & Stevens, P. Acute kidney injury and

CKD: chicken or egg? *Am. J. Kidney Dis.* 59, 485-491 (2012).

8. Rifkin, D.E., Coca, S.G. & Kalantar-Zadeh, K. Does AKI truly lead to CKD? *J. Am. Soc. Nephrol.* 23, 979-984 (2012).

9. Chawla, L.S. & Kimmel, P.L. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* 82, 516-524 (2012).

10. Chawla, L.S., Eggers, P.W., Star, R.A. & Kimmel, P.L. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N. Engl. J. Med.* 371, 58-66 (2014).

11. Ishani, A. et al. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 223-228 (2009).

12. Hsu, C.Y. Linking the population epidemiology of acute renal failure, chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 6, 221-226 (2007).

13. Thakar, C.V., Christianson, A., Himmelfarb, J. & Leonard, A.C. Acute kidney injury episodes and chronic kidney disease risk in diabetes mellitus. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 2567-2572 (2011).

14. Chawla, L.S., Amdur, R.L. & Amodeo, S. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 79, 1361-1369 (2011).

15. Murugan, R. & Kellum, J.A. Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nat.*

Rev. Nephrol. 7, 209-217 (2011).

16. Amdur, R.L., Chawla, L.S., Amodeo, S., Kimmel, P.L. & Palant, C.E. Outcomes following diagnosis of acute renal failure in U.S. veterans: focus on acute tubular necrosis.

Kidney Int. 76, 1089-1097 (2009).

17. Takaori, K. *et al.* Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis. J. Am. Soc. Nephrol. 27, 2393–406 (2016)

18. Soto, K. *et al.* The risk of chronic kidney disease and mortality are increased after community-acquired acute kidney injury. Kidney Int. 90, 1090–1099 (2016).

19. Bonventre, J.V. & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. J. Clin. Invest. 121, 4210-4221 (2011).

20. Humphreys, B.D. *et al.* Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. Cell Stem Cell. 2, 284-291 (2008).

21. Kusaba, T., Lalli, M., Kramann, R., Kobayashi, A. & Humphreys, B.D. Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 111, 1527-1532 (2014).

22. Charlton, J.R., Portilla, D. & Okusa, M.D. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. Nephrol. Dial. Transplant. 29, 1301-1311 (2014).

23. Amin, R.P. *et al.* Identification of putative gene based markers of renal toxicity.

Environ Health Perspect. 112, 465-479 (2004).

24. Ichimura, T. et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J. Biol. Chem.* 273, 4135-4142 (1998).

25. Wan, E. et al. Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction. *Circ. Res.* 113, 1004–1012 (2013).

26. Juncadella, I.J. et al. Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. *Nature* 493, 547–551 (2013).

27. Henson, P.M., Vandivier, R.W. & Douglas, I.S. Cell death, remodeling and repair in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 713–717 (2006).

28. Sandahl, M., Hunter, D.M., Strunk, K.E., Earp, H.S. & Cook, R.S. Epithelial cell-directed efferocytosis in the post-partum mammary gland is necessary for tissue homeostasis and future lactation. *BMC Dev. Biol.* 10, 122 (2010).

29. Mochizuki, A. et al. Hepatic stellate cells orchestrate clearance of necrotic cells in a hypoxia-inducible factor-1 α -dependent manner by modulating macrophage phenotype in mice. *J. Immunol.* 192, 3847–3857 (2014).

30. Ichimura, T. et al. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that

confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 118, 1657-1668 (2008).

31. Bonventre, J.V. Kidney injury molecule-1: a translational journey. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 125, 293-299, discussion 299 (2014).

32. The American Veterinary Medical Foundation. Total Pet Ownership and Pet Population. U.S. Pet Ownership & Demographics Sourcebook. Section 1 (2012).

33. The European Pet Food Industry. Facts and Figures 2014. http://www.fediaf.org/fileadmin/user_upload/Secretariat/facts_and_figures_2014.pdf. (2014)

34. White, J.D., Norris, J.M., Baral, R.M. & Malik, R. Naturally-occurring chronic renal disease in Australian cats: a prospective study of 184 cases. *Aust. Vet. J.* 84, 188-194 (2006).

35. White J.D., Malik, R. & Norris, J.M. Feline chronic kidney disease: can we move from treatment to prevention? *Vet. J.* 190, 317-322 (2011)

36. Lulich, J.P., O'Brien, T.D., Osborne, C.A. & Polzin, D.J. Feline renal failure: questions, answers, questions. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* 14, 127-152 (1992).

37. Brown, S.A. Linking treatment to staging in chronic kidney disease. *Consultations in Feline Internal Medicine* (edit. By August, J.R). 6, 475-482 (2010).

38. Pontius, J. U. et al. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res.* 17, 1675–89 (2007).
39. Montague, M. J. et al. Comparative analysis of the domestic cat genome reveals genetic signatures underlying feline biology and domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 17230–5 (2014).
40. Lyons, L. A. et al. Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2548–55 (2004).
41. Miyazaki, T., Hirokami, Y., Matsushashi, N., Takatsuka, H. & Naito, M. Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily. *J. Exp. Med.* 189, 413-422 (1999).
42. Sarrias, M. R. et al. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Sp α . *Tissue Antigens* 63, 335–44 (2004).
43. Arai, S. et al. A role of the apoptosis inhibitory factor AIM/Sp α /Api6 in atherosclerosis development. *Cell Metab.* 1, 201-213 (2005).
44. Joseph, S.B. et al. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell.* 119, 299-309 (2004).
45. Valledor, A.F. et al. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors

- prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101,17813-17818 (2004).
46. Hamada, M. et al. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. *Nat. Commun.* 5, 3147 (2014).
47. Arai, S. et al. Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain IgM immune complex on follicular dendritic cells. *Cell Rep.* 3, 1187-1198 (2013).
48. Yamazaki, T. et al. Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans. *PLoS One.* 9, e109123 (2014).
49. Tissot, J.D. et al. IgM are associated to Sp alpha (CD5 antigen-like). *Electrophoresis.* 23, 1203-1206 (2002).
50. Sarrias, M.R. et al. A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor. *J Biol Chem.* 280, 35391-35398 (2005).
51. Kurokawa, J. et al. AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. *Cell Metab.* 11, 479-492 (2010).
52. Maehara, N. et al. Circulating AIM prevents hepatocellular carcinoma through complement activation. *Cell Rep.* 9, 61-74 (2014).
53. Iwamura, Y. et al. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) diminishes lipid droplet-coating proteins leading to lipolysis in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 422, 476-481 (2012).

54. Arai, S. & Miyazaki, T. Impacts of the apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) on obesity-associated inflammatory diseases. *Semin. Immunopathol.* 36, 3-12 (2014).

55. Kurokawa, J. et al. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 19, 108:12072-12077 (2011).

56. Mera, K. et al. Serum levels of apoptosis inhibitor of macrophage are associated with hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *BMC Gastroenterol.* 13, 14:27 (2014).

57. Arai, S. et al. Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice. *Nat. Med.* 22, 183-193, (2016).

58. Chapuis, R. M. & Koshland, M. E. Mechanism of IgM polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 657-661 (1974).

59. PORTER, R. R. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73, 119-126 (1959).

60. Sørensen, V., Rasmussen, I. B., Sundvold, V., Michaelsen, T. E. & Sandlie, I. Structural requirements for incorporation of J chain into human IgM and IgA. *Int.*

Immunol. 12, 19–27 (2000).

61. Wiersma, E. J., Collins, C., Fazel, S. & Shulman, M. J. Structural and functional analysis of J chain-deficient IgM. *J. Immunol.* 160, 5979–89 (1998).

62. Davis, A. C., Roux, K. H., Pursey, J. & Shulman, M. J. Intermolecular disulfide bonding in IgM: effects of replacing cysteine residues in the mu heavy chain. *EMBO J.* 8, 2519–26 (1989).

63. Kai, T., Yamazaki, T., Arai, S. & Miyazaki, T. Stabilization and augmentation of circulating AIM in mice by synthesized IgM-Fc. *PLoS One.* 9, e97037 (2014).

64. Kitamura, S. et al. Transforming growth factor- β 1 induces vascular endothelial growth factor expression in murine proximal tubular epithelial cells. *Nephron Experimental Nephrology.* 95, e79-86 (2003).

65. Park, K.M. et al. Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J. Biol. Chem.* 278, 27256-2766 (2003).

66. Schmiedt, C.W., Brainard, B.M., Hinson, W., Brown, S.A. & Brown, C.A. Unilateral Renal Ischemia as a Model of Acute Kidney Injury and Renal Fibrosis in Cats. *Vet. Pathol.* 53, 87-101 (2016).

67. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C.SWISS-MODEL: An

- automated protein homology-modeling server *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385 (2003).
68. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J.T. & Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201 (2006).
69. Altschul, S.F. et al. BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402 (1997).
70. Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A. & Soding, J. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat. Methods* 9, 173-175 (2011).
71. Guex, N. & Peitsch, M. C.SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723 (1997).
72. Benkert, P., Biasini, M. & Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27, 343-350 (2011).
73. Pettersen, E.F. et al. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605-1612 (2004).
74. Ismail, O.Z. et al. Kidney Injury Molecule-1 Protects against Gα12 Activation and Tissue Damage in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Am. J. Pathol.* 185, 1207-1215 (2015).

75. Mori, M., Kimura, H., Iwamura, Y., Arai, S. & Miyazaki, T. Modification of N-glycosylation modulates the secretion and lipolytic function of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM). *FEBS Lett.* 586, 3569–74 (2012).
76. Bland, S. K., Côté, O., Clark, M. E., DeLay, J. & Bienzle, D. Characterization of kidney injury molecule-1 in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 1454–64 (2014).
77. Yamazaki, T. et al. A proteolytic modification of AIM promotes its renal excretion. *Sci Rep.* 6, 38762 (2016).
78. Gadjeva, M.G. et al. Interaction of human C1q with IgG and IgM: revisited. *Biochemistry.* 47, 13093-13102 (2008).
79. Yabuki, A, et al. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: induction of myofibroblasts. *Res Vet Sci.* 88, 294–299 (2010).
80. Segev, G., Nivy, R., Kass, P.H. & Cowgill, L.D. A retrospective study of acute kidney injury in cats and development of a novel clinical scoring system for predicting outcome for cats managed by hemodialysis. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 830-839 (2013).
81. Lee, Y.J., Chan, J.P., Hsu, W.L., Lin, K.W., Chang, C.C. Prognostic factors and a prognostic index for cats with acute kidney injury. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 500-505 (2012).
82. Worwag, S. & Langston, C.E. Acute intrinsic renal failure in cats: 32 cases

(1997–2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232, 728-732 (2008).

83. 日本獣医内科学アカデミー (編). 獣医内科学小動物編. 文永堂出版.
276-279. (2005)

84. Scarlett, J.M. & Donoghue, S. Associations between body condition and disease
in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 1725-1731 (1998).

85. Courcier, E.A., O'Higgins, R., Mellor, D.J. & Yam, P.S. Prevalence and risk
factors for feline obesity in a first opinion practice in Glasgow, Scotland. *J. Feline. Med.
Surg.* 12, 746-753 (2010).

86. Lund, E.M., Armstrong, P.J., Kirk, C.A. & Klausner, J. S. Prevalence and risk
factors for obesity in adult cats from private US veterinary practices. *Int. J. Appl. Res.
Vet. Med.* 3, 88–96 (2005).

87. Shibuya, A. et al. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated
microbes. *Nat. Immunol.* 1, 441–6 (2000).

88. Honda, S. et al. Enhanced humoral immune responses against T-independent
antigens in Fc alpha/muR-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11230–5
(2009).

89. Nishii, N. et al. Presence of anti-insulin natural autoantibodies in healthy cats
and its interference with immunoassay for serum insulin concentrations. *Domest. Anim.*

Endocrinol. 38, 138–45 (2010).

90. Takashima, S. et al. Natural anti-insulin autoantibodies in cats: enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of plasma anti-insulin IgG and its concentrations in domestic cats. Res. Vet. Sci. 95, 886–90 (2013).