

氏名	ばーたるじゃふ ちんとくとふ Baatarjav Chintogtokh
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 669 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	横紋筋融解症による急性腎障害における AIM2 インフラマソームの役割
論文審査委員	(委員長) 教授 森下 義幸 (委員) 教授 長田 太助 准教授 黒須 洋

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

Rhabdomyolysis is a syndrome characterized by damaged skeletal muscle releasing its cytosolic components into the bloodstream. One of the most common complications of rhabdomyolysis is AKI, which occurs in 5-30% of hospitalized patients with rhabdomyolysis. Patients with rhabdomyolysis-induced acute kidney injury (RIAKI) usually require renal replacement therapy, and the mortality rate is 10-14%.

The pathogenesis of RIAKI is related to cytosolic components of injured muscle such as myoglobin and dsDNA. dsDNA served as danger-associated molecular patterns (DAMPs) to bind pattern recognition receptors (PRRs) and enhance inflammation. AIM2, a cytosolic sensor for dsDNA, assembles an inflammasome with an adaptor protein (ASC) via its PYD domain and activates caspase-1 to produce the mature form of IL-1 $\beta$  and the pore-forming protein N-terminal GSDMD. This GSDMD-dependent cell death is referred to as pyroptosis. Interestingly, several facts have shown that deletion of AIM2 leads to activation of other dsDNA sensing pathways such as cGAS- STING. Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS), the stimulator of interferon genes (STING), is a known dsDNA-sensing pathway that leads to activation of interferon regulatory factor 3 (IRF3) and NF- $\kappa$ B to increase cytokine production. A recent paper suggests that circulating dsDNA increases during RIAKI and may contribute to the process of tubular injury and inflammation. However, the mechanism of how dsDNA affects and how dsDNA sensors interact and prioritize during RIAKI remains to be investigated.

### 2 研究方法

We used 8–12 week-old WT, *Aim2*<sup>-/-</sup> and ASC-citrine mice. *Aim2*<sup>-/-</sup> mice with C57BL/6J background were generated by CRISPR/Cas9-based genome editing. Female mice aged eight to 12 weeks were used for cell experiments. For the RIAKI model, eight-to 10-week-old male mice were used. RIAKI was generated by intramuscular injection of 50% glycerol (5mL/kg) or

vehicle (0.9% saline) into both hindlimbs after 24 hours of water deprivation. DNase-I was injected intraperitoneally (50KU) every 12 hours after the first 2 doses: Immediately before (10KU) and after (50KU) glycerol injection. Control mice were injected with vehicle (PBS containing 0.15mg/mL CaCl<sub>2</sub>). Mice were sacrificed at the indicated time points after glycerol administration.

PAS staining, Picrosirius red staining, immunohistochemistry, immunofluorescence staining, TUNEL assay, BrdU assay, western blot, flow cytometry, RT-PCR, ELISA, and serum chemistry were used for *in vivo* experiments to elucidate renal function, tubular injury, fibrosis, inflammation, and cell death during RIAKI.

Mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were isolated from mouse femurs and tibias. BMDMs were cultured for 24 hours in the above medium containing lipopolysaccharide and IFN $\gamma$  for M1 polarization. Media containing IL-4, TGF $\beta$ , IL-10, or dexamethasone were used for 72-hour polarization of M2, respectively. Primary tubular epithelial cells of the mouse kidney (mTECs) and kidney resident macrophages (KRM) were isolated from WT and *Aim2*<sup>-/-</sup> mice. J774 mouse macrophage-like cells were obtained from the RIKEN gene bank.

We transfected the cells with poly(dA:dT) using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol. Live cell imaging, LDH assay, Western blotting, RT-PCR and ELISA were performed to verify cell death and inflammation.

### 3 研究成果

We found that DNase-I treatment decreased the serum levels of BUN and creatinine. In addition, the histological staining of DNase-I treated mice kidney showed tubular damage, the expression of KIM1 and F4/80 was reduced after glycerol injection.

After the effect of DNase-I was confirmed, *Aim2*<sup>-/-</sup> mice were injected with glycerol. Unexpectedly, *Aim2*<sup>-/-</sup> mice had a sustained increase in BUN levels, indicating delayed recovery from RIAKI. However, tubular injury as well as cell proliferation was similar between WT and *Aim2*<sup>-/-</sup> mice, *Aim2*<sup>-/-</sup> mice developed severe fibrosis with massive accumulation of CD206<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> macrophages compared to WT mice.

Of note, *Aim2*<sup>-/-</sup> kidney strikingly suppressed macrophage pyroptosis during RIAKI. The number of dead macrophages was counted less in the *Aim2*<sup>-/-</sup> kidney after glycerol injection by flow cytometry and TUNEL than in the kidney of WT mice. Western blotting showed that cleaved GSDMD (an executor of pyroptosis) was detected in WT mice, but it was reduced in *Aim2*<sup>-/-</sup> mice. In response to glycerol injection, ASC-citrine mice formed ASC speck in the cytoplasm of F4/80<sup>+</sup> cells in the kidney, indicating inflammasome activation in macrophages

during RIAKI. Instead of initiating pyroptosis, *Aim2*<sup>-/-</sup> macrophages employed TBK1/NF- $\kappa$ B pathway, resulting in increased TNF $\alpha$  and IFN $\beta$  production. In vitro experiments confirmed the survival of *Aim2*<sup>-/-</sup> macrophages and STING -TBK1/NF- $\kappa$ B activation after dsDNA treatment. A wide range of macrophages, including kidney-resident or bone marrow-derived, underwent pyroptosis detected by Western blot of cleaved caspase-1 and GSDMD without releasing IL-1 $\beta$  immediately after dsDNA treatment. In contrast, *Aim2*<sup>-/-</sup> macrophages did not produce pyroptosis-related proteins and instead stimulated more TBK1 phosphorylation and produced more TNF $\alpha$  and IFN $\beta$ . This cytokine release was completely inhibited by the inhibitor H151, STING. These results suggest that AIM2-dependent pyroptosis is immunosilent and critical for terminating inflammation and allowing normal healing after RIAKI. In contrast, deletion of *Aim2* inhibited macrophage removal and increased inflammation through STING, resulting in severe fibrosis and delayed healing.

#### 4 考察

Our main findings are as follows: 1) Since DNase I treatment improves tubular injury and inflammation; dsDNA may be a potential danger signal of RIAKI. 2) Deletion of *Aim2* resulted in prolonged injury and severe fibrosis after glycerol injection, suggesting that AIM2 plays a protective role in the later stage of RIAKI. 3) CD206+CXCR3+ macrophages were the major proinflammatory cells during RIAKI. 4) Pyroptosis clearly occurs in macrophages during RIAKI. 5) dsDNA induced pyroptosis without cytokine release in certain macrophages such as M0/M2 and kidney resident macrophages, in contrast, only M1 type inflammatory macrophages released cytokines after dsDNA treatment. 6) *Aim2* deficiency reduced pyroptosis and delayed macrophage elimination. 7) Instead of rapid elimination by pyroptosis, *Aim2*<sup>-/-</sup> macrophages used STING to increase inflammation. 8) Humoral factors released by *Aim2*<sup>-/-</sup> macrophages after dsDNA exposure prolonged the inflammatory response.

During RIAKI, extracellular dsDNA exacerbated the initial phase, because our data showed that DNase-I treatment significantly improved tubular injury and inflammation. Thus, AIM2 had a protective function during RIAKI. Further studies are needed to determine which dsDNA sensor triggers inflammation during the initial phase of RIAKI.

Previously, Lammert, C.R. et al. reported that AIM2-dependent cell death contributes to the clearance of damaged neurons during brain development. Similar to our study, this study shows that AIM2-dependent pyroptosis can be a homeostatic to eliminate redundant cells. To date, pyroptosis has been more prevalent in macrophages, and our study demonstrate the protective role of AIM2-dependent pyroptosis under pathological conditions.

Our data reveal an unexpected role of AIM2 pyroptosis in limiting inflammation prior to activation of the STING pathway. Similarly, previous studies have shown that cGAS- STING produces type I IFNs to combat pathogens in macrophages in the absence of *Aim2*. Our *in vivo* data showed direct TBK1 activation, TNF $\alpha$  and IFN $\beta$  production in the *Aim2*<sup>-/-</sup> kidney, indicating activation of STING. In addition, we found that CXCR3<sup>+</sup> macrophage infiltration in the *Aim2*<sup>-/-</sup> RIAKI kidney is likely regulated by the STING /CXCL10/CXCR3 axis. Our *in vitro* data clearly demonstrated the activation of STING in *Aim2*<sup>-/-</sup> macrophages after dsDNA stimulation. After dsDNA transfection, all WT macrophages (mBMDMs and KRM) initiated pyroptosis. M0, M2 polarized mBMDMs as well as KRM did not produce inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  after dsDNA treatment. *Aim2*<sup>-/-</sup> macrophages were resistant to dsDNA-induced cell death, but *Aim2*<sup>-/-</sup> macrophages activated STING and produced more inflammatory cytokines.

## 5 結論

Our study has revealed a new concept of immunoregulatory pyroptosis in macrophages, and AIM2 plays a crucial role in RIAKI. dsDNA and dsDNA sensors may be potential targets for the treatment of RIAKI.

In conclusion, we have demonstrated an unexpected role for AIM2-driven pyroptosis in curbing inflammation. Previously, macrophage pyroptosis was reported to be highly inflammatory and harmful in sterile inflammatory diseases, and many drugs to inhibit pyroptosis have been proposed for clinical use in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cardiovascular diseases, etc. Our results are the first study on 'homeostatic' pyroptosis in macrophages. We hope that our study will expand the insight of inflammasome research.

## 論文審査の結果の要旨

横紋筋融解症は、熱中症・外傷・薬剤など様々な要因による直接的・間接的な骨格筋の破壊によって発症する。本病態では骨格筋が破壊されることによりミオグロブリンやヘム鉄などに代表される danger-associated molecular patterns (DAMPs)と総称される分子群が血液中に大量に放出される。DAMPs は本来細胞内因性分子であるが、細胞傷害に伴い細胞外に出ることで炎症反応を引き起こす。腎臓は血流が豊富な臓器であり、糸球体濾過や尿細管での再吸収・分泌により、老廃物や余剰体液の尿中排泄、電解質・酸塩基平衡の調整を司っているため、横紋筋融解症の際に DAMPs による傷害を受けやすいことが知られている。横紋筋融解症に合併する腎障害の代表的な病態は DAMPs による急性腎障害である。また横紋筋融解症による急性腎障害が完全には回復せず、慢性腎臓病に移行することも報告されている。さらに近年、横紋筋融解症により骨格筋を

はじめとした破壊組織から血液中に放出される double-stranded DNA (ds-DNA) による組織傷害についても報告されている。細胞質に取り込まれた ds-DNA は plethora of pattern recognition receptors (PPRs)によって認識され、免疫反応・細胞死を誘導することが報告されている。

Absent in melanoma 2 (AIM2)は炎症反応を調整する細胞内タンパク質複合体であるインフラマソームの一種であり、PPR として ds-DNA を認識し無菌性炎症を惹起している。しかし横紋筋融解症に合併する急性腎障害における ds-DNA と AIM2 の役割については未だ明確ではない。そこで本研究で申請者は、AIM2 欠損マウスと野生型マウスにグリセオール投与により横紋筋融解症に合併する急性腎障害を誘導し、ds-DNA と AIM2 の役割について検討した。

その結果、

- 1) 野生型マウスで横紋筋融解症による急性腎障害（尿細管障害、炎症）が DNase-1 投与により軽快した。
- 2) AIM2 欠損マウスでは横紋筋融解症による急性腎障害（糸球体・尿細管障害）の程度は野生型マウスと同様であったが、急性腎障害からの回復の遅れと、腎で M2 type マクロファージの浸潤が多く認められ、急性腎障害から慢性腎臓病（腎線維化）への移行亢進を認めた。
- 3) 上記2)の機序として AIM2 欠損マウスでは腎でマクロファージが炎症性プログラム細胞死（パイロトーシス）に陥りにくいことが明らかになった。また *in vitro* の研究で AIM2 欠損マウス由来のマクロファージは ds-DNA で誘導されるパイロトーシスに抵抗性を示し、Stimulator of interferon genes (STING) シグナリング経路亢進を介した炎症性サイトカインを惹起することが明らかになった。

以上の結果から、AIM2 分子および ds-DNA の横紋筋融解に合併する急性腎障害における役割が明らかになった。本研究の研究目的は明確で、研究方法も妥当であり、新規性や独自性もある。また、横紋筋融解症における無菌性炎症のさらなる病態解明ならびに、AIM2 分子を標的にした新たな治療法にも繋がることから、審査員全員一致で博士論文に相応しいと評価した。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は、研究背景や目的、方法、結果、考察について、決められた時間内で説明した。その内容の骨子は「論文審査の結果」に記載したとおりである。なお、審査委員からなされた主な質問やコメントは以下の通りである。

- 1) 実験結果のサマリーを図にしてはどうか? >> 追記します。
- 2) 尿細管細胞に AIM2 は発現していないのか? >> AIM2 は発現していますが、その下流分子である IL-1 $\beta$  と Gasdermin D (GSDMD)は発現していません。
- 3) マクロファージの移動能について野生型マウスと AIM2 欠損マウスで差があるか? >> 本研究では検討していないので今後の課題とします。
- 4) 以前申請者の指導教官らが発表した NLRP3 インフラマソーム欠損マウスと異なる結果(NLRP3 インフラマソーム欠損マウスでは横紋筋融解症に合併する急性腎障害が軽減される) についてどう考えるか? >> 申請者の指導教官らは NLRP3 インフラマソームが尿細管・集合管で活性化し、アポトーシスに作用することを報告しています。今回の AIM2 インフラマソームは、主と

してマクロファージのパイロトーシス活性化であり、発現細胞と役割が異なるため結果が異なっていると考えます。

- 5) なぜ’silent’ pyroptosis というのか? >> 本研究では野生型でも AIM2 欠損マウスでも横紋筋融解症に合併する急性腎障害時に腎でマクロファージが IL-1 $\beta$  (炎症性サイトカイン) を放出することなく pyroptosis に陥っていたためです。
- 6) Figure 5C(ウエスタンブロット)の Ly と SN というのは何の略語か? 同時に Figure 5C で  $\beta$ -actin および他のたんぱく質発現が野生型マウスと AIM2 欠損マウス間、および各刺激における群間内比較においても極端に異なるのはなぜか? >> Ly は lysate の SN は serum の略です。本実験はパイロトーシスによって細胞内容物が流出することを検証する目的で行いました。この実験では、細胞数を揃えて刺激を加えています。Ly (細胞溶解液) のアクチンは減少し、SN (上清) にアクチン流出が認められます。細胞死によって大きなタンパク質が流出することが証明できました。
- 7) 腎への M2 マクロファージの subtype (a b, c) は確認したか? (Figure11) >> *in vivo* で M2a, b, c を細分類することは難しいため、M2 マクロファージの多くでマーカーとできるアルギナーゼ 1 と CD206 の発現を確認しました。
- 8) いくつかの Figure で代表的な写真 (免疫染色、蛍光免疫染色) と定量化したグラフに乖離が認められるので代表的な写真の妥当性を考察して下さい。>>再考察します。
- 9) ds-DNA 刺激により Cxcl10 と TNF- $\alpha$  が AIM2 欠損マウス由来のマクロファージで野生型より強く誘導されるのはなぜか? (Figure24) 本結果から AIM2 より cGAS が ds-DNA を認識する主体を担っていることにはならないのか? >> 導入する DNA 量が少なければ cGAS, 多ければ AIM2 に結合しやすいという説が提唱されていますが、今後自分たちでも検討していきたいと思います。
- 10) ウエスタンブロット (Figure21 と Figure22) で Gsdmd の発現を 1 枚のパネルで示しているが、Figure17 では 2 枚のパネルで示されている、さらに FT-Gsdmd と NT-Gsdmd でのバックグラウンドが違うように見えるのはなぜか? >> Gsdmd の抗体ではバックグラウンドが高かったため、NT-GSDMD に対する異なる抗体を用いました。そのため別のパネルで示しています。
- 11) 同様にウエスタンブロット (Figure21 と 22) では FL-Gsdmd は 1 本のバンドで示しているが、Figure17 と Figure19 では FL-Gsdmd は 2 本のバンドをしめしているがこの理由は? >> ご指摘のように Figure17 と Figure19 では FL-Gsdmd は 2 本のバンドで検出されていますが、両者とも AIM2 ノックアウトで消失することを確認しています。Gsdmd は様々なプロテアーゼ (caspase-1 以外にも caspase-3) によって異なる部位で切断されるため、NT-Gsdmd の 2 本バンドが見られることも考えられます。
- 12) 指導教官らが過去に報告した AIM2 ノックアウトマウスを使用した片側尿管結紮で誘導した腎線維化モデルでは AIM2 ノックアウトマウスの腎でコラーゲン (collagen type of I and III) 分子増加を伴う線維化の程度が野生型より軽度であったことを報告しているが、本研究結果となぜ異なるのか? >> 片側尿管結紮で慢性的に誘導した腎線維化と横紋筋融解に合併した急性腎障害に続発した慢性腎臓病 (腎線維化) では発症機序が異なるためと考えます。
- 13) Figure7 にクレアチニン値のグラフを追加して下さい。>>追加します。
- 14) AIM2 欠損マウスで横紋筋融解症による急性腎障害を誘導した際に糸球体と尿細管には野生型

マウスと比較でその障害程度に変化が認められなかったと記載がある。これらの形態に変化がなかったのにも関わらず、血清クレアチニン値は AIM2 ノックアウトマウスで急性腎障害後も上昇している (Day3, Day7) のはどのような機序によるものと考えられるか? >> 間質の炎症細胞浸潤および線維化が、傍尿細管毛細血管などの損傷を惹起した可能性や、炎症自体による尿細管の機能低下が腎機能悪化に関与していると考えます。

15) 横紋筋融解による急性腎障害における腎でのマクロファージの pyroptosis の検討 (Figure16) で Day6 や day7 時の data はどうだったのか>> Day7 まで確認していますが、野生型マウスと AIM2 欠損マウスでのマクロファージの pyroptosis の差は一過性であり、day7 では差がなくなりました。

16) Figure 24 の Legends の typo を修正して下さい。>>修正します。

以上申請者は、ほぼほとんどの質問に対して的確に返答した。一部の質問に関しては、検討されていない、あるいはこれから検討予定とのことで、申請者の仮説を交えることで適切に答えることができた。また、提出された学位論文では、一部の指摘事項について、適切に修正かつ加筆された。

以上の発表および質疑応答から、申請者が十分な資質と能力を有していることが明らかになり、審査委員全員一致で合格と判断された。