

慢性腎臓病と腎老化におけるマクロファージ鉄ストレス制御の役割解明と治療応用への展開

代表研究者 徳島大学大学院医歯薬学研究部薬理学分野 教授 池田 康将
共同研究者 徳島大学大学院医歯薬学研究部薬理学分野 准教授 船本 雅文

【抄録】

腎臓病の発症・進展における「鉄」の重要性が指摘されている。マクロファージは鉄代謝が活発な細胞で、炎症性 M1 極性では鉄保持蛋白 H-ferritin(FTH)と細胞内鉄量が増加する。過去の研究で、マクロファージ特異的 FTH 欠損マウス (FTHKO) では鉄量が低下し、肥満糖尿病モデルの炎症が改善されることが示された。本研究では、FTHKO マウスを用い、葉酸誘発性腎障害モデルにおけるマクロファージ鉄の役割を検討した。14 日目 (慢性期) で FTHKO マウスは WT と比べ腎障害や線維化が軽度で、炎症や老化遺伝子の増加も抑制された。また、2 日目 (急性期) でも腎障害や酸化ストレスが抑制された。トランスクリプトーム解析では、FTHKO で抗酸化経路が増加し、炎症・老化経路が低下していた。これらの結果から、マクロファージ鉄の減少が腎病態の抑制に寄与し、腎臓病の新たな治療標的となる可能性が示唆された。

1. 研究の目的

1-1 腎臓病と鉄

高齢化社会に伴って慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) は本邦を含めて世界的に増加しているものの根本的な予防法・治療法は無く、その病態解明と治療法開発は喫緊の課題である。申請者は、各種の腎臓病モデルを用いた解析から、鉄除去による炎症・酸化ストレス抑制を介した腎臓病の改善効果を報告してきた¹⁻⁴⁾。よって、鉄は腎臓病の増悪因子かつ治療標的であるが、従来の非特異的鉄除去では貧血が必発のため現実に治療応用は困難であった。

1-2 マクロファージ鉄ストレス

我々は、病態下で鉄が問題となっている組織・細胞を特定するため、鉄代謝が盛んなマクロファージに着目した。マクロファージ極性は、鉄保持タンパク H-フェリチン (FTH) と細胞内鉄量で規定される。炎症性 M1 では FTH 発現増加と鉄蓄積を呈することから、マクロファージ特異的 FTH 欠損マウス (FTHKO) を作成・解析した。その結果、鉄依存性の炎症・酸化ストレスはマクロファージ由来であることを明らかにした⁵⁾。現在マクロファージのみ特異的に鉄量減少を示すモデル動物は現在この遺伝子改変マウスのみであり、マクロファージにおける鉄の役割解析には不可欠である。

1-3 CKD とマクロファージ鉄ストレス

CKD において、炎症は線維化と連関して病態の悪循環を形成して腎老化促進することで病態をさらに進行させる⁶⁾。よって、マクロファージの鉄ストレス制御は炎症-線維化-老化を介して CKD の病態に関与している可能性がある。本研究では、CKD における腎老化に対するマクロファージ鉄の役割について明らかにする病態解明研究と、次世代シーケンス網羅的解析による鉄代謝変容に関わる新規標的因子を同定する探索的研究によって、から、鉄代謝制御による CKD 克服につながる基礎知見の集積を目的とした。

2. 研究方法と経過

2-1 腎障害におけるマクロファージ鉄ストレスの役割解析

Lysosome M (LysM)-Cre マウスと *Fth*-floxed マウスを交配させてマクロファージで *Fth* 遺伝子を欠失するコンディショナルノックアウト (KO) マウスを作成した。FTHKO マウスはマクロファージ鉄量が野生型 (WT) の半分である。葉酸 (250mg/kg) を腹腔内に一回投与して腎障害を誘発し、投与後 2 日目 (48 時間) を Acute Kidney Injury (AKI) 期、投与後 14 日目を CKD 期としてサンプリングを行い、比較検討した。

解析項目

① 体重と腎重量の検討：サンプリング前に体

重を測定し、腎臓を摘出後、左右の腎重量を測定した。

② 腎機能の検討：採血後遠心して得られた血漿を用いて、BUN とクレアチニンを測定した。

③ 病理組織の検討：腎臓の HE 染色で腎尿細管障害の程度をスコア化した。

④ 臓器鉄量変化と鉄代謝関連遺伝子の検討：腎組織の鉄染色 (Perls/DAB)、ならびに腎鉄量をフェロジン法で測定した。鉄保持タンパクであるフェリチンの発現を調べた。

⑤ 炎症性サイトカインとマクロファージ浸潤の解析：腎組織の炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR で調べた。また、腎臓へのマクロファージ浸潤は F4/80 免疫組織化学と F4/80, Cd68 の遺伝子発現で評価した。

⑥ 酸化ストレス評価：脂質過酸化である 4-hydroxynonenal(HNE)発現をウェスタンブロットで調べた。

⑦ 線維化の評価：ピクロシリウスレッド染色で線維化の程度を評価した。また、線維化関連遺伝子 (Tgfb1, Col1a1) やタンパク質 (TGF- β 1, α SMA) の発現をリアルタイム PCR とウェスタンブロットでそれぞれ調べた。

⑧ 腎老化の評価：老化マーカーである細胞周期因子 p53, p21, Klotho 発現をリアルタイム PCR で調べた。

2-2 急性期腎障害における病態評価

今回用いた腎障害モデルは誘導直後に急性腎障害 (Acute Kidney Injury:AKI) を発症し、その後不完全な修復機転により CKD を呈する AKI to CKD transition モデルである。CKD に加えて AKI に対するマクロファージ鉄ストレスの影響も調べた。

2-3 鉄ストレス標的因子の探索

マウス腹腔内から採取したマクロファージを用いて RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、WT マウスと KO マウスの変動遺伝子群についてエンリッチメント解析を行った。同様に、正常腎と障害腎を用いて RNA-seq 解析を行い、エンリッチメント解析を行った。

3. 研究の成果

3-1 CKD モデルにおけるマクロファージ鉄ストレスの解析

① 体重について、葉酸投与後 14 日目の CKD 期において 4 群間で差を認めなかったが、腎重量については CKD の WT と KO マウスで低値であった (表 1)。

② CKD WT マウスにおける腎機能低下 (BUN, クレアチニン) は、FTHKO マウスで軽度であった (表 1)。

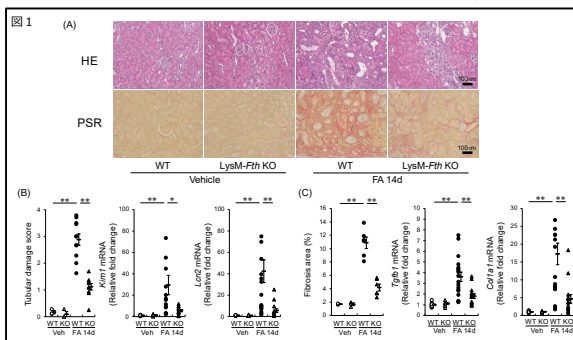
	Vehicle		FA 14d	
	WT	LysM-Cre Fth KO	WT	LysM-Cre Fth KO
Initial body weight (g)	22.5 ± 0.3	22.3 ± 0.5	22.2 ± 0.5	22.3 ± 0.2
Last body weight (g)	25.3 ± 0.4	25.3 ± 0.5	22.5 ± 1.0	24.7 ± 0.3
Right kidney weight (mg)	136 ± 3	134 ± 4	126 ± 5	124 ± 2**
Left kidney weight (mg)	135 ± 5	130 ± 3	114 ± 4 ^a	118 ± 1 ^a
RKW/BW	5.4 ± 0.1	5.3 ± 0.1	5.8 ± 0.2	5.0 ± 0.1 ^{††}
LKW/BW	5.3 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.3 ± 0.2 ^{†††}	4.8 ± 0.2 ^a
BUN (mg/dl)	23.6 ± 1.1	20.4 ± 0.5	62.6 ± 10.8 ^{***}	28.1 ± 1.8 ^{***††}
Creatinine (mg/dl)	0.09 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.26 ± 0.04 ^{***}	0.11 ± 0.01 ^{††}

Data represent mean ± SEM; n = 11-15; *P < 0.05, **P < 0.01 vs. WT-vehicle; ^aP < 0.05, [†]P < 0.01 vs. LysM-Fth KO-vehicle; ^{††}P < 0.05, ^{†††}P < 0.01 vs. WT-FA 14d

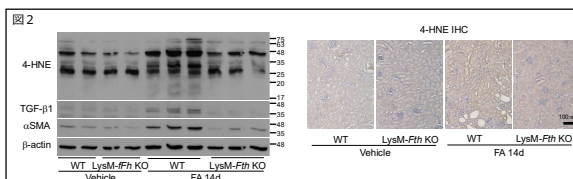
③ WT マウス CKD 腎における病理組織における腎尿細管障害や線維化は、FTHKO マウスで軽度であった (図 1A)。

④ 鉄保持タンパク FTH と FTL のタンパク発現は WT の CKD 腎で増加し FTHKO マウスでは抑制された。しかし、鉄染色性は CKD 腎で減少しており、WT マウス、FTHKO マウスともに差を認めなかった。

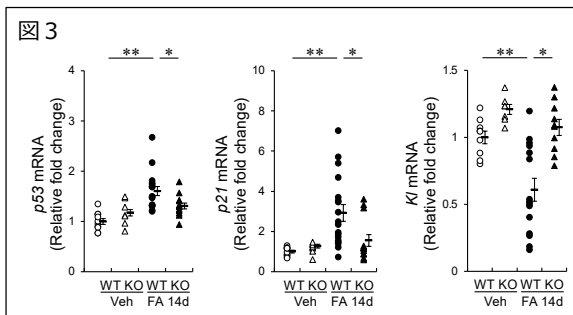
⑤CKD 腎において、WT マウスでは腎障害関連遺伝子 (*Kim1*, *Lcn2*) 炎症性サイトカイン (*Tnfa*, *Mcp1*, *Il6*)、線維化関連遺伝子 (*Tgfb1*, *Col1a1*) の発現は増加したが、FTHKO マウスではその程度は軽度であった (図 1B, C)。



⑥ WT マウスの CKD 腎での線維化 (TGF- β 1, α SMA)、過酸化脂質 (4-HNE) のタンパク発現増加は FTHKO マウスで抑制された (図 2)。



⑦ 免疫組織化学における WT マウスの CKD 腎へのマクロファージ浸潤増加は FTHKO マウスでは抑制されており、F4/80, Cd68 それぞ



れの遺伝子発現の変化も同様であった。

⑧ WT マウスの CKD 腎での老化遺伝子の *p53* と *p21* の発現増加、*Klotho* 発現低下は FTHKO マウスで抑制された (図 3)。

3-2 AKI モデルにおけるマクロファージ鉄ストレスの解析

① AKI では、WT マウスで体重の減少、腎重量の増加が認められたが、FTHKO マウスではそれらの変化は抑制されていた。

② CKD と同様に、AKI モデルにおける WT マウス病理組織の腎尿細管障害、腎機能低下 (BUN, クレアチニン) は、FTHKO マウスでは軽度であった。

③ AKI 腎での腎障害関連遺伝子 (*Kim1*, *Lcn2*) 炎症性サイトカイン (*Tnfa*, *Mcp1*, *Il6*) の発現増加は、FTHKO マウスで軽度であった。

④ AKI 腎では免疫組織化学でのマクロファージ浸潤は増加したが、WT マウス、FTHKO マウスで差は認めなかった。*Cd68* 遺伝子の発現は WT マウスの AKI 腎で増加したが、FTHKO マウスでは抑制された。

⑥ 全腎臓鉄量は AKI 腎臓で減少していたが WT と FTHKO で差を認めなかった。また DAB-Perl 染色でも同様の結果であった。

⑦ AKI 腎での過酸化脂質 (4-HNE) の増加は FTHKO マウスで抑制されたが、アポトーシス関連タンパク (cleaved caspase-3) の増加は差を認めなかった。

⑧ 腎臓における老化関連遺伝子について、*p53* と *p21* 発現増加、*Klotho* 発現低下は FTHKO マウスで抑制された。

3-2 マクロファージのトランスクリプトーム解析

マウス腹腔内から採取したマクロファージを用いて RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。両者間の変動遺伝子 (FC>2, p<0.05) 269 遺伝子について、エンリッチメント解析を行った。結果、FTHKO において NRF2 依存性抗酸化経路の遺伝子群の増加、ならびに炎症反応や老化に含まれる遺伝子群の減少を認めた。

3-3 バルク腎臓トランスクリプトーム解析

WT マウス、KO マウスのコントロール腎臓、

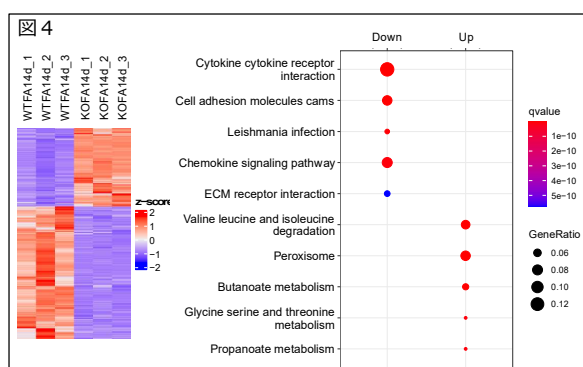
AKI 腎臓、CKD 腎臓を用いて RNAseq の変動遺伝子 (FC>2, p<0.05) の解析を行った。Multi DEG 解析の k-means clustering の 1300 遺伝子について、クラスター 4 (CKD 期) 遺伝子数が最も多かったため、CKD の DEG を使用してエンリッチメント解析を行った。その結果、増加遺伝子にアミノ酸代謝に関連する遺伝子群が、減少遺伝子に炎症・接着・細胞外基質に関連する遺伝子群が多く含まれていた (図 4)。

4. 今後の課題

葉酸投与後 14 日目の CKD 期では、WT マウスでみられた腎機能悪化、尿細管障害は FTHKO マウスで軽減していた。また、腎障害や線維化マーカーの遺伝子発現の増加と酸化ストレスが FTHKO マウスでは抑制されていた。マクロファージ特異的 FTHKO マウスでは、肥満糖尿病モデルにおいて脂肪組織の炎症、酸化ストレスが抑制されること、培養マクロファージ細胞の *Fth* ノックアウトにより LPS で誘導される炎症性サイトカイン増加は減弱することに加え、細胞内鉄量は減少する⁵⁾。これは、M1 極性が減弱することで、FTHKO マウスで CKD の病態が軽減する表現型に影響した可能性がある。

また、炎症と酸化ストレスは線維化を促進する。FTHKO マウスでは、腎臓線維化の程度が軽度であり、線維化関連遺伝子やタンパク質の発現も抑制されていた。CKD の FTHKO マウスでは、TGF-β1 発現と筋線維芽細胞マーカー αSMA 発現が抑制されていた。これはマクロファージ由来の炎症と酸化ストレスである鉄ストレスが抑制を介して線維化経路が促進されず、CKD 表現型の線維化の減弱につながった可能性がある。

腎老化マーカーについて、AKI と CKD モデルの両方において、WT マウスでは *p53* と *p21* の発現増加、*Kl* の発現低下がみられたが、それらの変化は FTHKO マウスでは軽度であった。炎症と酸化ストレスは両者ともに老化促進因子である。また CKD において、慢性炎症とともに腎臓線維化は基盤病態であり、老化細胞が老化関連性分泌表現型 (SASP) の分泌によって、さらなる線維化を促進する⁷⁾。また、老化細胞や SASP は、マクロファージをリクルートして活性化すること、マクロファージに老化を誘導してマクロファージの極性化に影響するなど、老化細胞とマクロファージは相互作用して共通の表現型も持つようになる。前述した通り、FTHKO マウスのマクロファージは炎



症性サイトカインの発現とマクロファージ浸潤が減弱しており、老化が誘導されず線維化の抑制につながっているかもしれない。今後、腎臓からマクロファージを単離してさらなる検討が必要である。

近年、AKI to CKD transition という概念が提唱されている。これは、AKI 後、完全に回復したようにみえても、実際は尿細管障害の修復は不十分なため、長期観察すると CKD へ移行する。本研究では、AKI も FTHKO マウスで抑制され、酸化ストレスや炎症も軽度であったことから、CKD の軽減につながった可能性がある。また、AKI における老化マーカーの発現も FTHKO マウスでは抑制されていたことも、CKD 進展の抑制につながったと考えられる。

腎臓マクロファージ単離を試みたものの条件検討に時間を要したため、先にマウス腹腔内マクロファージを用いて、RNA-seq による WT マウスと KO マウスの変動遺伝子群のエンリッチメント解析を行った。FTHKO マウスでは抗酸化経路にアノテーションされた遺伝子群の増加と炎症反応や老化にアノテーションされた遺伝子群の減少を認めた。またバルク腎臓の RNA-seq 変動遺伝子群のエンリッチメント解析では、減少遺伝子には炎症や細胞外基質の関連遺伝子群が多く、CKD の表現型との一致を確認できた。以上より、マクロファージ鉄ストレスは、細胞老化に伴う炎症性タンパク質の分泌現象に関与する可能性があり、腎臓微小環境周に影響して老化を促進することが示唆された。これらはマクロファージ鉄ストレスの抑制（鉄量減少）により、腎障害による腎老化を改善できるという仮説を支持している。

腎臓からのマクロファージ単離に難渋し、当初の予定であった単離マクロファージの RNA-seq 解析まで至ることが出来なかった。現在、単離方法を確立できたため、正常腎、疾患腎から単離したマクロファージを使用してトランスクリプトーム網羅的解析を行い、バルク腎臓の解析結果と比較検討し、鉄ストレス標的遺伝子を探索の予定である。

5. 研究成果の公表方法

日本薬理学会など全国学会での発表、ならびに論文にまとめて海外英文誌への投稿を予定している。

参考文献

1. Ikeda Y, Enomoto H, Tajima S, et al. Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304(7):F1028-F1036.
2. Ikeda Y, Ozono I, Tajima S, et al. Iron chelation by deferoxamine prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *PLoS One*. 2014;9(2):e89355.
3. Ikeda Y, Horinouchi Y, Hamano H, et al. Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-11089-0
4. Ikeda Y, Hamano H, Horinouchi Y, et al. Role of ferroptosis in cisplatin-induced acute nephrotoxicity in mice. *J Trace Elem Med Biol*. 2021;67(126798):126798.
5. Ikeda Y, Watanabe H, Shiuchi T, et al. Deletion of H-ferritin in macrophages alleviates obesity and diabetes induced by high-fat diet in mice. *Diabetologia*. 2020;63(8):1588-1602.
6. Cao Q, Harris DCH, Wang Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiology (Bethesda)*. 2015;30(3):183-194.
7. Xu J, Zhou L, Liu Y. Cellular senescence in kidney fibrosis: Pathologic significance and therapeutic strategies. *Front Pharmacol*. 2020;11:601325.

以上

Investigation of macrophage iron stress in chronic kidney disease and renal senescence and development for a therapeutic strategy

Primary Researcher: Yasumasa Ikeda
Professor, Tokushima University
Co-researchers: Masafumi Funamoto
Associate professor, Tokushima University

The importance of iron in the development and progression of kidney disease has been increasingly indicated. Macrophages are cells with active iron metabolism, and inflammatory M1 polarization is associated with increased H-ferritin (FTH) expression and intracellular iron content. Our previous study has demonstrated that macrophage-specific FTH knockout (FTHKO) mice, characterized by reduced iron levels, showed ameliorated inflammation in obesity-related diabetes models. In this study, we investigated the role of macrophage iron in folate-induced kidney injury using FTHKO mice. At day 14 (chronic phase), FTHKO mice exhibited significantly reduced kidney damage and fibrosis compared to wild-type (WT) controls, accompanied by suppressed expression of inflammatory and senescence-related genes. Similarly, at day 2 (acute phase), both kidney injury and oxidative stress were attenuated in FTHKO mice. Transcriptome analysis revealed the upregulation of antioxidant pathways and downregulation of inflammatory and senescence pathways in FTHKO mice. These findings suggest that reducing macrophage iron content may contribute to the suppression of renal pathology, potentially representing a novel therapeutic target for kidney disease.