

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09243

研究課題名(和文)腎障害進展における腎樹状細胞の関与の検討

研究課題名(英文)Analysis of the Role of Renal Dendritic Cells in the Progression of Renal Injury

研究代表者

廣村 桂樹(Hiromura, Keiju)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70292597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CD11c 特異的Shp1欠損マウス(Shp1-CKOマウス)は増殖性糸球体腎炎とともに尿細管間質性腎炎を発症する。腎臓内の免疫炎症細胞についてフローサイトメトリーを用いて詳細な解析を行ったところ、樹状細胞とマクロファージの両者のマーカーを有するCD11c+F4/80+のダブルポジティブな腎単核食細胞の活性化ならびに増加がみられ、Th1細胞の集簇を引き起こすとともに、腎単核食細胞が腎線維化に直接的に関与する可能性が示された。本研究では腎単核食細胞を介した腎尿細管間質障害・腎線維化の障害機序について示すとともに、Shp1が腎単核食細胞の制御に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CD11c-specific Shp-1 deficient mice (Shp1-CKO mice) spontaneously develop tubulointerstitial nephritis together with proliferative glomerulonephritis. In this study, we further examined the details of intrarenal immune-inflammatory cells in the kidney using flow cytometric analysis. CD11c (dendritic cell marker) and F4/80 (macrophage marker) double-positive renal mononuclear phagocytes were activated and increased in the kidney of Shp1-CKO mice. These renal mononuclear phagocytes are considered to induce accumulation of Th1 cells and possibly directly be involved in renal fibrosis. Our study showed that the mechanisms of tubulointerstitial injury and fibrosis via renal mononuclear phagocytes. In addition, Shp1 would play an important role in regulation of renal mononuclear phagocytes.

研究分野：腎臓病学

キーワード：腎臓病 尿細管間質性腎炎 樹状細胞 腎不全 腎単核食細胞

## 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は自然免疫とともに獲得免疫にも関与する細胞である。強い抗原提示能を有し外来抗原に対して免疫応答を引き起こし、一方で自己抗原に対しては免疫寛容を誘導する。樹状細胞の研究は近年めざましく進歩し、ヒトやマウスでのサブセットとそれぞれの機能が明らかにされ、また強力な抗原提示機能を利用した悪性腫瘍に対する免疫療法も開発されつつある。

健常な腎臓においても樹状細胞が尿細管間質に多数存在することが明らかにされ、尿路感染などに対する自然免疫だけでなく、尿細管間質障害の進行に炎症、免疫の両面から関与する可能性が報告されつつある (Kitching A. et. al. *Nephrol Dial Transplant*, 29:2185-2193, 2014)。

我々は群馬大学生体調節研究所の的崎尚博士 (現在、神戸大学 シグナル統合学分野) との共同研究で、CD11c-Cre マウスと Shp1-lox P マウスの交配で作成した樹状細胞特異的 Shp1 欠損マウス (Shp1-CKO マウス) は、36-40 週齢になると抗 dsDNA 抗体産生がみられ、抗核抗体、抗 dsDNA 抗体が陽性となり、肺臓炎ならびに増殖性腎炎をきたし、全身性エリテマトーデス (SLE) 様の病態を自然発症することをみだし報告した (Kaneko-T. *J Immunol*, 188:5397, 2012)。

Shp1 は免疫、血球系細胞に特異的に発現しているチロシン脱リン酸化酵素である。受容体型チロシンキナーゼが刺激を受け、細胞質領域のチロシン残基がリン酸化されると、不活性型の Shp1 が活性化し、その下流の分子を脱リン酸化することで、免疫、血球系細胞の増殖、分化、活性化に対して抑制的に働く。よって Shp1-CKO マウスでは、Shp1 が欠損していることで、樹状細胞がより活性化されやすい状態となり、そのため免疫寛容が破綻し、肺臓炎、腎炎が生じるものと考えている。

## 2. 研究の目的

Shp1-CKO マウスを用いて、樹状細胞の活性化による腎系球体ならびに尿細管間質障害の機序について、腎樹状細胞のサブセットやマクロファージ、T 細胞との関連などに着目してその詳細を解析する

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

CD11c-Cre マウスと Shp1-lox P (Ptpn<sup>fl/fl</sup>) マウスを交配し CD11c 特異的 Shp1 欠損マウスを作成し、群馬大学生物資源センターの SPF 環境下で飼育し、自然発症として生じる腎障害について検討を行った。Ptpn<sup>fl/fl</sup> マウスをコントロールマウスとして使用した。マウスは蓄尿ゲージを用いて 24 時間蓄尿を行い尿量や尿中アルブミン排泄について検討を行い、また採血を行い血清 Cr 等の検討を行った。腎臓の検討においては、

屠殺後腎臓を取り出し、光学顕微鏡、免疫組織染色、ならびにフローサイトメトリー解析を行った。動物実験、遺伝子組換え実験においては、群馬大学の動物実験倫理審査と遺伝子組換え実験審査で承認を得た上で施行した。

### (2) 組織学的検討

得られた腎臓についてパラフィン固定を行い、PAS 染色、Masson Trichrome 染色、Sirius Red 染色等を行い、通常の光学顕微鏡を用いての観察を行うと共に、各種抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。また新鮮凍結組織よりクリオスタットで薄切標本を作製し、蛍光抗体法での検討を行った。電子顕微鏡を用いての検討も施行した。

### (3) フローサイトメトリー

腎臓内の免疫・炎症細胞を詳細に検討するため、コラゲナーゼ処理をした腎臓を用いて、フローサイトメトリー解析を行った。さらに各細胞のサイトカイン産生の検討を行うため、各細胞を刺激し細胞内の各サイトカイン発現についてフローサイトメトリー解析を施行。また vimentin、 $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) などの細胞内蛋白の染色・解析もフローサイトメーターを用いて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 腎機能、尿所見

40 週齢以降の Shp1-CKO は尿中 Na 排泄の増加を伴う多尿を認め、60 週齢では腎機能の低下を認めた。飲水制限下においても多尿は抑制されず、腎性の多尿と考えられた。尿中アルブミンについては、60 週齢まで Shp1-CKO とコントロールマウスとの間で有意な差はみられなかった。

### (2) 組織学的検討

光学顕微鏡による観察では、8 週齢の Shp1-CKO マウスでは、コントロールマウスと比べて有意な形態学的な変化は認めなかった。しかし 40 週齢以降マウスにおいては、増殖性糸球体腎炎と尿細管間質性腎炎を認めた。蛍光抗体法の検討 8 週齢マウスでは免疫グロブリン、補体の沈着を認めなかったが、40 週齢のマウスでは糸球体内に IgG、C3 の沈着を認めた。しかし尿細管間質においては免疫グロブリン、補体の沈着は認めなかった。

免疫組織染色では糸球体と尿細管間質への CD11c<sup>+</sup>細胞の高度な集積と、尿細管間質への F4/80<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>T 細胞の高度な集積を認めた。このほか CD8<sup>+</sup>T 細胞、B220<sup>+</sup>B 細胞も程度は軽いものの 40 週齢の Shp1-CKO マウスでは陽性細胞の浸潤がみられた。

電子顕微鏡的検討では、メサンギウム細胞増加やメサンギウム領域での免疫複合体と思われる electron dense な物質の沈着を認めしたが、糸球体基底膜、上皮、内皮下への沈着はみられなかった。また糸球体上皮細胞の

足突起は保たれていた。

(3) 腎内細胞のフローサイトメトリーによる同定

腎臓内の免疫・炎症細胞についてフローサイトメトリーを用いて、10 週齢、20 週齢、40 週齢のマウスを用いて検討を行った。20 週齢までは Shp1-CKO マウスとコントロールマウスで有意差がみられなかったが、40 週齢マウスでは、免疫組織染色とほぼ一致して、CD11c、F4/80、CD4、CD8、B220 陽性の各細胞群の増加がみられた。

さらに腎臓内の細胞についてマルチカラーフローサイトメトリーにより、その詳細を検討すると、40 週齢の Shp1-CKO マウスでは、CD11c、F4/80 とともに陽性となる CD11c<sup>int</sup>F4/80<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> が増加していることがわかった。

(4) 腎単核食細胞に関する検討

近年腎臓内の樹状細胞/マクロファージ系は、従来の樹状細胞マーカーである CD11c とマクロファージマーカーである CD11b、F4/80 を合わせ持つ集団が主流であることが判明し、腎単核食細胞 (renal mononuclear phagocytes, rMoPh) と呼ばれている。そこで、40 週齢の Shp1-CKO マウスで増加がみられた CD11c<sup>int</sup>F4/80<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> (以降 F4/80<sup>+</sup> rMoPh と記載) についてさらに検討を行った。

Shp1-CKO マウスの F4/80<sup>+</sup>rMoPh はコントロールマウスに比べ CX3CR1、CCR5 の発現上昇と MHC class の発現低下を認めた。さらに細胞増殖マーカーで Ki67 陽性の F4/80<sup>+</sup>rMoPh の有意な増加がみられ、腎臓内でこれらの細胞が増殖する可能性が示唆された。

また F4/80<sup>+</sup>rMoPh のサイトカイン産生能を検討すると、Shp1-CKO マウスでは TNF、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生亢進を認めた。

F4/80<sup>+</sup>rMoPh は CD11c も共発現する細胞であり、CD11c プロモータ - を利用した本マウスでは Shp1 が欠損することが想定される。F4/80<sup>+</sup>rMoPh における Shp1 のフローサイトメトリーで解析すると、多くの細胞で Shp1 が欠損していることが確認できた。

(5) 腎内 T 細胞に関する検討

40 週齢の Shp1-CKO マウスでは CD4<sup>+</sup>T 細胞の浸潤が多数みられたことより、T 細胞についても詳細な検討を行った。Shp1-CKO 腎の CD4<sup>+</sup>T 細胞は CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> のメモリータイプが主体であり、早期活性化マーカーである CD69 の発現が上昇していた。これらは IFN、IL2、TNF 産生細胞が主体であり Th1 細胞と考えられた。

(6) 腎線維化に関する検討

Masson Trichrome 染色 Sirius Red 染色で

腎線維化の評価を行ったところ、40 週齢の Shp1-CKO マウスでは、線維化領域の増加を認めた。腎臓内の細胞に対してフローサイトメトリー解析を施行したところ、F4/80<sup>+</sup>rMoPh において間葉系マーカーの vimentin が多くの細胞で陽性となり、筋線維芽細胞マーカーである SMA が一部の細胞で発現していた。

(5) 考察

今回の検討では、CD11c<sup>+</sup> プロモータを利用して Shp1 を特異的に欠損させたマウスにおいて、増殖性糸球体腎炎ならびに尿細管間質性腎炎が自然発症することを示した。糸球体病変については、メサンギウム病変が主体であり、またアルブミン尿もみられず、電子顕微鏡による観察でも係蹄壁の変化はほとんどみられなかった。

一方、本マウスでは加齢により多尿、腎不全を生じたが、尿細管間質障害の関与が考えられた。蛍光抗体染色では糸球体には免疫グロブリン、補体の沈着がみられるものの尿細管間質には認めず、各種細胞浸潤がみられたことより、主に細胞性免疫を介した障害と考えられる。フローサイトメトリー解析による詳細な検討を行ったところ、F4/80<sup>+</sup>rMoPh が尿細管間質障害の病変の形成に強く関与しているものと考えられた。

Shp1 の欠損により、F4/80<sup>+</sup>rMoPh の活性化が生じ、炎症性細胞としてケモカイン受容体や炎症性サイトカインの発現が増加するとともに、自ら増殖することで、病変を形成するものと思われる。さらに F4/80<sup>+</sup>rMoPh 自身が筋線維芽細胞への形質転換を起こし、腎線維化に直接的に関与している可能性が示唆された。また病変形成には、F4/80<sup>+</sup>rMoPh に加えて、Th1 細胞を主体とする T 細胞の関与も示された。活性化 F4/80<sup>+</sup>rMoPh からのケモカインやサイトカインにより Th1 細胞が集簇し、尿細管間質障害に関与しているのではないかと考えている。

(6) 結論

Shp1-CKO マウスの腎尿細管間質障害において、F4/80<sup>+</sup>rMoPh の腎単核食細胞が重要な役割を果たし、Th1 細胞の集簇を引き起こすとともに、線維化にも直接的に関与する可能性が示された。

腎尿細管間質障害・腎線維化は末期腎不全への進展においてほぼ共通してみられる重要な悪化因子である。本研究において腎単核食細胞を介した腎尿細管間質障害・腎線維化の障害機序の一端を明らかにすることができた。

現在論文作成中である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. 廣村 桂樹, 渡辺 光治. 樹状細胞の制御異常による腎炎自然発症マウス. 医学のあゆみ、査読無、262(2)17494-17495

[学会発表](計6件)

1. Watanabe M, Hiomura K, Kaneko Y, Kinoshita M, Ohishi Y, Sakairi T, Ikeuchi H, Maeshima A, Ohnishi H, Matozaki T, Nojima Y. Dendritic Cell-Specific Shp-1-Knockout Mice Spontaneously Develop Unique Glomerulo- and Tubulointerstitial Nephritis. 第48回米国腎臓学会議 2015.11.3-8. サンディエゴ 米国.
2. Watanabe M, Kaneko Y, Hiomura K, Kinoshita M, Ohishi Y, Kinoshita M, Saito Y, Ohnishi H, Matozaki T, Nojima Y. Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp-1 induces autoimmune nephritis characterized by infiltration of dendritic cell and Th1 cell. 2015.11.18-20. 第44回日本免疫学会 札幌
3. 渡辺 光治, 廣村 桂樹, 金子 和光, 木下 雅人, 大石 裕子, 坂入 徹, 池内 秀和, 前嶋 明人, 大西 浩史, 的崎 尚, 野島 美久. 樹状細胞特異的 Shp1 欠損マウスにおける自己免疫性腎炎の解析: 第2報 第59回 日本腎臓学会総会 2016.6.17-19 横浜
4. 渡辺 光治. 樹状細胞特異的 Shp1 欠損マウスにおける自己免疫性腎炎の解析. 第7回分子腎臓フォーラム 2016.9.3 東京
5. Watanabe M, Hiomura K, Kaneko Y, Ohishi Y, Kinoshita M, Sakairi T, Ikeuchi H, Maeshima A, Ohnishi H, Matozaki T, Nojima Y. Accumulation of Dysregulated Renal Mononuclear Phagocytes (rMoPh) and Th1 Cells in the Kidney of CD11c-Specific SHP-1 Knockout Mice. 第49回米国腎臓学会議 2016.11.15-11.20 シカゴ 米国
6. 渡辺 光治. CD11c 特異的 SHP-1 欠損マウスにおける腎尿細管間質障害の検討 Japan Kidney Council 2017 2017.12.16-17 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣村 桂樹 (HIROMURA, Keiju)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 70292597

(2)連携研究者

金子 和光 (KANeko, Yoriaki)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 00334095