

平成 30 年 9 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09251

研究課題名(和文) 進行性腎障害におけるTLR7を介した免疫担当細胞制御の意義

研究課題名(英文) Progressive kidney disease and inflammation

研究代表者

岩田 恭宜 (Iwata, Yasunori)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：90432137

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)：慢性腎不全により透析治療を必要とする患者は依然減少しない。腎障害の発症・進展に慢性炎症が関与していることがこれまで示されている。本研究課題では、進行性腎障害における自然免疫の意義を検討した。その結果、自然免疫に深くかかわる、マクロファージの新たな制御因子を見出した。また、ヒト進行性腎障害において、マクロファージより産生されるマクロファージアポトーシス抑制因子(Apoptosis inhibitor of macrophage : AIM)の沈着が蛋白尿増加、eGFR低下と相関することが明らかとなった。進行性腎障害において、慢性炎症の意義を、マクロファージを中心に解明した。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation contributes to the progression of kidney disease. We found the novel macrophage regulator molecule, which is involved in progressive kidney injury in mice model. Moreover, Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM), which is secreted by macrophage, was detected in various kinds of human kidney disease in kidney biopsy specimen. The deposition of AIM was associated with the increase of proteinuria and the decline of eGFR. These results showed the important role of macrophage in progressive kidney disease both in mouse and human.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓内科学 感染症学

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全により透析治療を必要とする患者は依然減少しない。また、その経過中に発症する様々な合併症が生命予後を低下させ、更に医療費の増加を招いている。進行性腎障害に対する新規検査・治療標的の創出は医学的、医療経済的に喫緊の課題である。我々はこれまで、進行性腎障害において、免疫担当細胞および腎固有細胞が、環境に応じてその機能を変化させ、複雑な免疫バランスを形成し、全体としての腎疾患の予後を決定していることを報告している。これら免疫バランスを制御する因子は、新たな検査・治療標的として非常に有用と考えられるが、現在のところ詳細は明らかではない。一方、近年、自然免疫が炎症性疾患の病態に関与していることが明らかとなっている。病原微生物を認識する toll like receptor (TLR)や、シグナル伝達にかかわるインフラマゾームなどが、自己免疫性疾患、炎症性腸疾患など炎症性疾患の病態にかかわることが報告されている。しかしながら、進行性腎疾患の病態におけるこれらの意義は明らかではない。

2. 研究の目的

そこで、本検討課題では、進行性腎障害慢性炎症を自然免疫の観点、特に自然免疫に深くかかわる、免疫担当細胞と、Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)の原因となる病原微生物に着目して検討することとした。

3. 研究の方法

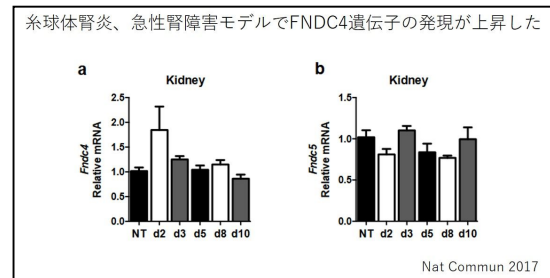
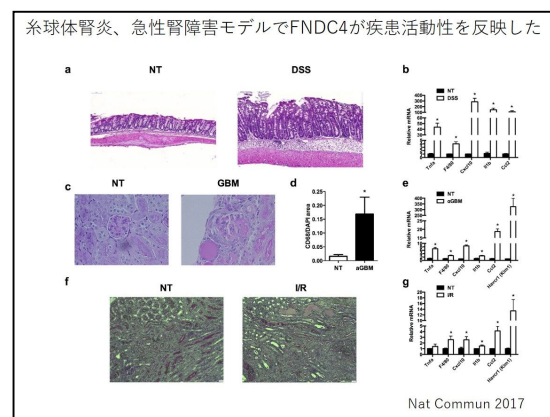
マクロファージは、damage-associated molecular patterns (DAMPs)やPAMPsを認識し、抗原提示を行うことにより炎症を惹起する。本研究課題では、自然免疫に深くかかわるマクロファージに着目し、検討を進めた。

4. 研究成果

その結果、マクロファージの新たな抑制

因子を発見した。また、ヒト進行性腎障害において、マクロファージの病態への関与を報告した。

最近、骨格筋より運動に伴い分泌される、FNDC5/irisin が発見された。この分泌蛋白は、褐色脂肪細胞を活性化させ、抗糖尿病、抗肥満作用を持つことで注目されている。このFNDC5ファミリーの一つである、FNDC4に着目し、解析を進めた。興味深

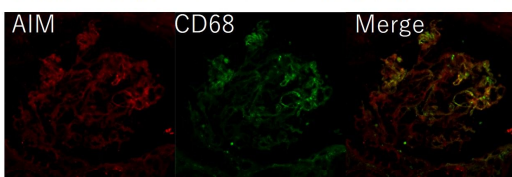


いことに、FNDC4 は、炎症性腸疾患モデルにおいて、発現が上昇した。腎臓においても、抗基底膜型半月体形成性腎炎や、腎虚血再灌流障害において、FNDC4mRNAの発現が上昇した。一方で、FNDC5の発現は認められなかった。このことより、FNDC4 は、炎症性臓器障害に関与している可能性が考えられた。そこで、機能を調べるために、免疫担当細胞との結合能を調べたところ、マクロファージと高い結合能を示した。培養マクロファージにFNDC4を添加したところ、炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現低下を認め、マクロファージへの抗炎症作用が示された。また、実際FNDC4欠損マウスに炎症性腸疾患を発症させたところ、腸炎の増悪を認め

た。これらのことより、FNDC4 は、腎臓を含む、炎症性臓器障害において発現が亢進し、主にマクロファージの制御を介して、抗炎症作用を持つことが示唆された。腎障害の進展においても、慢性炎症、特にマクロファージの関与は大きく、新規治療標的を考えるうえで、重要な発見であると考えられる。これらの結果は、Nat Commun 誌に報告した。

また、マクロファージの、ヒト進行性腎障害の病態への関与も検討した。マクロファージアポトーシス抑制因子(Apoptosis inhibitor of macrophage : AIM)は、マクロファージより分泌され、自身のアポトーシスを抑制する分子である。近年、マウスを用いた腎障害モデルで、AIM がその美容体に関与していることが報告されたが、ヒトにおける意義は不明であった。そこで、本検討では、ヒト腎障害における AIM とマクロファージの関係について検討を進めることとした。その結果、糸球体において AIM は、主に CD68 陽性マクロファージに陽性であった。また、IgM と共存している

糸球体内AIM沈着部位はマクロファージと一致し、蛋白尿のリスクとなる



Factor	Hazard Ratio (95% CI)	P value
AIM positive area (%)	1.27 (1.00 to 1.60) *	0.04
Initial sCr (mg/dl)	3.00 (1.20 to 7.50) *	0.02
Initial urinary protein (g/day)	1.32 (0.74 to 2.38)	0.35

*P < 0.05. 95% CI, 95% confidence interval.

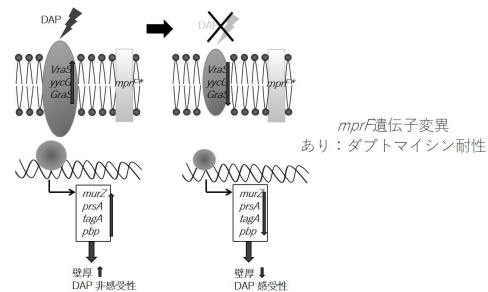
Clin Exp Nephrol 2017

ことも明らかとなった。さらに、AIM と IgM が共存して沈着している面積率と、蛋白尿が相関した。また AIM の面積率と年間 eGFR の低下が相関することが判明した。他臨床パラメーターとの単変量解析、多変量解析においても同様であった。これらの結果は、マクロファージが産生する AIM と IgM が共存することで、腎機能障害が進展する可能性を示していると考えられた。得

られた知見は、Clin Exp Nephrol 誌に掲載された。また、TLR7 をはじめとするパターン認識受容体により認識される PAMPs のうち、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に着目して解析を進めた。

MRSA 感染症は合併症として、腎障害を発症することも多く、生命予後が低下することが知られている。近年、ダプトマイシン (DAP) 感受性が低下したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)株が報告され、さらなる治療抵抗性が懸念されている。当院で分離した、DAP 非感受性株を網羅的遺伝子解析により、検討した。興味深いことに、感受性株にも、耐性の責任遺伝子である *MprF* 領域の変異を認めた。一方で、非感受性株では、細胞壁が厚く、感受性株では

細菌ゲノム解析により、抗菌薬耐性を獲得しうる変異と機序が明らかとなり、耐性獲得の予防につながる



Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017

コントロール株とほぼ同等に戻っていた。細胞壁形成関連因子と、その調節因子である二成分制御因子の mRNA 発現は DAP 非感受性株で亢進しており、このことが薬剤耐性に関与することが考えられた。この知見は、Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 誌に掲載された。

以上のように、本研究課題では、進行性腎障害に関する自然免疫の意義を、免疫担当細胞および PAMPs の視点から、検討し報告することができた。現在、これらの病態に関わる TLR7 の意義について検討をすすめている。

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 11 件)

- 1) Oshima M, Iwata Y, Furuichi K, Sakai N, Shimizu M, Hara A, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Umeda E, Kaneko S, Arai S, Miyazaki T, Wada T. Association of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression with urinary protein and kidney dysfunction. *Clin Exp Nephrol* (2017) 21 :35-42.
- 2) Shinozaki Y, Furuichi K, Toyama T, Kitajima S, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Isozumi N, Nagamori S, Kanai Y, Sugiura T, Kato Y, Wada T. Impairment of the carnitine/organic cation transporter 1-ergothioneine axis is mediated by intestinal transporter dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney Int.* (2017) 92:1356-1369
- 3) Sakai N, Nakamura M, Lipson KE, Miyake T, Kamikawa Y, Sagara A, Shinozaki Y, Kitajima S, Toyama T, Hara A, Iwata Y, Shimizu M, Furuichi K, Kaneko S, Tager AM, Wada T. Inhibition of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis through suppression of fibroblast and myofibroblast accumulation and angiogenesis. *Sci Rep.* (2017)14;7:5392.
- 4) Iwata Y, Satou K, Tsuzuku H, Furuichi K, Senda Y, Sakai-Takemori Y, Wada T, Fujita S, Miyake T, Yasuda H, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Miyagawa T, Hara A, Shimizu M, Kamikawa Y, Kaneko S, Wada T. Down-regulation of the two-component system and cell-wall biosynthesis-related genes was associated with the reversion to daptomycin susceptibility in daptomycin non-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2017) 36:1839-1845.
- 5) Kitajima S, Iwata Y, Furuichi K, Sagara A, Shinozaki Y, Toyama T, Sakai N, Shimizu M, Sakurai T, Kaneko S, Wada T. Messenger RNA expression profile of sleep-related genes in peripheral blood cells in patients with chronic kidney disease *Clin Exp Nephrol* (2016) 20: 218.
- 6) Kitagawa K, Furuichi K, Sagara A, Shinozaki Y, Kitajima S, Toyama T, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Wada T; Kanazawa Study Group for Renal Diseases and Hypertension. Risk factors associated with relapse or infectious complications in Japanese patients with microscopic polyangiitis. *Clin Exp Nephrol.* (2016) 20 :703-711.
- 7) Hara A, Furuichi K, Yamahana J, Yasuda H, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Wada T. Effect of Autoantibodies to Erythropoietin Receptor in Systemic Lupus Erythematosus with Biopsy-proven Lupus Nephritis. *J Rheumatol.* (2016)43:1328-34.
- 8) Bosma M, Gerling M, Pasto J, Georgiadi A, Graham E, Shilkova O, Iwata Y, Almer S, Soderman J,

- Toftgard R, Wermeling F, Bostrom EA, Bostrom PA. FNDC4 acts as an anti-inflammatory factor on macrophages and improves colitis in mice. *Nat Commun.* (2016) 12;7:11314
- 9) Okumura T, Furuichi K, Higashide T, Sakurai M, Hashimoto S, Shinozaki Y, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Sugiyama K, Kaneko S, Wada T. Association of PAX2 and Other Gene Mutations with the Clinical Manifestations of Renal Coloboma Syndrome. *PLoS One* (2015); 10 : e0142843
- 10) Toyama T, Furuichi K, Shimizu M, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Perkovic V, Kobayashi M, Mano T, Kaneko S, Wada T. Relationship between Serum Uric Acid Levels and Chronic Kidney Disease in a Japanese Cohort with Normal or Mildly Reduced Kidney Function *PLoS One* (2015); 10 : e0137449
- 11) Nakade Y, Toyama T, Furuichi K, Kitajima S, Miyajima Y, Fukamachi M, Sagara A, Shinozaki Y, Hara A, Shimizu M, Iwata Y, Oe H, Nagahara M, Horita H, Sakai Y, Kaneko S, Wada T. Impact of kidney function and urinary protein excretion on intima-media thickness in Japanese patients with type 2 diabetes. *Clin Exp Nephrol.* 2015 Oct;19(5):909-17.
- 〔学会発表〕(計 8 件)
- 1) Iwata Y, Oshima M, Furuichi K, Sakai N, Shimizu M, Hara A, Toyama T, Shinozaki Y, Kamikawa Y, Kitajima S, Sagara A, Wada T. Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) Expression in the Kidney Was Associated with Increased Proteinuria and Decline in Renal Function. *ASN Kidney Week 2016* 2016-11-19
- 2) Iwata Y, Satou K, Hase A, Furuichi K, Senda Y, Takemori Y, Wada T, Fujita S, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Miyagawa T, Kaneko S and Wada T, *ASN Kidney Week 2016* 2016-11-15
- 3) Iwata Y, Hara A, Furuichi K, Wada T. The Protective Effect of Erythropoietin on High Glucose Stimulated Endothelial Cell 53rd Congress ERA-EDTA 2016-5-23
- 4) 岩田恭宜、和田隆志 細菌ゲノム解析から見る進行性腎疾患と全身、第 5 9 回日本腎臓学会 2016-5-17
- 5) 岩田恭宜、大島恵、北島信治、竹森優喜子、千田靖子、和田泰三 難治性嚢胞感染症により死亡した多発性嚢胞腎の一例 第 90 回日本感染症学会総会 2016-04-15
- 6) Iwata Y, Wada T, Erythropoietin protects endothelial cell from high glucose induced injury 12th World Congress on Inflammation 2015-08-11
- 7) 堀越慶輔、湯浅貴博、迫恵輔、牧石祥平、宮川太郎、相良明宏、篠崎康之、北島信治、原章規、岩田恭宜、坂井宣彦、清水美保、古市賢吾、和田隆志 若年性 ANCA 関連血管炎の 3 例 第 59 回日本リウマチ学会総会 2015-04-23
- 8) 岩田恭宜、千田靖子、竹森優喜子、和田泰三、藤田信一、北島信治 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の遺伝子配列が臨床病態に与える影響 第 89 回日本感染症学会 2015-04-17

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田恭宜 (Yasunori Iwata)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：90432137

(2)研究分担者

和田隆志 (Takashi Wada)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：40334784

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()