

令和元年6月19日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10055

研究課題名(和文)腎糸球体構成細胞での自然免疫を介する炎症病態と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Glomerular inflammation induced by innate immune reaction in residual glomerular cells and future therapeutic strategy for CKD

研究代表者

田中 完 (Tanaka, Hiroshi)

弘前大学・教育学部・教授

研究者番号：50271820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)はウイルス感染を契機に発症、悪化することが知られているがその病態の多くは不明であった。今回、申請者らは腎糸球体構成細胞であるメサンギウム細胞(MCs)と糸球体内皮細胞(GECs)の培養細胞を用いて、ウイルス感染を細胞表面で認知するToll様受容体3(TLR3)を刺激することで活性化される細胞局所での炎症経路群の詳細を検討した。併せて臨床で得られた腎生検組織での免疫染色を行った。その結果、MCsとGECsでのTLR3を起点とする炎症経路群の伝達様式やその制御機構の一部が明らかとなった。今回明らかとなった炎症経路群の制御は将来的なCKDの新規治療法の候補となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)の病態形成には、感染症や内因性リガンドが惹起する自然免疫系の活性化とこれに伴う慢性炎症の関与が知られているが、その分子病態学的詳細は不明の点が多い。ウイルス感染はCKDの発症機転や増悪因子となることが臨床観察で知られているが、その分子生物学的詳細に関しても不明な点が多い。今回、培養ヒトメサンギウム細胞(MCs)、培養ヒト糸球体内皮細胞(GECs)でのウイルスdsRNAを認識するToll様受容体3(TLR3)を介する炎症経路群の詳細を検討し、および腎生検組織での免疫染色から、TLR3を起点とする炎症病態の一部が明らかとなり、新規の治療法開発への足掛かりが得られた。

研究成果の概要(英文)：We examined the Toll-like receptor (TLR) 3 signaling cascades triggered by polyinosinic-polycytidylic acid, a synthetic analogue of viral dsRNA, that elicits "pseudoviral" infection in cultured human mesangial cells (MCs) and glomerular endothelial cells (GECs), and found that TLR3/IFN- activation and subsequent regional expressions of proinflammatory chemokines/cytokines in MCs and GECs may be a key trigger in the glomerular inflammatory cascades. Although glomerular inflammation via innate immunity reportedly plays a pivotal role in the pathogenesis and progression of chronic kidney diseases (CKD), detailed signaling pathways via TLR3 activation in the residual glomerular cells have not always been studied so far. Considering that TLR3 signaling is implicated in CKD pathogenesis, intervention in these signaling pathways may be a considerable therapeutic strategy for treating CKD in the future.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：培養ヒトメサンギウム細胞 培養ヒト糸球体上皮細胞 Toll様受容体3 慢性腎臓病 糸球体腎炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD)の病態形成には、種々の要因に加えて感染症や内因性リガンドが惹起する自然免疫系 (innate immunity)の活性化とこれに伴う慢性炎症の関与が知られているが、その分子病態学的詳細は不明の点が多い。ウイルス感染は CKD の発症機転や増悪因子となることが臨床観察で知られているが、その分子生物学的詳細に関しても不明な点が多い。以上を背景として、これまで申請者らはウイルス dsRNA の人工合成類似物の polyinosinic- polycytidylic acid (poly IC)を刺激因子とし、培養ヒトメサンギウム細胞 (MCs)での Toll 様受容体 3 (TLR3)、細胞質内受容体のレチノイン酸誘導遺伝子アイ (RIG-I)と melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)を起点とする多彩な炎症経路群の検証、および臨床で得られた腎生検組織での免疫染色を用いて CKD における innate immunity の検討を行ってきた。ウイルスや内因性リガンドが腎系球体構成細胞に存在する TLRs/MDA5/RIG-I に認識されると I 型 interferon (IFN)産生と各種の炎症性ケモカインの発現が腎局所で引き起こされ (viral and pseudoviral immunity) CKD の病態進展に関与すると推察されるが、腎系球体構成細胞局所での詳細の多くは検討課題であった。

## 2. 研究の目的

CKD の病態解明と新規治療法の開発を、ヒト系球体構成細胞 [MCs と系球体内皮細胞 (GECs)]に着目し TLR3 を起点とした炎症経路群の関わりから研究する。CKD は腎系球体構成細胞 [内皮細胞 (GECs)、メサンギウム細胞 (MCs)、上皮細胞]と浸潤する免疫担当細胞 (マクロファージ、リンパ球、好中球など)に存在する TLR3 を介する炎症経路群活性化が病態に大きく関与している。今回、これまでの成果を踏まえて、血流と直接接する GECs での炎症経路群の制御機構の詳細を MCs との異同を含めて検討し、腎系球体構成細胞における自然免疫系の制御機構の解明から新規の CKD 治療法の開発につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

[培養ヒトメサンギウム細胞 (MCs)を用いた実験系]

1. MCs を poly IC で刺激し、TLR3/IFN- $\beta$  を介して発現する IFN-stimulated gene の一つである IFN-induced 35-kDa protein 35 (IFI35)の意義を検討した。
2. MCs で、poly IC 刺激により活性化する代表的な炎症経路 TLR3/IFN- $\beta$ /RIG-I/CCL5 に対する抗マラリア薬クロロキンの作用を検討した。
3. MCs における Cyldromatosis (CYLD: 様々な細胞において NF- $\kappa$ B を抑制的に制御するとされる)の意義を以下の方法で検討した。CYLD を RNA 干渉法で knockdown した MCs を poly IC で刺激し、これまでのわれわれの報告で示された TLR3/IFN- $\beta$  を介して発現する代表的な炎症経路群 (TLR3/IFN- $\beta$ /RIG-I/CCL5 と TLR3/IFN- $\beta$ /MDA5/CXCL10) への影響を検討した。

[培養ヒト系球体内皮細胞 (GECs)を用いた実験系]

1. GECs における TLR3/IFN- $\beta$  を介する炎症経路群の詳細は不明である。GECs は流血中の免疫担当細胞と直接接触する系球体構成細胞であることから、好中球の遊走・接着に関わるケモカイン CXCL1 の発現に注目し、poly IC 刺激により GECs の TLR3/IFN- $\beta$ /CXCL1 と TLR3/IFN- $\beta$ / E-selectin の発現を、併せて腎組織での CXCL1 の発現を検討した。
2. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)は系球体硬化に関与する。ループス腎炎では PAI-1 の発現亢進が報告されていることから、GECs における TLR3 を起点とする PAI-1 の発現と欧米での SLE の標準治療薬である抗マラリア薬 クロロキンの PAI-1 発現に及ぼす影響を確認した。
3. 腎系球体構成細胞で産生される interleukin-6 (IL-6)は GN の発症に関与していることから、GECs での TLR3/IL-6 の発現を検討した。

## 4. 研究成果

[MCs に関して]

1. MCs において、poly IC 刺激は時間・濃度依存性に IFI35 の発現を誘導した。RNA 干渉法による IFI35 の knockdown は、MDA5 と RIG-I の蛋白レベルでの発現、およびそれぞれのシグナリングの下流に発現する CXCL10 と CCL5 を mRNA と蛋白レベルで抑制した。一方、IFI35 の knockdown は STAT-1 のリン酸化と MDA5、RIG-I の mRNA 発現には影響

を示さなかった。これまでの報告から、CKDではTLR3/IFN- $\beta$ /RIG-I/CCL5とTLR3/IFN- $\beta$ /MDA5/CXCL10を介する炎症経路群が病態に関与している可能性があることから、IFI35による制御機構の詳細な検討は、将来的なCKDの抗炎症療法開発に有用かも知れない。

2. 抗マラリア薬クロロキンはSTAT1のリン酸化を抑制しNF- $\kappa$ B p65の核内移行を阻害することでTLR3/IFN- $\beta$ を起点とする炎症経路の初期段階を抑制することが示された。
3. CYLDのknockdownはRIG-I/CCL5、MDA5/CXCL10の発現をタンパクレベルで増加させた。一方、IFN- $\beta$ とSTAT1のリン酸化には影響しなかった。腎生検組織では増殖性ループス腎炎でCYLDの染色性が明らかであった。CYLDはTLR3/IFN- $\beta$ を介する炎症経路群を抑制的に制御している可能性があり、CYLD発現に関する制御機構のより詳細な検討は将来的なCKDの抗炎症療法開発に有用かも知れない。

以上のように、MCsでのTLR3を起点とする炎症経路群のより詳細な制御機構が明らかとなり、将来的なCKDの治療戦略の足掛かりが得られた。

[GECsに関して]

1. GECsにおけるpoly IC刺激で上記炎症経路群が活性化することが示された。腎生検組織では好中球活性化の関与が大きい半月体形成性腎炎で内皮細胞領域に有意なCXCL1の発現が確認された。GECsでのTLR3/IFN- $\beta$ を介する炎症経路群の制御はCKDの病態を改善する可能性がある。
2. GECsではpoly IC刺激でTLR3を起点とするPAI-1の発現は増強すること、抗マラリア薬の前処置でPAI-1発現は有意に抑制されることが明らかとなった。TLR3を起点とする炎症経路群の抑制には抗マラリア薬クロロキンは有用であり、ループス腎炎を含む一部のCKDの治療薬として有望であることが示唆された。
3. poly ICは時間・濃度依存性にGECs上にIL-6の発現を誘導した。RNA干渉法によるIFN- $\beta$ のノックダウンはIL-6の発現を有意に低下させた。興味深いことにIL-6の発現にはウイルス細胞質内受容体RIG-IとMDA5も関与しており、GECs上のTLR3/IFN- $\beta$ /MDA5/RIG-I/IL-6経路の存在が示された。IL-6は炎症惹起に加えて腎糸球体構成細胞間の調整や好中球の腎局所での好中球遊走への関与も知られている。GECsでのTLR3を起点とする炎症経路群の制御はCKDの新規治療法としても有用となる可能性がある。

以上のように、これまで検討がなされていなかったGECsでもTLR3を起点とする炎症関連経路群の一部が明らかとなり、これらの経路の抑制には抗マラリア薬が有望であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Liu Q, Imaizumi T, Aizawa T, Hirono K, Kawaguchi S, Watanabe S, Tsugawa K, Matsumiya T, Seya K, Yoshida H, Tanaka H. Cytosolic sensors of viral RNA are involved in the production of interleukin-6 via Toll-like receptor 3 signaling in human glomerular endothelial cells. *Kidney Blood Press Res* (査読有) 2019; 44: 62-71 (DOI: 10.1159/000498837).
2. Aizawa T, Imaizumi T, Hirono K, Watanabe S, Tsugawa K, Tanaka H. Chloroquine attenuates TLR3-mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression in cultured human glomerular endothelial cells. *Clin Exp Nephrol* (査読有) 2019; 23: 448-454 (DOI: 10.1007/s10157-018-1659-y).
3. Liu Q, Imaizumi T, Kawaguchi S, Aizawa T, Matsumiya T, Watanabe S, Tsugawa K, Yoshida H, Tsuruga K, Joh K, Kijima H, Tanaka H. Toll-like receptor 3 signaling contributes to regional neutrophil recruitment in cultured human glomerular endothelial cells. *Nephron* (査読有) 2018; 139: 349-358 (DOI: 10.1159/000489507).
4. Watanabe S, Aizawa T, Tsukaguchi H, Tsugawa K, Tsuruga K, Shono A, Nozu K, Iijima K, Joh K, Tanaka H. Long-term clinicopathologic observation in a case of steroid-resistant nephrotic syndrome caused by a novel Crumbs homolog 2 mutation. *Nephrology (Carlton)* (査読有) 2018; 23: 697-702 (DOI: 10.1111/nep.13244).

5. Liu Q, Imaizumi T, Murakami K, Tanaka H, Wu Y, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino H, Kijima H. DEC1 negatively regulates the expression of CXCL10 and CCL5 induced by poly IC in normal human mesangial cells. Biomed Res (Tokyo) (査読有) 2017; 38: 249-255 (DOI: 10.2220/biomedres.38.249).
6. Imaizumi T, Hayakari R, Watanabe S, Aizawa T, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Kawaguchi S, Tanaka H. Cyldromatosis (CYLD), a deubiquitinase, attenuates inflammatory signaling pathways by activating Toll-like receptor 3 in human mesangial cells. Kidney Blood Press Res (査読有) 2017; 42: 942-950 (DOI: 10.1159/000485084).
7. Watanabe S, Tsugawa K, Tsuruga K, Imaizumi T, Tanaka H. Urinary excretion of SMPDL-3b in children with intractable nephrotic syndrome. Pediatr Int (査読有) 2017; 59: 1112-1115 (DOI: 10.1111/ped.13355).
8. Imaizumi T, Hayakari R, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Watanabe S, Kawaguchi S, Tanaka H. Chloroquine attenuates TLR3/IFN- $\beta$  signaling in cultured normal human mesangial cells: A possible protective effect against renal damage in lupus nephritis. Mod Rheumatol (査読有) 2017; 27: 1004-1009 (DOI: 10.1080/14397595.2017.1289646).
9. Tanaka H, Joh K, Imaizumi T. Treatment of pediatric-onset lupus nephritis: A proposal of optimal therapy and prospects for new medicines. Clin Exp Nephrol (査読有) 2017; 21: 755-763 (DOI: 10.1007/s10157-017-1381-1).
10. Tsugawa K, Imaizumi T, Watanabe S, Tsuruga K, Yoshida H, Tanaka H. Clarithromycin attenuates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 by activating Toll-like receptor 4 in human mesangial cells. Clin Exp Nephrol (査読有) 2017; 21: 573-578 (DOI: 10.1007/s10157-016-1333-1).
11. Imaizumi T, Yano C, Numata A, Tsugawa K, Hayakari R, Matsumiya T, Yoshida H, Watanabe S, Tsuruga K, Kawaguchi S, Murakami M, Tanaka H. Interferon (IFN)-induced protein 35 (IFI35), a type I interferon-dependent transcript, upregulates inflammatory signaling pathways by activating Toll-like receptor 3 in human mesangial cells. Kidney Blood Press Res (査読有) 2016; 41: 635-642 (DOI: 10.1159/000447932).

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 渡邊祥二郎, 田中 完, 特発性ネフローゼ症候群における糸球体上皮細胞の sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL3b), 第 53 回日本小児腎臓病学会学術集会, シンポジウム 2: ネフローゼ症候群の病因と病態, 2018 年 6 月 29-30 日, 福島市
2. 相澤知美, 渡邊祥二郎, 津川浩二, 敦賀和志, 田中 完, 今泉忠淳, クロロキンはヒト培養糸球体内皮細胞で TLR3 を介する plasminogen activator inhibitor-1 の発現を抑制する, 第 53 回日本小児腎臓病学会学術集会, 2018 年 6 月 29-30 日, 福島市
3. 田中 完, 相澤知美, 渡邊祥二郎, 津川浩二, 敦賀和志, 城 謙輔, 今泉忠淳, ヒト培養糸球体内皮細胞における TLR3 を起点とする好中球遊走・接着因子の発現, 第 53 回日本小児腎臓病学会学術集会, 2018 年 6 月 29-30 日, 福島市
4. 相澤知美, 渡邊祥二郎, 津川浩二, 敦賀和志, 田中 完, クロロキンはヒト培養糸球体内皮細胞で TLR3 を介する plasminogen activator inhibitor-1 の発現を抑制する, 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 2018 年 6 月 8-10 日, 新潟市
5. 渡邊祥二郎, 相澤知美, 津川浩二, 敦賀和志, 田中 完, 小児難治性ネフローゼ症候群に

おける尿中 SMPDL3 発現の検討，第 61 回日本腎臓学会学術総会，2018 年 6 月 8-10 日，新潟市

6. 田中 完，相澤知美，渡邊祥二郎，津川浩二，敦賀和志，城 謙輔，ヒト培養系球体内皮細胞における TLR3 を起点とする好中球遊走・接着因子の発現，第 61 回日本腎臓学会学術総会，2018 年 6 月 8-10 日，新潟市
7. Watanabe S, Tsugawa K, Aizawa T, Tsuruga K, Ito E, Tanaka H. Urinary and glomerular expressions of SMPDL3b in pediatric-onset intractable nephrotic syndrome, The 13<sup>th</sup> Asian Congress of Pediatric Nephrology, Oct. 5-7, 2017, Kuala Lumpur, Malaysia
8. 渡邊祥二郎，敦賀和志，田中 完，小児難治性ネフローゼ症候群における sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL3b)の発現に関する検討，第 60 回日本腎臓学会学術総会，2017 年 5 月 26-28 日，仙台市
9. 田中 完，渡邊祥二郎，相澤知美，津川浩二，敦賀和志，今泉忠淳，クロロキンはヒトメサンギウム細胞における TLR3 /IFN- $\beta$  を起点とする炎症経路の初期段階を抑制する，第 52 回日本小児腎臓病学会学術集会，2017 年 6 月 1-3 日，東京都
10. 田中 完，渡邊祥二郎，津川浩二，敦賀和志，クロロキンはヒトメサンギウム細胞における Toll-like receptor 3/IFN- $\beta$  を起点とする炎症経路の初期段階を抑制する，第 60 回日本腎臓学会学術総会，2017 年 5 月 26-28 日，仙台市
11. 田中 完，免疫抑制薬の薬理作用から見た特発性ネフローゼ症候群の発症機序 - ミゾリピン，カルシニューリン阻害薬，リツキシマブ，第 51 回日本小児腎臓病学会学術集会，シンポジウム 2: 特発性ネフローゼ症候群の成因と治療，2016 年 7 月 7-9 日，名古屋市
12. 田中 完，渡邊祥二郎，敦賀和志，城 謙輔，ヒトメサンギウム細胞での自然免疫を介する interferon-stimulated gene 15 (ISG15)は炎症病態を抑制する，第 59 回日本腎臓学会学術総会，2016 年 6 月 17-19 日，横浜市

〔図書〕(計 4 件)

1. 田中 完 .Expert 医師の治療 15. IgA 腎症の臨床 .湯村和子 編 ,pp 310-315, 東京医学社，東京，2018 .
2. 田中 完 . 感染症に伴う腎障害 . 小児腎臓病学 改訂第 2 版，日本小児腎臓病学会 編，pp 319-321, 診断と治療社，東京，2017 .
3. 田中 完 . 紫斑病性腎炎：小児 . 腎疾患・透析 最新の治療 2017-2019 . pp. 131-134, 山縣邦弘，南学正臣 編，南江堂，東京，2017.
4. 田中 完 ループス腎炎：小児の特徴 大人との相違 新 膠原病・血管炎の腎障害 .pp.94-107, 湯村和子 編，東京医学社，東京，2016.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：今泉 忠淳

ローマ字氏名：IMAZUMI TADAATSU

所属研究機関名：弘前大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : 90232602

研究分担者氏名：吉田 秀見

ローマ字氏名：YOSHIDA HIDEMI

所属研究機関名：弘前大学

部局名：大学院医学研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：40201008

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。