

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2006-2009
課題番号：18380188
研究課題名 (和文) マクロファージ筋線維芽細胞を基軸とした腎線維化の病理発生の解明と治療法の確立
研究課題名 (英文) Based on the relationship of macrophages-myofibroblasts, the pathogenesis of renal fibrosis and its therapeutic strategies
研究代表者
山手 文至 (YAMATE JY0J1)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：50150115

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：病態、病理発生、応用動物学、腎線維化モデル、マクロファージ、筋線維芽細胞

1. 研究計画の概要

腎線維化の形成において重要な役割を担うマクロファージと筋線維芽細胞の特性を多角的に解析するとともに、これら細胞の相互関連を基軸とした病理発生機序を解明し、その機序に基づいた新たな治療法を探索する。さらに、線維化病変である肝線維化と皮膚の創傷線維化病変を同様の方法で解析し、腎線維化の発生機序を比較病理学的に解明する。

2. 研究の進捗状況

(1) シスプラチン誘発ラット腎線維化モデルを解析し、以下の成果を得た。

①筋線維芽細胞は α -平滑筋アクチン、ビメンチン、デスミンを種々の割合で発現することが示された。また、再生尿細管上皮においても α -平滑筋アクチンとビメンチンが発現することが分かった。さらに、尿細管上皮由来細胞株に線維原性因子である TGF- β 1 を添加したところ筋線維芽細胞特有の細胞骨格が発現し、TGF- β 1 と PDGF を同時添加するとその発現が相乗的に増強することが示された。
②この腎線維化モデルに抗炎症剤であるデキサメサゾンを投与すると ED1 陽性の浸潤マクロファージの出現が抑制され線維化が軽減された。しかし、ED2 陽性固着マクロファージと OX6 陽性抗原提示マクロファージの出現には影響が見られなかった。

(2) 腎線維化には線維原性因子を産生するマクロファージと細胞外基質を産生する筋線維芽細胞が重要であることから、*in vitro* での実験系の作成を試みた。

①その結果、筋線維芽細胞に分化し得る細胞株(MT-9 と LY-H12)の開発に成功した。

②さらに、ラットの悪性線維性組織球腫から

マクロファージの特性を示す細胞株(KJ-A)の樹立に成功した。

これら細胞株は本研究の遂行において有用である。

(3) 高血圧自然発症ラットを用いて、腎と心臓におけるマクロファージの出現を解析するとともに、このモデルに小豆抽出物を投与するとマクロファージの出現が抑制されることを見出した。

(4) 以上に加え、チオアセトアミド誘発肝線維化ラットモデルを作製し、出現するマクロファージについて解析した。その結果、傷害部位に出現するED1陽性の貪食活性の高いマクロファージの多くがOX6に対しても免疫組織化学的に反応することが示された。これは、細胞残屑を貪食した浸潤マクロファージが抗原提示能を有することを示唆する。さらに、マクロファージの誘導に係るMCP-1は類洞周囲細胞から産生されることをミラー標本で明らかにした。

(5) さらに、LPS を投与したラット脳髄膜に出現するマクロファージ群の特性についても解析を行った。その結果、脳傷害では固着マクロファージが重要な役割を演じることが示された。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

研究目的であった、腎線維化に関わるマクロファージと筋線維芽細胞の特性をかなり明らかにできた。特に、TGF- β 1 と PDGF が筋線維芽細胞の形成に相乗的に働くことは新知見である。また、新たな *in vitro* の実験系の確立と他の部位における線維化の病態も明らかにすることができた。

4. 今後の研究の推進方策

実験計画に大きな変更はない。基本的には腎線維化に出現するマクロファージと筋線維芽細胞の特性をこれからも解明する。

(1) シスプラチン誘発ラット腎線維化モデルを用いて以下の研究を遂行する。

①特にマクロファージの出現と炎症時に発現するシクロオキシゲナーゼ(COX)の関連について解析する。また、COX 発現抑制剤による治療効果も検討する。

②さらに、筋線維芽細胞の形成に関わるとされる Thy-1 の発現について、免疫組織化学的に解析する。

③また、血管新生とマクロファージの動員あるいは筋線維芽細胞の誘導との関わりについても免疫組織化学的に解析する。

(2) 他の部位の線維化として ANIT 誘発の胆管傷害後の線維化、ブレオマイシン誘発の肺線維化と創傷治癒後の線維化についても比較病理学的に解析を加える。

5. 代表的な研究成果

(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 13 件)

1. Mori Y, Izawa T, Takenaka S, Kuwamura M, and Yamate J. Participation of functionally-different macrophage populations and monocyte chemoattractant protein-1 in early stages of thioacetamide-induced rat hepatic injury. *Toxicol Pathol*, (in press), 2009. 査読有.
2. Yamate J, Ishimine S, Izawa T, Kumagai D, and Kuwamura M. Macrophage populations and expressions of regulatory proinflammatory factors in the rat meninx under lipopolysaccharide treatment *in vivo* and *in vitro*. *Histol Histopathol*. 24(1):13-24. 2009. 査読有.
3. Sato S, Mukai Y, Yamate J, Kato J, Kurasaki M, Hatai A, and Sagai M. Effect of polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 35(1):43-49. 2008. 査読有.
4. Yamate J. Heterogeneity of macrophage populations and myofibroblasts appearing in rat renal interstitial fibrosis (review). *J Toxicol Pathol*. 20 (4):185-195. 2007. 査読有.
5. Yamate J, Ogata K, Yuasa T, Kuwamura M, Takenaka S, Kumagai D, Itoh K, and LaMarre J. Adipogenic, osteogenic and myofibrogenic

differentiations of a rat malignant fibrous histiocytoma (MFH)-derived cell line, and a relationship of MFH cells with embryonal mesenchymal, perivascular and bone marrow stem cells. *Eur J Cancer*. 43(18):2747-2756. 2007. 査読有.

[学会発表] (計 18 件)

1. Yamate J, Mori Y, zawa T, Takenaka S, and Kuwamura M. Macrophage appearance and monocyte chemoattractant protein-1 in thioacetamide-induced rat hepatic injury. The 27th Annual Meeting of the Society of Toxicologic Pathology (STP). 2008.6.22-26. San Francisco.
2. 山手丈至. 慢性腎不全猫に対する ACE 阻害剤の具体的な使い方—腎間質線維化の面から—腎線維化の進展機序：マクロファージと筋線維芽細胞の役割、ならびに実験モデルを用いた ACE 阻害剤の効果. 第 28 回動物臨床医学会年次大会. 2007.11.17-18. 大阪.
3. 山本絵美, 山手丈至, 井澤武史, 桑村 充, 小谷猛夫. シスプラチン誘発急性腎傷害モデルにおける COX-2 の発現と再生尿細管との係わり. 第 143 回日本獣医学会学術集会 2007.4.3-5. つくば.
4. 湯浅隆宏, 山手丈至, 井澤武史, 桑村 充, 小谷猛夫. ラットの腎線維化と腎発生における Thy-1 発現細胞の分布と特性解析. 第 142 回日本獣医学会学術集会 2006.9.22-24. 山口.
5. Yamate Y, Machida Y, Kuwamura M, Kotani T. Renal interstitial fibrosis in neonatal rats induced by cisplatin. The 24th European Society of Veterinary Pathology (ESVP). 2006.8.30-9.2. Edinburgh.

[その他] アウトリーチ活動 (講演 2 件)

1. 山手丈至. 肝臓における線維化の病理発生. 2007 年 7 月 5 日. 徳島県 鳴門 大塚製薬工業株式会社.
2. 山手丈至. ラット腫瘍モデルの確立と応用：特に、線維化 (腎線維化・肝硬変) の病理発生に向けた応用性の探索. 2007 年 6 月 26 日. 麻布大学 生物科学総合研究所.