

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08231

研究課題名(和文)腎単核貪食細胞による腎尿細管間質障害機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of tubulointerstitial injury by renal mononuclear phagocytes.

研究代表者

廣村 桂樹 (Hiromura, Keiju)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70292597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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)は加齢に伴い尿細管間質腎炎を自然発症する。この尿細管間質障害ではCD11c+ F4/80highの腎単核貪食細胞が増殖し、 α -SMA陽性の筋線維芽細胞に形質転換することを示した。Shp1-CKOマウスのCD11c+ F4/80highの腎単核貪食細胞は、M-CSF刺激により強い細胞増殖能を示し、M-CSF受容体のリン酸化増強・遷延が認められた。以上より、Shp1はCD11c+ F4/80highの腎単核貪食細胞の細胞増殖や筋線維芽細胞への形質転換を負に制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿細管間質障害は末期腎不全への進行過程で共通にみられる病態である。特に尿細管間質の線維化は多くが非可逆的であり、その制御は末期腎不全への進展阻止のために重要である。今回の研究より、腎単核貪食細胞は腎尿細管線維化に直接的に関与する細胞群であること、ならびに腎単核貪食細胞の増殖や形質転換にチロシンホスファターゼであるShp1が深く関与している可能性があることを示した。今後、Shp1経路の制御による腎障害進展阻止に向けた研究の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：CD11c-specific Shp1-deficient mice (Shp1-CKO mice) spontaneously develop tubulointerstitial nephritis with aging. We found that CD11c+F4/80high renal mononuclear phagocytes proliferate and transform into α -SMA-positive myofibroblasts in this process. CD11c+F4/80high renal mononuclear phagocytes from Shp1-CKO mice showed robust cell proliferation by M-CSF stimulation, together with enhancement and prolongation of phosphorylation of M-CSF receptor. These results suggest that Shp1 may negatively regulate the proliferation of CD11c+F4/80high renal mononuclear phagocytes and the transformation into myofibroblasts.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓病学 尿細管間質障害 腎線維化 腎単核貪食細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎の尿管間質にはマクロファージ (M ϕ) や樹状細胞が常在し感染防御機能を担うとともに、尿管間質障害においても重要な役割をはたしている。M ϕ は強い貪食能を持ち、様々なサイトカインやケモカインを産生して免疫・炎症反応を調整する細胞であり、樹状細胞は T 細胞に抗原を提示する細胞として考えられてきた。しかしマルチカラーフローサイトメトリーや遺伝子解析により M ϕ と樹状細胞が同じマーカーを持つことがわかり、特に腎臓においては、これらの細胞の 70~90% が、CD11b や F4/80 (ともに M ϕ マーカー) と CD11c (樹状細胞マーカー) を共に発現することが明らかとなった¹⁾。両者の区別が難しいことより M ϕ と樹状細胞をまとめて、腎単核貪食細胞と呼ばれるようになりつつある²⁾。

SH2 domain-containing protein phosphatase 1 (Shp1) は免疫炎症細胞等に特異的に発現す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、Shp1 が活性化し細胞質内の標的分子の脱リン酸を促すことで、免疫炎症細胞の増殖、分化、活性化に対して抑制的に働く。我々は群馬大学生体調節研究所の崎尚教授 (現在、神戸大学シグナル統合学分野) との共同研究で、樹状細胞特異的に Shp1 を欠損させることを目的に作成した CD11c 特異的 Shp1 欠損 (Shp1-CKO) マウスが、40 週齢になると肺臓炎ならびに増殖性腎炎を自然発症することをみだして報告した³⁾。その後、本マウスの腎臓について解析を進め、免疫組織染色、腎フローサイトメトリーを用いて検討したところ、尿管間質に CD11c、CD11b、F4/80、CD4 等の陽性細胞の増加を認めた。さらにフローサイトメトリーで詳細に解析したところ、腎臓内に CD11c⁺F4/80^{high} の細胞群が増加し、Th1 細胞の集簇を伴い、尿管間質障害が生じることを明らかにした⁴⁾。すなわち腎単核貪食細胞が病変形成に深く関与していることを見出した。

2. 研究の目的

今回の研究では尿管間質障害において、M ϕ と樹状細胞の両者のマーカーを発現する CD11c⁺F4/80^{high} の腎単核貪食細胞が障害の進展に関与しているとの仮説のもと、尿管間質障害機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス

CD11c-Cre マウスと Shp1-lox P (Ptpn^{fl/fl}) 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臓障害について検討を行った。Ptpn^{fl/fl} マウスをコントロールマウスとして使用した。フローサイトメトリー解析方法の確立のためには、C57BL/6j マウスを購入して使用した。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

マウス腎臓は 4% パラフォルムアルデヒド PBS で固定し、パラフィン包埋。脱パラフィン後、抗 vimentin 抗体、抗 α -smooth muscle actin (SMA) 抗体を用いて免疫組織染色を実施した。

(3) 腎臓内の免疫・炎症細胞のフローサイトメトリー解析

マウス腎臓は冷 PBS で灌流後に、コラゲナーゼ処理を施行し、gentleMACS C Tubes に入れて、gentleMACS Dissociator を用いて破碎した。細胞懸濁液はポリエステルのメッシュを通して、パーコール液を用いて遠心分離し、細胞を回収した。各種抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。また vimentin、 α -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トリーを用いて検討した。

(4) 培養腎細胞の M-CSF 刺激による増殖能と M-CSF 受容体リン酸化の検討

マウス腎臓より上述方法で細胞を回収し、macrophage colony stimulating factor (M-CSF) を加えて 7 日間培養。M-CSF を除いて 1 日間培養後、再度 M-CSF を加えて、bromodeoxyuridine (BrdU) を培養液に添加し、抗 BrdU 抗体を用いてフローサイトメトリーで細胞増殖能を検討した。また抗リン酸化チロシン抗体と抗リン酸化 M-CSF 受容体抗体で染色し、CD45.2 と F4/80 でゲートしてフローサイトメトリーで解析した。

4. 研究成果

(1) 腎臓内免疫・炎症細胞のフローサイトメトリー解析方法の確立

腎単核貪食細胞などの腎臓内免疫・炎症細胞の解析にあたり、フローサイトメトリーを用いているが、研究者間でプロトコールが統一されていないことから結論が一定しないことが多い。そこで C57BL/6 マウスを用いて、腎臓からの免疫・炎症細胞の適切な回収方法とフローサイトメトリーの解析条件を検討した。まず腎臓からの免疫・炎症細胞の単離に際しコラゲナーゼ処理を

用いることで収量が増加することを明らかにした。特に腎単核貪食細胞である F4/80^{high} 細胞についてはコラゲナーゼ処理の有無で回収量が大きく変化することがわかった。また、CD11b⁺Ly6C⁺細胞の中に Ly6G が陽性となる好中球が約 30%混入することを見だし、Ly6G をマーカーとして使用することで、好中球を除外する解析方法を確立した⁵⁾。

(2) vimentin 陽性細胞、 α -SMA 陽性細胞と腎単核貪食細胞との関係

40 週齢の Shp1-CKO マウスは尿細管間質障害を自然発症し、免疫染色を行うと間葉系マーカーである vimentin 陽性細胞の高度な増加と、筋線維芽細胞マーカーの α -SMA 陽性細胞の増加がみられる。腎臓内の細胞についてフローサイトメトリーで詳細な解析を行ったところ、vimentin 陽性細胞や α -SMA 陽性細胞の大部分は CD11c⁺F4/80⁺の腎単核貪食細胞であることが明らかとなった。これまで腎線維芽細胞の起源として CD73、ER-TR7、PDGFR2b 陽性細胞が考えられており、また F4/80 陽性細胞も筋線維芽細胞への形質転換も最近報告されている⁶⁾。そこで 40 週齢のマウスについて、CD73、ER-TR7、PDGFR2b、F4/80 と α -SMA の二重染色をフローサイトメトリーで解析した。CD73、ER-TR7、PDGFR2b については α -SMA 陽性細胞は少なく、またコントロールマウスと有意な違いはみられなかった。一方、Shp1-CKO マウスでは F4/80 陽性の α -SMA 陽性細胞が増加し、 α -SMA 陽性細胞の半分以上は F4/80 陽性細胞であった。続いて細胞増殖マーカーである Ki67 の染色を行いフローサイトメトリーで検討したところ、Shp1-CKO マウスでは CD11c⁺F4/80^{high} 細胞において、細胞増殖マーカーである Ki67 の増加が見られた。以上の結果より、Shp1-CKO マウスでは CD11c⁺F4/80^{high} の腎単核貪食細胞が、間葉系マーカーの vimentin 陽性となるとともに増殖し、その一部が α -SMA 陽性の筋線維芽細胞に形質転換するものと考えられた。

(3) Shp1-CKO マウスから単離した CD11c⁺/F4/80⁺腎単核貪食細胞の M-CSF に対する反応

これまでの報告で F4/80⁺の腎単核貪食細胞の分化、生存は macrophage colony stimulating factor (M-CSF) に依存するとの報告がある⁷⁾。そこでマウスの腎臓より回収し培養した細胞を M-CSF で刺激後、BrdU の取り込みで細胞増殖能を評価したところ、Shp1-CKO マウスはコントロールマウスと比較して、F4/80⁺CD11c⁺細胞の有意な増殖能の上昇を認めた。抗チロシンリン酸化抗体と抗 M-CSF 受容体チロシンリン酸化抗体を用いた、F4/80⁺CD11c⁺細胞における細胞内リン酸化状態のフローサイトメトリー解析では、Shp1-CKO マウスはコントロールマウスと比較して、両者ともチロシンのリン酸化が増強し、また遷延することがわかった。以上より、Shp1 は CD11c⁺F4/80^{high} の腎単核貪食細胞において、M-CSF のシグナル伝達を負に制御して、腎単核貪食細胞の間葉系細胞への形質転換を抑制している可能性が示唆された。

(4) Shp1-CKO マウスにおける Shp1 の発現状況の確認

Shp1-CKO マウスにおける細胞内の Shp1 の発現状況について確認を行った。コントロールマウスと Shp1-CKO マウスに対して、腎臓の CD45.2 陽性細胞における細胞内 Shp1 染色を行い、CD11⁺、F4/80⁺、CD3⁺群に分けてフローサイトメトリーで解析した。CD11c⁺、F4/80⁺ではほとんどの細胞で Shp1 の欠損を認め、一方、CD3⁺ (T 細胞) ではコントロールマウスと同程度の Shp1 陽性細胞が見られた。以上より、CD11c⁺F4/80^{high} の腎単核貪食細胞では Shp1 が欠損することで、細胞増殖ならびに α -SMA 陽性細胞に形質転換を起こすことが示唆された。

(5) まとめ

Shp1-CKO マウスでは 40 週齢になると尿細管間質障害を自然発症する。この尿細管間質障害においては多数の細胞が間葉系マーカーの vimentin 陽性となり、また一部の細胞は筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA 陽性となる。腎内細胞のフローサイトメトリー解析では、vimentin や α -SMA 陽性細胞の大部分が CD11c⁺F4/80^{high} の腎単核貪食細胞であり、これらが腎線維化に直接関与していることがわかった。Shp1-CKO マウス腎から取り出して培養した CD11c⁺F4/80^{high} の腎単核貪食細胞においては、コントロールマウス腎からの培養細胞と比較して、M-CSF 刺激により細胞増殖能の亢進がみられた。さらに M-CSF 受容体のリン酸化の増強・遷延が認められることより、Shp1 は M-CSF 刺激を負に制御しているものと考えられた。以上より、Shp1 は CD11c⁺F4/80^{high} の腎単核貪食細胞の細胞増殖や筋線維芽細胞への形質転換を負に制御している可能性が示唆された。

また本研究の過程で、マウス腎臓内の免疫・炎症細胞のフローサイトメトリー解析における適切な回収方法と解析方法を検討し、腎単核貪食細胞の回収にはコラゲナーゼ処理が重要なことを明らかにした。また解析時には Ly6G を除外することで好中球の混入を防ぐことができることを示した。

引用文献

- 1) Rogers NM. et al. Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil. *Nat Rev Nephrol.* 2014; 10(11):625-43.
- 2) Nelson PJ. et al. The renal mononuclear phagocytic system. *J Am Soc Nephrol.* 2012 23(2):194-203.

- 3) Kaneko T, et al. Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp1 promotes Th1 cell differentiation and induces autoimmunity. *J Immunol.* 2012 Jun 1;188(11):5397-407.
- 4) Watanabe M, et al. Accumulation of Dysregulated Renal Mononuclear Phagocytes (rMoPh) and Th1 Cells in the Kidney of CD11c-Specific SHP-1 Knockout Mice. *J Am Soc Nephrol.* (Abstract Supplement). SA-PO292,696A.
- 5) Watanabe M, et al. *Biochem Biophys Rep.* Importance of methodology in the evaluation of renal mononuclear phagocytes and analysis of a model of experimental nephritis with Shp1 conditional knockout mice. 2020; 22:100741.
- 6) Wang YY, et al. Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28:2053-2067.
- 7) Kawakami T, et al. Resident renal mononuclear phagocytes comprise five discrete populations with distinct phenotypes and functions. *J Immunol.* 2013; 191:3358-72.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Mitsuharu, Kaneko Yoriaki, Ohishi Yuko, Kinoshita Masato, Sakairi Toru, Ikeuchi Hidekazu, Maeshima Akito, Saito Yasuyuki, Ohnishi Hiroshi, Nojima Yoshihisa, Matozaki Takashi, Hiromura Keiju	4. 巻 22
2. 論文標題 Importance of methodology in the evaluation of renal mononuclear phagocytes and analysis of a model of experimental nephritis with Shp1 conditional knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100741 ~ 100741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 渡辺光治, 金子和光, 木下雅人, 大石裕子, 坂入 徹, 池内秀和, 野島美久, 廣村桂樹
2. 発表標題 CD11c陽性細胞に特異的なShp-1の欠損は腎単核食細胞を活性化し腎の線維化を促進する
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe M, Kaneko Y, Kinoshita M, Shrestha S, Ohishi Y, Sakairi T, Ikeuchi H, Nojima Y, Hiromura K
2. 発表標題 Establishment of a Preparative Method and Gating Strategy for Renal Mononuclear Phagocytes (rMophs) and Analysis of rMophs in CD11c-Specific Shp-1 Knockout Mice
3. 学会等名 Annual Meeting of American Society of Nephrology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe M, Kaneko Y, Kinoshita M, Ohishi Y, Sakairi T, Ikeuchi H, Nojima Y, Hiromura K
2. 発表標題 CD11c-Specific Ablation of SHP-1 Results in Renal Fibrosis with Age
3. 学会等名 Annual Meeting of American Society of Nephrology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺 光治(群馬大学 腎臓・リウマチ内科学), 金子 和光, 今井 陽一, Shreya Shrestha, 木下 雅人, 大石 裕子, 坂入 徹, 池内 秀和, 野島 美久, 廣村 桂樹
2. 発表標題 腎単核食細胞の解析においては細胞の単離法が重要である
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金子 和光 (Kaneko Yoriaki) (00334095)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関