

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08693

研究課題名(和文)新規CKD治療ターゲットとしての制御性B細胞-IL-10 system

研究課題名(英文)Breg-IL-10 system as a novel therapeutic target for CKD

研究代表者

深水 圭 (FUKAMI, KEI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：80309781

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)：今回、虚血再還流AKIモデルマウスにおいて、AKI-to-CKDをもたらす病態にIL-10を発現するBregがどのように関わるかについて詳細に検討を行った。AKIモデルでは糸球体におけるIL-10発現は時間とともに低下し、髄質では逆に上昇していた。虚血再還流における糸球体病変としてはIL-10が低下したのちに硬化をきたすことが明らかとなった。Bregの糸球体での存在を確認するために、CD19を用いて共染色を行ったところ、大変興味深いことに、糸球体のメサンギウム細胞にIL-10とCD19が共染色された。メサンギウム細胞がBregとして糸球体保護に働いている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、AKIは様々な状況で生じることが明らかとなっている。特に高齢者においては動脈硬化による腎虚血からAKIを引き起こし、その後CKDへ移行する。その過程において、尿細管障害が腎障害の首座と考えられてきたが、我々は糸球体の変化に着目し研究を行った。現状ではAKI-to-CKDへの移行を阻止するための治療法は確立されていない。今回我々は、世界で初めてメサンギウム細胞がBregとして機能していることを見出した。今後はメサンギウム細胞のBregとしての機能解析と治療応用を考えており、新規治療ターゲットとして研究を進展させることは、社会的にも大変意義があることと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether IL-10-expressed Breg is associated with the pathogenesis of AKI-to-CKD in re-perfusion-induced AKI model IL-10GFP mice. We found that in this AKI model, IL-10 expression was time-dependently decreased in the glomeruli and increased in the renal medulla by IR. Decrease in IL-10 expression in the glomeruli occurred before the progression to glomerulosclerosis in this AKI model. To identify the existence of Breg in the kidney, we stained with CD19, as a B cell marker, and we found the colocalization of IL-10 and CD19 in the mesangial area of the glomeruli. These expression was also diminished by the IR. These findings suggest that mesangial cells might work as a Breg to inhibit the progression to CKD by IR-induced AKI. Breg in the glomeruli might be an important therapeutic target to prevent the progression of AKI-to-CKD.

研究分野：腎臓病

キーワード：AKI IL10 reperfusion Breg

### 1. 研究開始当初の背景

DKD や AKI-to-CKD における腎機能低下の主座は、final common pathway としての細胞浸潤、高度な線維化、尿管間質障害である[1]。近年様々な CKD 傷害抑制因子が同定されているものの、修復過程を制御する研究はなされていない。現在我々が着目している B 細胞性免疫が腎組織修復に深く関与している可能性を考えている。抗体産生能、抗原提示能や、種々のサイトカイン産生、T 細胞活性に関与する B 細胞の中にも、免疫を負に制御する B 細胞 (regulatory B cell: Breg) が存在すること、これら Breg が IL-10 産生による樹状細胞活性化により組織修復にあたること[2]、IKK などのシグナル伝達が重要であること[3]などが判明した。IL-10 産生制御性 Breg は様々な自己免疫疾患モデルにおいて疾患の発症進展抑制に関わっている可能性がある。

### 2. 研究の目的

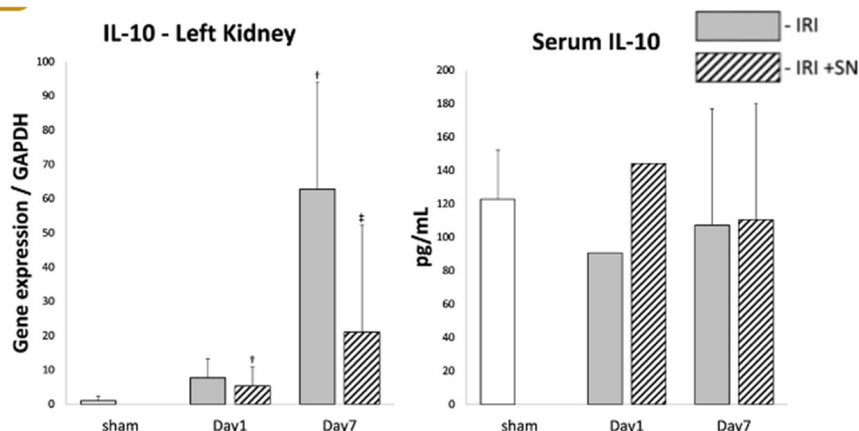
以上の背景から、AKI-to-CKD 進展における修復過程に糸球体 Breg-IL-10 系がどのように関与するかについて検討を行うこととした。正常腎における Breg の存在の確認と、IL-10GFP マウスに IR を施し、AKI-to-CKD における Breg の役割について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

IR モデル：10 週令の IL-10 GFP マウスの右腎を摘出し、左腎動脈を 45 分間駆血後再灌流させ、day1, day7, day14, day28 にて sacrifice を行った。もう一つのモデルとして、右腎を摘出しない IR モデルも作成した。また、Breg の起源を検討するために脾臓摘出を施行した。その後、腎臓における各々の IL-10 発現を GFP にて確認し、Breg-IL-10 系が positive となる部位を探索した。IR マウス、コントロールマウス(各々n=5)を作製した。同様に腎障害の程度を、血液学的検査、尿アルブミン測定、線維化(Masson-Trichrome 染色)にて確認した。

### 4. 研究成果

当初、半腎摘モデルにて検討を行ったが、その後のマウスの死亡率が高率であったため断念し、半腎摘を行わずに IR を行うモデルにて結果を解析することとした。IL-10-GFP マウスを用いて IRI における IL-10、Breg の役割を検討した。AKI モデルは、半腎摘では腎機能に影響を及さな



かったが、尿管障害マーカーの上昇が見られ、day7 にて線維化が確認された。さらに腎臓において IRI により IL-10mRNA レベルは数十倍に増加し、脾臓摘出にて軽減した。IR

による反応性 IL-10 上昇は脾臓由来の Breg によるものが考えられた。しかしながら、免疫染色や western blotting 法にて IL-10 蛋白発現が全く detect されず、遺伝子レベルでは動いてい

ることは確認できたが微量な IL-10 蛋白発現が故に、その組織蛋白発現や動態を詳細に解明することができなかった。そこで IL-10-GFP マウスにおいて GFP 抗体による蛍光免疫染色を用いて詳細に IL-10 の発現を検討したところ、確かに髄質に染色性が増加していることを確認し得た。IRI によって髄質を中心に GFP 陽性細胞が誘導された。Breg の起源は現在のところ定かではないものの、IRI による急性の尿細管障害を受けて組織修復的にリクルートされることが示唆される。しかしながら、偶然にも正常状態では IL-10 が糸球体に dominant に強く発現していることを発見した。つまり、IL-10 蛋白は糸球体に dominant に恒常的に発現し、メサンギウム細胞において糸球体の圧調節や線維化抑制を担っている可能性が示唆される。IRI によってメサンギウム細胞の IL-10 発現減弱が day7 にて初めて示されたことから、IRI において尿細管-糸球体連関が存在し、糸球体 IL-10 発現減弱がのちの糸球体硬化に関与している可能性が考えられる。これまでの国内外の研究では IL-10 の腎臓における発現を正確に評価されておらず、我々の IL-10-GFP マウスは今後の IL-10 研究において break through を引き起こす可能性がある。以上より、AKI-to-CKD 進展に IL-10-Breg 系を中心とした組織修復過程が重要であり、糸球体硬化進展や傷害尿細管の修復の一端を担っている可能性が考えられる。これらの結果をもとに、Breg の局在を確認するために、CD19、IL-10 との共染色を行った。その結果、メサンギウム細胞の領域に共染色が確認され、メサンギウム細胞が Breg 様の作用を糸球体内にて発揮している可能性が示唆されている。さらに AKI を惹起すると、IL-10 の糸球体内発現が有意に低下することから、メサンギウム細胞における Breg としての作用が AKI にて減弱し、AKI-to-CKD をもたらず進展機序に Breg 作用不全が挙げられる。今後はこれら新規に発見された現象をターゲットとした新規治療開発を行う予定である。

## 引用文献

1. Franzin R, Stasi A, Fiorentino M, Stallone G, Cantaluppi V, Gesualdo L et al. Inflammaging and Complement System: A Link Between Acute Kidney Injury and Chronic Graft Damage. *Front Immunol.* 2020;11:734. doi:10.3389/fimmu.2020.00734.
2. Long W, Zhang H, Yuan W, Lan G, Lin Z, Peng L et al. The Role of Regulatory B cells in Kidney Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:683926. doi:10.3389/fimmu.2021.683926.
3. Wan X, Hou LJ, Zhang LY, Huang WJ, Liu L, Zhang Q et al. IKK $\alpha$  is involved in kidney recovery and regeneration of acute ischemia/reperfusion injury in mice through IL10-producing regulatory T cells. *Dis Model Mech.* 2015;8(7):733-42. doi:10.1242/dmm.018200.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 12件）

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 横田祐之介、深水 圭
2. 発表標題 腎虚血再灌流傷害における調節サイトカインIL-10の産生について
3. 学会等名 日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 横田祐之介、深水 圭
2. 発表標題 腎虚血再灌流傷害モデルにおける調節性サイトカインIL-10誘導
3. 学会等名 横田祐之介
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yunosuke Yokota, Kei Fukami
2. 発表標題 Production of the regulatory cytokine IL-10 in renal ischemia-reperfusion injury
3. 学会等名 World congress of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計4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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------