

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590952

研究課題名（和文）心腎連関機序：新規骨髄由来細胞の関与とその臨床評価システムの構築

研究課題名（英文）Possible involvement of CD45<sup>+</sup>/collagen I<sup>+</sup> dual positive cells in renal fibrosis and cardiorenal syndrome.

研究代表者

和田 隆志 (WADA TAKASHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40334784

研究成果の概要（和文）：

CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞に着目し、腎間質線維化ならびに心線維化を中心とした心腎連関への関与を検討した。この線維化を基盤とする心腎連関モデルの作成により、CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の心ならびに腎の線維化への関与が示唆された。また、臨床的に線維化を反映する臨床検査診断法の確立への期待は強い。今回、CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の測定系が樹立され、今後、臨床上の有用性を検討していきたい。

研究成果の概要（英文）：

CD45<sup>+</sup>/Collagen I<sup>+</sup> dual positive cells migrate into fibrotic kidney dependent on chemokine system, which may promote and escalate chronic inflammatory processes and possible interaction with resident stromal cells, thereby perpetuating renal fibrosis. In addition, our present data suggest the possible involvement of CD45<sup>+</sup>/Collagen I<sup>+</sup> dual positive cells in cardiac fibrosis, closely related to renal lesions. Furthermore, the detection of CD45<sup>+</sup>/Collagen I<sup>+</sup> dual positive cells in circulation has been established in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：炎症、免疫担当細胞、CD45、心臓病、腎臓病、線維化、コラーゲン、臨床検査診断

## 1. 研究開始当初の背景

末期腎不全による透析患者は国内外で増加の一途を辿っている。このうち、慢性炎症を基盤とした腎間質線維化は、腎不全に至る進

行性腎臓病の共通進展機序である。腎間質線維化は、腎固有細胞、骨髄由来細胞といった細胞成分とケモカイン/サイトカイン、増殖因子といった生理活性物質などが複雑なネットワークを形成しながら進展する。しかし

ながら、臨床上いまだ有効な治療法は確立していない。一方、腎臓は生体適応を調節する重要な臓器である。生体では未病から疾病の発症・進展に至るまで、腎臓と関連する様々な生体適応調節機構の関与が推測される。実際、腎臓病の進展に伴い、心血管病変が生じ、生命予後に影響を与える（心腎連関）。しかしながら、腎間質線維化ならびに腎臓病に伴う心血管病変の進展機序いわゆる心腎連関の詳細は不明である。そのため、その機序を解明し、治療戦略を構築すること、また臨床上簡便な評価システムを確立し、モニタリングをすることは医学的、社会的、医療経済上も重要な課題である。

これまで、ケモカインを介した炎症・免疫担当細胞が腎臓病、ことに急性期の好中球浸潤と蛋白尿に深く関与すること (J Exp Med 1994) を明らかにして以来、炎症・免疫担当細胞と腎臓病の発症・進展との関連を検討してきた。腎線維化ではマクロファージに代表される炎症・免疫担当細胞のケモカインを介した腎局所への浸潤と活性化が発症・進展に重要と考えられている。これまで、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 は、単球・マクロファージを介して病因を問わない共通の腎線維化進展因子であることを報告した (FASEB J 1996、J Leukoc Biol 1998、Kidney Int 1996、2000)。加えて進行性腎線維化モデルに対し MCP-1 とその受容体 CCR2 を阻害したところ腎機能保持効果、線維化改善を確認した (FASEB J 1996、J Am Soc Nephrol 2003、2004、Am J Pathol 2004)。MCP-1/CCR2 に代表されるケモカインの発現ならびに受容体のシグナル伝達に重要な p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) 阻害薬を用いることにより、炎症・免疫担当細胞を抑制し、腎線維化の進展抑制効果を示してきた (J Am Soc Nephrol 2000、2003、Am J Kidney Dis 2001)。さらに、進行性のヒト糖尿病性腎症、半月体形成性腎炎にも p38MAPK 活性化はケモカイン、炎症・免疫担当細胞を介して病態に深く関与することを報告してきた (Nephrol Dial Transplant 2002、Am J

Kidney Dis 2005)。

本研究では、腎間質線維化において、これまでの単球・マクロファージに加えて、新規の骨髄由来炎症・免疫担当細胞である CD45/I 型 コラーゲン二重陽性細胞（別名 fibrocyte）に着目した。腎間質線維化の過程において、骨髄、血液内にある CD45/I 型 コラーゲン二重陽性の mesenchymal progenitor cell と推測されている細胞は、ケモカインである CCL21/CCR7 システムを介してマウス腎間質線維化に関与することを明らかにしてきた (PNAS 2006、Kidney Int 2007)。本研究において、腎臓病と心血管病変とをつなぐ共通進展機序に CD45/I 型 コラーゲン二重陽性細胞が関与するという仮説をたてた。この CD45/I 型 コラーゲン二重陽性細胞は骨髄由来と推測され、血中に存在することより測定が可能であると考えられる。そこで、簡便な臨床評価システムを構築し、腎臓病やそれに由来する心血管病変の臨床モニタリングシステムの基盤構築もあわせて検討した。

## 2. 研究の目的

現在、血液浄化療法を余儀なくされる腎不全例は増加の一途で 29 万人となり、人口比では世界最大である。さらに、慢性腎臓病は末期腎不全の予備軍であるばかりでなく、心血管病の独立した危険因子であることも近年明らかとなり、心腎連関としても注目されている。したがって、慢性腎臓病例において、腎不全への進行抑制は腎機能の保持にとどまらず、生命予後の改善に重要な意味を持つ。

腎間質線維化は腎臓病の予後規定因子である。したがって、腎間質線維化成立において、細胞基盤、分子基盤の解明は重要な課題である。しかしながら、腎臓病ことに腎間質線維化自体ならびにその過程で生じる心腎連関の詳細な機序は不明である。本研究では、これまでの研究結果をさらに発展させ、CD45/I 型 コラーゲン二重陽性細胞が、生命予後に深く関与する心血管病変の病態における関与

を理解し、臨床検査診断法の標的としての可能性を明らかにするものである。これらの知見は腎臓病の予後規定因子である腎間質線維化ならびに心血管病変の病態、治療ならびに臨床上有用なバイオマーカーを考える上で重要な意味をもつものと考えられる。さらに、これまで、腎間質線維化における CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の役割は十分に評価されておらず、炎症・免疫機序と線維化機序を橋渡しする新規機序である可能性がある。現在、治療に難渋している進行性腎障害の共通進展経路である腎間質線維化ならびに心腎連関の臨床的な有用なバイオマーカーの可能性が示されれば腎臓病、心臓病への多面的な臨床応用が可能である。

### 3. 研究の方法

#### 1) CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の心線維化への関与

本研究では、①腎臓病により心線維化が増悪する、線維化機序からみたいわゆる心腎連関モデルの確立、②このモデルを用いた CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の心腎連関における関与について検討した。

##### ① 心腎連関モデルの確立

これまで心線維化が生じることが報告されているアンジオテンシン II 持続全身投与を行ったマウスに対して、腎線維化モデルを追加作成し心臓病変への影響を検討した。すなわち、B6 マウスに浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシン II 持続全身投与を行った。同時に腎間質線維化モデルである一側尿管結紮術（以下 UUO）を行い、血圧測定を行ったのちに、14 日後に屠殺し心臓病変の評価を行った。

##### ② CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の心腎連関における関与

心腎連関機序における CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の役割を検討する目的で、腎線維化時に心への CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の動態を検討した。本研究において確

立したマウス心腎連関モデルを 8 週雄性 NOD. CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J マウスに作成した。次に、PKH26 標識ヒト CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞をマウスに尾静注した。UUO 施行後 14 日目に屠殺し、心組織における PKH26 陽性細胞数を検討した。

#### 2) CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の臨床検査診断法への応用：線維化を反映するバイオマーカーの可能性の検討

腎はじめ臓器の線維化は病因を問わず臓器不全に至る共通進展機序である。したがって、臓器線維化の早期診断とその治療の確立が臓器不全への進展阻止を考える上で重要である。しかしながら、各臓器線維化を正確、迅速および簡便に評価する測定系はこれまでなかった。そこで、骨髄由来の白血球系細胞である CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞に着目し、血液中の CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞を同定・計測する臨床評価システムの基盤構築を検討した。

### 4. 研究成果

#### 1) CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の心線維化への関与

##### ① 心腎連関モデルの確立

本モデルを作成した結果、収縮期血圧はアンジオテンシン II 持続投与群（A II）147.3mmHg およびアンジオテンシン II 持続投与＋一側尿管結紮群（A II + UUO）152.3mmHg でコントロール群（CON）105mmHg、一側尿管結紮群（UUO）125.7mmHg に比し高値であったが、A II と A II + UUO 間では差を認めなかった。心重量、Azan 染色で青染する線維化面積を画像解析ソフトを用いて検討した結果、心重量、心間質線維化面積および心内 TGF- $\beta$  発現は A II および A II + UUO で CON、UUO に比し高値であり、かつ A II + UUO で A II に比し高値であった。さらに、ハイドロキシプロリンにて線維化の定量評価を行ったところ、心間質線維化

面積と相関して増加が確認された。以上より、心線維化を基盤とし、腎間質線維化を追加することで、線維化を基盤とした心腎連関モデルが作成しえたと考えている。

## ② CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の心腎連関における関与

心組織を用いた免疫組織染色にて、CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞は心間質を中心に浸潤を認めた。CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞浸潤数は心間質線維化の程度と一致して、AII および AII + UUO で CON、UUO に比し高値であり、かつ AII + UUO で AII に比し高値であった。さらに心内 CCL2 (CCR2 リガンド) および CCL21 (CCR7 リガンド) 発現は AII および AII + UUO で CON、UUO に比し高値であり、かつ AII + UUO で AII に比し高値であった。以上の結果より、腎障害ことに腎間質線維化を契機に、CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞はケモカイン・ケモカインレセプターシステムによる心への浸潤を介して心腎連関機序に関与することが示唆された。

さらに、UUO にアンジオテンシン II を投与した群において、少数ではあるが心における PKH26 陽性細胞がみられた。このことより、腎線維化を契機に、末梢血の CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞は心に浸潤し、線維化や炎症を介し心腎連関に関与する可能性がある。

## 2) CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の臨床検査診断法への応用：線維化を反映するバイオマーカーの可能性の検討

抗ヒト CD45 抗体および抗ヒト I 型コラーゲン抗体によるフローサイトメトリー法にて、血液中に二重陽性細胞が同定され、検出システムを構築しえた（特願：2010-281080、和田隆志 金子周一 坂井宣彦、平成 22 年 12 月 16 日、腎症の進行度の判定方法並びに線維化抑制剤）。この方法を用いて、同意を得た後、健常者ならびに線維化例に対して解析を進

めているところである。今後、腎臓病例において臨床的意義を検討する予定である。

なお、ヒト腎臓病の組織内での CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞のバイオマーカーとしての可能性についても検討した。ことに、再生検例では、ステロイド治療による疾患活動性の低下に一致して、間質内 CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞数は減少した。腎生検時の間質内 CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞数をモニタリングすることにより、腎機能ならびに治療効果を反映することが示唆され、腎内の CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞がバイオマーカーのひとつとなることが期待される。

今回、CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞に着目し、腎間質線維化ならびに心線維化を中心とした心腎連関への関与について検討を行った。この線維化を基盤とする心腎連関モデルの確立により、まだ不明な点が多い心腎の臓器間ネットワーク機構の解明につながる可能性がある。さらにその制御効果を検討することにより新規の治療ストラテジー構築も期待できる。また、臨床的に線維化を反映する臨床検査診断法の確立は喫緊の課題であり、有用なバイオマーカーへの期待は強い。今後、樹立した CD45/I 型コラーゲン二重陽性細胞の測定系の有用性を検討していきたいと考えている。

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 10 件)

- 1) Wada T, Sakai N, Sakai Y, Matsushima K, Kaneko S, Furuichi K.  
Involvement of bone-marrow-derived cells in kidney fibrosis. Clin Exp Nephrol. 15, 8-13, 2011, 査読有
- 2) Sakai N, Furuichi K, Shinozaki Y, Yamauchi H, Toyama T, Kitajima S, Okumura T, Kokubo S, Kobayashi M, Takasawa K, Takeda SI, Yoshimura M, Kaneko S, Wada T. Fibrocytes are involved in the pathogenesis of human chronic kidney disease. Hum Pathol. 41, 672-678, 2010, 査読有
- 3) Iwata Y, Furuichi K, Kitagawa K, Hara A, Okumura T, Kokubo S, Shimizu K, Sakai N, Sagara A, Kurokawa Y, Ueha S, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Involvement of CD11b(+) GR-1 (low) cells in autoimmune disorder in MRL-*Fas*<sup>lpr</sup> mouse. Clin Exp Nephrol. 14, 411-417, 2010, 査読有
- 4) Furuichi K, Kaneko S, Wada T. Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 13, 9-14, 2009, 査読有
- 5) Iwata Y, Furuichi K, Sakai N, Yamauchi H, Shinozaki Y, Zhou H, Kurokawa Y, Toyama T, Kitajima S, Okumura T, Yamada S, Maruyama I, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Dendritic cells contribute to autoimmune kidney injury in MRL-*Fas*<sup>lpr</sup> mice. J Rheumatol. 36, 306-314, 2009, 査読有
- 6) Sakai N, Wada T, Iwai M, Horiuchi M, Matsushima K, Kaneko S. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. J Hypertens. 26, 780-790, 2008, 査読有
- 7) Furuichi K, Wada T, Kitajima S, Toyama T, Okumura T, Hara A, Kawachi H, Shimizu F, Sugaya T, Mukaida N, Narumi S, Matsushima K, Kaneko S. IFN-inducible Protein 10 (CXCL10) Regulates Tubular Cell Proliferation in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. Nephron Exp Nephrol. 109, c29-38, 2008, 査読有
- 8) Wada T, Matsushima K, Kaneko S: The role of chemokines in glomerulonephritis. Frontiers in Bioscience 13, 3966-3974, 2008, 査読有
- 9) Furuichi K, Wada T, Kaneko S, Murphy PM. Roles of chemokines in renal ischemia reperfusion injury. Frontiers in Bioscience 13, 4021-4028, 2008, 査読有
- 10) Sakai N, Wada T, Matsushima K, Kaneko S. Fibrocyte: New participant in the pathogenesis of renal fibrosis. Inflammation and regeneration 28, 20-26, 2008, 査読無

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 和田 隆志, 腎線維化にはたす骨髄由来細胞の意義, 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- 2) 和田 隆志, 慢性腎臓病と炎症・免疫担当細胞, 第 71 回日本小児科学会沖縄地方会, 2010 年 9 月 12 日, 沖縄県医師会館 (沖縄県)

- 3) 和田 隆志, 腎間質線維化と骨髄由来細胞, 第 53 回日本腎臓学会学術総会, 2010 年 6 月 17 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- 4) 和田 隆志, 炎症と腎線維化, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 23 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- 5) 和田 隆志, 腎臓病における臨床検査の展望, 第 20 回日本臨床化学会東海北陸支部総会, 2009 年 8 月 8 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
- 6) Takashi Wada, Fibrocyte and Renal Injury, 41st Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2008 年 11 月 6 日, フィラデルフィア (米国)
- 7) 和田 隆志, 腎間質線維化: 骨髄由来細胞の関与とその制御, 第 38 回日本腎臓学会東部学術大会, 2008 年 10 月 12 日, 六本木アカデミーヒルズ 40 (東京都)
- 8) 和田 隆志, 骨髄由来細胞からみた腎臓線維化機構, 第 49 回日本組織細胞化学会総会学術集会, 2008 年 10 月 5 日, 長崎大学 (長崎県)

[図書] (計 1 件)

- 1) Sakai N, Furuichi K, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Fibrocytes in renal Fibrosis, World Scientific Press, in press

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 腎症の進行度の判定方法並びに線維化抑制剤

発明者: 和田 隆志 金子周一 坂井宣彦

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願:2010-281080

出願年月日: 平成 22 年 12 月 16 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 隆志 (WADA TAKASHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 40334784