

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17273

研究課題名(和文)腎線維化の免疫学的メカニズムの解明

研究課題名(英文)Investigation of Immunological Mechanisms of Renal Fibrosis

研究代表者

渡辺 光治 (Watanabe, Mitsuharu)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40865052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎線維化の進展にはマクロファージ(M₁)などの免疫系細胞が関与するとされているが詳細は明らかでない。そこで我々は腎線維化を自然発症するShp1^{CKO}マウスの腎臓をフローサイトメトリーで解析した。その結果、Shp1^{CKO}の線維化腎ではF4/80^{high}M₁が著増しており、このM₁は線維化マーカーであるVimentinを高発現し、増殖能が亢進していた。さらにはShp1^{CKO}の腎F4/80^{high}M₁ではShp1が欠損しており、M-CSFシグナルが亢進していた。以上より、Shp1は腎F4/80^{high}M₁のM-CSFシグナルを負に制御し、腎の線維化を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Shp1は腎F4/80^{high}M₁のM-CSFシグナルを負に制御し、腎の線維化を抑制する可能性が示された。これらの事実は、F4/80^{high}M₁、Shp1、M-CSFといった分子・細胞が腎線維化におけるkey playerである可能性を示している。腎線維化の免疫学的メカニズム解明のため重要な知見であると考えられ、さらには、これらをターゲットにした腎線維化における新規治療法の開発につながる可能性を示したと思われる。

研究成果の概要(英文)：Immune cells such as macrophages (M₁) are thought to be involved in developing renal fibrosis, but the details are unclear. Therefore, we analyzed the kidneys of Shp1^{CKO} mice, which spontaneously develop renal fibrosis, by flow cytometry. We found that F4/80^{high}M₁s were significantly increased in the fibrotic kidneys of Shp1^{CKO} mice, and these M₁s expressed high levels of the fibrosis marker Vimentin and had high proliferative potential. Furthermore, renal F4/80^{high}M₁s with Shp1^{CKO} lacked Shp1 and showed enhanced M-CSF signaling. These results suggest that Shp1 negatively regulates M-CSF signaling in renal F4/80^{high}M₁s and suppresses renal fibrosis.

研究分野：免疫学、腎臓病学

キーワード：腎線維化 マクロファージ Shp1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎の線維化の進展にはマクロファージ (M ϕ) などの免疫系細胞が関与するといった知見が得られているが依然として詳細は明らかでない。我々はこれまでにフローサイトメトリー (FCM) を用いた腎内 M ϕ の解析法を確立し、腎臓内の炎症細胞を詳細に解析している。そして、正常マウスの腎内には M ϕ マーカーである F4/80 を高発現し、樹状細胞のマーカーである CD11c を発現するマクロファージが多数存在することを見出している。また、抑制性のシグナル伝達分子であるチロシン脱リン酸化酵素 Shp1 を CD11c 特異的に欠損するコンディショナルノックアウトマウス (Shp1 CKO) を用いた腎臓の解析において、Shp1 CKO は加齢に伴い腎臓内に浸潤する F4/80^{high} M ϕ が著増し、腎の線維化が亢進する事実を見出している。本研究課題においては Shp1 CKO を用いて、腎臓内 M ϕ の活性化と腎の線維化の亢進に焦点をあてて解析を行い、腎線維化の免疫学的メカニズムの解明と新規治療法の可能性を探索した。

2. 研究の目的

本研究課題では、腎内 M ϕ が腎の線維化に関与することの直接的な証明を目指した。また、その分子レベルの機序解明を目標とした。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスを用いて腎臓内の免疫細胞を FCM で解析する手法を確立した。そして Shp1 CKO の腎を FCM 法で解析し、Shp1 CKO の線維化腎における免疫細胞の特徴を解析した。細胞内に発現する分子やサイトカインの定量解析においては、細胞内 FCM 法を用いた。また、腎線維芽細胞など、非血球系細胞の解析も FCM 法を応用して行なった。

4. 研究成果

(1) Shp1 CKO の腎病変の特徴・組織学的解析

Shp1 CKO の血液所見、尿所見を経時的に測定した。Shp1 CKO は加齢に伴い 60 週齢で血清 Cr と BUN の有意な上昇を認めたと、いずれの週齢においても尿中アルブミンは認めなかった。組織学的な解析では、Shp1 CKO は、40 週齢で重度の増殖性糸球体腎炎と尿細管間質性腎炎の所見を認めた。CD34 による内皮細胞の染色では、Shp1 CKO の腎では内皮細胞の外側への偏位を認めており、メサンギウム領域の拡大が示唆された。蛍光組織染色では IgG、IgA、C3c の糸球体への沈着を認めた。次に、腎浸潤細胞を同定するため、免疫細胞の表面マーカーを用いて、免疫組織化学による解析を行った。その結果、Shp1 CKO では、白血球マーカーである CD45 の陽性細胞が糸球体・尿細管間質に多く浸潤していた。特に CD11c、F4/80、CD4 陽性細胞の尿細管間質への高度な集簇を認めた。CD8、B220、Gr1 陽性細胞においては、コントロール (Ctrl) と比べ軽度の増加を認めた。以上の結果から、Shp1 CKO は加齢に伴い、腎機能障害を来することが証明された。組織学的には増殖性糸球体腎炎と尿細管間質性腎炎を認めたが、アルブミン尿がなかったことから、尿細管間質性腎炎による腎障害が主体と考えられた。CD11c、F4/80、CD4 陽性細胞の著明な集簇を認めており、これらの細胞の腎障害への関与が示唆された。

(2) Shp1 CKO の腎浸潤細胞の免疫学的解析

腎に浸潤した免疫細胞を定量的に解析するために、腎臓の FCM 解析を行った。40 週齢の Shp1 CKO の腎臓内では、ほぼすべての免疫細胞の増加を認めたと、とりわけ CD11c、CD11b、F4/80、CD4 陽性細胞の増加が顕著であった。これらの結果は組織染色の結果と一致していた。CD11c、CD11b、F4/80 の多重染色の FCM 解析を行ったところ、Shp1 CKO では F4/80^{high} M ϕ の著明な増加を認め、これらは CD11b⁺CD11c^{int~+} であることが示された。Shp1 CKO で著増していた F4/80^{high} M ϕ は CD11c を発現していたため、Shp1 がノックアウトされているか、細胞内 FCM 解析を用いて確認したところ、Shp1 の発現が有意に低下していた。そこで F4/80^{high} M ϕ に着目し、免疫学的な特徴の解析を行った。その結果、Shp1 CKO の F4/80^{high} M ϕ では CD11b の発現の上昇を認めた。また、これらの細胞では、Shp1 CKO において、MHC- の発現低下と、CD86、CX3CR1、CCR5 の発現上昇を認めた。次に F4/80^{high} M ϕ の増殖とサイトカイン産生について調べた。Shp1 CKO の F4/80^{high} M ϕ は Ctrl に比べ、Ki-67 の陽性率が高かったが、Annexin の陽性率に差はなかった。このことは Shp1 CKO の F4/80^{high} M ϕ では増殖が亢進しており、アポトーシスには変化がなかったことを示していた。またサイトカイン/ケモカイン産生能を、細胞内 FCM 解析にて調べたところ、Shp1 CKO の F4/80^{high} M ϕ では IL-6、TNF の産生亢進を認めた。これらの結果から、Shp1 CKO の腎では加齢に伴い Shp1 が欠損した F4/80^{high} M ϕ が顕著に増加しており、これらの細胞では増殖能と炎症性サイトカイン産生能が亢進していることが証明された。

一方、Shp1 CKO の腎臓内で増加していたもう一種類の免疫細胞である CD4⁺ T 細胞に対し解析を行った。Shp1 CKO の腎臓内 CD4⁺ T 細胞は CD62^{low}CD44^{high} の memory phenotype を持ったものが

Ctrl より多かった。また Shp1 CKO の CD4⁺ T 細胞は活性化マーカーである CD69 の陽性率が高かった。Shp1 CKO の腎 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生能を調べたところ、Ctrl の脾臓 CD4⁺ T 細胞に比べ IFN と IL-10 の産生能が高かった。また、Shp1 CKO の脾臓 CD4⁺ T 細胞に比べ IL-17 産生能が高かった。これら T 細胞において、TCR repertoire を調べたが、特に有意な偏りは認めなかった。これらの結果は、Shp1 CKO の腎 CD4⁺ T 細胞は、Activated/memory Th1 細胞が主体である事を示した。

(3) Shp1 CKO の腎 F4/80^{high} M と腎線維化との関連についての解析

Shp1 CKO は尿細管間質性腎炎を発症し、加齢とともに腎機能障害が進行する経過であり、慢性腎臓病 (CKD) の経過に似ていると考えられた。そのため、次に我々は Shp1 CKO の腎線維化について評価した。Masson 's Trichrome 染色では、Shp1 CKO は 40 週齢で有意な腎線維化領域の拡大を認めた。EVG 染色においても、同様の結果を認めた。線維化マーカーである Collagen 、 Vimentin、 α -SMA の免疫組織染色では、40 週齢の Shp1 CKO の尿細管間質で、Ctrl に比べ陽性領域の増加傾向を認めた。そこで、Vimentin と α -SMA の陽性細胞の同定と定量を、FCM を用いて行った。結果、Shp1 CKO の腎では、Vimentin 陽性細胞数の有意な増加を認め、Vimentin 陽性細胞は F4/80^{high} M において著増しており、一方で CD45.2 陰性細胞 (非血球系細胞) においては増加を認めなかった。 α -SMA の FCM 解析においても同様の結果を認めた。線維芽細胞のマーカーである CD73、ER-TR7、PDGFR2b の FCM 解析を行ったところ、これらのマーカーが陽性の細胞は有意な増加はなかった。これらの結果は、Shp1 CKO では腎線維化が進行し、Vimentin 等の線維化マーカーが陽性となる細胞は、腎線維芽細胞ではなく、F4/80^{high} M が主体であることを示唆した。

(4) Shp1 CKO における腎 F4/80^{high} M の制御メカニズムの解析

最後に我々は、Shp1 の F4/80^{high} M に対する制御メカニズムを探索した。Shp1 CKO では Shp1 が欠損した F4/80^{high} M が著増していた。F4/80^{high} M の分化・維持は macrophage colony stimulating factor (M-CSF) に依存していることが報告されている。また、Shp1 は bone marrow-derived macrophages において、M-CSF シグナルを負に制御していることも報告されている。よって、我々は、腎の F4/80^{high} M においても、Shp1 は M-CSF の制御に関与していると予測した。そこで、M-CSF 刺激に対する腎 F4/80^{high} M のチロシンリン酸化レベルを、intracellular Phospho-Flow cytometry を用いて解析した。その結果、Shp1 CKO の腎 F4/80^{high} M では、M-CSF 刺激による P-Tyr-1000 (pan-phosphotyrosine) と phospho-M-CSF receptor の発現上昇を認めた。また、Shp1 CKO の腎 F4/80^{high} M は、M-CSF 刺激にて BrdU 陽性比率の有意な増加を認めた。これらの結果は、腎臓内 F4/80^{high} M において、Shp1 は M-CSF シグナルを負に制御することで、増殖を制御していることを示唆した。

(結論)

Shp1 は腎 F4/80^{high} M の M-CSF シグナルを負に制御し、腎の線維化を抑制する可能性が示された。これらの事実は腎線維化における新規治療法開発の可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M. Kinoshita, Y. Kaneko, M. Watanabe, Y. Imai, S. Shrestha, J. Suwa, Y. Ohishi, H. Hamatani, M. Nakasatomi, T. Sakairi, H. Ikeuchi, Y. Nojima, K. Hiromura.
2. 発表標題 CD11C-SPECIFIC ABLATION OF SHP1 INDUCES AUTOIMMUNE SIALADENITIS SIMILAR TO SJOGREN'S SYNDROME
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 諏訪絢也, 金子和光, 渡辺光治, 今井陽一, Shrestha Shreya, 木下雅人, 大石裕子, 中里見征央, 浜谷博子, 坂入徹, 池内秀和, 廣村桂樹
2. 発表標題 腎虚血再灌流によりMSR1を高発現したマクロファージが増加する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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