

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17424

研究課題名（和文）ループス腎炎の増殖性病変とワイヤーループ病変におけるケモカインの関与

研究課題名（英文）Impact of chemokine on endocapillary proliferative lesions and wire-loop lesions in lupus nephritis

研究代表者

藏島 乾（Zoshima, Takeshi）

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任助教

研究者番号：00632506

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：ループス腎炎モデルであるMRL/lprマウス由来の腎炎原性モノクローナルIgG3産生ハイブリドーマを野生型マウスに投与し、管内細胞増多病変とワイヤーループ病変を個別に形成した。前者は後者よりCCL2、CCL3、CCR2、CCR5、CX3CR1の発現が亢進し、糸球体に浸潤したマクロファージが主にこれらを発現していた。このハイブリドーマと、ケモカイン受容体欠損マウスや選択的CCR5阻害薬のマラビロクを用いて、CCR5とCCR2が管内細胞増多病変の形成に関与し、特にCCR5が管内細胞増多病変の治療ターゲットとなりうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ループス腎炎において糸球体管内細胞増多病変とワイヤーループ病変は代表的な腎病理学的病変である。既存のモデルではこれらの病変は同時に出現するため、各病変を形成する各々の病態は十分検討されていなかった。本研究では、各病変を個別に再現するモデルを用いて、各病変におけるケモカイン受容体の関与と、その治療ターゲットとしての有効性を明らかにした。本研究により、日常診療で得られるヒトループス腎炎の腎病理所見をもとに病態を判定し、ステロイド治療に代わる、病態に応じた最適の治療法を選択する個別化医療につながりうる。

研究成果の概要（英文）：MRL/lpr mouse-derived monoclonal IgG3 antibody-producing hybridomas, 2B11.3 and B1, were injected into wild type mice to induce glomerular endocapillary hypercellularity and wire-loop lesions, respectively. The former had enhanced expression of CCL2, CCL3, CCR2, CCR5, and CX3CR1 than the latter. It was mainly glomerular macrophages that expressed them in endocapillary hypercellularity. Using chemokine receptor-deficient mice or a selective CCR5 antagonist, maraviroc, we showed that CCR2 and CCR5 regulated glomerular macrophage infiltration and contributed to the development of glomerular endocapillary hypercellularity, and that CCR5 inhibition could be a specific therapy for endocapillary hypercellularity in lupus nephritis.

研究分野：リウマチ・膠原病内科、腎臓内科、免疫学

キーワード：ループス腎炎 管内細胞増多病変 ワイヤーループ病変 ケモカイン ケモカイン受容体

1. 研究開始当初の背景

ループス腎炎 (LN) は全身性エリテマトーデス (SLE) の腎病変である。ループス腎炎は SLE の臓器障害の中で最も頻度が高く、今日の免疫抑制療法の進歩にもかかわらず 10~30% で末期腎不全に至る難治性疾患である [1]。SLE 例で LN が疑われた際には腎生検が推奨され、腎病理所見が診断と治療方針の決定に関与する [2]。病理学的に代表的な病変である管内細胞増多病変とワイヤーループ病変は両者とも免疫複合体と補体が沈着しているが、前者は炎症細胞浸潤が多く、後者は少ない [3]。免疫複合体や補体が沈着しているにもかかわらず炎症細胞浸潤の程度が異なり、異なる病変を形成する機序は明らかではない。また、管内増殖性病変とワイヤーループ病変は活動性病変として、ステロイドを中心とした画一的な免疫抑制療法が推奨されているが [2]、長期のステロイド投与による副作用が問題になっている。そのため、各病変を形成する病態に応じた、ステロイドに代わる最適な新規治療を開発する必要があり、各病態の解明が必要である。

LN ではケモカイン・ケモカイン受容体によって誘導される単球・マクロファージの病態への関与が報告されている。LN のモデルマウスにおいて、CCL2 や CCR2、CCR5、fractalkine などのケモカイン・ケモカイン受容体の阻害により、腎機能が改善する [4-7]。そのうち、CCR2 は単球・マクロファージの浸潤のみならず、T 細胞の活性化や自己抗体産生などにも関与している可能性が示唆されており、より病態に関与している可能性がある [4]。しかし、これらの報告で使用されている MRL/lpr マウスなどの LN モデルでは、管内細胞増多病変とワイヤーループ病変を含めた多彩な腎病変が混在しているため、ケモカイン・ケモカイン受容体が各病変に与えている特異的な影響は明らかではない。また、ケモカイン・ケモカイン受容体の治療ターゲットとしての有用性も十分検討されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、LN の代表的な病理学的活動性病変である増殖性病変とワイヤーループ病変におけるケモカイン・ケモカイン受容体の関与に着目し、各病変の病態の違いと、治療ターゲットとしての有効性を明らかにすることを研究目的とする。

LN の単一病変モデルでケモカイン・ケモカイン受容体の関与を検討することが、本研究が既報と異なる点である。LN においてケモカインの関与は報告されているが、各病変単独でのケモカインの病変への影響を検討した報告はこれまでにない。MRL/lpr マウスなどの LN モデルマウスは、管内増殖性病変やワイヤーループ病変などの多彩な病変が混在し、ヒトの病変と類似するため、多くの報告で使用されてきた。しかし、ひとつひとつの病変を個別に再現できないため、各病変を個別に検討することができなかった。本研究で使用する腎炎原性 IgG3 産生ハイブリドーマは単一病変を再現可能であり [8]、各病変に対するケモカイン・ケモカイン受容体の影響やその治療ターゲットとしての可能性を検討することができる。また、同ハイブリドーマを使用した報告は、B 細胞や T 細胞を欠いた SCID マウスを用いた E-selectin と fractalkine の検討に限られている [9-10]。本研究では BALB/c マウスを使用することで、B 細胞や T 細胞の存在する、よりヒト LN に近い生体環境において、単一病変モデルでケモカインの関与を検討できる。

本研究によって、病変ごとに特異的なケモカインを阻害する新規治療法の開発につながり、ステロイドに代わる LN の個別化医療の実現に寄与することが期待できると考えられる。

3. 研究の方法

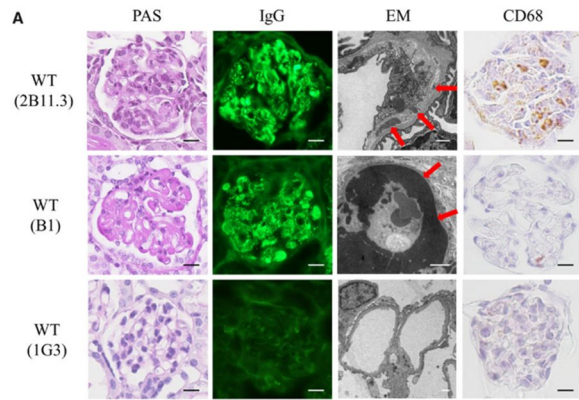
LN の管内細胞増多病変とワイヤーループ病変をそれぞれ単独で再現するため、腎炎原性モノクローナル抗体によるループス腎炎モデルを使用した。MRL/lpr マウスでは腎臓に IgG3 が主に沈着し、病原性があると考えられている [11]。Nose らは、MRL/lpr マウスの脾細胞と Balb/c マウス由来の NS-1 骨髄腫細胞を融合させたモノクローナル IgG3 産生ハイブリドーマを開発した [8]。このハイブリドーマを SCID マウスに腹腔内投与すると腎臓の糸球体に IgG3 を含む免疫複合体と補体が沈着する。3 種類あるハイブリドーマのうち、クローン「2B11.3」は増殖性病変のみ、クローン「7B6.8(B1)」はワイヤーループ病変のみを形成する。クローン「1G3」はマウスに生着するものの沈着わずか、病変を形成しない (コントロールとして使用する) [8]。

管内細胞増多病変とワイヤーループ病変を個別に再現するため、上記ハイブリドーマをそれぞれ BALB/c マウス (WT) に腹腔内投与した。糸球体に浸潤したマクロファージは免疫組織化学染色で検討した。ケモカイン・ケモカイン受容体の発現はリアルタイム定量 PCR 法と免疫蛍光染色法で評価した。ケモカイン・ケモカイン受容体の発現細胞は二重免疫蛍光法で検討した。さらに、ケモカイン受容体の各病変への関与を検討するため、ケモカイン受容体欠損マウス (CCR2 欠損マウス [12]、CCR5 欠損マウス [13]、CX3CR1 欠損マウス [14]) を用いた。治療効果を検討するため、選択的 CCR5 阻害薬のマラビロク [15] を用いた。

4. 研究成果

(1) WT における各病変の形成

WT にハイブリドーマ 2B11.3 を投与すると、系球体管内細胞増多病変のみを形成した。B1 を投与するとワイヤーループ病変のみを形成した。管内細胞増多病変とワイヤーループ病変ではともに系球体内皮下に免疫複合体の沈着を認めた。管内細胞増多病変には、系球体に CD68 陽性マクロファージがワイヤーループ病変よりも多く浸潤していた。1G3 は系球体病変を形成しなかった。(右図) これらの所見は、このハイブリドーマを SCID マウスに投与した際の病変 [8] と同様だった。



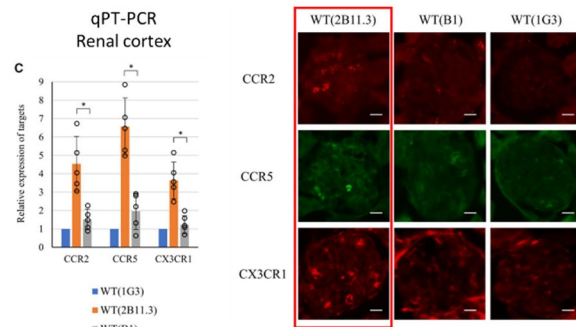
(2) 管内細胞増多病変におけるケモカイン受容体の発現

次に、2B11.3 による管内細胞増多病変におけるケモカイン受容体の発現を検討した。

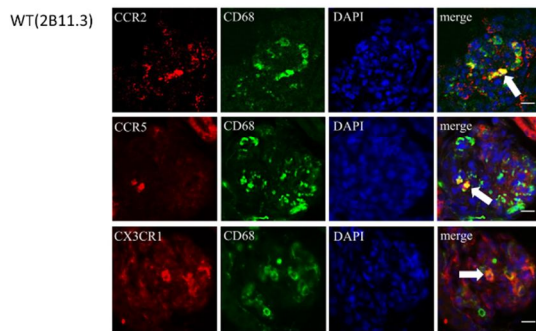
管内細胞増多病変は、ワイヤーループ病変より、CCR2、CCR5、CX3CR1 が多く発現していた (右図) 。

管内細胞増多病変では、CD68 陽性系球体マクロファージが CCR2、CCR5、CX3CR1 を発現し (左下図) CD31 陽性系球体内皮細胞は CCR2 を発現していた (右下図) 。

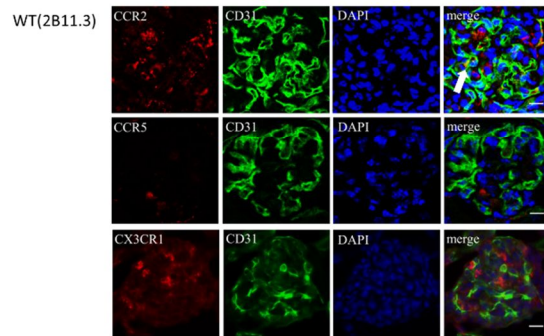
Chemokine receptors were upregulated in glomerular endocapillary hypercellularity



CD68-positive macrophages in glomerular endocapillary hypercellularity expressed CCR2, CCR5 and CX3CR1.



CD31-positive endothelial cells in glomerular endocapillary hypercellularity expressed CCR2, but not CCR5 or CX3CR1.



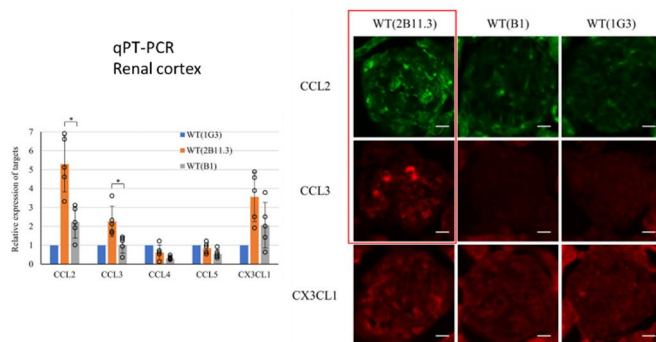
(3) 管内細胞増多病変におけるケモカインの発現

次に、これらのケモカイン受容体のリガンドの発現を検討した。

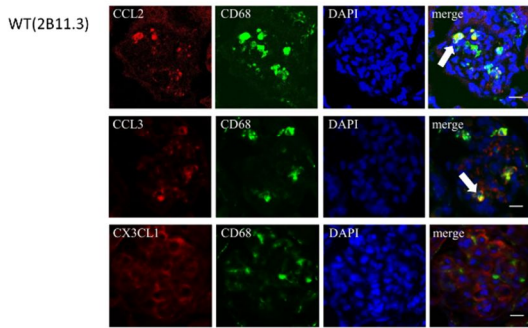
2B11.3 による管内細胞増多病変は、ワイヤーループ病変より、CCL2 と CCL3 が多く発現していた (右図) 。

管内細胞増多病変では、系球体マクロファージが CCL2 と CCL3 を発現し (左下図) 系球体内皮細胞は CCL2、CCL3、CXCL1 を発現していた (右下図) 。

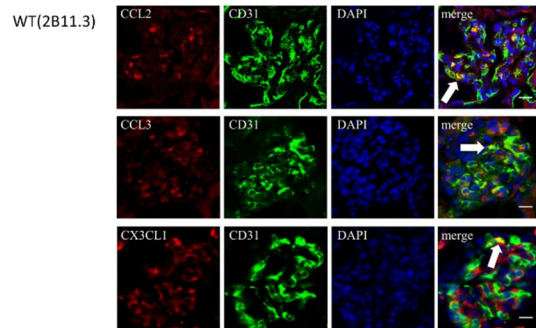
Chemokines, CCL2 and CCL3, were upregulated in glomerular endocapillary hypercellularity



CD68-positive macrophages in glomerular endocapillary hypercellularity expressed CCL2 and CCL3, but not CX3CL1.



CD31-positive endothelial cells in glomerular endocapillary hypercellularity expressed CCL2, CCL3 and CX3CL1.

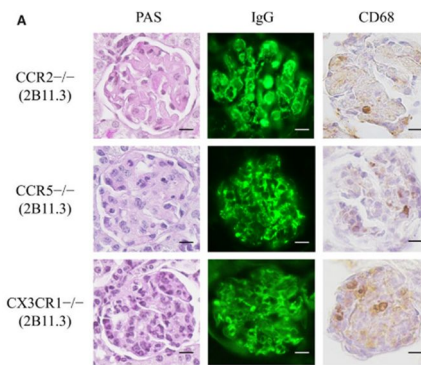


(4) ケモカイン受容体の病変形成への関与

ハイブリドーマ 2B11.3 をケモカイン受容体欠損マウスに投与すると、CCR2 欠損マウスと CCR5 欠損マウスでは、WT より管内細胞増多病変や糸球体浸潤マクロファージが減少し、血清 BUN 値が低下した。CCR2 欠損マウスではワイヤーループ病変を形成した。CX3CR1 欠損マウスでは腎病変や腎機能は WT と同等だった (右図)

一方、B1 をケモカイン受容体欠損マウスに投与しても、WT と同様のワイヤーループ病変を形成した。ワイヤーループ病変の形成にこれらのケモカイン受容体は関与していないと考えられた。

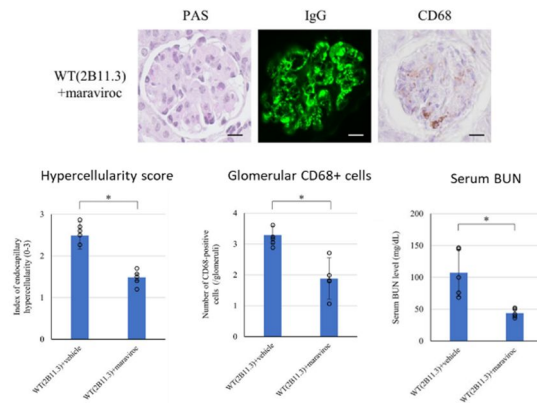
Effects of genetic ablation of a chemokine receptor on glomerular endocapillary hypercellularity



(5) CCR5 阻害薬の治療的効果

さらに、選択的 CCR5 阻害薬のマラビロクを、2B11.3 を投与した WT に経口投与すると、CCR5 欠損マウスの結果と同様に、管内細胞増多病変や糸球体浸潤マクロファージが減少し、血清 BUN 値の減少を認めた (右図)

Therapeutic effects of the CCR5 inhibitor maraviroc on glomerular endocapillary hypercellularity



(6) 結論

以上の結果より、CCR2 と CCR5 が糸球体マクロファージ浸潤や管内細胞増多病変の形成に関与していることが示された。さらに、薬物的な CCR5 阻害は管内細胞増多病変への特異的な治療法となりうることが示された。

Figure の一部は Zoshima T, et al. Rheumatology 2021 Epub から引用・改変した。

参考文献

- 1) Arthritis Rheum 2013;65:2154-60.
- 2) Ann Rheum Dis 2020;79:713-23.
- 3) Heptinstall's Pathology of the Kidney 7th edition, Lippincott Williams and Wilkins 2014:565-6.
- 4) J Am Soc Nephrol 2005;16:3592-601.
- 5) Am J Physiol Renal Physiol 2012;302:F1503-15.
- 6) Arthritis Rheum 2005;52:1522-33.
- 7) J Exp Med 1999;190:1813-24.
- 8) Am J Pathol 1993;143:1436-43.
- 9) Kidney Int 2004;65:1290-30.
- 10) Am J Physiol Renal Physiol 2010;299:F207-16.
- 11) J Immunol 1991;147:515-20.
- 12) Cancer Res 2009;69:7884-92.
- 13) J Exp Med 2013;210:2661-73.
- 14) J Leukoc Biol 2010;88:133-43.
- 15) N Engl J Med 2008;359:1429-41.

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 0件）

1. 著者名 Zoshima Takeshi, Baba Tomohisa, Tanabe Yamato, Ishida Yuko, Nakatani Kimihiko, Nagata Michio, Mukaida Naofumi, Kawano Mitsuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 CCR2- and CCR5-mediated macrophage infiltration contributes to glomerular endocapillary hypercellularity in antibody-induced lupus nephritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keab825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takeshi Zoshima and Mitsuhiro Kawano
2. 発表標題 Crucial involvement of macrophage infiltration regulated by chemokine receptors, CCR2 and CCR5, in glomerular endocapillary hypercellularity in lupus nephritis
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------