

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591177

研究課題名（和文） マクロファージをターゲットとした慢性腎疾患（CKD）治療戦略

研究課題名（英文） Macrophage as a therapeutic target for chronic kidney diseases

研究代表者

池住 洋平 (Yohei Ikezumi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70361897

研究成果の概要（和文）：マクロファージ（M ϕ ）の浸潤が、炎症性、非炎症性を問わず全ての進行性腎疾患の進展過程にみられる共通所見であることに着目し、慢性腎疾患（CKD）における M ϕ 機能の検討ならびにその制御法について、腎生検標本を用いた組織学的検討、動物腎炎モデルおよび培養系を用いて解析を行った。その結果、ヒトの慢性糸球体腎炎や移植腎などの慢性腎疾患組織中には、腎傷害の進展過程で 2 系統の活性化 M ϕ （M1, M2）の浸潤が認められることが明らかとなった。M1 は古典的な炎症性活性化 M ϕ で主に急性、活動性病変の形成に関与し、ステロイド薬や代謝拮抗薬を主とする免疫抑制薬により抑制される。一方、M2 は抗炎症性または組織修復型の活性化 M ϕ 群であり、主に腎糸球体の硬化性病変や間質線維化などの慢性病変の形成に関与しており、ステロイド薬によりむしろ活性化し、組織の線維化を助長する可能性が示唆された。以上より、活性化 M ϕ は CKD の重要な治療のターゲットであり、ステロイド薬や免疫抑制薬の使用にあたっては、ステロイド単剤ではむしろ活性化する M ϕ 群（M2）の存在を念頭に、病勢や病期を考慮した治療が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Macrophage accumulation typically observed during progression of all kidney diseases and is potentially involved in the development of clinico-histopathological abnormalities observed as the disease progresses. These findings suggest that macrophages could be an important therapeutic target for chronic kidney diseases although their roles at the site of kidney lesion remain to be elucidated. We studied the mechanism of activated macrophage-mediated kidney injury using renal biopsy tissue, experimental model and culture system. Our studies on activated macrophages revealed that different macrophage phenotypes (M1 and M2) are involved in chronic glomerulonephritis with specific roles in different phases and lesions. The M1-activated macrophage, a pro-inflammatory phenotype, appeared to play a role in acute glomerular injury and was detected in active glomerular lesions such as cellular glomerular crescents and glomerular cell proliferations, and was suppressed by glucocorticoids. In contrast, the M2-activated phenotype, an anti-inflammatory phenotype, was more predominant in sites with chronic lesions such as glomerular sclerotic lesions and interstitial fibrosis, and was rather activated by glucocorticoids. Thus, macrophage phenotype-specific targeting, timing of treatment, and choice of therapeutic agents are vital in the prevention of macrophage-mediated renal injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000

年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腎・泌尿器学、慢性腎疾患、活性化マクロファージ、M1、M2

1. 研究開始当初の背景

我が国では学校腎臓検診制度が定着しているのにも関わらず、毎年3万以上の末期腎不全患者が新規に透析導入され、2008年度の統計では透析患者数はすでに28万人を越えなお増加傾向にある。このような慢性腎疾患（CKD）が増加する背景として、成人以降に発症がみられる糖尿病性腎症が増加していることから、学校腎臓検診の成果が十分に発揮されていないこと、さらに、慢性糸球体腎炎の治療法が確立していないことから、学校腎臓検診によって早期に発見された症例も成人へとキャリアオーバーすることが最大の原因と考えられる。

腎疾患の発症機序は、感染症にともなう抗原抗体反応、糖尿病、動脈硬化、血管炎、原因不明なものなど様々であるが、腎固有細胞（血管内皮細胞、メサンギウム細胞、上皮細胞、間質筋細胞、上皮細胞）が傷害された後に生じる細胞浸潤、糸球体細胞外基質の増生、糸球体硬化、間質線維化といった一連の過程は、炎症性・非炎症性を問わず全ての腎疾患にみられる共通の組織所見である。私たちは、CKD 進展過程にみられるこれら共通所見の中でも特にMφの浸潤に着目し、慢性糸球体腎炎の発症・進展過程における機能を明らかにしてきた。

Mφはその機能の違いから、炎症性作用を有するM1と抗炎症性作用を有するM2の2系統の存在が明らかにされており、私たちはこれまでに活性化Mφが腎炎の進展に重要な役割を果たしていること、また、M1、M2の2系統の活性化Mφ浸潤がヒトの慢性糸球体腎炎でみられること、また、小児ネフローゼ症候群の治療として用いられるシクロスポリンによる腎障害（シクロスポリン腎症）や腎移植患者の長期的な移植腎機能廃絶、いわゆる慢性移植腎症の進展過程でM2型活性化Mφ浸潤がみられることを見出してきた。

しかし、このようなCKD進展過程におけるこれらM1、M2の2系統のMφの活性化機序や腎病変局所での機能は明らかになっていない。

臨床的には、多くの慢性糸球体腎炎および糖尿病性腎症などのCKDの治療にステロイド薬、免疫抑制薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンI受容体拮抗薬

などの降圧薬が腎保護作用を有するという観点から使用されているが、これら薬剤のCKDにおける作用機序（治療のターゲット）についてもいまだに不明な点が多い。一方、私たちはこれまでの研究から、これら臨床的に用いられるステロイド薬や免疫抑制薬がMφに直接作用すること、さらにミゾリビンなどいくつかの免疫抑制薬がM1、M2双方の活性化を抑制する可能性を見出しており、前述したCKD進展過程にみられるMφ浸潤がこれら薬剤の治療ターゲットである可能性が強く示唆される。

また、高脂血症や動脈硬化は腎疾患の増悪因子であるとともに、発症要因ともなりうることで知られている。著明な蛋白尿とともに高脂血症を呈する小児の微小変化型ネフローゼ症候群は、その多くがステロイド薬感受性であるが、治療経過中にステロイド治療に対する反応性が低下する症例がある。このような高脂血症下での腎疾患の増悪機序あるいは難治化機序は明らかではないが、動脈硬化病巣の形成にMφが関与していることは知られ、腎疾患の難治化機序に高脂血症下で活性化するMφ群が関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、M1、M2双方の活性化Mφに着目し、腎疾患特異的な病巣における活性化Mφ機能を解明することである。これにより、腎疾患の進展機序、難治化機序を明らかにするとともに、組織中Mφの観察による病期・病勢の早期診断と病態に応じた治療法を確立することが最終的な目的である。

3. 研究の方法

I 腎生検組織を用いた検討

① 最も頻度の高い慢性糸球体腎炎であるIgA腎症の腎生検組織について、M1マーカーとして抗CD86(B7-2)、M2マーカーとして抗CD163（ヘモグロビンスカベンジャー受容体）抗体を用いた免疫組織染色を行い、Mφ浸潤像および組織病変および臨床像（血尿、蛋白尿、血圧）との関連を検討した。

② 経過中に治療抵抗性を生じた例を含むステロイド反応性(SSNS)および抵抗性(SRNS)ネフローゼ症候群の小児の腎生検組

織中における CD36、CD204（ともに LDL スカベンジャー受容体：LDL-SR）陽性 Mφ 数を比較した。

II ヒト単球由来 Mφ を用いた in vitro 実験による検討

① 正常ヒト単球を MCSF 存在下で 7 日間培養して得られる Mφ に対して、M1 誘導因子であるインターフェロン γ (IFN γ)、リポポリサッカライド (LPS) を、M2 誘導因子としてインターロイキン (IL)4、IL13、デキサメサゾン (Dex) を添加し、サイトカイン発現をリアルタイム PCR により網羅的に観察するとともに、ステロイド薬および免疫抑制薬 (ミゾリビン) による抑制効果を検討した。

② 同様にヒト単球由来 Mφ に対して酸化 LDL または Dex を添加し、サイトカイン発現を網羅的に観察した。

4. 研究成果

① CD86+M1 浸潤は血尿、蛋白尿の強度および管内細胞増殖、半月体形成率などの急性、活動性所見と有意な相関がみられ、CD163+M2 浸潤は蛋白尿および糸球体メサンギウム基質の増生および間質線維化の程度と相関が認められた (図 1)。

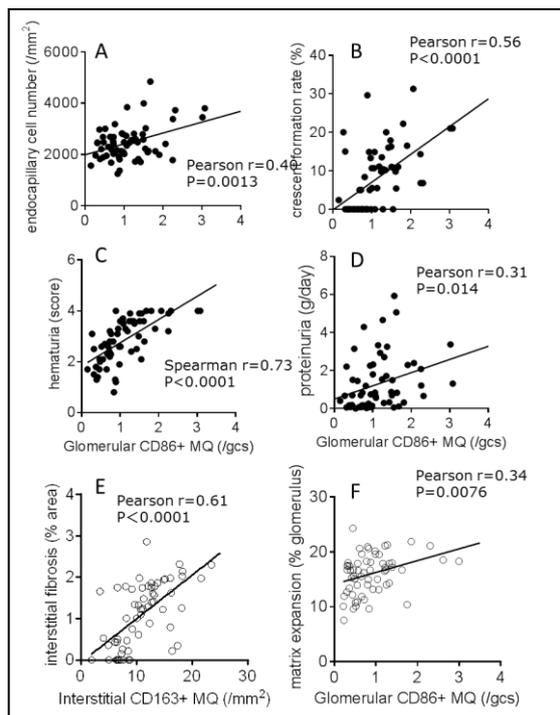


図 1 IgA 腎症における活性化 Mφ 浸潤と臨床・病理所見との相関

A: M1 と管内増殖性病変 B: M1 と半月体形成
C: M1 と血尿 D: M1 と蛋白尿 E: M2 と尿細管間質線維化 F: M2 と糸球体基質の増生

すなわち、小児 IgA 腎症において、M1 は急性糸球体腎炎に類似した急性活動性病変の形成に関与し、M2 は組織線維化など慢性組織病

変の形成、進展に関与する可能性が示唆された。

また、in vitro 実験系では、IFN γ および LPS の刺激により TNF α 、iNOS などの炎症性サイトカインの発現が増強した。この作用は Dex またはミゾリビンにより抑制され、特に Dex とミゾリビンの併用により抑制作用が増強した (図 2)。

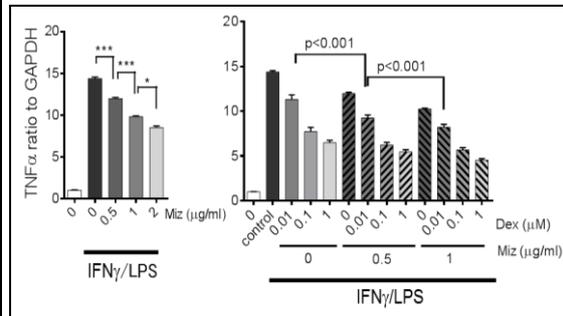


図 2 ミゾリビン(Miz)およびデキサメサゾン(Dex)による M1 活性の抑制作用

IFN γ /LPS の共刺激により活性化した M1 は著明な TNF α の発現が誘導される、Miz、Dex とともに用量依存性にこれを抑制し、Miz/Dex の併用により抑制作用は増強される。

一方、Dex は M2 マーカーである CD163 発現はむしろ増強し、抗炎症性サイトカインまたは線維化促進因子である IL10、TGF β 、CTGF の発現を増強した。この Dex による M2 活性化作用は免疫抑制薬であるミゾリビンによって抑制された (図 3)。

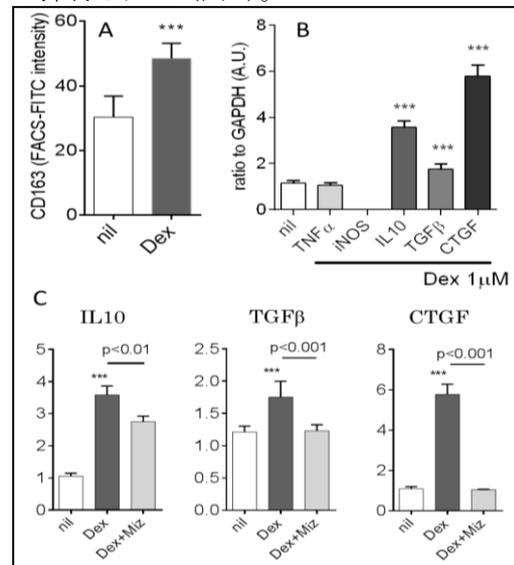


図 3 ヒト単球由来 Mφ に対するデキサメサゾン (Dex) 刺激効果 (A, B) およびミゾリビン (Miz) による抑制効果 (C)

A: Dex 刺激による CD163 発現 (フローサイトメトリ)
B: Dex 刺激による各種サイトカイン発現
C: Dex 刺激による M2 サイトカイン発現と Miz による抑制効果 (***) $p<0.001$ 無刺激 (nil) との比較

以上の結果から、小児 IgA 腎症では 2 系統の

活性化 Mφ (M1, M2) の浸潤が見られ、M1 は管内増殖や半月体形成などの急性活動性病変の形成に関与し、ステロイド薬、ミゾリビンにより抑制されるのに対し、M2 は糸球体基質の増生や間質線維化などの慢性病変の形成に関与し、ステロイド薬によりむしろ活性化し、組織線維化を助長する可能性が示唆された。ミゾリビンはこのステロイドの負の作用に対し拮抗する。

重症な小児 IgA 腎症に対して、日本小児腎臓病学会による診療ガイドラインでは、ステロイド薬およびミゾリビンを含む多剤併用療法が推奨されているが、活性化 Mφ をターゲットとした治療を考えた場合には、M1, M2 ともに抑制効果をもつ本治療は理に適っているものと言える。

② SSNS、SRNS における CD36 陽性 Mφ 数は 1 糸球体切片あたり 1.9 vs 3.4 ($p < 0.01$) と SRNS において有意に多数の糸球体浸潤が認められた(図 4)。

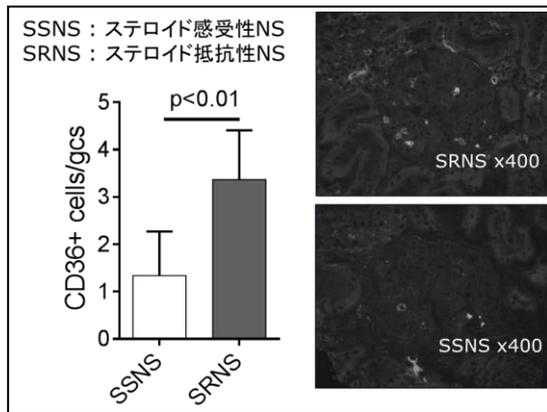


図 4 ステロイド感受性(SSNS)および抵抗性(SRNS)ネフローゼ症候群患児における CD36 陽性 Mφ 浸潤の比較

ヒト単球由来 Mφ は IL4, IL13 などの抗炎症性サイトカイン、デキサメサゾン (Dex) または酸化 LDL (ox-LDL) 添加により CD36 の発現が有意に増加した。また、Dex, ox-LDL 刺激によりアンジオテンシン変換酵素 (ACE) および TGFβ の発現が有意に増加した(図 5)。以上から、ネフローゼ症候群にみられる CD36 陽性 Mφ はステロイド刺激により活性化する M2 型 Mφ と考えられ、ネフローゼ症候群では LDL を含むコレステロールの増加が見られるが、糸球体に浸潤したマクロファージは治療薬として用いられるステロイドや血清 LDL の刺激によりむしろ活性化し、TGFβ やアンジオテンシン II の産生や糸球体基質の増加を介して治療抵抗化に関与する可能性が示唆された。

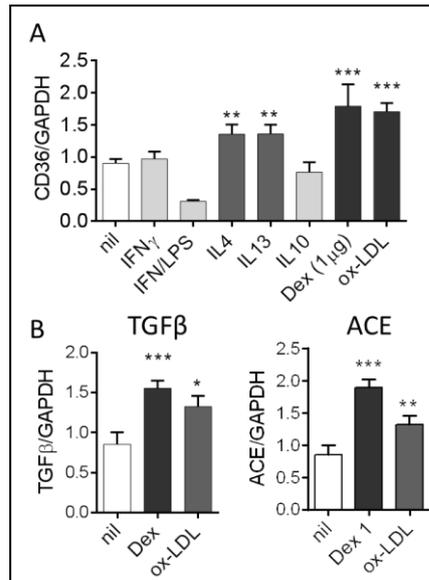


図 5 ヒト単球由来 Mφ に対する CD36 発現誘導(A) および Dex, oxLDL 刺激による TGFβ, ACE 発現誘導 (B) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 正常細胞(nil)との比較

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 16 件)

- ① 池住洋平. 【クローズアップ腎・泌尿器】管理・治療の進歩. 急性糸球体腎炎. 小児内科 44 : 237-240, 2012 (査読無)
- ② 池住洋平, 鈴木俊明, 唐澤環, 長谷川博也, 西村宏子, 内山聖. 糸球体硬化性病変形成の共通現象としての podocyte 脱落に関する考察. 発達腎研究会誌 20 : 26-20, 2012 (査読無)
- ③ 鈴木俊明, 池住洋平, 唐澤環, 長谷川博也, 中川由紀, 斉藤和英, 高橋公太, 石原俊二, 原正則, 柳原俊雄, 内山聖. Nonadherence を原因とする拒絶反応から、移植腎機能低下をきたした 13 歳男子例 思春期における腎移植後患児の Nonadherence について. 日本小児腎臓病学会雑誌 25 : 58-62, 2012 (査読有)
- ④ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Yamada T, Imai N, Narita I, Kawachi H, Polkinghorne KR, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. Histopathology 58 : 198-210, 2011 (査読有)
- ⑤ Saito A, Miyauchi N, Hashimoto T, Karasawa T, Han GD, Kayaba M,

- Sumi T, Tomita M, Ikezumi Y, Suzuki K, Koitabashi Y, Shimizu F, Kawachi H. Neurexin-1, a presynaptic adhesion molecule, localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocytes in kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300 : R340-348, 2011 (査読有)
- ⑥ 池住洋平, 鈴木俊明, 唐澤 環, 長谷川博也, 金子詩子, 内山 聖. 小児 IgA 腎症の高血圧合併例に関する組織学的検討. *小児高血圧研究会誌* 8 : 26-30, 2011 (査読無)
- ⑦ 鈴木俊明, 池住洋平, 唐澤 環, 長谷川博也, 高橋雄一, 山田剛史, 内山 聖. 治療反応性および経過が全く異なる、Diffuse Mesangial Sclerosis の 3 例. *日児腎不全誌* 31 : 169-171, 2011 (査読無)
- ⑧ 池住洋平. 慢性糸球体腎炎の進展過程におけるマクロファージ. *新潟県医師会報* 741 : 11-13, 2011 (査読無)
- ⑨ 池住洋平. 未来に活かそう学校健診. 腎臓検診をもっと活かすために : 疫学調査の試み. *小児保健研究* 70 : 195-200, 2011 (査読無)
- ⑩ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Kawachi H, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Contrasting Effects of Steroids and Mizoribine on Macrophage Activation and Glomerular Lesions in Rat Thy-1 Mesangial Proliferative Glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 31 : 273-282, 2010 (査読有)
- ⑪ Frank Y. Ma, Ikezumi Y, and Nikolic-Paterson DJ. Macrophage Signaling Pathways: A Novel Target in Renal Disease. *Seminars in Nephrology* 30 : 334-344, 2010 (査読有)
- ⑫ 池住洋平, 鈴木俊明, 唐澤 環, 長谷川博也, 内山 聖. 慢性糸球体腎炎における活性化マクロファージ. *日本小児腎臓病学会雑誌* 23 : 134-140, 2010 (査読無)
- ⑬ 池住洋平, 鈴木俊明, 唐澤 環, 山田剛史, 長谷川博也, 内山 聖, 原正則, 柳原俊雄. 慢性移植腎症の成因における M2 マクロファージの関与. *日本小児腎不全学会誌* 30 : 296-298, 2010 (査読無)
- ⑭ 鈴木俊明, 池住洋平, 唐澤 環, 山田剛史, 長谷川博也, 内山聖, 中川由紀, 斎藤和英, 高橋公太. 下大静脈閉塞を有する女兒に対し、小児ドナーの二次献腎移植を行った 1 例. *日本小児腎不全学会雑誌* 30 : 142-144, 2010 (査読有)
- ⑮ 唐澤 環, 池住洋平, 鈴木俊明, 長谷川博也, 内山 聖. 運動後急性腎不全の一例における病態に関する検討. *日本小児腎臓病学会雑誌* 23 : 96-101, 2010 (査読有)
- ⑯ 鈴木俊明, 池住洋平. 知的障害児における移植前後の変化. *今日の移植* 23 : 231-233, 2010 (査読無)
- [学会発表] (計 16 件)
- ① Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Yamada T, Hasegawa H, Nikolic-Paterson DJ, Saitoh A. Development of steroid-resistant pediatric nephrotic syndrome following prolonged steroid therapy is associated with alternative macrophage activation. 2012 Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, CA, USA, 2012 年 11 月 2 日
- ② 池住洋平. ターゲットを考えた慢性腎疾患の治療戦略. 腎臓学の基礎と臨床をつなぐ探索研究: Translational Research. 第 42 回日本腎臓学会東部学術集会, 新潟, 2012 年 10 月 14 日
- ③ 池住洋平. 慢性糸球体腎炎の治療になぜ免疫抑制薬を併用するのか? 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会, 東京, 2012 年 6 月 30 日
- ④ 池住洋平. ネフローゼ症候群の高脂血症下における M2 型マクロファージを介したステロイド抵抗化機序の検討. 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会, 東京, 2012 年 6 月 30 日
- ⑤ 池住洋平. LDL スカベンジャー受容体陽性 M2 型マクロファージを介するネフローゼ症候群のステロイド抵抗化機序. 第 55 回日本腎臓学会総会, 横浜, 2012 年 6 月 3 日
- ⑥ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Hara M, Yanagihara T, Nikolic-Paterson DJ and Uchiyama M. Potential role of alternatively activated macrophages in chronic allograft nephropathy. 2011 Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2011 年 11 月 12 日
- ⑦ 池住洋平. 糸球体硬化性病変形成の共通現象としての podocyte 脱落に関する考察. 第 20 回発達腎研究会, 東京, 2011 年 8 月 28 日
- ⑧ 池住洋平. 小児 IgA 腎症における高血圧症の病的意義に関する検討. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011 年 8 月 13 日
- ⑨ 池住洋平. 小児 IgA 腎症における臨床症

状および組織病変特異的な活性化マクロファージ浸潤像に関する検討. 第 54 回日本腎臓学会総会, 横浜, 2011 年 6 月 15 日

- ⑩ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Nishimura H, Uchiyama M. Low birth weight is a risk factor for podocyte damage and secondary focal segmental glomerulosclerosis. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka, 2011 年 6 月 4 日
- ⑪ Hasegawa H, Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Kawachi H, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Corticosteroid augments cyclosporine nephrotoxicity in childhood nephrotic syndrome via alternative activation of macrophage. 43rd Annual Meeting of American Society of Nephrology. Denver, Colorado, USA, 2010 年 11 月 19 日
- ⑫ 池住洋平. 小児 IgA 腎症における高血圧合併に関する組織学的検討. 第 17 回小児高血圧研究会, 東京, 2010 年 9 月 19 日
- ⑬ 池住洋平. 腎臓検診をもっと活かすために—疫学調査の試み—. 第 57 回日本小児保健学会, 新潟市, 2010 年 9 月 16 日
- ⑭ 池住洋平. 小児 IgA 腎症における血尿の意義. 第 206 回日本小児科学会新潟地方会, 新潟市, 2010 年 8 月 21 日
- ⑮ 池住洋平. マクロファージ糸球体浸潤像による慢性糸球体腎炎の病態把握の試み. 第 45 回日本小児腎臓病学会, 大阪市, 2010 年 7 月 3 日
- ⑯ 池住洋平. 糸球体マクロファージ浸潤像による慢性糸球体腎炎の病態解析. 第 53 回日本腎臓学会総会, 神戸市, 2010 年 6 月 17 日

[図書] (計 10 件)

- ① 池住洋平. IgA 腎症. 小児疾患の診断治療基準 第 4 版 (「小児内科」「小児外科」編集委員会共編). 東京医学社, 東京: 618-619, 2012
- ② 池住洋平. 膜性腎症. 今日の小児治療指針 第 15 版 (大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎, 水口 雅 編集). 医学書院, 東京: 576-577, 2012
- ③ 池住洋平. 一次性高血圧 (本態性高血圧) の病態, 診断, 治療. 高血圧. 小児腎臓病学 (日本小児腎臓病学会 編). 診断と治療社, 東京: 384-387, 2012
- ④ 池住洋平. 腎血管性高血圧. 50 の典型例で学ぶ小児の腎泌尿器疾患 (金子一成

編). 診断と治療社, 東京: 259-262, 2011

- ⑤ 池住洋平. 慢性腎炎 (病態生理). 小児のネフローゼと腎炎. 小児科臨床ピクシス (五十嵐 隆総編集), 中山書店, 東京: 82-85, 2010
- ⑥ 池住洋平. 子どもの病気 急性糸球体腎炎症候群. 家庭医学大全科, 法研, 東京: 326-327, 2010
- ⑦ 池住洋平. 子どもの病気 慢性腎臓病 (CKD). 家庭医学大全科, 法研, 東京: 327-329, 2010
- ⑧ 池住洋平. 子どもの病気 急速進行性糸球体腎炎症候群. 家庭医学大全科, 法研, 東京: 329-330, 2010
- ⑨ 池住洋平. 腎実質性高血圧・腎血管性高血圧. 小児の治療指針. 小児科診療 73 巻増刊号. 診断と治療社, 東京: 660-662, 2010
- ⑩ 池住洋平. 小児のネフローゼ症候群. 今日の治療指針 2010 (山口徹, 北原光夫, 福井次矢総編集), 医学書院, 東京: 1130-1132, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池住 洋平 (Ikezumi Yohei)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 70361897

(2) 研究分担者

河内 裕 (Kawachi Hiroshi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 60242400

鈴木 俊明 (Suzuki Toshiaki)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 50419305

唐澤 環 (Karasawa Tamaki)
新潟大学・医歯学総合病院・特任助教
研究者番号: 30447601

(H22、H23 研究分担者)

(3) 連携研究者

成田 一衛 (Narita Ichiei)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 20272817