

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591575

研究課題名(和文)腎系球体の障害再生過程におけるM1・M2マクロファージの役割と再生促進因子の解明

研究課題名(英文)The role of M1, M2 macrophage and regenerative factors in renal injury and recovery process

研究代表者

川崎 幸彦(KAWASAKI, Yukihiro)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00305369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：腎障害時や腎炎罹患時のマクロファージの役割を明らかにするため、溶血性尿毒症候群(HUS)マウスモデル、ヒトIgA腎症(IgAN)や紫斑病性腎炎(HSPN)患者の血清や腎組織を使用しM1M2マクロファージ活性との関連性を検索した。HUSのマウスモデルでは腎障害時の回復時期において、M2マクロファージ浸潤度が強く認められた。IgANでの腎内浸潤活性化マクロファージは、腎炎の活動性や腎組織硬化度の高い症例で高度であった。血清MRP8/14濃度が高いHSPN患児では腎組織障害度が高度であった。これらの結果からM2マクロファージは腎障害時の回復機序に強く関与し、硬化性病変との関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To efficacy the role of Macrophage subclasses in renal injury and glomerulonephritis(GN), we investigate the relationship between M1,M2 macrophage, myeloid-related protein(MRP) 8/14 complex and the laboratory and pathological findings in HUS mice model and IgA nephropathy(IgAN) and Henoch-Schoenlein purpura nephritis(HSPN).

The scores of renal M2 macrophage expression in the recovery phase of HUS mice model were higher than those in control mice. MRP 8/14 levels, and glomerular and interstitial MRP8+CD68+ scores at the second biopsy were all higher in unfavorable IgAN than in favorable IgAN. Pathological findings revealed that the proportions of patients with ISKDC more grades III in HSPN with high MRP8/14 values were higher than those in HSPN with low MRP8/14 values. Our findings suggest that M2 macrophage plays important role in the recovery phase of renal injury, and serum MRP8/14 complex levels may be associated with the severity of renal injury.

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：M2マクロファージ M1マクロファージ HUS IgA腎症 紫斑病性腎炎

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは、ヒトの免疫応答のあらゆる段階に關与する細胞であり、炎症や免疫応答の生体防御機構として作用し、その後、抗原の処理、抗原提示細胞として機能し、炎症の誘導や組織の再生や修復にも關与すると報告されている。これまで、私達は、慢性糸球体腎炎における腎内マクロファージ浸潤が、腎炎発症進展に重要であり、腎組織の硬化進展に密接な關連があることを報告してきた (A.J.Nephrol 24:147-153 2004; AJKD 42:1131-1138 2003)。また、活性化マクロファージの一つであるMyeloid relative protein (MRP)8の腎内浸潤が、腎炎の硬化進展の指標になることを初めて報告した。

(Myeloid-related protein 8 expression on macrophage is a useful prognostic marker for renal dysfunction in children with MPGN type 1. AJKD 45:510-518 2005; TEJM 21: 49-55 2009)。しかしながら、炎症に關与するマクロファージと組織修復に關与するマクロファージの明確な鑑別が難しく、その詳細な機序は依然不明であった。

近年、これらマクロファージが、その産生するサイトカインの種類によりM1マクロファージ(古典的活性型マクロファージ)とM2マクロファージ(alternative activation)の2種類に分類されることが報告されている。M1マクロファージは、リポポリサッカライドやインターフェロン- γ などの炎症性サイトカインにより誘導され、感染症や免疫疾患の宿主反応に關与し、M2マクロファージはインターロイキン(IL)-4やIL-13などのサイトカインにより誘導され、組織修復や血管新生に影響するとされている。しかしながら、炎症性疾患、特に慢性腎炎をはじめとした腎疾患におけるこれらM1、M2マクロファージの報告は少なく、ヒトの急性・慢性腎障害とその修復・再生過程におけるこれらマクロファージのかわりは明らかではない。

2. 研究の目的

(1) 腎障害からの再生過程とマクロファージとの關連性を明らかにするため、重度の腎障害モデルである(Hemolytic Uremic Syndrome: HUS)マウスモデルを使用した。特に、糸球体内皮細胞障害からの再生機序を明らかにするため、重症度の異なるHUS類似病変マウスを作製し、糸球体・尿管障害とその回復過程における血管新生増殖因子(VEGF, Ang1)の発現度と血清中の各種サイトカインとケモカイン濃度を測定し組織内のマクロファージサブクラスの浸潤度を検討し、その病態におよぼす役割に關して検討した。

(2) ヒト慢性腎炎におけるマクロファージサブクラスの働きを解析するために、小児期発症慢性糸球体腎炎の代表的疾患であるIgA腎症と紫斑病性腎炎における治療前後の臨床経過と腎生検組織を用いて、M1・M2マクロファージの浸潤度と臨床的パラメーター、腎組織硬化度と予後との關連性について検討した。

3. 研究の方法

(1) リポポリサッカライド(LPS)とShiga Toxin2を用いたHUSマウスモデルの作製と腎障害からの再生過程における再生因子と腎組織内浸潤マクロファージサブクラスの役割に關する解析を行った。6週齢のC57BL/6マウスにLPS 300 μ g/kg+Stx2 225ng/kg投与群(重症群)とLPS 100 μ g/kg+Stx2 50ng/kg投与群(軽症群)および生食投与群(対象群)に分け、各群LPS+Stx2投与および生食投与时点を0時間とした。これらのマウスは代謝ゲージで飼育し、体重、尿量、尿中蛋白排泄量、尿中・血清クレアチニン値を測定。各群マウスを6、12、24、72時間後、7、14、28日後にケタミン麻酔下に関腹し、生理食塩水で両腎の腎臓を灌流脱血したのち摘出した。摘出

腎は、光学顕微鏡、電子顕微鏡用に検体を採取後、直ちに氷上で皮質を分離し、細片後、糸球体を単離する。皮質の一部を液体窒素で直ちに凍結保存し、遺伝子発現の評価に用いた。また、同時に採血も施行した。作製したHUSマウスモデルを、各々の腎組織的变化を光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いて経時的に解析した。免疫染色法を用いることで、血管修復促進因子であるVEGFやAngiopoietin-1の染色性や、組織学的急性変化、内皮細胞のマーカであるCD31、CD34や硬化性病変の指標となる α -smooth muscle actin、活性マクロファージ(MRP8)およびM1・M2マクロファージ浸潤(CD163、CD204)の程度を比較検討した。採取した血液検体を用いて、血清クレアチニン、アルブミン濃度に加え各種サイトカインやケモカイン濃度をELISA kitを用いて測定した。

(2) 2003年以降当科に入院加療した重症型IgA腎症50症例を対象とし、その治療反応性から治療反応群(1群)と治療不能群(2群)にわけ、その初回および再腎生検組織を用いた活性化マクロファージであるMyeloid-related protein(MRP)陽性マクロファージマーカーとM2マクロファージマーカーであるCD204を免疫染色し、その染色度と臨床症状や検査成績、検尿所見と腎生検組織における急性変化、慢性変化、硬化性病変の指標である α -Smooth muscle actin(SMA)の染色性に関し比較検討した。さらに、紫斑病性腎炎患者における活性化マクロファージの指標とされているMRP8/14濃度を病初期に測定し、その値の程度と紫斑病性腎炎の疾患活動性について検索を加えた。

4. 研究成果

(1) 致死群マウスでは腎障害に対する回復機序はみられなかったが、軽症群マウスはメサンギオリーシスや内皮細胞障害後にメサンギウム細胞や内皮細胞の増殖が出現した。

この時期にあわせて内皮細胞にVEGFとAngiopoietin1の発現が強くなり、かつM2マクロファージの腎組織内浸潤が高度に認められ、血清中のMIP1 α 、MIP1 β 、MIP2、MCP1、MIGなどのケモカイン濃度も高値であった。

(2) 治療反応不良IgA腎症患者群では良好患者群と比較して、初回腎生検所見での糸球体内C3沈着度や再生検所見でのIgA沈着度が多く認められた。不良患者群では良好患者群と比較して再生検時の蛋白尿量や血清IgA濃度が高値であった。MRP陽性細胞やCD204陽性細胞の糸球体内や間質内浸潤が不良患者群において多く認められた。糸球体内や間質内における活性化マクロファージやCD163陽性細胞の浸潤度は、慢性指数や α -SMA陽性細胞の浸潤度と正の相関性が認められた。紫斑病性腎炎患者の中でMRP8/14濃度高値群では、低値群と比較して一日蛋白尿量が多い傾向があり、特に内皮細胞障害や急性腎障害度が高度に認められた。

【考察】HUSのマウスモデルの回復過程におけるサイトカインやケモカインの検討結果によると、VEGFとAngiopoietinおよびMIP1,2、MCP1、MIGなどのケモカインに加えM2マクロファージが糸球体内皮細胞障害からの回復機序に重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに、ヒトのIgA腎症においては、補体活性や組織糸球体内IgA沈着度が腎炎の進展に強く関連し、特に間質内に浸潤した活性化マクロファージやM2マクロファージは、IgA腎症の活動性や腎組織の硬化性病変の進展と密接な関わりを有することが示唆された。また、血清中のMRP8/14濃度は、一日蛋白尿量や腎組織障害度と関連し、腎臓内の活性化マクロファージ浸潤との相関性が示唆され、今後のマクロファージ関連炎症の指標になりえるマーカーであると考えられた。

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)

Kawasaki Y, Suyama K, Miyazaki K, Kannno S, Ono A, Suzuki Y, Sato M, Hashimoto K, Hosoya M. Risk factors for non-responsiveness to treatment for IgA nephropathy with diffuse mesangial proliferation. *Nephrology*、査読有、2014、DOI:10.1111/nep.12232.

Kawasaki Y, Suyama K, Maeda R, Yugeta E, Takano K, Suzuki S, Sakuma H, Nemoto K, Sato T, Nagasawa K, Hosoya M. Incidence and index of severity of hemolytic uremic syndrome in a 26 year period in Fukushima Prefecture, Japan. *Pediatr. Int.*、査読有、Vol.56、No.1、2014、p.77-82、DOI:10.1111/ped.12193.

Kawasaki Y, Isome M, Ono A, Suzuki Y, Takano K, Suyama K, Hosoya M. Two children with obesity-related glomerulopathy identified in a school urinary screening program. *Pediatr. Int.*、査読有、Vol.56、No.1、2014、p.115-118、DOI:10.1111/ped.12213.

Kawasaki Y, Suyama K, Ono A, Oikawa T, Ohara S, Suzuki Y, Sakai N, Hosoya M. Efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin for childhood hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Int.*、査読有、Vol.55、No.5、2013、e139-142、DOI:10.1111/ped.12165.

Kawasaki Y, Ono A, Ohara S, Suzuki Y, Suyama K, Suzuki J, Hosoya M. Henoch-Schönlein purpura

nephritis in childhood: pathogenesis, prognostic factors and treatment. *Fukushima J. Med. Sci.*、査読有、Vol.59、No.1、2013、p.15-26.

Ohara S, Kawasaki Y, Abe Y, Watanabe M, Ono A, Suyama K, Hashimoto K, Honda T, Suzuki J, Hosoya M. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin 1 in renal injury in hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Nephrol.*、査読有、Vol.36、No.6、2012、p.516-523、DOI:10.1159/000345142.

Kawasaki Y, Ohara S, Abe Y, Watanabe M, Suyama K, Sato M, Hashimoto K, Hosoya M. The role of serum meylold-related protein 8/14 complex in Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Pediatr. Nephrol.*、査読有、Vol.27、No.1、2012、p.65-71、DOI:10.1007/s00467-011-1937-3.

Kawasaki Y. Mechanism of onset and exacerbation of chronic glomerulonephritis and its treatment. *Pediatr. Int.*、査読有、Vol.53、No.6、2011、p.795-806、DOI:10.1111/j.1442-200X.2011.03469.x.

Kawasaki Y. The pathogenesis and treatment of pediatrics Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Clin. Exp. Nephrol.*、査読有、Vol.15、No.5、2011、p.648-657、DOI:10.1007/s10157-011-1478-1.

Kawasaki Y, Suyama K, Hashimoto K, Hosoya M. Methylprednisolone pulse

plus mizoribine in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis. Clin. Rheumatol., 査読有、Vol.30、No.4、2011、p.529-535、DOI:10.1007/s10067-010-1572-6.

〔学会発表〕(計 5件)

川崎幸彦、溶血性尿毒症候群(HUS)に対するトロンボモジュリン [recombinant human soluble thrombomodulin (rhTM)]の治療効果、第45回日本小児感染症学会総会・学術集会、2013年10月26日、札幌コンベンションセンター(札幌)

川崎幸彦、慢性糸球体腎炎の活動性指標としての血清 Myeloid-related protein (MRP)8/14 と腎組織浸潤 MRP 陽性マクロファージ、第48回日本小児腎臓病学会学術集会、2013年6月29日、あわぎんホール(徳島)

川崎幸彦、重症・軽症 HUS モデルマウスにおける経時的なサイトカインプロファイリング - rhTM の抗サイトカイン作用、第48回日本小児腎臓病学会学術集会、2013年6月28日、あわぎんホール(徳島)

川崎幸彦、ステロイド剤加味ミゾリピン多剤併用療法を施行した重症型 IgA 腎症患児の予後と予後規定因子の解析、第56回日本腎臓学会学術総会、2013年5月12日、東京国際フォーラム(東京)

川崎幸彦、紫斑病性腎炎発症病態における血清 MRP8/14 の役割、第115回日本小児科学会学術集会、2012年4月20日、福岡国際会議場(福岡)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 幸彦 (KAWASAKI, Yukihiro)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00305369

(2) 研究分担者

細矢 光亮 (HOSOYA, Mitsuaki)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：80192318

(3) 研究分担者

橋本 浩一 (HASHIMOTO, Kouichi)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50322342

(4) 研究分担者

陶山 和秀 (SUYAMA, Kazuhide)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90423798

(5) 研究分担者

鈴木 順造 (SUZUKI, Junzo)
福島県立医科大学・看護学部・教授
研究者番号：20171217