

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号	32666
研究種目	若手研究（B）
研究期間	2011～2012
課題番号	23790962
研究課題名（和文）	新規樹状細胞サブセットによる糸球体腎炎の発症・進展機構解明と治療応用
研究課題名（英文）	Elucidation of Pathogenic mechanisms for glomerulonephritis and therapeutic application by a newly identified dendritic cell subset
研究代表者	
	永坂 真也 (NAGASAKA SHINYA)
	日本医科大学・医学部・助教
	研究者番号：00573239

研究成果の概要（和文）：

まず、IL-12p70 産生能の低下・IL-23 産生能の上昇、樹状細胞（Dendritic cell; DC）成熟化マーカーの上昇について、申請者がこれまでに同定した新規 DC サブセットはプロスタグランジン E2（Prostaglandin E2: PGE2）存在下で分化した DC と非常に似た性質を持つことを明らかにした。

次に、PGE2 に着目し糸球体腎炎で重要な役割を担っていると考えられる腎局在 DC へも作用し、IL-6 等の炎症性サイトカイン産生も増加させることを明らかとした。

本研究結果より、DC-PGE2 経路が糸球体腎炎の発症・進展機構へ関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

First, I showed that in the point of view of decrease of IL-12p70 production, upregulation of IL-23 production, and enhanced expression of DC maturation markers, new DC subset which I previously identified had very similar characteristics to DC differentiated under prostaglandin E2 (PGE2).

Next, I focused on interaction of PGE2 on DC. I showed that PGE2 interacted with renal-DC which had been considered to have important role for glomerulonephritis, and enhanced productions of pro-inflammatory cytokines for example IL-6.

The present study suggested that the DC-PGE2 interaction would be involved in pathogenic and progression mechanism of glomerulonephritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：新規樹状細胞サブセット、糸球体腎炎、プロスタグランジン E2、Th17、免疫学

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞（Dendritic cell: DC）は非常に強力な抗原提示細胞として知られているが、定常状態の未成熟型 DC は炎症誘導能を有さず、逆に末梢免疫寛容に働く。一方、活性化され成熟型となった DC は細胞表面の成熟マーカー発現を上昇させ、同時に炎症

性サイトカインを大量に分泌する事で T 細胞を活性化させ炎症反応を開始させる。DC はこの強力な抗原提示能から免疫寛容を打破する可能性が示され、近年では新たな細胞医療として抗腫瘍免疫や自己免疫性疾患等の分野で注目されている (Figdor et al., Nat Med. 2004; Melief et al., Immunity, 2008)。一方、腎臓局在 DC の機能研究も近

年進んでおり、腎病変発症に必須の役割を担っている事が指摘されている (Rohan et al., J Am Soc Nephrol. 2007)。

DC の成熟シグナル活性化の過程で IL-23 産生が促進され、その結果、近年糸球体腎炎を始めとする自己免疫疾患で重要な役割を果たしている事が明らかとなりつつある IL-17 産生 CD4⁺T 細胞 (Th17 細胞) からの IL-17 産生が促進される。申請者はこうした過程の制御に関わる非常に興味深い新規の DC サブセットを同定した。この DC が *in vitro* における分化誘導過程で培地を血清含有培地から無血清培地へと転換する事で誘導された事から、申請者はこの新規の DC サブセットを SF-DC (serum-free DC) と名付けた (Nagasaka et al., Biochem Biophys Res Commun. 2009)。SF-DC は従来の DC と異なり、成熟刺激に伴う IL-23 産生が長期に渡り飛躍的に上昇し、Th17 細胞からの IL-17 産生を強く誘導する一方で、IL-12 産生が欠落するという非常にユニークな特徴を有している。

一方、糸球体腎炎は主に免疫担当細胞により糸球体構成成分が傷害される事で引き起こされる自己免疫性疾患であり、腎組織浸潤 DC を介した IL-23/Th17 経路が腎組織傷害に重要である事が報告されている (Paust et al., J Am Soc Nephrol. 2009)。そして Th17 細胞を中心として、さらに多くの炎症細胞・実質細胞・間質細胞が相互作用する事で糸球体腎炎が発症・進展すると考えられるが、DC によるこれら様々な細胞を介した糸球体腎炎制御の詳細な分子メカニズムは未だ不明な点が多く、完全な理解には至っていない。

申請者が同定した SF-DC は IL-23/Th17 経路の活性化という点で、糸球体腎炎において産生が誘導されるプロスタグランジン E2 (PGE2) 処理された DC と性質が非常によく似ていることから、腎炎発症時に存在する DC は PGE2 刺激を受けた DC であり、*in vivo* における SF-DC ではないかと推測した。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに IL-23/Th17 経路を優位に活性化し自己免疫疾患の発症・進展に重要な役割を演ずる可能性のある新規の樹状細胞 (Dendritic cell: DC) サブセットを同定していた。この DC は IL-23 産生能の促進により T 細胞からの IL-17 産生を飛躍的に上昇させる。本研究はこの DC サブセット及び腎局在 DC に関し、

1) IL-23 産生能促進以外の新たな炎症反応誘導機能を解明する

2) IL-23/Th17 経路を中心とした糸球体腎炎の発症・進展への関与を明らかにする

3) それらを標的とした新たな抗炎症治療の可能性について検討する。

ことを目的に研究計画を立案した。

3. 研究の方法

まず、マウス骨髄細胞から DC をプロスタグランジン E2 (PGE2) 存在下で分化誘導を行なった。得られた DC を各種 Toll-like receptor (TLR) のリガンドで刺激を行ない、培養上清中のサイトカインを ELISA 法を用いて測定した。

また、次にマウス腎臓からの腎局在 DC の単離精製方法の確立を試みた。その後確立した方法によりマウス腎臓から腎局在 DC を単離精製し、上記同様各種 TLR リガンドにより刺激を行ない、リアルタイム PCR 法、ELISA 法を用いて腎局在 DC と一般的な DC (今回は脾臓由来 DC を用いた) との機能比較を行なった。

4. 研究成果

PGE2 存在下で分化誘導した樹状細胞は、CD80, CD86, MHC classII, CD40 などの DC 成熟化マーカーの発現が上昇していた。また、PGE2 存在下で分化させた DC は成熟化刺激として TLR4 のリガンドである LPS で刺激しても IL-12p70 産生は上昇せず、代わりに IL-23 産生が飛躍的に上昇することが確認された。PGE2 存在下で分化させた DC は TLR2, TLR9 の発現が上昇しているとの報告があったため、それぞれのリガンド Pam3CSK4 (TLR2 リガンド) 及び CpG-ODN (TLR9 リガンド) による刺激を行なったところ、どちらの刺激でも DC 成熟化マーカー発現が上昇した。一方、サイトカイン産生能を ELISA により測定したところ、IL-1 β 産生は TLR2 リガンド刺激では上昇したのに対して、TLR9 リガンド刺激では上昇は見られなかった。また、PGE2 存在下で分化させた DC は PGE2 の主要なレセプターである EP2 の発現が上昇していた。

次に腎局在 DC の単離精製を行ない、一般的な DC と腎局在 DC の機能比較を行なった。その結果、腎局在 DC は PGE2 存在下において LPS などの炎症刺激を受けると PGE2 受容体 EP1, EP2, EP3, EP4 それぞれの発現レベルが上昇し、さらに IL-6 等の炎症性サイトカイン産生も増加することを明らかにした。PGE2 存在下で LPS 刺激を受けると非存在下で刺激を受けた場合と比較して PGE2 の合成に関与する Cox-2, mPGES-1 発現も上昇する

ことを明らかとした。

以上の研究成果より、申請者が以前同定した新規 DC サブセットは PGE2 存在下で刺激を受けた DC と非常によく似た特徴を有していることを初めて明らかとし、PGE2 による DC 機能制御機構が自己免疫性疾患、特に糸球体腎炎にも関与している可能性を示唆することができた。

そしてさらに、PGE2 は骨髄細胞から誘導した DC だけでなく、腎局在 DC にも作用し炎症を促進させる可能性が考えられ、DC-PGE2 経路が糸球体腎炎の発症・進展機構へ関与することが示唆された。

今後、腎局在 DC と PGE2 のより詳細な相互作用の解明が期待される。

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 4 件)

1) Renal inflammatory changes in acute hepatic failure-associated acute kidney injury.

Shimizu A, Ishii E, Masuda Y, Sato A, Piao H, Kunugi S, Takahashi M, Terasaki M, Nagasaka S, Terasaki Y, Ohashi R, Morioka T, Fukuda Y.

Am J Nephrol. 2013;37:378-88. doi: 10.1159/000348567.

査読有

2) Surgical technique of orthotopic liver transplantation in rats: the Kamada technique and a new splint technique for hepatic artery reconstruction.

Ishii E, Shimizu A, Takahashi M, Terasaki M, Kunugi S, Nagasaka S, Terasaki Y, Ohashi R, Masuda Y, Fukuda Y.

J Nippon Med Sch. 2013;80(1):4-15.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470801>

査読有

3) Proliferative glomerulonephritis with monoclonal immunoglobulin G3 κ deposits in association with parvovirus B19 infection.

Fujita E, Shimizu A, Kaneko T, Masuda Y, Ishihara C, Mii A, Higo S, Kajimoto Y, Kanzaki G, Nagasaka S, Iino Y, Katayama Y, Fukuda Y.

Hum Pathol. 2012 Dec;43(12):2326-33. doi: 10.1016/j.humpath.2012.04.004.

査読有

4) Inhibition of matrix metalloproteinases reduces ischemia-reperfusion acute kidney injury.

Kunugi S, Shimizu A, Kuwahara N, Du X, Takahashi M, Terasaki Y, Fujita E, Mii A, Nagasaka S, Akimoto T, Masuda Y, Fukuda Y. Lab Invest. 2011 Feb;91(2):170-80. doi: 10.1038/labinvest.2010.174.

査読有

[学会発表] (計 6 件)

1) 永坂真也

スタチンはマクロファージ分化・活性化を直接抑制し、抗炎症機能を誘導する

第 35 回日本分子生物学会年会

2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日

福岡

2) Shinya Nagasaka

Statin directly inhibit macrophage differentiation and activation, and provide anti-inflammatory function

American Society of Nephrology Kidney Week 2012

2012 年 10 月 30 日～2012 年 11 月 4 日

San Diego, USA

3) 永坂真也

スタチン存在下で分化させたマクロファージは Cox-2 発現が増強する

第 55 回日本腎臓学会学術総会

2012 年 6 月 1 日～2012 年 6 月 3 日

横浜

4) 永坂真也

スタチン処置マクロファージを用いた糸球体腎炎抑制効果の検討

第 101 回日本病理学会総会

2012 年 4 月 26 日～2012 年 4 月 28 日

東京

5) 永坂真也

スタチン処理マクロファージによる糸球体腎炎に対する抗炎症効果

第 34 回日本分子生物学会年会

2011 年 12 月 13 日～2011 年 12 月 16 日

横浜

6) 永坂真也

スタチン (Atorvastatin) によるマクロファージを介した抗炎症機構の解析

第 54 回日本腎臓学会学術総会

横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永坂 真也 (NAGASAKA SHINYA)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00573239

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：