

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461615

研究課題名(和文)腎系球体においてウイルス感染が惹起する炎症経路の解明とその制御による治療法の開発

研究課題名(英文) Mesangial viral and pseudoviral immunity: possible involvement in the pathogenesis of glomerulonephritis

研究代表者

田中 完 (Tanaka, Hiroshi)

弘前大学・教育学部・教授

研究者番号：50271820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：培養ヒトメサンギウム細胞(MCs)でToll様受容体(TLR)3を起点とするシグナリングは腎炎の病態に關与する。

MCsにおいて、ウイルス dsRNAの人工産物(poly IC)はTLR3/IFN- γ を起点とするInterferon-stimulated gene (ISGs)と炎症性ケモカインの産生を誘導した。これらの制御にはステロイド薬に加えて免疫抑制薬のmizoribineが一部の炎症性ケモカイン抑制に有用であった。興味深いことにISGsの中でISG15は抗炎症効果を持つことが示唆された。ISG15を含めた制御機構の詳細な検討は、将来的な腎炎の新規療法開発に有用である。

研究成果の概要(英文)：Since viral infections activate type I interferon (IFN) pathways and cause subsequent release of IFN-dependent proinflammatory chemokines/cytokines, the innate immune system plays an important role in the pathogenesis of glomerulonephritis (GN). So far, we have examined the toll-like receptor (TLR) 3 signaling cascades treated with polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC), a synthetic analogue of viral dsRNA, that makes "pseudoviral" infection in cultured human mesangial cells (MCs). We found that the activation of mesangial TLR3 upregulated the expression of functional molecules acting as monocyte/macrophage and lymphocyte chemoattractants in MCs. Further, intense glomerular expressions of these functional molecules were observed in biopsy specimens from children with GN. These observations further support the implication of "pseudoviral" immunity in the pathogenesis of GN.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：腎炎症候群 自然免疫 メサンギウム細胞 炎症性ケモカイン メサンギウム細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD)の病態には、感染症や内因性リガンドが惹起する自然免疫系 (innate immunity)を介した慢性炎症の関与が知られているが、その分子病態学的な詳細は不明である。臨床的観察としてウイルス感染などが CKD の発症機転や増悪因子となること、時に内因性リガンドが innate immunity に関わる細胞受容体の Toll 様受容体 3 (TLR3) や TLR4、細胞質内受容体のレチノイン酸誘導遺伝子アイ (RIG-I)、melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA5)に認識され、その下流で I 型 interferon (IFN)を起点とする炎症経路群が活性化することが知られているが、CKD での分子生物学的詳細は不明である。申請者らは、これまでウイルス dsRNA の人工合成類似物の polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC)を刺激因子とし、培養ヒトメサンギウム細胞 (MCs)上で TLR3/(RIG-I)/IFN- β を起点とした炎症経路群の検討、および臨床で得られた腎生検組織での免疫染色を用いて innate immunity の検討を行ってきた。その結果、MCs 上で TLR3/(RIG-I)/IFN- β を起点とした様々な IFN-stimulated gene (ISG)の発現とこれを介した炎症性ケモカイン・サイトカイン産生に至る複数の炎症経路群がネットワークを形成していることが明らかとなった [TLR3/IFN- β /RIG-I/CC chemokine ligand 5 (CCL5) pathway, TLR3/IFN- β / MDA5/C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) pathway など]。

2. 研究の目的

これまでの成果から、CKD の病態に MCs での TLR3 (TLR4)/RIG-I を起点とする innate immunity の活性化と、これに伴う炎症性ケモカイン群の発現が関与していることが示された。これらの新規に見いだされた炎症経路群相互のネットワークをより明らかとし、そ

の周辺分子の制御機構の解明を進めることは、糸球体腎炎・CKD における慢性炎症の解明に寄与するとともに、新たな治療戦略や予防法の構築につながる可能性がある。本研究の目的は、innate immunity からみた CKD の炎症病態を分子レベルで明らかとし、新規治療法への足掛かりを得ることである。

3. 研究の方法

細胞培養：MCs (Lonza, USA)を指示書に従って培養し、poly IC (Sigma, USA)を PBS に 0.08 ~ 50 μ g/ml の濃度で溶解、または 1 ng/ml を cationic lipid との複合体 (poly IC/cationic lipid complex)として実験に供した。なお、これまでの MCs を用いた実験系から poly IC を刺激因子とした場合、MCs 上で I 型 IFN として誘導されるのは、IFN- β が主であり IFN- α 誘導は有意ではないことが確認されている。

RNA 干渉法：RIG-I、MDA5、IFN- β (Frederick, USA)、TLR3 (Hilden, Germany)に対する干渉 RNA を導入した MCs を poly IC、または poly IC/cationic lipid complex で 16 時間 (RT-PCR 法)、24 時間 (Western blot 法)の処理を行った後、実験に供した。

以上の実験系において、RIG-I、CCL2、CCL5、CXCL1、CXCL10、IFN- β 、TLR3 に対する cDNA を用いた RT-PCR 法、細胞内蛋白の確認には Western blot 法を、細胞外へ分泌される蛋白の確認には ELISA 法を施行した。

4. 研究成果

1) 比較的低用量の TNF- α による priming が TLR3 を起点とする炎症経路群に及ぼす影響。

MCs を 1 ng/ml の TNF- α で前処置した場合、産生される CCL5 は mRNA、蛋白レベルともにごく微量であった。一方、TNF- α 前処置後の MCs を poly IC で刺激すると poly IC 単

独と比べて著明な CCL5 の産生亢進が確認された ($p < 0.01$)。TNF- α + poly IC は IFN- β , RIG-I の発現も poly IC 単独に比べて著明な発現亢進を示した ($p < 0.01$)。CCL5 の発現亢進は IFN- β , RIG-I のいずれかの knockdown で有意に抑制された ($p < 0.01$)。以上から , TNF- α のプライミングは , 例え微量であっても腎局所での自然免疫系を介する炎症経路群の活性化を促進することが示唆された。基礎に生活習慣病を含む慢性疾患をもつ場合 , ウイルス感染などを契機に腎局所での炎症が著明に惹起され CKD・腎炎群発症のリスク因子となる可能性がある。

2) MCs での TLR3 を介する CXCL1/GRO α の発現。

poly IC は MCs 上に濃度・時間依存性に CXCL1 の発現を誘導した。poly IC による CXCL1 の発現は , TLR3 , IFN- β , NF- κ B , interferon regulatory factor (IRF) 3 の knockdown により有意に抑制されたことから , TLR3 を起点としたそれぞれの経路が同程度 CXCL1 の発現に関与していることが示唆された。poly IC による CXCL1 の発現には細胞質内受容体である RIG-I/MDA5 の関与は否定的で TLR3 依存性であることが確認された。臨床検体では , 増殖性ループス腎炎検体のメサンギウム領域に CXCL1 が陽性であったが , IgA 腎症での染色性には乏しかった。以上から , MCs 上に TLR3 を介して CXCL1 が発現することが示され , 特にループス腎炎では "pseudoviral immunity" の強い活性が病態に関与していることが示唆された。

3) MCs で TLR3 を介する ISG15 発現の意義。

MCs において , poly IC 刺激は時間・濃度依存性に ISG15 の発現を誘導した。RNA 干渉法による TLR3 , IFN- β の knockdown は ISG15 の発現を抑制したが , ISG56 と MDA5 の knockdown は関与しなかった。一方 , ISG15

の knockdown はこの経路の STAT1 のリン酸化と ISG56 , MDA5 と CXCL10 の発現を増強した。免疫組織染色では , 重症 IgA 腎症と増殖性ループス腎炎での染色性はそれぞれの軽症例と比べて低下していた。以上から , MCs での TLR3 を介する ISG15 の発現は , STAT1 のリン酸化とその下流のシグナリングを抑制し炎症性ケモカイン発現を抑制することで , 炎症病態を抑制的に制御している可能性がある。ISG15 制御機構の詳細な検討は , 将来的な CKD・糸球体腎炎の抗炎症療法開発に有用かも知れない。

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 13 件)

1. Imaizumi T, Aizawa-Yashiro T, Watanabe S, Matsumiya T, Yoshida H, Tatsuta T, Xing F, Meng P, Hayakari R, Tsuruga K, Tanaka H. TLR4 signaling induces retinoic acid inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5 in mesangial cells. J Nephrol (査読有), 26, 886-893, 2013
2. Tanaka H, Imaizumi T. Inflammatory chemokine expression via toll-like receptor 3 signaling in normal human mesangial cells. Clin Dev Immunol (査読有), 984708 (DOI: 10.1155/2013/9847028), 2013
3. Watanabe S, Imaizumi T, Tsuruga K, Aizawa T, Ito T, Matsumiya T, Yoshida H, Joh K, Ito E, Tanaka H. Glomerular expression of myxovirus resistance protein 1 (Mx1) in human mesangial cells: possible activation of innate immunity in the pathogenesis of lupus nephritis. Nephrology (Carlton) (査読有), 18, 833-837, 2013
4. Aizawa T, Imaizumi T, Tsuruga K, Watanabe S, Kumagai N, Chiba Y, Yoshida H, Ito E,

- Tanaka H. Urinary fractalkine and monocyte chemoattractant protein-1 as possible predictors of disease activity of childhood glomerulonephritis. *Tohoku J Exp Med* (査読有), 231, 265-270, 2013
5. Aizawa T, Imaizumi T, Tsuruga K, Watanabe S, Chiba Y, Matsumiya T, Yoshida H, Tanaka H. Mizoribine selectively attenuates monocyte chemoattractant protein-1 production in cultured human glomerular mesangial cell: A possible benefit of its use in the treatment of lupus nephritis. *Nephrology (Carlton)* (査読有), 19, 47-52, 2014
 6. Tanaka H, Aizawa T, Watanabe S, Oki E, Tsuruga K, Imaizumi T. Efficacy of mizoribine-tacrolimus-based induction therapy for pediatric lupus nephritis. *Lupus* (査読有), 23, 813-818, 2014
 7. Imaizumi T, Aizawa T, Hayakari R, Xing F, Meng P, Tsuruga K, Matsumiya T, Yoshida H, Wang L, Tatsuta T, Tanaka H. Tumor necrosis factor- α synergistically enhances polyinosinic-polycytidylic acid-induced toll-like receptor 3 signaling in cultured normal human mesangial cells: possible involvement in the pathogenesis of lupus nephritis. *Clin Exp Nephrol* (査読有), 19, 75-81, 2015
 8. Tanaka H, Tsuruga K, Imaizumi T. Mizoribine in the treatment of pediatric-onset glomerular disease. *World J Pediatr* (査読有), 11, 108-112, 2015
 9. Imaizumi T, Aizawa T, Segawa C, Shimada M, Tsuruga K, Kawaguchi S, Matsumiya T, Yoshida H, Joh K, Tanaka H. Toll-like receptor 3 signaling contributes to the expression of a neutrophil chemoattractant, CXCL1, in human mesangial cells. *Clin Exp Nephrol* (査読有), 19, 761-770, 2015
 10. Suzuki K, Fukusumi Y, Yamazaki M, Kaneko H, Tsuruga K, Tanaka H, Ito E, Matsui K, Kawachi H. Alteration in the podoplanin-ezrin-cytoskeleton linkage is an important initiation event of the podocyte injury in puromycin aminonucleoside nephropathy, a mimic of minimal change nephrotic syndrome. *Cell Tissue Res* (査読有), 362, 201-213, 2015
 11. Tsuruga K, Aizawa T, Watanabe S, Tsugawa K, Yoshida H, Imaizumi T, Ito E, Tanaka H. Expressions of mRNA for innate immunity-associated functional molecules in urinary sediment in IgA nephropathy. *Nephrology (Carlton)* (査読有), 20, 916-921, 2015
 12. Tanaka H, Imaizumi T. Mesangial viral and psuedoviral immunity: possible involvement in the pathogenesis of pediatric-onset active lupus nephritis. *J Arthritis* (査読有), 4, 183 (DOI: 10.4172/2167-7921.1000183), 2015
 13. Imaizumi T, Shimada T, Matsumiya T, Yoshida H, Watanabe S, Tsuruga K, Kawaguchi S, Murakami K, Joh K, Tanaka H. Interferon-stimulated gene 15, a type I interferon-dependent transcript, is involved in a negative feedback loop in innate immune reactions in human mesangial cells. *Nephron* (査読有), 132, 144-152, 2016
- 〔学会発表〕(計 6 件)
1. 田中 完, 相澤知美, 渡邊祥二郎, 敦賀和志, 腎糸球体疾患の非侵襲的診断法開発の試み- 尿中 MCP-1, fractalkine は病変を反映するか?, 第 43 回日本腎臓学会東部学術大会, 2013 年 10 月 4-5 日, 東京都
 2. 田中 完, 相澤知美, 渡邊祥二郎, 沖 栄真, 津川浩二, 敦賀和志, TNF α はヒトメサンギウム細胞の自然免疫系を介する

- 炎症を増悪させる：慢性疾患は腎炎発症のリスク因子となる，第 57 回日本腎臓学会学術総会，2014 年 7 月 4-6 日，横浜市
3. 敦賀和志，相澤知美，沖 栄真，渡邊祥二郎，津川浩二，城 謙輔，田中 完，ヒトメサンギウム細胞における Mx1 の発現：ループス腎炎にみられる自然免疫系の活性化，第 57 回日本腎臓学会学術総会，2014 年 7 月 4-6 日，横浜市
 4. 田中 完，渡邊祥二郎，津川浩二，敦賀和志，城 謙輔，培養ヒトメサンギウム細胞での TLR3 を介する CXCL1 の発現：ループス腎炎の病態と“pseudoviral immunity”，第 58 回日本腎臓学会学術総会，2015 年 6 月 5-7 日，名古屋市
 5. 田中 完，渡邊祥二郎，津川浩二，敦賀和志，城 謙輔，今泉忠淳，培養ヒトメサンギウム細胞での TLR3 を介する CXCL1/GRO α の発現：ループス腎炎の病態と“pseudoviral immunity”，第 50 回日本小児腎臓病学会学術集会，2015 年 6 月 18-20 日，神戸市
 6. 田中 完，渡邊祥二郎，津川浩二，敦賀和志，城 謙輔，今泉忠淳，ループス腎炎の病態と“pseudoviral immunity”：腎糸球体メサンギウムでの TLR3 を介する Mx1 と CXCL1/GRO α の発現，第 25 回日本小児リウマチ学会，2015 年 10 月 9-11 日，金沢市

〔図書〕(計 1 件)

1. Tanaka H, Tsuruga K, Imaizumi T. Implication of regional activation of Toll-like receptor 3/interferon- β signaling in human mesangial cells - Possible involvement in the pathogenesis of lupus nephritis. In Autoimmunity - Pathogenesis, Clinical Aspects and Therapy of Specific Autoimmune Diseases. Chatzidionysiou K. Eds. pp.53-64, InTec Open Access Publisher,

Rijeka, Croatia, 2015.

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 完 (TANAKA HIROSHI)

弘前大学・教育学部・教授

研究者番号：50271820

(2)研究分担者

今泉 忠淳 (IMAIZUMI TADAATSU)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90232602

吉田 秀見 (YOSHIDA HIDEMI)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40201008