

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860692

研究課題名(和文) プロスタグランジンE2-腎局在樹状細胞による糸球体腎炎発症・進展制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis and progression mechanisms of glomerulonephritis through prostaglandin E2-renal dendritic cell axis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎局在樹状細胞(RDC)のCD11c+F4/80+PDCA1+という新たな表現型を同定した。さらにこのRDCは炎症メディエーターであるプロスタグランジンE2(PGE2)の合成に關与する分子(Cox-2やmPGES-1)やその受容体を発現していることが明らかとなり、RDCがPGE2のAutocrine経路を介して自身の機能制御を行なっている可能性が示唆された。

腎臓でPGE2発現が上昇することが知られている一側尿管結紮モデル(UUO)では、腎臓でのRDCは減少していたが、これらのRDCはMHC classIIやIL-12/23p40、IL-23p19の発現が顕著に上昇していた。

研究成果の概要(英文)：I showed the novel phenotype of renal dendritic cell (RDC), CD11c+F4/80+PDCA1+. Furthermore, RDCs expressed PGE2 receptor as well as Cox-2 and mPGES-1 molecule involved in prostaglandin E2 synthesis which is known as an inflammatory mediator. These findings suggested that RDC function might be regulated by PGE2 autocrine manner.

In in vivo experiment, the population of RDCs in UUO (unilateral ureteral obstruction) mouse kidney were decreased, in which model is known that PGE2 expression is upregulated. However, the expressions of MHC classII molecule, IL-12/23p40 and IL-23p19 were significantly increased in RDCs migrated in UUO kidney.

研究分野：腎臓学、免疫学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：腎局在樹状細胞 プロスタグランジンE2 (PGE2) 腎疾患

1. 研究開始当初の背景

主に Cyclooxygenase-2 (Cox-2) により合成される PGE2 は古くからその疼痛作用や血管透過性亢進作用・血管拡張作用などの炎症促進機能、逆にマクロファージなどからの炎症性サイトカイン産生抑制といった抗炎症作用機能が知られているが、近年になりこれら PGE2 の相反する機能はその受容体 (EP1, EP2, EP3, EP4) からのシグナルによって制御されていることが明らかとなりつつある。つまり、PGE2 の各細胞への作用は EP 受容体依存的に決定し、炎症促進作用と抗炎症作用を発揮すると考えられている。しかしながら、各受容体による細胞ごとの PGE2 機能・シグナルの制御機構の解析は十分ではなかった。申請者も HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンがマクロファージに直接作用し、Cox-2 の発現上昇を伴って抗炎症に働くことを示している (永坂 他、第 33 回日本分子生物学会年会、第 55 回日本腎臓学会学術総会)。一方で、PGE2 存在下で LPS 刺激をした樹状細胞 (Dendritic cell: DC) は申請者が同定した新規 DC サブセット (Nagasaka et al., Biochem Biophys Res Commun. 2009) 同様炎症性サイトカイン IL-23 産生が増加するという相反する作用を確認している (研究代表者: 永坂真也、平成 22-24 年度科学研究費補助金若手研究 (B) による研究)。さらに、PGE2 は脾臓由来 DC (Spleen-derived DC: SP-DC) に対して EP4 受容体シグナルを介して IL-23/Th17 経路を活性化し、マウスの多発性硬化症モデル (EAE) の増悪に関与することも示されている (Chengcan et al. Nat. Med. 2009)。

DC は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 (Renal DC: RDC) 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た (Rohan et al., JASN, 2007)。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、RDC 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た (Paust et al., JASN, 2009)。しかし、RDC は一般的な SP-DC などとは異なる表現型・機能を有することが少しずつ示されてきていた。つまり一般的な DC と炎症細胞・組織実質細胞との相互作用の知見は RDC には一概には当てはまらない。これらのことから、様々な細胞を介した糸球体腎炎発症・進展制御と RDC の相互作用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かった。

2. 研究の目的

自己免疫性疾患の一つである糸球体腎炎の発症・進展を研究するにあたり、各種腎炎

患で重要な働きをしていることが示唆されている RDC に着目することは非常に有意義であると考えられるが、一般的な DC との表現型・機能の違いに関する報告は未だ不十分であった。また免疫反応を惹起/抑制に制御していることが示唆されている PGE2 が糸球体腎炎において RDC に対してどのような働きを有しているかも不明のままであった。

申請者は PGE2 が末梢リンパ組織中の全身性 DC (SP-DC など) と共に RDC に対しても受容体特異的な作用を示すことによって腎組織での炎症環境が形成されて、全身性の免疫反応及び腎局所の炎症反応が誘導されているはずであると考えた。そこで本研究では近年新たに発見された腎局在 DC について、糸球体腎炎発症・進展時における PGE2 との関与を大きく以下の 3 点に分けて検討することをした。

(1) 腎局在 DC と脾臓由来 DC における機能の比較及び PGE2 に対する反応性の違いの解析

(2) 糸球体腎炎発症・進展時の腎組織における PGE2 産生環境及び腎局在 DC の関与

(3) 腎局在 DC をターゲットとした新規糸球体腎炎治療の可能性

3. 研究の方法

まず RDC と SP-DC の表現型の違いを各種表面抗原に対する抗体を用いてフローサイトメーターにより解析した。

次に RDC・SP-DC をマウス腎臓・脾臓からセルソーターあるいは磁気ビーズを用いて単離精製し、様々な炎症刺激によるサイトカイン発現や PGE2 受容体の発現レベルを定量 RT-PCR により測定した。

in vivo での RDC の分布・働きを調べるために、一側尿管結紮マウスモデルを作製し、傷害時の腎臓で RDC がどのような働きをしているか、蛍光免疫染色を行なった。同時に、腎臓へ遊走してきた炎症細胞の割合や RDC の表面抗原の変化をフローサイトメーターを用いて解析した。

4. 研究成果

本研究は、腎局在樹状細胞 (Renal dendritic cell: RDC) の機能特性及び PGE2 に対する反応性の解析を目的とした。

平成 25 年度は、まず RDC (CD11c⁺F4/80⁺) 特異的マーカーの探索を行なった。マウス脾臓由来の Classical-DC (cDC: CD11c⁺F4/80⁺B220⁻PDCA1⁻) と Plasmacytoid DC (pDC: CD11c⁺F4/80⁺B220⁺PDCA1⁺) との比較を行なった。その結果、マウス pDC がそのマーカー分子である B220 と PDCA1 の両方を発現している一方で、驚いたことに RDC は pDC ほど高くはないが cDC よりも優位に高く PDCA1 を発現していることが明らかとなり、CD11c⁺F4/80⁺B220⁻PDCA1⁺ という新たな RDC の表現型を同定した。Cox-2 や mPGES-1 など

PGE2 合成に関与する分子の発現も確認され、RDCがPGE2のAutocrine経路を介して自身の機能制御を行なっていることが示唆された。

平成26年度では、腎臓内においてPGE2発現の上昇が報告されている疾患モデルとして一側尿管結紮モデル(UUO)を用い、誘導5日目の腎臓にはcDCやM₁が非常に多く浸潤してくる一方、RDCの割合はむしろ減少する傾向にあることを示した。驚いたことにRDCはUUO後にMHC classII分子やIL-12/23p40及びIL-23p19の発現が顕著に上昇していたことから、RDCはUUOにより活性化し発現が上昇したPGE2と協調することで腎臓内で炎症を惹起する役割を担っている可能性が示唆された。同時にPDCA1分子の発現も上昇しており、本研究で同定した新たなRDCマーカー分子PDCA1はRDCの活性化マーカーにもなりうることを示唆された。

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4件)

1. Role of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of type IV collagen in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts. Urushiyama H, Terasaki Y, Nagasaka S, Terasaki M, Kunugi S, Nagase T, Fukuda Y, Shimizu A. Lab Invest. 2015 May 25. doi: 10.1038/labinvest.2015.66. 査読有
2. Acute graft-versus-host disease of the kidney in allogeneic rat bone marrow transplantation. Higo S, Shimizu A, Masuda Y, Nagasaka S, Kajimoto Y, Kanzaki G, Fukui M, Nagahama K, Mii A, Kaneko T, Tsuruoka S. PLoS One. 2014 Dec 26;9(12):e115399. doi: 10.1371/journal.pone.0115399. 査読有
3. An ophthalmic solution of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist prevents corneal inflammation in a rat alkali burn model. Uchiyama M, Shimizu A, Masuda Y, Nagasaka S, Fukuda Y, Takahashi H. Mol Vis. 2013 Nov 1;19:2135-50, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3816991/> 査読有
4. Role of survivin in acute lung injury: epithelial cells of mice and humans. Terasaki Y, Terasaki M, Urushiyama H, Nagasaka S, Takahashi M, Kunugi S, Ishikawa A, Wakamatsu K, Kuwahara N, Miyake K, Fukuda Y. Lab Invest. 2013

Oct;93(10):1147-63. doi: 10.1038/labinvest.2013.103. 査読有

[学会発表](計10件)

1. PPAR α アゴニストによるマクロファージのインフラマソーム活性化抑制効果の検討, 庄司昂、永坂真也、清水章, 第82回日本医科大学医学会総会, 日本医科大学橋桜会館(東京都), 2014/09/02
2. 腎局在樹状細胞の表現型解析, 永坂真也、岩堀徹、肥後清一郎、神崎剛、梶本雄介、益田幸成、清水章, 第57回日本腎臓学会学術総会, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜), 2014/07/05
3. The reactivity of renal dendritic cells for prostaglandin E₂, Shinya Nagasaka, Toru Iwahori, Seiichiro Higo, Go Kanzaki, Kayori Tsuruoka, Yusuke Kajimoto, Akira Shimizu, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド(神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル)(兵庫県、神戸), 2013/12/04
4. The reactivity of renal dendritic cells for prostaglandin E₂, Shinya Nagasaka, Toru Iwahori, Seiichiro Higo, Go Kanzaki, Kayori Tsuruoka, Yusuke Kajimoto, Akira Shimizu, American Society of Nephrology Kidney Week® 2013, Atlanta (USA), 2013/11/08
5. Tolvaptan Increases Urine and Ultrafiltration volume for Patients with Oliguria Undergoing Peritoneal Dialysis, Iwahori T, Nagasaka S, Shimizu A, American Society of Nephrology Kidney Week® 2013, Atlanta (USA), 2013/11
6. Impaired renal microcirculation in hepatic failure-associated acute kidney injury in rats., 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, American Society of Nephrology Kidney Week® 2013, Atlanta (USA), 2013/11
7. Aberrant Activation of Neutrophils Allow ANCA to Aggravate Glomerulonephritis in Experimental Autoimmune vasculitis, Kanzaki G, Nagasaka S, Kajimoto Y, Higo S, Tsuruoka K, Shimizu A, American Society of Nephrology Kidney Week® 2013, Atlanta (USA), 2013/11

8. Acute graft-versus-host disease in the kidney after DA-to-Lewis rat bone marrow transplantation., Higo S, Shimizu A, Nagasaka S, Kajimoto Y, Kanzaki G, Mii A, Tsuruoka S, American Society of Nephrology Kidney Week® 2013, Atlanta (USA), 2013/11
9. 炎症時における腎局在樹状細胞のプロスタグランジン E2 応答性の解析, 永坂真也、清水章、岩堀徹、肥後清一郎、神崎剛、岩下山連、梶本雄介、益田幸成, 第56回日本腎臓学会学術総会, 東京国際フォーラム(東京都), 2013/05/10
10. プロスタグランジン E2 に対する腎局在樹状細胞の応答性, 永坂真也、清水章、寺崎泰弘、益田幸成、功刀しのぶ、高橋美紀子、寺崎美佳、岩堀徹、漆山博和、内山昌明、肥後清一郎、神崎剛、岩下山連、梶本雄介、野村俊一郎、福田悠, 第102回日本病理学会総会, ロイトン札幌(北海道、札幌) 2013/06/06

研究者番号 :
(3)連携研究者 ()
研究者番号 :

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
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

永坂 真也 (Shinya Nagasaka)
日本医科大学 医学部 助教
研究者番号 : 00573239

(2)研究分担者

()