

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860756

研究課題名(和文) ヘルプシグナゼ-1とM2マクロファージから見たループス腎炎の病態解析

研究課題名(英文) Research on the role of M2 macrophage and HO-1 in lupus nephritis

研究代表者

田村 真麻(浜)(TAMURA, Maasa)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70574169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ループス腎炎(LN)におけるM2マクロファージ(M₂)の機能を解析した。活動性LNの糸球体にはHO-1発現が低下したM2 M₂が浸潤し、M2 M₂数と尿蛋白量は正の相関を認めた。ヒト単球から分化させたM2 M₂へのtype I IFN刺激で、HO-1が低下し、HO-1転写抑制因子Bach1とIL-6の発現が増加した。Bach1欠損LNモデルマウスは生存期間延長と尿蛋白減量がみられ、これらはM2 M₂への分化促進と腎でのHO-1増加が関係すると考えられた。LNにおいてM2 M₂は炎症性に働くが、Bach1作用阻害によるHO-1発現促進を介したM2 M₂の抗炎症作用の回復がLN治療に有用と考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the role of M2 macrophages (M₂) in lupus nephritis (LN). M2 M₂ predominantly infiltrated into the glomeruli of active LN and the number of M2 M₂ was correlated with the amounts of proteinuria. Unlike usual phenotype of M2 M₂, HO-1 expression was low in those glomerular M2 M₂. Stimulation of human M2 M₂ derived from monocytes by type I interferons induced a decrease in HO-1 expression and increases in the expression of Bach1, the repressor of HO-1, as well as the expression of IL-6. Bach1-deficient LN model mice showed longer survival and reduction of urine protein, compared to the wild type. Promoted differentiation into M2 M₂ and high HO-1 expression in kidney, which occurred in Bach1-deficient mice, contributed somewhat to the favorable outcome. The inhibition of Bach1 is promising therapeutic target of LN to restore anti-inflammatory function of M2 M₂ via upregulation of HO-1.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：ループス腎炎 M2マクロファージ ヘルプシグナゼ-1 Bach1

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)に併発するループス腎炎(LN)は、無治療では透析に至る重大な病態であり、ステロイドと免疫抑制剤の併用療法が確立している。しかし、感染などの副作用や治療抵抗例も多く、より疾患特異的治療法の確立が必要である。

マクロファージ(M ϕ)を介した自然免疫応答が SLE の病態進展に重要な役割を果たすと考えられている。LN 系球体に M ϕ の高集積が見られ、浸潤 M ϕ 数は尿蛋白量と相関する(Hill GS et al, *Kidney Int.* 2001)ことや、M ϕ 欠損で抗体誘導腎炎の軽減が得られた(Chalmers SA et al, *Journal of autoimmunity.* 2015)ことが示された。

M ϕ は M1 M ϕ と CD163 分子が高発現する M2 M ϕ に分けられ、M2 M ϕ にはヘムオキシゲナーゼ(HO)-1 やフェリチンが高発現する。M1 M ϕ が炎症を促進するのに対し、M2 M ϕ は IL-10 などの抗炎症性サイトカイン産生を介して、Th1 細胞・M1 M ϕ などの機能を抑制し抗炎症作用を発揮する。LN 患者は尿中フェリチン値が高値と報告され(Nishiya et al, *J Rheumatol.* 1989)、ゲノムワイド関連解析で *IL10* は SLE の感受性遺伝子であることが見出され(Gateva et al, *Nat Genet.* 2009)、SLE における M2 M ϕ の重要性が示唆される。

当研究室では、M ϕ に高発現する HO-1 が、関節リウマチなどの膠原病の病態に関連し、炎症抑制作用を持つことを報告した(Kobayashi et al, *Arthritis Rheum.* 2006, Kirino et al, *Arthritis Rheum.* 2007)。種々の炎症疾患マウスモデルにおいて HO-1 の誘導が治療的役割を持つことが示されているが、当研究室は LN 自然発症モデル MRL/lpr マウスへの HO-1 誘導剤 hemin 投与により、抗 DNA 抗体産生が抑制され LN の炎症が軽減されることを報告した(Takeda et al, *Clin Exp Immunol.* 2004)。一方、HO-1 の発現は主に転写促進因子 nuclear factor erythroid-derived 2 related factor 2

(Nrf2) と転写抑制因子 BTB-and-CNC-homology-1 (Bach1)が HO-1 エンハンサー E1, E2 の Maf-recognition elements (MARE)に競合的に結合することにより制御されるが、Nrf2 欠損メスマウスでは自己抗体発現とともに LN が自然発症することが報告されており(Yoh et al, *Kidney Int.* 2001)、HO-1 発現抑制と LN 発症との関連性が示唆される。関節リウマチでは M2 M ϕ の炎症保護作用が報告されており(Ambarus et al, *Arthritis Res Ther.* 2012)、SLE においても HO-1 などを介して M2 M ϕ の機能を制御できれば LN の治療に応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

LN の病態への M2 M ϕ の関わりと、HO-1 発現調整による M2 M ϕ の分化・機能、LN への影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LN 患者の腎生検検体の検討

19名の活動性 LN 患者(ISN/RPS 分類 class ;7名, class ;7名, class + ;3名, class + ;1名, ;1名)の腎生検検体を評価。免疫染色法にて系球体内の CD68(M ϕ の表面マーカー), CD163(M2 M ϕ の表面マーカー), HO-1 陽性細胞の存在を検討し、さらに ISN/RPS 分類の組織型や尿蛋白量との関連性を検討した。

(2) *In vitro* での M2 M ϕ の検討

健康人、SLE 患者の PBMC を各々 GM-CSF, M-CSF を添加した培養液で培養し、M1 M ϕ , M2 M ϕ へ分化させた。各 M ϕ の性状や LPS, type IFN 刺激への反応を比較した。

(3) *Bach1* 欠損 MRL/lpr マウスの検討

Bach1^{-/-} C57BL/6 マウスの MRL/lpr マウスへの戻し交配を 12 世代繰り返し、コンジエニックマウスを確立後、*Bach1*^{-/-} MRL/lpr と同種野生型 (*Bach1*^{+/+} MRL/lpr) のメスを実験に用いた。*Bach1* 欠損と野生型マウス

で、臨床像、腎組織所見を比較した。また、LPS 腹腔内投与後に腹腔液から回収した M ϕ の性状を比較した。

4. 研究成果

(1) LN 患者の腎生検検体の検討

糸球体への CD68 陽性浸潤細胞のうち、CD163 陽性細胞 (M2 M ϕ) が陰性細胞に比べ多く集積していた。一方、HO-1 陽性細胞は CD163 陽性細胞より少なかった (図 1)。また、糸球体への浸潤 CD163 細胞数と尿蛋白量は正の相関を認めた (図 2)。以上より、LN の病態に HO-1 発現が低下した M2 M ϕ が関わっている可能性が考えられた。

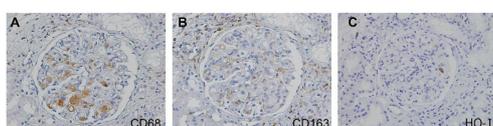


図 1 : LN 腎生検検体 (ISN/RPS 分類 class -G (A/C)) の免疫染色

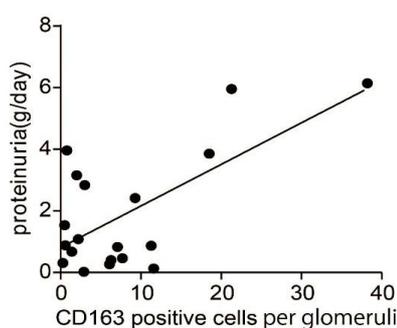


図 2

(2) In vitro での M2 M ϕ の検討

健常人 PBMC から分化させた M2 M ϕ への type IFN 刺激で、HO-1 の発現低下が見られた (図 3)。RT-PCR の検討にて、type IFN 刺激で IL-10 mRNA 量は不変であったが、Bach1 mRNA と IL-6 mRNA 量が増加した (図 4)。SLE 患者 PBMC を用いた実験においても同様の結果であった。以上から、SLE 患者において M2 M ϕ への分化自体は障害されていないが、LN の type IFN 過剰的环境下で M2 M ϕ は HO-1 発現が低下し炎症性に作用すること、HO-1 発現低下は Bach1 発現亢進に

伴うことが示唆された。

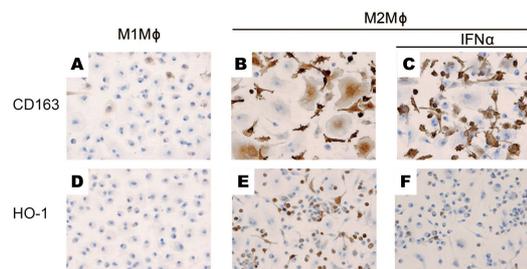


図 3 : 免疫染色 (CD163、HO-1)

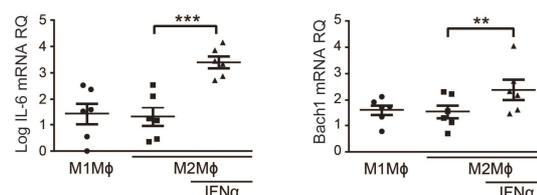


図 4

(3) Bach1 欠損 MRL/lpr マウスの検討

Bach1 欠損マウスは、同種野生型に比べ、有意に生存期間が延長し、尿蛋白量の減量が見られた (図 5)。一方、血清抗 ds-DNA 抗体値に差はなかった。Bach1 欠損マウスの腎組織では、同種野生型に比べ CD163 と HO-1 発現量が増加し、IFN 発現量は低下していた。LPS の腹腔内投与で得た M ϕ を比較したところ、Bach1 欠損マウスで有意に CD163 と HO-1 mRNA 量が増加していた。以上から、Bach1 は M2 M ϕ の分化、HO-1 発現に抑制的に関与すること、Bach1 発現の障害が LN の炎症抑制につながることを示された。

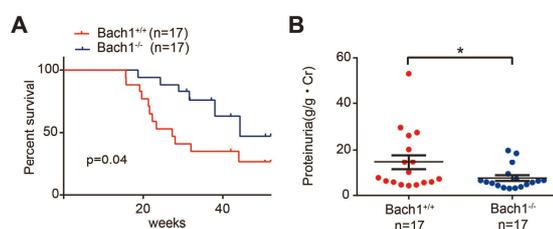


図 5

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Kishimoto D, Kirino Y, Tamura M, et al. Association between macrophages and proteinuria in lupus nephritis. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016 年 4 月、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Kishimoto D, Kirino Y, Tamura M, et al. Functional alteration of M2 macrophages contributes to pathogenesis of lupus nephritis. 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017 年 4 月、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 (浜) 真麻 (TAMURA, Maasa)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号 : 70574169