

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006-2009
 課題番号：18380188
 研究課題名 (和文) マクロファージ-筋線維芽細胞を基軸とした腎線維化の病理発生の解明と治療法の確立
 研究課題名 (英文) Based on the relationship of macrophages-myofibroblasts, the pathogenesis of renal fibrosis and its therapeutic strategies
 研究代表者
 山手 丈至 (YAMATE JYOJI)
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：50150115

研究成果の概要 (和文)：

慢性腎臓病の基本病態である腎線維化の機序を明らかにする目的で、線維化部位に出現するマクロファージと筋線維芽細胞の機能特性を病理学的に解析した。その結果、腎傷害部位には多彩なマクロファージ群が出現し、マクロファージから産生される因子により筋線維芽細胞が誘導されることが明らかとなった。マクロファージの出現を抑制することで線維化の進行が軽減されることが示された。また、肝線維化と創傷治癒過程での線維化についても病理学的に比較解析した。

研究成果の概要 (英文)：

To clarify the pathogenesis of renal fibrosis leading to chronic renal disease, functional properties of macrophages and myofibroblasts appearing in kidney injured tissues were investigated pathologically. It was found that heterogeneous macrophages appeared, and that then factors produced by macrophages could induce myofibroblasts. Inhibition of macrophage functions may improve renal fibrosis. Additionally, hepatic fibrosis and wound healing fibrosis were analyzed comparative-pathologically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：病態、病理発生、応用動物学、腎線維化モデル、マクロファージ、筋線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

腎線維化は、糸球体や尿細管傷害後に形成される細胞外基質の間質における異常な蓄積による疾病で、進行すれば慢性腎臓病となる。免疫疾患や感染症などによる直接的な組織傷害に加え、高血圧や糖尿病などの成人病

に付随した疾患として生じる。国内では約 27 万人が進行性の慢性腎不全で透析を強いられ、獣医学領域においても、5-6 歳以上の犬や猫の 60%以上が慢性腎臓病に罹患しているとされる。しかし、その進展機序は未だ不明であることから、その病態の解明と治療

法の早期確立が求められている。腎線維化では、マクロファージと筋線維芽細胞が中心的な役割を演じると仮説し、かつ、これら細胞の機能をコントロールすることがこの疾患の進行抑制・改善につながると考え、この研究を計画した。

2. 研究の目的

腎線維化は、「組織傷害→マクロファージの反応及び線維原性サイトカインの放出→筋線維芽細胞の誘導と細胞外基質の蓄積→線維化の進行→腎機能不全（慢性腎臓病）」の病理発生機序を仮定した。そこで本研究の目的は、腎線維化の形成において重要な役割を担うマクロファージと筋線維芽細胞の機能特性を病理学的に多角的に解析するとともに、これら細胞の相互関連を基軸とした病理発生機序を分子病理学的に解明し、その機序に基づいた新たな治療法を探索することである。

3. 研究の方法

(1) シスプラチン誘発のラット腎線維化モデルを用いて、以下の解析を行う。

①腎線維化部位に出現するマクロファージ群の特性を免疫細胞学的に解析するとともに、産生されるサイトカインを明らかにすることで、個々のマクロファージ群の機能的役割を解明する。

② 形成される筋線維芽細胞の特性を細胞骨格と表面蛋白の発現を指標に免疫細胞学的に明らかにするとともに、その形成機序を分子レベルで解明する。

③腎線維化の軽減機序を解明する目的で、マクロファージの出現抑制実験を行い、その病態をマクロファージ-筋線維芽細胞の相互の関連を基軸に解析することで、新たな治療法を模索する。

(2) これらの *in vivo* 実験に加え、ラットマクロファージ株と筋線維芽細胞株を確立することで、*in vitro* でマクロファージと筋線維芽細胞との係わりを分子レベルで解析する実験系を確立する。また、尿細管上皮細胞株を用いて、線維化因子の性状を明らかにする。

(3) ラットでの肝線維化と創傷治癒線維化モデルを作成し、解析することで、腎線維化の形成機序を、比較病理学的により明らかにする。

4. 研究成果

(1) シスプラチン誘発ラット腎線維化モデルを病理学的に解析し、以下の成果を得た。

①筋線維芽細胞は α -平滑筋アクチン（筋線維芽細胞のマーカー）、ビメンチン、デスミンを種々の割合で発現することが分かった。また、再生尿細管上皮においても α -平滑筋アクチンとビメンチンが発現することが示された。これは尿細管の上皮-間葉転換を示唆す

る。

②この腎線維化モデルには、ED1、ED2、そして OX6 陽性の多彩な免疫表現形を示すマクロファージが出現することが示された。さらに、抗炎症剤であるデキサメサゾンを投与すると ED1 陽性の浸潤マクロファージの出現が抑制され線維化が軽減された。しかし、ED2 陽性固着マクロファージと OX6 陽性抗原提示マクロファージの出現には影響が見られなかった。

③この腎線維化モデルを用いて、マクロファージの出現とシクロオキシゲナーゼ(COX)の発現について解析した。その結果、このモデルでは、COX2 の発現が減じるとともに、COX1 の発現が増加した。また、傷害尿細管上皮には COX 合成酵素と PGE₂ のレセプター、特に EP4 発現が増加することが分かった。シスプラチン誘発モデルでは、他の腎線維化モデルで示されているような COX2 の関与はなく、むしろ COX1 の関与を通じて、PGE₂ が産生され、それが尿細管上皮の再生に影響を与えることを明らかにした。

④この腎線維化モデルを用いて、新生血管の特性を解明した。マクロファージの出現に伴い線維化が進行し、その部位に CD34 陽性の血管内皮が出現し、かつ血管新生には血管増殖因子が関与することが示された。さらに、骨髄幹細胞などの未分化間葉系細胞を認識する A3 抗体陽性の血管内皮が、線維化部位に出現することが示された。線維化部位の血管は、骨髄幹細胞から常に動員されている可能性が示唆された。

⑤腎線維化部位に出現する筋線維芽細胞の特性解析として、特に Thy-1 発現細胞との関わりについて詳細に検討した。この実験では、シスプラチン誘発ラット腎線維化モデルに加え、尿管結紮腎障害モデルを用いた。その結果、皮質から髄質外帯に線維化が生じ、その線維化部位に Thy-1 発現細胞が出現した。この細胞はビメンチンを発現したが、 α -平滑筋アクチンは発現しなかった。さらに、結紮腎では髄質内帯にも線維化が生じたが、この部位では Thy-1 発現細胞とビメンチンさらには α -平滑筋アクチン発現細胞が一致した。皮質と髄質の間質細胞において、Thy-1 の発現が異なることが分かった。以上より、Thy-1 発現細胞の出現は腎の部位により異なり、かつ筋線維芽細胞誘導との関連も部位により異なることが示された。

(2) 腎線維化には線維原性因子を産生するマクロファージと細胞外基質を産生する筋線維芽細胞が重要であることから、*in vitro* での実験系の作出を試みた。その結果、

①筋線維芽細胞に分化し得る細胞株(MT-9 と LY-H12)の開発に成功した。

②さらに、ラットの悪性線維性組織球腫からマクロファージの特性を示す細胞株(HS-P と

KJ-A)の樹立に成功した。

③尿細管上皮由来細胞株(NRK-52E)に線維原性因子である TGF- β 1 を添加したところ、筋線維芽細胞特有の細胞骨格が発現し、TGF- β 1 と PDGF を同時添加するとその発現が相乗的に増強することが示された。同様の現象が腎間質線維芽細胞(NRK-49F)と未分化間葉系細胞(MT-9)でも確認された。筋線維芽細胞の起源が多様であることが示された。

(3) その他の線維化モデルを用いて以下の成果を得た。

①高血圧自然発症ラットに小豆抽出物を投与する、腎におけるマクロファージの出現と線維化などの病変が軽減されることを見出した。

②チオアセトアミド誘発肝線維化ラットモデルを作製し、出現するマクロファージについて解析した。その結果、傷害部位に出現する ED1 陽性の貪食活性の高いマクロファージの多くが OX6 に対しても免疫組織化学的に反応することが分かった。これは、細胞残屑を貪食した浸潤マクロファージが抗原提示能を有することを示唆する。さらに、マクロファージの誘導に係る MCP-1 は類洞周囲細胞から産生されることを明らかにした。

③LPS を投与したラット脳髄膜に出現するマクロファージ群の特性について解析を行った。その結果、髄膜傷害では固着マクロファージが重要な役割を演じることが示された。

④創傷治癒過程での線維化部位の病態を解析した。その結果、多種多様なマクロファージ群が出現し、筋線維芽細胞の誘導に関わることが分かった。

研究成果の国内外での位置づけ・インパクト

(1) マクロファージの特性について：線維化に係わるマクロファージ群の機能的役割については、肝硬変でのクッパー細胞、肺線維症での肺マクロファージにおいて調べられ、これら細胞から TGF- β などの線維原性因子が産生され線維化の進展に深く係わることが報告されている。腎線維化でも、滲出マクロファージから TGF- β あるいは PDGF などが産生されることを明らかにした。さらに、滲出マクロファージの他に、固着マクロファージあるいは樹状細胞/抗原提示マクロファージが腎線維化の増悪に深く関わることを新たに提示した。これは、慢性的に進行する腎線維化の病態を改善する上で、マクロファージ機能を抑制することが一つの方策であることを提示する。実際、この研究ではマクロファージの機能を抑制することで腎線維化が軽減されることを明らかにした。

(2) 筋線維芽細胞の特性について：肝硬変において筋線維芽細胞は伊東細胞に由来し多彩な免疫表現型(細胞骨格や神経細胞特異的蛋白)を現すことが報告されている。腎線

維化での筋線維芽細胞の同定には α -平滑筋アクチンが主として用いられているが、本研究では、筋線維芽細胞が種々の免疫表現型(ビメンチン、デスミン、Thy-1)を発現することを示した。また、筋線維芽細胞の由来としては、間質の既存の線維芽細胞、未分化間葉系細胞、そして尿細管上皮の「上皮-間葉転換」により形成されることが示された。

(3) 腎線維化の病態解明のためのモデル細胞の作成と応用：腎線維化にはマクロファージと筋線維芽細胞が重要な役割を演じることから、ラット由来のマクロファージ株(HS-P と KJ-A)と筋線維芽細胞に分化し得る細胞株(MT-9 と LY-H12)の確立を試み成功した。これらモデルの応用は、腎線維化に関する発生機序を *in vitro* で系統立てて解明することが期待できる。

今後の展望

(1) マクロファージ機能の更なる探索：この研究では、滲出マクロファージの他に固着マクロファージや樹状細胞/抗原提示マクロファージが腎線維化に係わるとする新たな知見を得た。しかし、これらのマクロファージ群が腎線維化において、どのステージ(初期・進展期・末期)で出現し、その機能発現においてどのような分子発現機構が働いているのかは未だ解明されていない。また、抗原提示マクロファージはTリンパ球を介した複雑な慢性病態の進行に係わると考えており、今後その点を解明する必要がある。

(2) 筋線維芽細胞の特性解明：腎線維化部位に出現する筋線維芽細胞は、既存の間質線維芽細胞、血管周囲の間葉系幹細胞、そして再生尿細管による上皮-間葉転換(EMT)により形成されるとされ、諸説ある。本研究においてもそれを支持するデータを得た。しかし、筋線維芽細胞の起源とその形成に係わる因子(促進あるいは抑制因子)に関しては未だ不明である。筋線維芽細胞は基本的には、骨髄の生体幹細胞に由来し、その幹細胞から上皮系を介した EMT と、間葉系幹細胞を経由して形成される2種の経路があると考えている。この仮説を証明するために、幹細胞との関連を今後追及する必要性がある。

(3) 研究遂行の意義・独創性：このようにマクロファージと筋線維芽細胞の特性とその相互の関わりに注目した慢性腎臓病の病態解明と治療法の開発を追究した研究は、これまでになく本研究の独創的な点である。この相互関連の追究は難治疾患である慢性腎臓病の改善薬の開発に繋がることを期待され、よって得られた成果は社会的貢献が高く、進めてきた意義は大きいと考えている。「獣医学の社会的使命の一つとして疾患モデルの開発と病態解明を通じたヒト・動物福祉への貢献」がある。本研究の遂行は、生命科学

の基礎研究への貢献のみならず、臨床治療や創薬など将来に向けて更なる展開につながると考えている。

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 16 件)

1. Yamamoto E, Izawa T, Vetrizah J, Kuwamura M, Sugiura K, Takeuchi T, and Yamate J. Involvement of endogenous prostaglandin E2 in tubular epithelial regeneration through inhibition of apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-induced rat renal lesions. *Histol Histopathol* (in press). 2010. 査読有.
2. Vetrizah J, Izawa T, Yamamoto E, Kuwamura M, and Yamate J. The kinetics and distribution of different macrophage populations in the developing rat skin. *Histol Histopathol* (in press). 2010. 査読有.
3. Yuasa T, Izawa T, Kuwamura M, and Yamate J. Thy-1 expression mesenchymal cells in rat nephrogenesis, in correlation with cells immunoreactive for α -smooth muscle actin and vimentin. *J Toxicol Pathol* (in press). 2010. 査読有.
4. Mori Y, Izawa T, Takenaka S, Kuwamura M, and Yamate J. Participation of functionally-different macrophage populations and monocyte chemoattractant protein-1 in early stages of thioacetamide-induced rat hepatic injury. *Toxicol Pathol*. 37(4):463-473. 2009. 査読有.
5. Yamate J, Ishimine S, Izawa T, Kumagai D, and Kuwamura M. Macrophage populations and expressions of regulatory proinflammatory factors in the rat meninx under lipopolysaccharide treatment *in vivo* and *in vitro*. *Histol Histopathol*. 24(1):13-24. 2009. 査読有.
6. Sato S, Mukai Y, Yamate J, Kato J, Kurasaki M, Hatai A, and Sagai M. Effect of polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 35(1):43-49. 2008. 査読有.
7. Yamate J. Heterogeneity of macrophage populations and myofibroblasts appearing in rat

renal interstitial fibrosis (review). *J Toxicol Pathol*. 20 (4):185-195. 2007. 査読有.

8. Yamate J, Ogata K, Yuasa T, Kuwamura M, Takenaka S, Kumagai D, Itoh K, and LaMarre J. Adipogenic, osteogenic and myofibrogenic differentiations of a rat malignant fibrous histiocytoma (MFH)-derived cell line, and a relationship of MFH cells with embryonal mesenchymal, perivascular and bone marrow stem cells. *Eur J Cancer*. 43(18):2747-2756. 2007. 査読有.

[学会発表] (計 24 件)

1. 山手丈至, 矢野 遼, 村井 文, 山本絵美, 湯浅隆宏, 栗林正伯, 桑村 充, マクロファージ筋線維芽細胞を基軸にした腎間質線維化の病理発生. 第 26 回日本毒性病理学会学術集会. 2010.2.3-4. 金沢.
2. 藤澤可恵, 土谷紀子, 増野功一, 山本絵美, 丸山敏之, 桑村 充, 山手丈至, 鳥井幹則. Thioacetamide誘発肝障害モデルにおける Heat Shock Protein 25 の発現とマクロファージの関連. 第 26 回日本毒性病理学会学術集会. 2010.2.3-4. 金沢.
3. 湯浅隆宏, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至. ラット腎発生過程における Thy-1 免疫陽性間葉系細胞の動態, 特に α -平滑筋アクチン及び vimentin 陽性細胞との関連. 第 26 回日本毒性病理学会学術集会. 2010.2.3-4. 金沢.
4. Vetrizah J, 井澤武史, 村井 文, 山本絵美, 桑村 充, 山手丈至. Immunohistochemical analyses of myofibroblasts appearing in rat excisional wound healing. 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009.9.25.-27. 鳥取.
5. Golbar HM, 井澤武史, 村井 文, 桑村 充, 山手丈至. Immunohistochemical analyses in the developing rat live, particularly macrophages, mesenchymal stellate cells and bile duct epithelia. 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009.9.25.-27. 鳥取.
6. 矢野 遼, 井澤武史, 澤本 修, 桑村 充, 山手丈至. シスプラチン誘発ラット腎線維化病変に発現する骨形成因子. 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009.9.25.-27. 鳥取.
7. Yamate J, Mori Y, zawa T, Takenaka S, and Kuwamura M. Macrophage appearance and monocyte chemoattractant protein-1 in thioacetamide-induced rat hepatic injury. The 27th Annual Meeting of the Society of Toxicologic Pathology (STP). 2008.6.22-26.

San Francisco.

8. 山手丈至. 慢性腎不全猫に対するACE阻害剤の具体的な使い方—腎間質線維化の面から— 腎線維化の進展機序：マクロファージと筋線維芽細胞の役割, ならびに実験モデルを用いたACE阻害剤の効果. 第 28 回動物臨床医学会年次大会. 2007.11.17-18. 大阪.
9. 山本絵美, 山手丈至, 井澤武史, 桑村 充, 小谷猛夫. シスプラチン誘発急性腎傷害モデルにおけるCOX-2 の発現と再生尿細管との係わり. 第 143 回日本獣医学会学術集会 2007.4.3-5. つくば.
10. 湯浅隆宏, 山手丈至, 井澤武史, 桑村 充, 小谷猛夫. ラットの腎線維化と腎発生におけるThy-1 発現細胞の分布と特性解析. 第 142 回日本獣医学会学術集会 2006.9.22-24. 山口.
11. Yamate Y, Machida Y, Kuwamura M, Kotani T. Renal interstitial fibrosis in neonatal rats induced by cisplatin. The 24th European Society of Veterinary Pathology (ESVP). 2006.8.30-9.2. Edinburgh.

[図書] (計 1 件)

1. 山手丈至 (分担執筆), 中央経済社 産学官連携の研究開発：第 9 章；獣医学が目指す癌撲滅に向けた基礎研究 —ラット腫瘍モデルの確立と応用—. 2009. pp113-135.

[その他] アウトリーチ活動 (講演 6 件)

1. 山手丈至. 腎線維化の病理発生:2009 年 10 月 27 日. 大阪府此花区. 住友化学株式会社 安全性研究所社内セミナー.
2. 山手丈至. 慢性腎臓病の病理学的進展機序: 特にマクロファージ—筋線維芽細胞を基軸とした病態解析と治療法の探索. 2009 年 10 月 4 日. 日本獣医臨床病理学会 2009 年シンポジウム. 大阪府立大学りんくうキャンパス.
3. 山手丈至. ラット腫瘍モデルの開発と生命科学の基礎研究に向けた応用性の探索と実用化. 2008 年 7 月 2 日. 第 7 回国際バイオフォーラム. 東京ビックサイト.

4. 山手丈至. ラット腫瘍モデルの開発と生命科学の基礎研究に向けた応用性と実用化. 2008 年 7 月 11 日. 次世代医療システムフォーラム 2008. 大阪堺商工会議所.

5. 山手丈至. 肝臓における線維化の病理発生. 2007 年 7 月 5 日. 徳島県 鳴門 大塚製薬工業株式会社.

6. 山手丈至. ラット腫瘍モデルの確立と応用: 特に, 線維化 (腎線維化・肝硬変) の病理発生に向けた応用性の探索. 2007 年 6 月 26 日. 麻布大学 生物科学総合研究所.

6. 研究組織

(1)研究代表者

山手 丈至 (YAMATE JYOJI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：50150115

(2)研究分担者

桑村 充 (KUWAMURA MITSURU)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：20244668

竹中 重雄 (TAKENAKA SHIGEO)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：10280067

岩崎 忠 (IWASAKI TADASHI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：70336808

(3)連携研究者

なし