

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590928

研究課題名（和文） MIF の腎炎発症進展における役割の解明とその治療応用に関する研究

研究課題名（英文） Pathologic roles of MIF in the development and progression of glomerulonephritis and therapeutic applicatoin of MIF inhibition

研究代表者

佐々木 聡 (SASAKI SATOSHI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：70312345

研究成果の概要：

MIF(マクロファージ遊走阻止因子)は、自然免疫を司る上流因子として知られるが、最近様々な疾患の発症や進展に関わりが深い分子である事が数多く報告されている。本研究では、MIFが、MIF 受容体や幾つか関連分子(CD74 など)と結合した結果生まれる情報伝達が、腎臓疾患に関わる機構を明らかにする事を試みた。糸球体硬化症の動物モデルであるマウス腎症やシクロスポリン腎症のモデルを用いて MIF の腎炎における役割を研究を進める中、シクロスポリン腎症における新たな病態と治療法開発の可能性についても解明し得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：糸球体腎炎、腎不全、サイトカイン、

1. 研究開始当初の背景

MIF (macrophage migration inhibitory factor)は、自然免疫を司る上流因子として知られ、近年腎疾患発症進展における役割の面においても注目されている。最近の研究で、MIF は腎臓を含めた多様な臓器に発現しており、炎症、免疫応答に限らず、腫瘍増殖、血管新生、創傷治癒において重要な役割を有している事がわかっている。正常腎においては、尿細管および糸球体上皮細胞を中心に、その発現が認められる。腎炎では、尿細管上皮細胞における発現性が増し、炎症細胞浸潤

や間質の線維化などを促す。また、最近我々は糸球体ポドサイトにおける MIF 発現の増強が進行性の糸球体硬化をきたすことをつきとめた。このように、MIF は腎症進行の過程にきわめて密接に関わることが示唆されてきた。しかしながら、これまで MIF の情報伝達機構の詳細が非常に不明であったこともあり、MIF の腎症における関与のメカニズムは十分に探求されたとはいえない。よって、我々は本研究において、複数の腎疾患動物モデルを中心に丹念に検討する事で、MIF の腎症における役割を解明し治療法を開発

するための研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究においては、腎症における MIF の役割を、MIF の情報伝達、及び向炎症性サイトカインとしてだけでなく MIF 多機能性から解明を試みる事を目的とした。具体的に、1) 腎疾患における MIF シグナル伝達機構の動態の解明、2) MIF の MIF 関連分子との結合を通じた腎障害、について解明を試み、複数の腎疾患動物モデルを用い検討し、MIF 発現抑制などにより腎疾患発症阻止、腎不全進行阻止の治療法開発を図る事を目的とした。また腎不全進行阻止に働く因子、治療法が見出されたなら、さらにそのメカニズムを探索する事とした。

3. 研究の方法

各種マウス腎炎・腎症モデルを用いて、MIF、MIF 関連分子に関する解析を開始した。モデルとして、MIF 欠損マウス (Balb/c 系統)、アドリアマイシン投与モデル (Balb/c 系統)、シクロスポリン (CyA)腎症モデル (ICR 系統)を用いて検討を行った。うち、CyA 腎症モデルにおける MIF 発現の検討を重ねるうち、本腎症を著明に改善する薬剤を見出すに至り多くの検討を重ねるのに至っている。

MIF やその他の因子が腎症の発症や進展に関与する機転として、間質繊維化(collagen III 蓄積)、細胞浸潤(リンパ球、マクロファージ)、アポトーシス (tunnel 法、caspase-3 発現)、レニンアンジオテンシン系の活性化、活性酸素系活性化(iNOS、eNOS 発現パターンの変化)等に着目し解析した。

4. 研究成果

シクロスポリン (CyA)は、移植領域に加えて、ネフローゼ症候群をはじめとする慢性腎疾患や自己免疫疾患等に対して幅広く長期使用されている。一方、CyA の長期投与に伴って最も懸念される副作用として慢性腎毒性が存在する。そのメカニズムとして、血管攣縮による虚血、直接的細胞毒性、細胞外基質増多等が指摘されている(Fig.1)が、病態解明と予防・治療法開発に関しては、未だ十分とはいえない。CyA をはじめとするカルシニューリン抑制剤を免疫抑制薬として用いた移植治療、自己免疫疾患、腎疾患治療患者は、近年圧倒的にその数を増しており、副作用である慢性腎毒性の予防や治療法開発はますます重要な課題になりつつある。

MIF は、正常腎において尿細管、糸球体上皮細胞に弱い発現を認める。ヒト各種糸球体

腎炎、動物腎炎、ネフローゼ疾患モデルにおいては尿細管や糸球体メサンギウム、上皮細胞における発現が著しく上昇し、疾患活動性と有意な相関がある事がわかっている。これまで、CyA 腎症における役割は不明であるが、CyA 腎症の病理所見の主なものとしては、尿細管の縞状萎縮、糸球体硬化が挙げられ、MIF がその病態に関与する事が推察される。

一方、近年、エリスロポエチン (Epo)が、脳神経系、心血管系、腎など非造血臓器の障害に対して保護作用を示す事が報告された。また、Epo 自身の大量投与は、多血、血栓症、高血圧などの有害事象をもたらす事が危惧される。多血や血栓症は、腎糸球体硬化を促進し、腎機能低下をもたらす可能性もある。よって造血作用を持たず、細胞保護作用のみを示す Epo 誘導体として、asialo-Epo(A-Epo)、carbamyated-Epo(C-Epo)が開発された。今回我々は、これらの Epo 誘導体が、CyA 腎症治療に有用な可能性があると考え、検討を試みた。

我々は、CyA 腎症モデルマウスを作製し、Epo 誘導体の CyA 腎症進展抑制効果について検討した。マウスを以下の 5 群 (vehicle 投与対照群、CyA 群、CyA+Epo 群、CyA+A-Epo 群、CyA+C-Epo 群)に分けて検討した。CyA 投与開始4週の時点で、腎機能、病理組織学的評価 (光顕による尿細管間質病変の検討、III型コラーゲン発現)、アポトーシスの検討、炎症性サイトカイン(オステオポンチン、マクロファージ遊走阻止因子)の発現、低酸素障害(iNOS、eNOS 発現)について検討した。

(1) 体重推移と腎機能。

CyA 群では、週齢による正常な体重増加が認められなかった。Epo、A-Epo、C-Epo 群では対照群同様の体重増加がみられた。血清クレアチニン (sCr)値は、CyA 群において有意な上昇が認められたのに対して、CyA+Epo 群、CyA+A-Epo 群、CyA+C-Epo 群では、いずれも sCr 上昇が有意に抑えられていた (図 1)。Epo、Epo 誘導体共に、CyA 腎症による腎機能低下を抑制し得る事が示唆された。一方、BUN 値に関しては、Epo 誘導体 (A-Epo、C-Epo)投与による CyA 腎症による BUN 値上昇の抑制効果が認められた (図 2)。それに対し、Epo 群では、有意な抑制効果がみられなかった (図 2)。この事は、造血作用を有する Epo の大量投与が多血 (他群と比し、~10% Ht 値上昇)をもたらした事による影響も考えられた。

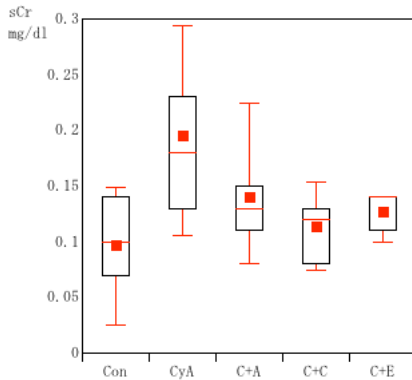


図1. 各実験群における血清クレアチニン値

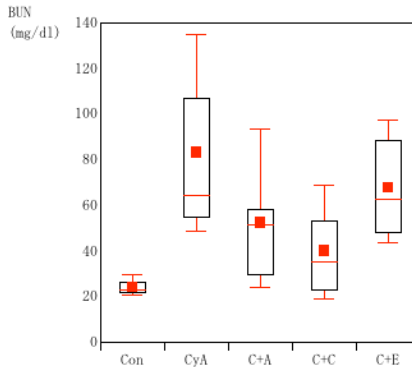


図2. 各実験群における尿素窒素値

(2) 病理組織学的変化

CyA 群では、CyA の慢性毒性として特徴的な尿細管萎縮、間質線維化が広範囲に認められた。CyA+A-Epo 群および CyA+C-Epo 群では、同病変の広がりや抑えられ、Epo 誘導体投与が、病理組織学的にも CyA 腎症抑制に有効であることが示唆された。画像解析によって、尿細管萎縮、間質線維化病変領域の割合を定量的に評価したところ、CyA+A-Epo 群、CyA+C-Epo 群では、CyA 群に比して有意に病変領域の縮小化がみられる事が確認し得た。間質領域の III 型コラーゲン発現についても、免疫染色にて検討したが、光顕における検討と同様に A-Epo、C-Epo 投与群において III 型コラーゲン発現低下がみられている。また、A-Epo、C-Epo の比較では、C-Epo の方が、組織障害抑制効果はより強力に認められた。最近、*in vitro* のレベルで、*carbamylated-Epo* が臓器保護に働く Epo 受容体との親和度が高い事が示されている事を反映しているのかも知れない。

(3) Epo 誘導体が CyA 腎症に有効なメカニズムの検討

これまで提唱されている CyA 腎症の病態のなかで、Epo 誘導体が本腎症発症、進展の抑制に働くメカニズムについて検討を試みた。

まず、アポトーシスについて、*caspase-3*

の発現を検討した。CyA 群では、CyA 投与群で糸球体周囲、尿細管上皮細胞、間質領域の一部に一致して発現の増強を認めた。CyA 群に比し、CyA+A-Epo 群および CyA+C-Epo 群、CyA+Epo 群では、発現数が有意に減少していた。CyA 腎症においては、低酸素障害の存在も重要な因子である。低酸素による臓器障害に関与する代表的因子である eNOS、iNOS の発現に関して検討した。eNOS の発現性は各群間に有意差を認めなかったのに対して、iNOS の発現性は各群において明らかに違いが見られた。CyA 群においては、尿細管上皮細胞を中心に著しい iNOS の上昇が認められた。A-Epo、C-Epo 投与群では、その発現が有意に抑制されていた。iNOS は、アポトーシス、細胞増殖に関与する積極的因子であり、Epo 誘導体が尿細管細胞による iNOS 発現増強を抑える事が CyA 腎症抑制に働いている事も考えられた。また、CyA 腎症をはじめとする尿細管間質障害に積極的に関与する炎症性サイトカインであるオステオポンチン、また代表的な向炎症性サイトカインの一つである MIF について検討した。オステオポンチンは、CyA 投与群では、尿細管上皮細胞に著しい発現増強を認めた。これに対し、CyA+A-Epo 群、CyA+C-Epo 群では、発現強度減、発現範囲がより狭い範囲に留まっていた。また、MIF についても同様の傾向を認め、Epo 誘導体は CyA の慢性刺激による尿細管上皮細胞によるオステオポンチン、MIF をはじめとするサイトカイン発現上昇を抑制し、炎症細胞集積を抑止し組織障害を軽減化する機序も示唆された。Epo 誘導体投与は、MIF の発現性にも影響を与えている事から、CyA 腎症における MIF 発現制御機構、Epo の同発現制御に与える影響についてさらに検討を進める必要がある。MIF 受容体である CD74 は、糸球体周囲、間質領域において発現細胞が散在、また一部の糸球体上皮細胞に発現している。その発現性は、組織障害が高度になるにつれて増強傾向を示す事から、障害進展に何らかの役割を果たしている事が示唆される。

(4) 結論的に、Epo、及び Epo 誘導体が、CyA による慢性腎障害進展を抑制する可能性が示唆された。多血をはじめとする副作用を有しない Epo 誘導体は、CyA 腎症の治療に有望な可能性がある。

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 Ishikura K、Sasaki S (9名中5番目)、Honda M、他、Effective and safe treatment with cyclosporine in nephrotic children: a prospective, randomized multicenter trial、Kidney International、73、1167-1173、2008、査読有
- ② Morita K、Sasaki S (11名中10番目)、Nonomura K、他、Pediatric kidney transplantation is safe and available for patients with urological anomalies as well as those with primary renal diseases、Pediatric Transplantation、13、200-205、2008、査読有
- ③ Onodera S (7名中1番目)、Oshima S、Koyama Y、他、Active immunization against macrophage migration inhibitory factor using a novel DNA vaccine prevents ovariectomy-induced bone loss in mice、Vaccine、26、829-836、2008、査読有
- ④ 佐々木聡、腎泌尿器疾患診療マニュアル 小児から成人まで・主要症候・検査から腎尿路系疾患を見つけ出す・電解質異常 Na・Cl の異常(小児)、日本医師会雑誌、36、S98-S99、2007

[学会発表] (計 2 件)

- ① 伊東広臨、佐々木聡、岡本孝之、有賀正、エリスロポエチン誘導体は、シクロスポリン腎症の進展を抑制し得る、第44回日本小児腎臓病学会、平成21年6月26日、東京都
- ② 中島泰志、佐々木聡、伊東広臨、有賀正、重症ループスエリテマトーデス若年症例における低用量シクロフォスファミドパルス療法(EURO-Lupus)による寛解導入、第43回日本小児腎臓病学会、平成20年6月13日、福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 聡 (SASAKI SATOSHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：70312345

(2) 研究分担者

小野寺 伸 (ONODERA SHIN)
北海道大学・大学院医学研究科・特任講師
研究者番号：00359481

(3) 連携研究者 なし