

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591263
 研究課題名（和文）マトリックスメタロプロテイナーゼ遺伝子過剰発現マクロファージを用いた腎線維化治療

研究課題名（英文）Therapeutic potential for renal fibrosis using macrophages genetically modified to produce matrix metalloproteinases.

研究代表者

西田 眞佐志（NISHIDA MASASHI）
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：50275202

研究成果の概要：片側尿管結紮によるマウス腎線維化モデルにおいて、選択的マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤を用いた実験により、腎線維化修復過程においては、マトリックスメタロプロテイナーゼにより分解された細胞外基質成分がマクロファージ浸潤を促進させ、その喰食処理により腎線維化の軽減と組織修復に関わっている可能性が示された。これらの結果は、マトリックスメタロプロテイナーゼ遺伝子過剰発現マクロファージを用いた腎線維化治療の可能性を裏付けるものであった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・小児科学

キーワード：腎線維化、マクロファージ、MMP

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体および間質の線維化は、原因の如何を問わずほぼすべての腎疾患において認められる最終的な病理組織像であり、この病変が広がることにより臨床的に末期腎不全を呈する。特に、腎間質に線維化が起こると病変は不可逆的となり、腎不全に至る。しかし、このような腎間質線維化の進展メカニズムの詳細については未だ不明な点も多く、その有効な治療法も未だ確立されていない。腎線維化の過程は細胞外基質(extracellular matrix: ECM)の過剰な蓄積により特徴づけら

れるが、ECMの分解に中心的役割を果たしているのがmatrix metalloproteinase(MMP)を中心とするproteaseである。実際に片側尿管結紮(unilateral ureteral obstruction: UUO)による腎線維化動物モデルにおいてもMMPやtissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1)の発現増加が報告されている。

一方、腎間質線維化進展の過程では、間質へのマクロファージの浸潤が認められ、UUOモデルでも早期より間質にマクロファージを主体とした細胞浸潤が認められる。従来、

これらの腎浸潤マクロファージの腎障害に対する促進的な役割が考えられており、UUOモデルでも経時的に間質浸潤マクロファージ数の増加に平行して腎皮質におけるTGF- β 1 mRNAなど pro-fibrotic geneの発現の増加が認められることなどより、間質浸潤マクロファージの腎間質線維化に対する促進的な役割が考えられてきた。しかし以前我々が報告した angiotensin II type 1 receptor (Agtr1) geneの knockout mouseより得た骨髄を wild type mouseに移植し、UUOにより腎線維化を誘導する実験により、従来報告されてきた腎障害の程度と腎浸潤マクロファージ数の正の相関とは逆に、UUOの後期においては浸潤マクロファージが腎線維化の進展に対し、腎保護的に働いている可能性が示唆され、この機序として Agtr1を介する angiotensin IIのマクロファージ嚥食促進作用が示唆された (J Clin Invest 110:1859-1868, 2002)。さらにマウス UUOモデルにおいて、シクロフォスファミドの腹腔内投与によりマクロファージ欠乏を誘導し、その後マウス骨髄由来マクロファージを静脈内に反復して投与する実験により、UUO後期の腎線維化修復過程においては、腎間質浸潤マクロファージが組織修復および腎線維化軽減作用をもつ可能性が示された (Nishida M et al. Biochem Biophys Res Commun 332:11-16, 2005)。

MMPはECMの分解、線維化の軽減、組織修復において中心的役割を果たす酵素であり、現在までの我々の結果をふまえて、腎線維化の修復過程においては、MMPなどのECM蛋白分解酵素と浸潤マクロファージの共同作用が重要であるという認識に至った。今回、UUO腎におけるMMP-2の作用をマクロファージ浸潤などの機能にfocusを当て検討することで、MMP遺伝子導入などによりマクロファージ機能を増強させることによる腎線維化に対する治療応用の可能性を検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MMP産生マクロファージの腎線維化に対する治療応用の可能性を探るものである。従来、腎線維化に対するMMPの作用に関しては、ECMの蓄積はその産生と分解のバランスによるとの観点から、MMPのECM分解作用を介する線維化に対する軽減作用を中心として考えられてきた。また、腎浸潤マクロファージの腎障害促進的な作用やその機序に関しても多くの研究がなされてきた。しかし、我々の検討では、ある条件下では腎浸潤マクロファージは腎保護的な作用も合わせ持つ可能性が示唆された。現在まで、このマクロファージの腎保護的な作用に関してはあまり検討がなされておらず、この点を明らかにすることは腎障害進展過程を理解する上で

極めて重要なことと考えられる。さらに、本研究はこのマクロファージによる腎保護的な作用に着目し、治療応用の可能性を探るものであり、今後の新たな腎疾患治療開発の端緒となるものである。

3. 研究の方法

マウス UUOモデルにおいて選択的MMP-2阻害剤(TISAM)を線維化の早期(UUO day -2 から day 4)または後期(UUO day 7 から day 13)において投与し(5mg/kg/dayを1日1回経口投与)、UUO早期(day 5)およびUUO後期(day 14)のUUO腎におけるgelatinolytic activityの変動をin situ zymographyにより、また腎線維化の程度を腎組織のMasson染色や、腎組織抽出液中のヒドロキシプロリン含有量のHPLC法による定量などにより検討した。間質浸潤マクロファージ数をF4/80免疫染色により検討した。さらに、マウスに3%thioglycollateを腹腔内投与することにより得た腹腔由来マクロファージのUUO腎組織やECM構成蛋白(intact laminin, intact fibronectin)、ECM分解産物(RGDS peptide)などに対する遊走能をinvasion chamberを用いin vitroにて検討した。以上により、線維化のさまざまなstageにおけるMMPの作用とそのマクロファージ浸潤に対する影響、その関連性や相互作用などにつき検討した。

4. 研究成果

(1) 結果

① TISAM投与によるUUO腎におけるgelatinolytic活性に対する影響
UUO腎においてUUO後day 4, day 13とも主として尿細管間質領域にin situ zymographyによる強いgelatinolytic活性が認められた。これらのgelatinolytic活性はMMP-2の選択的阻害剤であるTISAM投与によりUUO後day 4, day 13の両者とも減弱した。コントロールマウスのUUO腎におけるgelatinolytic活性はMMP阻害剤である1,10-phenanthrolineをcoatしたゼラチンフィルムを使用することにより著明に減弱した。UUO未施行の対側腎ではgelatinolytic活性はほとんどみられなかった。

② TISAM投与によるUUO腎における腎線維化と間質マクロファージ浸潤に対する影響

TISAM投与によりUUO day 5, day 14の両者において、コントロール群に比し間質collagen indexの有意な増加を認めた(day 5: 44 ± 3 vs. 79 ± 5 / 1000 points, $P < 0.001$, $N=7$ in each group; day 14: 95 ± 8 vs. 202 ± 45 , $P < 0.05$, $N=10$ in control and $N=8$ in TISAM group)。F4/80陽性浸潤マクロファージ数に関しては、UUO day 5ではTISAM投与によりコントロール群に比し有意

な変動はみられなかったが(12.7 ± 0.5 vs. 11.7 ± 0.6 / ×400 field, NS)、UUO day 14では TISAM 投与により有意な減少を認めた(32.0 ± 1.9 vs. 21.6 ± 1.5, P<0.001)。

③ マクロファージ遊走活性

Matrigel-coated insertを用いたin vitroにおけるマクロファージ遊走活性の検討では、TISAM投与マウスのUUO腎組織(day 14)を下部compartmentにおいた場合の遊走活性は、コントロールマウスのUUO腎に対するものと比べ有意に減少した(40.8 ± 3.3 vs. 28.7 ± 1.5 / ×400 field, P<0.001)。UUO未施行の対側腎に対しては遊走マクロファージはわずかであった(7.7 ± 1.2)。下部compartmentにagentを加えない場合の遊走活性は無視し得るものであり(2.8 ± 0.6)、intact lamininまたはintact fibronectin (10⁻⁷ M)を加えた場合は小数の遊走がみられた(14.9 ± 0.9 in intact laminin, and 10.4 ± 2.1 in intact fibronectin)。しかしながらfibronectin分解peptideであるRGDS (10⁻⁷ M)、またはマクロファージ遊走促進因子であるfMLP (1 μM)を加えた場合、遊走活性は著明に増加した(45.3 ± 6.1 in RGDS peptide, P<0.001 vs. intact laminin or intact fibronectin; 48.0 ± 2.4 in fMLP, P<0.001 vs. intact laminin or intact fibronectin)。さらにマクロファージをRGDS peptide (10⁻⁷ M)とpreincubateし、あらかじめそのligand receptorをブロックした場合、コントロールマウスのUUO腎組織(day 14)に対する遊走活性は有意に減弱した(41.5 ± 2.7 vs. 24.1 ± 1.3, P<0.001)。これに対し、TISAM投与マウスのUUO腎組織に対する遊走活性は、マクロファージをRGDS peptideとpreincubateしても有意な変化はみられなかった(21.0 ± 1.5 vs. 25.1 ± 2.0, NS)。

(2) 考察

本研究では TISAM 投与により UUO 腎における gelatinolytic 活性の抑制が認められ、これは MMP-2 活性の抑制によるものと考えられた。これは以前の報告において、UUO 腎では gelatinase である MMP-2 と MMP-9 の内、MMP-2 mRNA の増加がみられるが MMP-9 mRNA は減少しており、また UUO 腎において尿細管間質領域において強い MMP-2 mRNA の発現がみられるが、MMP-9 mRNA の発現は主に糸球体にみられるとの報告と一致するものであった。

今回の我々の研究で、UUO day -2 から day 4 における MMP-2 活性の抑制により UUO day 5 における腎線維化が増強し、UUO day 7 から day 13 における MMP-2 活性の抑制によっても UUO day 14 における腎線維化が増強したことは、MMP-2 活性の抑制による ECM 分解の減少が要因として考えられる。さらに重要なことに、MMP-2 活性の抑制による腎線維化の増加に伴って、UUO 早期(day 5)では間質浸潤マク

ロファージ数に有意な変動を認めなかったが、UUO 後期(day 14)では浸潤マクロファージ数の有意な減少を認めた。この結果より、MMP-2 が UUO 後期にのみ stage-specific に、マクロファージ浸潤促進作用をもつ可能性が示唆された。

さらにこの機序を解明する目的で、我々はマウス腹腔由来マクロファージを用いて、in vitro におけるマクロファージ遊走活性に関する実験を行った。これらの結果より、マクロファージは UUO 後期(day 14)の腎組織に対し遊走活性をもち、UUO 腎の MMP-2 活性を抑制することによりこのマクロファージ遊走活性も抑制されること、マクロファージは ECM 構成成分である intact laminin や intact fibronectin に対するより fibronectin 分解産物である RGDS peptide に対して著明な遊走活性を有すること、さらにマクロファージを RGDS と preincubate し ligand receptor をブロックすることによりコントロールマウスの UUO 腎組織に対する遊走活性は有意に抑制されることなどが明らかとなった。これらの結果により、MMP-2 により分解された ECM に由来する RGDS peptide が、UUO 後期の腎における間質マクロファージ浸潤に促進的に作用していることが示唆された。

腎線維化の過程における浸潤マクロファージの正確な役割は以前不明であるが、近年腎線維化におけるマクロファージの組織修復における役割も報告され、その機序にマクロファージによる ECM 分解産物の phagocytic removal を介する機序が示唆されている。今回の我々の結果より、UUO 後期の腎線維化修復過程においては、MMP-2 を介して産生された ECM 分解産物がマクロファージ浸潤を促進させ、この浸潤マクロファージは ECM 分解産物の喰食処理により腎線維化の軽減と組織修復に関わっている可能性が示された。腎線維化の修復過程においては、MMP などの ECM 蛋白分解酵素と浸潤マクロファージの共同作用の重要性が示され、マクロファージの MMP 産生能を遺伝子導入などにより増強させ、腎線維化に対する治療に応用するという可能性が示された。従来、浸潤マクロファージは線維化に対し促進的に働き、線維化に対する治療としてマクロファージ浸潤を抑制する手法が実験的に多く行われているが、本研究は線維化のステージによりマクロファージは組織修復的に働くことを示し、マクロファージの作用を増強させることで治療応用のために使用する可能性を示すユニークなものである。今後、実際に遺伝子導入などにより MMP を過剰発現するマクロファージを作成し、それらを用いた腎線維化に対する効果などの検討を進めていく予定である。

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 Nishida M, Hamaoka K. Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*. 2008;110:e31-36. (査読有)
- ② Nishida M, Okumura Y, Sato H, Hamaoka K. Delayed inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase ameliorates renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:2520-2524. (査読有)
- ③ Nishida M, Okumura Y, Fujii M, Yoneda T, Yamamoto Y, Ozawa S, Hamaoka K. Pancreatitis and pancreatic abscess in a CAPD patient with severe malnutrition. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:975-976. (査読有)
- ④ Nishida M, Okumura Y, Ozawa S, Shiraishi I, Itoi T, Hamaoka K. MMP-2 inhibition reduces renal macrophage infiltration with increased fibrosis in UUO. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354:133-139. (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① 西田眞佐志：片側尿管結紮モデルにおける腎間質線維化、第36回近畿小児腎臓病研究会、2007.11.24. 大阪
- ② 西田眞佐志、奥村保子、白石公、糸井利幸、濱岡建城：p38 MAPK 阻害剤による腎線維化軽減効果の検討、第50回日本腎臓学会総会、2007.5.25-27. 浜松
- ③ 西田眞佐志、奥村保子、白石公、糸井利幸、濱岡建城：p38 MAPK 阻害剤の腎線維化に対する影響、第42回日本小児腎臓病学会、2007.6.28-30. 横浜
- ④ 奥村保子、杉山紀之、西田眞佐志、濱岡建城、谷村進、河野通明、横山尚彦：inv/inv ΔC::GFP マウス (2型若年性ネフロン癆モデルマウス) の腎嚢胞形成における ERK-MAP kinase cascade の役割、第42回日本小児腎臓病学会、2007.6.28-30. 横浜
- ⑤ Nishida M, Okumura Y, Sato H, Toiyama K, Shiraishi I, Itoi T, Hamaoka K. Effect of p38 MAPK Inhibition on Renal Fibrosis. The 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2007.11.2-5. San Francisco, USA

(1) 研究代表者

西田 眞佐志 (NISHIDA MASASHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50275202

(2) 研究分担者

濱岡 建城 (HAMAOKA KENJI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：60189602

(3) 連携研究者

なし

6. 研究組織