

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19603

研究課題名(和文) シクロスポリン腎症の病態解明と早期診断を目的としたバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cyclosporine nephropathy and development of biomarkers for early detection of cyclosporine nephropathy

研究代表者

山田 剛史 (Yamada, Takeshi)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90601922

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)：小児のネフローゼ症候群に対する治療はステロイドであるが、再発を繰り返すことが多いためその副作用が問題となる。免疫抑制薬のシクロスポリンは再発予防に有効な薬剤であるが、長期投与による腎毒性が問題となる。今回、シクロスポリンが腎毒性をきたすメカニズムについて研究し、その一端を解明した。すなわち、シクロスポリン長期投与による尿細管間質の線維化にM2型マクロファージが関与しており、さらにステロイドの投与はM2型マクロファージの活性化を介して線維化を助長していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nephrotic syndrome is the most common chronic kidney disease in children. Most patients respond well to steroid therapy. However, many patients relapse and suffer from side effects of steroid. On the other hand, cyclosporine is effective in preventing relapse, but cyclosporine-induced nephrotoxicity is observed in some patients during long-term treatment. I revealed some mechanisms of cyclosporine-induced nephrotoxicity. Chronic cyclosporine-induced nephrotoxicity is characterized by arteriopathy and tubulointerstitial lesions. Tubulointerstitial lesions consist of vacuolization of the tubules, focal areas of tubular atrophy, and interstitial fibrosis. The results obtained in this study suggest that M2 alternatively activated macrophages are involved in the interstitial fibrosis and that steroid therapy promotes interstitial fibrosis by activating M2 macrophages.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：シクロスポリン腎症 マクロファージ ネフローゼ症候群

1. 研究開始当初の背景

小児のネフローゼ症候群(NS)は、年間小児10万人あたり5人に発症がみられる比較的頻度の高い慢性腎疾患である。小児NSの約90%は原因不明な特発性NSであり、その約8割はステロイド治療により寛解にいたるステロイド感受性NSである。しかし、約8割に再発がみられ、さらにその約半数(全体の4割)がステロイドの減量または中止により再発を繰り返す頻回再発例またはステロイド依存例となる。また一部に、徐々にステロイド治療への抵抗化を生じる症例もあり、このようなステロイド依存性・難治例では、易感染性、成長障害、肥満、高血圧、骨粗鬆症等のステロイドの副作用により、患児のQOLが著しく低下する。こうした難治性NSに対して、ステロイド代替薬として免疫抑制薬が使用されるが、本邦において小児NSに対して保険適応を有し、有効性のエビデンスが確立している薬剤はシクロスポリン(CyA)、シクロホスファミド(CyPh)および最近認可されたBリンパ球に対する分子標的薬リツキシマブのみである。しかし、CyAは長期投与による慢性腎毒性(CyA腎症)、CyPhでは性腺抑制などの重篤な副作用が知られ、かついずれも投与中止により原病の再発が高頻度にみられる。また、リツキシマブもBリンパ球の回復とともに再発がみられることから、CyAを主とした免疫抑制薬の併用または後療法が必要とされている。

このような背景のもと、臨床の現場ではCyPhの短期限定使用とCyAの長期使用を余儀なくされている。CyAの長期使用にあたっては、血中濃度や腎機能のモニタリング、さらに腎生検を行いつつ慎重な管理が必要であるが、CyA腎症を臨床的に早期診断することは極めて困難であり、小児に対して安全かつ非侵襲的な診断法が存在しないのが現状である。

CyA腎症の発症機序はいまだに不明な点が

多いが、病理像は細動脈・尿細管間質病変が主体であり、進行に伴い高度な間質線維化と不可逆性腎機能障害を生じることが知られている。一方、腎尿細管間質の線維化は、炎症性・非炎症性を問わず、末期腎不全へと進行する全ての腎疾患にみられる普遍的な現象である。これまでに各種の慢性糸球体腎炎で、活性化マクロファージ(M)が腎の組織障害・線維化に深く関与することを報告してきた。特に抗炎症性または組織修復に関わるM2型活性化マクロファージ(M2)が腎糸球体硬化や尿細管間質線維化などの慢性病変の形成に強く関与することを見出している。

以上の知見から、小児NSに生じるCyA腎症の尿細管間質線維化にM2が関与する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、シクロスポリン腎症の尿細管間質線維化の進展機序を明らかにし、その制御法を確立することである。尿細管間質線維化の進展機序に関しては、M2型活性化マクロファージが関与する可能性について検討する。

3. 研究の方法

ステロイド依存性ネフローゼ症候群患者のうち、CyAを2年以上投与された症例を対象とし、CyAの投与されていない症例を対照とした。各々の腎組織で、糸球体病変(メサンギウム基質の増生、糸球体細胞数)、間質線維化(-smooth muscle actin(SMA)および型コラーゲン発現)、マクロファージ(M)の浸潤について比較検討した。糸球体病変は一般の病理診断時に行うPeriodic acid-Schiff(PAS)染色標本を用い、コンピュータ画像解析にて1糸球体切片あたりに占める、PAS陽性領域(メサンギウム基質領域)および1糸球体あたりの総細胞数を単位面積あたりに換算して行った。間質線維化お

よび M 浸潤数については、同じ腎生検組織のパラフィン包埋切片を用いて、酵素抗体法または蛍光抗体法による免疫組織染色を行った。いずれも、一患者あたり 12 個以上の糸球体でカウントし、間質では高倍率 (400 倍) 下連続 9 視野以上でカウント、計測した。

CyA 投与群は、CyA 投与後 2 年以上経過した時点での腎生検検体を用いた。また、診療録を後方視的に検討し、初発時から腎生検施行時までのステロイド投与量を、体重あたりのプレドニゾロン (PSL) 投与量で算出し、間質の線維化および M 浸潤度との相関について検討した。

ネフローゼ症候群は厚生労働省研究班の定義に従い、蛋白尿の持続と低蛋白血症により診断した。すなわち、早朝尿で 300mg/dL 以上の蛋白尿が持続し、血清総蛋白が 6.0g/dL 以下 (乳児では 5.5g/dL 以下) または血清アルブミンが 3.0g/dL 以下 (乳児では 2.5g/dL 以下) のときに、ネフローゼ症候群と診断した。患者は全てステロイドによる治療が行われた。初発時には、PSL を体表面積当たり 60mg (60mg/m²) 4 週間投与し、その後は 40mg/m² を 4 週間隔日投与して治療を終了した。再発時には、PSL60mg/m² で治療を開始し、尿蛋白陰性を 3 日間確認した後に漸減中止した。CyA は血中濃度を測定し、投与開始後 6 か月間は、トラフ濃度 80-100ng/mL を維持するよう投与量を調整し、その後は、トラフ濃度 60-80ng/mL となるよう調整を続けた。なお、ステロイド減量中あるいはステロイド中止後 2 週間以内に 2 回連続して再発した場合を、ステロイド依存性と定義した。

使用抗体類

本研究では、一次抗体として、抗ヒト CD68 マウスモノクローナル抗体 (PG-M1: マウス IgG3; 汎 M) (DAKO, Tokyo, Japan) 抗ヒト CD86 ウサギモノクローナル抗体 (EP1158Y: ウサギ IgG; M1 マーカー) (abcam,

Tokyo, Japan) 抗ヒト CD163 マウスモノクローナル抗体 (10D6: マウス IgG1; M2 マーカー) (Vision Biosystems, Newcastle-upon-Tyne, UK) 抗ヒト SMA マウスモノクローナル抗体 (1A4: マウス IgG2a) (DAKO) 抗ヒト I 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) および抗ヒト CTGF マウスモノクローナル抗体 (2154-60: マウス IgM) (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Germany) を使用した。また、二次抗体として、horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス抗体 (DAKO)、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗マウス抗体 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA)、tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC) 標識ヤギ抗マウス抗体 (Southern Biotechnology Associates) FITC 標識ブタ抗ウサギ抗体 (DAKO) FITC 標識ヤギ抗マウス抗体 (Chemicon, Temecula, CA, USA) を用いた。

免疫組織化学

腎生検組織のパラフィン切片 (厚さ 2 μm) をキシレンによる脱パラフィン後、エタノールで親水化、抗原賦活化のため pH6.0 クエン酸ナトリウム緩衝液を使用して 20 分間のオートクレーブによる加熱処理を施し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄した。これにより得られた検体を、以下に示す通り、酵素抗体法および蛍光抗体法にて染色した。

酵素抗体法

酵素抗体法は PAP 法 (peroxidase-anti-peroxidase) を用いた。検体を、10%ヤギ血清、10%ウシ胎児血清 (FCS)、1%ウシ血清アルブミン (BSA) に 30 分間反応させ、一次抗体を 4 で一晩反応させた。一次抗体として、抗ヒト CD68 マウスモノクロ

ーナル抗体 (PG-M1: マウス IgG3) 抗ヒト CD163 マウスモノクローナル抗体 (10D6: マウス IgG1) 抗ヒト -SMA マウスモノクローナル抗体 (1A4: マウス IgG2a) を用いた。その後、PBS により 3 回洗浄し、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するために過酸化水素水で処理し、PBS で洗浄した。続いて、二次抗体として HRP 標識ヤギ抗マウス抗体を 45 分間、PAP (peroxidase-anti-peroxidase complex) を 45 分間、各々室温で反応させた。PBS で洗浄後、DAB (diaminobenzidine) または True Blue を用いて発色させた。酵素抗体法で染色された CD68 陽性細胞および CD163 陽性細胞を、一患者あたり 12 個以上の糸球体でカウントし、間質では高倍率 (400 倍) 下連続 9 視野以上でカウントした。また、尿細管間質の線維化は、コンピュータを用いた画像解析にて、単位面積当たりの -SMA 陽性領域の面積を計測、%として算出した。解析ソフトとして Sigma Scan Pro version5.0 (Systat Software, Point Richmond, CA, USA) を用いた。

蛍光抗体法

蛍光抗体染色は、上述のパラフィン包埋切片を用い、脱パラフィン、抗原賦活化を行った後に、主に細胞の表出抗原の一致または抗原局在の一致を確認するための二重染色を目的に行った。一次抗体として抗ヒト CD68 マウスモノクローナル抗体 (PG-M1: マウス IgG3) 抗ヒト CD86 ウサギモノクローナル抗体 (EP1158Y: ウサギ IgG) 抗ヒト CD163 マウスモノクローナル抗体 (10D6: マウス IgG1) 抗ヒト I 型コラーゲンウサギポリクローナル抗体、抗ヒト CTGF マウスモノクローナル抗体 (2154-60: マウス IgM) を用いた。二次抗体として、一次抗体のサブクラスまたは宿主の対応した FITC 標識ヤギ抗マウス IgG1、IgM 抗体、TRITC 標識ヤギ抗マウス IgG1、IgG3 抗体、FITC 標識ブタ抗ウサギ抗体、を用いた。

CD68 陽性細胞数、CD86 陽性細胞数、CD163 陽性細胞数は、酵素抗体法でのカウントと同様の方法でカウントし、間質での I 型コラーゲン陽性領域の占める面積も、酵素抗体法と同様の方法で計測した。

統計学的解析

患者年齢、薬剤投与期間、薬剤投与量、再発回数、eGFR (estimated glomerular filtration ratio) は、平均値 \pm SD で示した。統計解析は統計ソフト GraphPad バージョン 6.0 (San Diego, CA, USA) を用いて、群間の有意差検定に Mann-Whitney test または Fisher's exact test を用い、相関係数の検定に Pearson single correlation coefficient または Spearman's correlation coefficient を用いて行った。各々 $P < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

(1) CyA 群と対照群の臨床背景の比較

両群間で、男女比、発症年齢、腎生検時年齢、発症から腎生検までの期間、腎生検時の腎機能 (eGFR) のいずれにも有意な差が認められなかったが、発症から腎生検までの PSL の総投与量が CyA 投与群で有意に多かった。

(2) CyA 群と対照群の組織所見の比較

CyA 投与群と非投与群で、糸球体病変 (糸球体基質の増生、糸球体総細胞数) に差異はみられず、全例微小変化型であった。一方間質では、免疫組織染色 (酵素抗体法) にて、CyA 投与群で -SMA 発現の有意な増加が認められ、-SMA 発現部位に一致して有意な CD163 (M2 マーカー) 陽性細胞浸潤の増加を認めた。蛍光抗体所見でも、CyA 投与群の間質に I 型コラーゲン発現の有意な増加と、これに一致して CD163 陽性細胞浸潤が認められた。また、CD68 (汎 M マーカー) 陽性細胞浸潤も CyA 投与群で有意に多かったが、CD86 (M1 マーカー) 陽性細胞浸潤は少なく、両群

間に差を認めなかった。

二重蛍光染色で、CD68 陽性細胞の 95%が CD163 を発現していたが、CD86 陽性の M はわずかであった。さらに、この CD163 陽性細胞に一致して線維化促進因子である CTGF の発現が確認された。

(3) 間質線維化と各種パラメータの相関

間質の線維化と臨床データとの相関を検討したところ、CyA 投与中の PSL 投与量 ($r = 0.74$, $P < 0.01$)、CyA 投与期間 ($r = 0.80$, $P < 0.01$)、CyA 投与中の再発回数 ($r = 0.68$, $P < 0.05$) が、間質線維化と有意な相関を認めた。間質の線維化は、間質の α -SMA 陽性領域面積を用いて検討したが、これは CD163 陽性細胞数 ($r = 0.82$, $P < 0.01$) とも相関していた。さらに、CD163 陽性細胞数は、CyA 投与中の PSL 投与量 ($r = 0.73$, $P < 0.05$) および CyA 投与期間 ($r = 0.82$, $P < 0.01$) と相関していた。CD86 陽性細胞数は、間質の線維化、CyA 投与期間のいずれとも相関はみられなかった。

今回の検討から、ステロイド依存性ネフローゼ症候群患者に対する CyA の長期使用により生じる CyA 腎障害に M が関与することが明らかとなった。特に、CyA 腎症の特徴的な病理所見である尿細管間質線維化に CD163 陽性の M2 型 M が関与するものと考えられた。

本研究で明らかになったもう一点の重要な事実は、長期 CyA 投与患者では、程度に差はあるものの、非投与患者と比較して有意な間質線維化が認められることである。CyA 腎症の診断は、一般には病理専門医によって尿細管間質の縞状線維化や尿細管上皮細胞の萎縮、細小動脈障害などの特徴的所見からなされる。一方、今回の検討対象になった症例中、病理学的に CyA 毒性有りと診断された症例は 2 割のみであった。このことは、病理学的に CyA 腎症の特徴的所見が出現する以前にすでに様々なスペクトラムで間質線維化が

進行していることを示唆する。

CyA を 2 年以上投与されているステロイド依存性ネフローゼ症候群患者の尿細管間質には、M2 型 M が α -SMA または 型コラーゲン発現領域に一致して浸潤していた。さらに、浸潤した M2 型 M の数と、間質の線維化の程度は有意に相関していた。これらの所見は、慢性糸球体腎炎や実験腎炎で、M2 型 M と糸球体、尿細管間質の線維化に関連があるとする、過去の報告とも一致する¹⁾⁻³⁾。

また今回、CyA 治療中のステロイド総投与量と間質 M2 型 M 数との間に有意な相関が認められ、ステロイドが M の M2 型活性化もしくは M2 型 M の浸潤を促進させるという知見が得られた。実際に、ラット M がステロイド投与により M2 型へ活性化することが報告されている⁴⁾。

今回の研究から、CyA を長期間投与されたステロイド依存性ネフローゼ症候群患者では、腎尿細管間質への M2 型 M の浸潤、あるいは間質 M の M2 型活性化が促進する結果、尿細管間質の線維化を生じ、頻回のステロイド投与が M2 型 M の CTGF など線維化促進因子の産生を促進し、さらに線維化病変の形成を助長する可能性が示唆された。しかし、CyA 腎障害にみられる M2 型 M が、腎尿細管間質局所で M2 型活性化をするのか、あるいはすでに活性化した M2 型 M が腎間質へと浸潤するのか、さらにどのような機序でこれら M が腎組織へと浸潤するのか、今後解明すべき点は多い。

CyA を使用しているステロイド依存性ネフローゼ症候群患者は多く、不可逆性腎不全の原因ともなりうる CyA 腎障害の予防法の確立は最も重要な課題といえる。この点で、M2 型活性化 M は重要なターゲットと言える。我々はミゾリピンなどの代謝拮抗薬が、ステロイドによって活性化する M2 型 M の抑制作用を有することを見出している。今後 M2 型 M をターゲットとして、既知の免疫抑制薬の

応用や新規抑制薬の開発が期待される。

<引用文献>

- 1) Ikezumi Y, et al. Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. Histopathology 58: 198-210, 2011.
- 2) Ikezumi Y, et al. Alternatively activated macrophages in the pathogenesis of chronic kidney allograft injury. Pediatr Nephrol 30: 1007-1017, 2015.
- 3) Han Y, et al. Role of macrophages in the fibrotic phase of rat crescentic glomerulonephritis. Am J Physiol Renal Physiol 304: 1043-1053, 2013.
- 4) Mantovani A, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. J Pathol 229: 176-185, 2013.

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 1 件)

山田剛史、シクロスポリン腎障害発症における、M2型マクロファージの関与とステロイドの影響、新潟医学会雑誌、査読無、130巻、2016、341-350

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 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 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

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

山田剛史 (YAMADA Takeshi)
新潟大学医歯学総合病院・助教
研究者番号: 90601922

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()