

令和元年5月15日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09611

研究課題名(和文)白血球接着因子とその調節分子の糸球体腎炎における機能解析と細胞移入治療への応用

研究課題名(英文) Functional analyses of leukocyte integrins and its regulatory molecule in glomerulonephritis and those application for cell transfer therapy

研究代表者

坪井 直毅 (Tsuboi, Naotake)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50566958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】白血球発現受容体PILRは、急性炎症反応条件下において2インテグリン活性化を主に制御する。本研究は抗体型腎系球体障害におけるPILRの役割解明を目的とした。【結果】PILR^{-/-}マウスは抗GBM抗体型腎炎において野生型マウスに比し重篤な糸球体障害を示した。またPILR^{-/-}でみられた糸球体好中球増加は前免疫条件下でのみ観察された。PILR^{-/-}好中球は免疫複合体癒着が有意に増強していた。【結論】PILRは接着因子Mac-1活性化を阻害することで、腎障害を導く病原抗体依存性の好中球導入を主に制御する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から白血球発現分子PILRの接着因子Mac-1制御を介する抗体型糸球体腎炎抑制効果が明らかとなった。またPILRによる接着因子活性化抑制機能は炎症時にのみ発揮された。したがってPILRの活性化は、抗体型糸球体腎炎のみならず、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなどの炎症性自己免疫疾患に対する有望な治療ターゲットとして考えられる。

研究成果の概要(英文)：【Background】PILR expressed on leukocytes has regulatory functions in leukocyte 2 integrin activation during acute inflammation. Here, we investigated its roles in antibody-mediated glomerular inflammation. 【Results】PILR^{-/-} mice with NTS-GN demonstrated severe glomerular injury. Enhanced glomerular neutrophil accumulation was observed in NTS-GN PILR^{-/-} only under pre-immunized conditions. PILR^{-/-} neutrophils exhibited enhanced spreading and adhesion to ICs compared to those in WT cells. 【Conclusion】PILR negatively regulates antibody-mediated neutrophil recruitment, leading to renal injury, by inhibiting Mac-1 integrin activation.

研究分野：腎臓病学

キーワード：抗腎系球体基底膜抗体型腎炎 白血球活性化 接着因子 好中球 免疫複合体

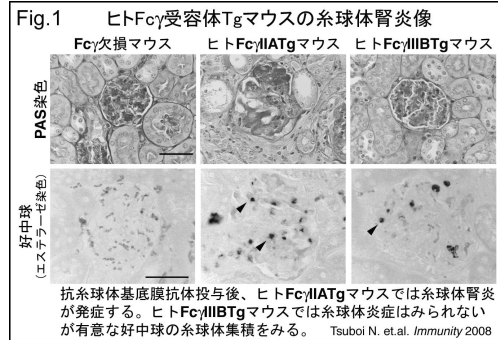
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦の透析患者数は30万人を超え、これを減少させるためCKD対策は我が国の医療の重要な課題となっている。CKDの発症・進行過程で関与する様々な機序の内、最も重要なものの一つが炎症と免疫である。特に炎症機転は糸球体腎炎に留まらず、糖尿病性腎症においても重要な役割を演ずることが近年の研究で明らかにされている。腎障害を惹起させるのは白血球であるが、免疫抑制薬や生物製剤など有効な治療薬が開発されているリンパ球に対し、好中球とMについては分子治療標的が定まっておらず、特異的な治療法は開発されていない。

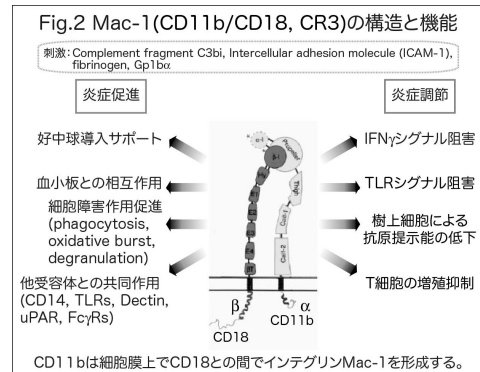
『好中球、Mの糸球体腎炎への関与』

腎炎患者の糸球体に沈着した免疫グロブリン(IgG,IgA)や免疫複合体(IC)は白血球上のFc受容体により認識される。申請者は活性型ヒトFcγ受容体(hFcγR)を好中球のみに発現させた遺伝子改変マウスを作成し、抗腎糸球体基底膜(GBM)抗体型腎炎ではhFcγRを介した好中球による糸球体炎症を起点に、M、リンパ球の順に組織炎症が拡大することを世界に先駆けて報告した(Immunity.2008,IF20.589, Fig.1). Mは組織障害の惹起のみならず抗原提示細胞としてリンパ球による免疫反応を誘導することが認知されている。近年Mには炎症促進的役割を担う炎症性M1型M以外に、炎症を抑制する免疫調節性M2型Mの存在が新たに定義された。申請者は脂肪由来幹細胞(ASC)の抗GBM抗体型腎炎腎炎治療での有用性を動物実験で証明(Furuhashi K, *J Am Soc Nephrol.*2013)し、ASCによる直接的M2型M誘導が腎炎改善の一因と結論づけ、さらには平成25-27年度科研費基盤C採択課題において、マウス抗GBM抗体型腎炎への骨髄細胞・iPS細胞から人為的に誘導したM2型M投与の優れた治療効果を確認した(論文準備中)。腎炎研究は従来のリンパ球中心の考え方から、好中球、Mを主役においた考え方へ、今大きな転換期を迎えている。



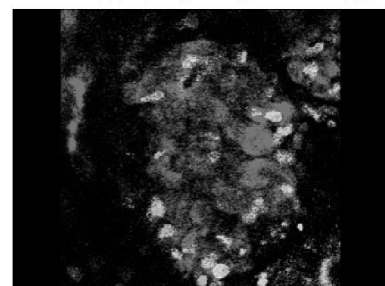
『好中球、M上のインテグリンと糸球体腎炎への関わりと、インテグリン抑制因子PILRα』

細胞表面上に発現しているインテグリンは、細胞と細胞外基質との接着、加えてその後の細胞活性化に不可欠な接着因子である(Fig.2)。インテグリンは鎖と鎖からなるヘテロ二量体であり、白血球の血管内皮への接着や炎症組織への遊走過程では、Mac-1(CD11b/CD18)、LFA-1(CD11a/CD18)が重要な役割を担うことが、遺伝子欠損動物や機能阻害抗体を用いた長年の研究により明らかになってきている。また2009年ヒトSLE患者において、Mac-1の鎖であるCD11bの点変異と疾患発症頻度に相関があるとする報告が相次ぎ(Nath SK, *Nat*

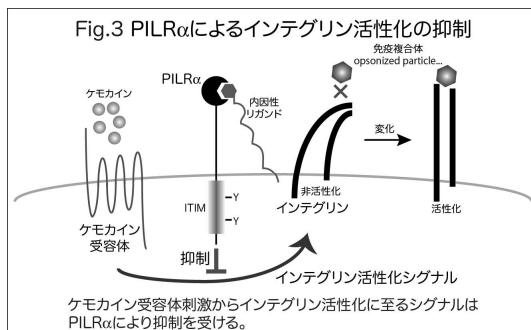


Genet.2008, Herley JB, *Nat Genet.*2008, Hom G, *N Engl J Med.* 2008)、Mac-1の機能低下の病因学的意義に注目が集まった。申請者らも、好中球特異的にヒトFcγRIIAをMac-1^{-/-}マウスに遺伝子導入し、ヒト全身性ループスエリテマトーデス(SLE)患者血清を移入することでループス腎炎を再現した(Rosetti F, *J Immunol.*2012)。同モデルの腎障害は一時的なため、慢性の全身炎症を伴うSLEの発症メカニズムへのMac-1欠損の一旦を説明したにすぎないが、Mac-1は抗体型、IC型炎症疾患を負に制御している可能性が示唆された。注目すべきことに、Mac-1の機能的agonistが薬剤スクリーニングで同定され、マウス抗GBM型腎炎モデルで治療効果を発揮した(Maiguel D, *Sci Signal.*2011)。また好中球・マクロファージ上に発現する受容体paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha (PILR)は、LFA-1活性化を負に制御することで、敗血症モデルでの白血球組織浸潤を抑制し過度な炎症が起こらないよう調

Fig.4 多光子励起レーザー走査型顕微鏡によるラット生体腎糸球体での赤血球動態観察



正常ラットにPKH greenで蛍光標識した赤血球を静脈内投与し、糸球体内での赤血球動態を観察した。カラー元画像では赤血球は緑、糸球体毛細血管は赤、細胞核は青にそれぞれ蛍光標識されている。



節する因子として同定された。抗体型あるいは IC 型系球体腎炎発症への関与は明らかではないが、Mac-1 活性化を調整する可能性が考えられる。以上から抗 GBM 型腎炎や SLE による腎炎における Mac-1 活性化と PILR α によるインテグリン活性化調整機構の解明は、学術的意味が極めて高い。

2. 研究の目的

慢性腎炎や糖尿病性腎症など主な慢性腎臓病(CKD)の発症・進展過程に共通する最も重要な機序の一つは炎症であることが多くの研究で明らかにされている。今回の研究は CKD の代表的原疾患である抗体型、免疫複合体型系球体腎炎において中心的役割を担う好中球・マクロファージの炎症部位への導入メカニズムに着目する。接着分子インテグリン Mac-1 とその抑制分子 PILR α の系球体腎炎における役割を明らかにする、多光子励起レーザー走査型顕微鏡下での生体内イメージング法を用い炎症時に系球体へ導入される白血球の動態観察の実現、炎症性 M1 型 M₁、免疫調節性 M2 型 M₂ 上の Mac-1、PILR α 機能解析を行い、インテグリン活性化調節を介した系球体腎炎発症機構の解明と、免疫調整性マクロファージを用いた細胞治療基盤の確立を目的とした。

3. 研究の方法

抗 GBM 抗体型腎炎、ループス腎炎モデルを PILR α 欠損(PILR α -/-)、およびその野生型(WT)マウスに導入し、腎機能、組織学的検討、腎炎症性サイトカイン分析、炎症白血球分画解析など多方面から疾患表現形を評価することで、Mac-1、PILR α の系球体腎炎発症・進展における役割を *in vivo* で検討した。さらに多光子励起レーザー走査型顕微鏡下での生体内イメージング法を用いた炎症系球体内好中球動態解析を行った。また、骨髄細胞よりマクロファージを誘導し、LPS 刺激後のサイトカイン分泌を評価した。

(1) 系球体腎炎発症・進展過程における Mac-1、インテグリン抑制因子 PILR α の役割

代表的 II 型アレルギー疾患である抗腎系球体基底膜 (GBM) 抗体型腎炎 (NTS-GN) を、野生型 (WT)、PILR α 欠損 (PILR α -/-) マウスで作製した。尿蛋白・血清尿素窒素・血清クレアチニンなどの腎機能解析、フローサイトメトリーを使用した好中球・マクロファージ等の腎局所浸潤の比較検討、腎傷害の組織学的検討、疾患惹起後の腎臓における mRNA、タンパクレベルでのサイトカインプロファイリングを行った。また上記腎炎モデル腎系球体を抗 PILR α 抗体と抗 Ly 6B (好中球・単球)、Ly6G 抗体 (好中球)、CD68 (マクロファージ) 抗体で蛍光二重染色を行い、炎症系球体における PILR α 陽性細胞、およびウサギ抗 GBM-IgG と二次性に産生されるマウス抗ウサギ IgG の GBM 沈着、病腎での系球体好中球浸潤評価を反映する系球体 Esterase 染色の組織学的検討、好中球由来ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 産生の評価をそれぞれ WT、PILR α -/- マウスで行なった。なおループス腎炎モデルにおいては両マウスにおける表現系が一定しなかった。また、疾患惹起時の好中球系球体導入を観察するため、抗 GBM 抗体型実験モデルにおける系球体好中球観察時間を 0, 2, 4 時間とし、かつ前免疫あり、前免疫なしの条件に分け、Mac-1 活性化アゴニスト Leukadherin-1 (LA1) を WT マウスに投与、さらには WT、PILR α -/- マウスで系球体好中球数を組織学的に評価した。

また *in vitro* 実験系として、BSA-抗 BSA 抗体により形成される免疫複合体でコートした培養ディッシュ上に両マウス系統より単離した骨髄由来好中球を添加し、接着因子 Mac-1 依存性である細胞癒着、MPO 産生における PILR α 欠損の役割について継時的に解析した。

(2) 多光子励起レーザー走査型顕微鏡下での生体内イメージング法を用いた炎症系球体動態解析

WT、PILR α -/- マウス骨髄より好中球を単離。低毒性生細胞蛍光ラベル用キット (CFSE、CMF2HC) で蛍光生細胞染色後に、前免疫ありの抗 GBM 抗体型腎炎 WT マウスに移入し系球体炎症に関わる白血球挙動を観察した。

(3) 炎症性 M1 型 M₁、免疫調節性 M2 型 M₂ 上に発現する Mac-1、PILR α の機能解析

WT、PILR α -/- マウス骨髄由来培養 M0 型 M₂ を LPS/IFN γ で M1 型 M₁ に誘導した後、それぞれ LA1 あるいは Vehicle コントロール (DMSO) で処理し、LPS 刺激後に培養上清 IL-6、IL-1 β 、TNF α 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 系球体腎炎発症・進展過程における Mac-1、インテグリン抑制因子 PILR α の役割

古典的 NTS-GN モデルにおいて、尿蛋白・血清尿素窒素・血清クレアチニン値による腎機能評価、系球体の PAS 染色陽性部位半定量的評価の両者において、PILR α -/- マウスは、WT マウスと比較し有意に重篤であった。また同腎傷害は、腎系球体内外それぞれの好中球・マクロファージ浸潤程度と強く関連しており、サイトカインプロファイリングでも、TNF α 、iNOS、IL-6 発現が PILR α ノックアウトマウスで有意に増加していた。蛍光顕微鏡によるウサギ抗 GBM-IgG および二次性マウス抗ウサギ IgG の GBM 沈着評価では、WT、PILR α -/- マウス間で差はみられなかった。病腎系球体 Esterase 陽性細胞数および好中球由来ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 産生は PILR α -/- マウスで有意に増加していた。短期観察 NTS-GN モデルにおいては、LA1 投与 WT マウスでは、前免疫ありの条件下において 2 時間後に系球体好中球数の有意な増加をみた。ま

た興味深いことに前免疫なしの条件下では糸球体好中球数に PILR^{-/-}マウスと野生型マウス間で差は認めなかったのに対し、前免疫により PILR^{-/-}マウスは4時間目の糸球体好中球数の有意な増加を示した。

In Vitro における免疫複合体(IC)上での癒着好中球数および MPO 産生においても PILR^{-/-}マウスは、WT マウスと比較し有意に増加していた。

(2) 多光子励起レーザー走査型顕微鏡下での生体内イメージング法を用いた炎症糸球体動態解析

糸球体内好中球停滞時間(dwelling time)は PILR^{-/-}マウスにおいて長い傾向が見られたが有意差は確認されなかった。原因として、CMF2HC の蛍光輝度が低く観察しにくい点が挙げられた。

(3) 炎症性M1型M^φ、免疫調節性M2型M^φ 上に発現するMac-1、PILR α の機能解析:

WT、PILR^{-/-}マウス骨髄由来 M0、M1 型 M^φ 両者で LPS 後のサイトカイン分泌に LA1 処理マクロファージでは抑制がみられたものの、WT、PILR^{-/-}マウス間では有意差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Du Q, Tsuboi N, Shi Y, Ito S, Sugiyama Y, Furuhashi K, Endo N, Kim H, Katsuno T, Akiyama S, Matsuo S, Isobe KI and Maruyama S. Transfusion of CD206+ M2 Macrophages Ameliorates Antibody-Mediated Glomerulonephritis in Mice. The American Journal of Pathology. 186(12):3176-3188, 2016, 査読有
2. Endo N, Tsuboi N, Furuhashi K, Shi Y, Du Q, Abe T, Hori M, Imaizumi T, Kim H, Katsuno T, Ozaki T, Kosugi T, Matsuo S and Maruyama S. Urinary soluble CD163 level reflects glomerular inflammation in human lupus nephritis. Nephrology Dialysis Transplantation. 31(12):2023-2033, 2016, 査読有
3. Kitagawa A, Tsuboi N, Yokoe Y, Katsuno T, Ikeuchi H, Kajiyama H, Endo N, Sawa Y, Suwa J, Sugiyama Y, Hachiya A, Mimura T, Hiromura K, Maruyama S. Urinary levels of the leukocyte surface molecule CD11b associate with glomerular inflammation in lupus nephritis. Kidney Int. 2019 Mar;95(3):680-692, 2019, 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. Yutaka Sugiyama, Naotake Tsuboi, Du Qiuna, Yutaka Kamimura, Shoichi Maruyama, Seiichi Matsuo. Paired immunoglobulin-like type2 receptor (PILR) negatively regulates antibody-mediated glomerulonephritis. ISN Nexus 2016(国際学会) 2016, Berlin, Germany
2. Yutaka Sugiyama, Naotake Tsuboi, Yuko Shimamura, Akimitsu Kitagawa, Yutaka Kamimura, Asuka Horinouchi Takayuki Katsuno, and Shoichi Maruyama. PAIRED IMMUNOGLOBULIN-LIKE TYPE2 RECEPTOR ALPHA (PILRA) NEGATIVELY REGULATES MOUSE CRESCENTIC GLOMERULONEPHRITIS. the 18th international vasculitis & ANCA workshop(国際学会) 2017, Tokyo, Japan
3. 坪井直毅, 腎糸球体炎症とマクロファージ, 第46回日本腎臓学会西部学術大会, 2016/10/14, 宮崎市
4. Yutaka Sugiyama, Naotake Tsuboi, Yuko Shimamura, Akimitsu Kitagawa, Yutaka Kamimura, Shoichi Maruyama. Negative regulation of integrin Mac-1 by paired immunoglobulin-like type2 receptor a (PILRa) enhances immune complex-mediated glomerulonephritis. ISN Frontiers Meetings 2018(国際学会) 2018
5. Akimitsu Kitagawa, Naotake Tsuboi, Takayuki Katsuno, Shoichi Maruyama. Urinary CD11b, an Alpha Subunit Integrin MAC-1, Associates with Histological Disease Activity in Lupus Nephritis. The 55th ERA-EDTA Congress, Copenhagen, Denmark, 2018

〔図書〕(計1件)

坪井直毅, 丸山彰一, Basic nephrology「Alternatively activated macrophage と腎疾患」2016, 206(2430-2433), 中外医学社

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：丸山彰一

ローマ字氏名：(MARUYAMA, Shoichi)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部大学院医学系研究科腎臓内科学

職名：教授

研究者番号（8桁）：10362253

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：荒瀬尚

ローマ字氏名：(ARASE, Hisashi)

研究協力者氏名：杜邱娜

ローマ字氏名：(DU, Qiuna)

研究協力者氏名：杉山豊

ローマ字氏名：(SUGIYAMA, Yutaka)

研究協力者氏名：北川章充

ローマ字氏名：(KITAGAWA, Akimitsu)

研究協力者氏名：古林陽一

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, Yoichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。