

令和元年6月12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：16K10062

研究課題名(和文)腎疾患特異的マクロファージの同定と機能解析および制御法の確立

研究課題名(英文) Identification of kidney disease specific macrophages and its functional analysis and establishment of control method

研究代表者

池住 洋平 (Ikezumi, Yohei)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70361897

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)：全ての慢性進行性腎疾患が末期腎不全に至る過程でマクロファージ(MQ)の浸潤が認められることに着目し、腎疾患の慢性病変の形成に特異的に関わるMQが存在することを想定し、その同定および機能解析、抑制法の開発を試みた。その結果、CD163、CD204、CD36などの抗原を表出するM2型活性化MQが慢性病変の進展に関わることを見出し、特にCD163陽性MQが全ての慢性腎疾患に共通して尿細管間質の線維化に関わることを明らかにした。CD163陽性MQは腎疾患治療に用いられるステロイドによりむしろ活性化し、病変形成を助長する可能性があり代謝拮抗薬など一部の免疫抑制薬が有効である可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により同定された腎慢性病変の進展に関わる腎疾患特異的MQは、全ての慢性腎臓病(CKD)の治療ターゲットであり、その制御法(治療法)の開発は現在まだ進行中の研究課題であるが、現在社会問題となっているCKD患者および透析患者(末期腎不全患者)の増加に歯止めをかけるための活路を見出す課題である

研究成果の概要(英文)：The progression of chronic lesions such as interstitial fibrosis, as well as macrophage (MQ) accumulation are common futures observed in the course of progressive chronic kidney diseases. This study tried to identify a chronic kidney disease-specific MQ which are associated with chronic lesions irrespective of the nature of the underlying disease. We found that M2-type activated MQs; MQs expressing CD163, CD204, or CD36 as M2-type MQ antigens were involved in the progression of chronic lesions. In particular, CD163+ M2-type MQ as the main MQ population associated with interstitial fibrosis across a range of progressive forms of kidney disease, suggesting a functional role for this MQ subset in renal fibrosis. Since M2-type MQ can be rather activated by glucocorticoid, another immunosuppressive drug such as purine nucleoside antimetabolite might be useful to regulate their activation.

研究分野：小児腎臓病

キーワード：慢性糸球体腎炎 慢性腎臓病 マクロファージ M2型活性化マクロファージ 間質線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦では学校腎臓検診制度が定着しているのにも関わらず、毎年3万以上の末期腎不全患者が新規に透析導入され、透析患者数はすでに30万人を越えなお増加傾向にある。これは、成人以降に発症がみられる糖尿病性腎症の増加と、小児期発症の慢性糸球体腎炎についてもその治療法が十分に確立していないことが最大の要因となっている。特に、これら進行性慢性腎疾患において、その進展機序について不明な点が多く、治療のターゲットが明らかでないことが治療法確立の妨げとなっていると考えられる。

筆者らはこれまでに、全ての慢性腎疾患の進展過程で認められる普遍的な現象であるマクファージ(MQ)浸潤に注目し、慢性腎疾患の発症・進展過程におけるMQの役割について検討を続けてきた。特に活性化MQは、ヒト、動物モデルを問わず、慢性糸球体腎炎の発症・進展に深く関与し、単独で糸球体障害を惹起しうることを報告してきた。

MQは、その活性化様式として炎症性(M1)と抗炎症性または組織修復型(M2)の2系統があることが知られ、M1(CD86⁺またはCD11c⁺MQ)は糸球体の管内増殖性病変や細胞性半月体などの急性活動性病変の形成に関与し、M2(CD163⁺またはCD206⁺MQ)は糸球体基質の増生や間質線維化などの慢性病変の形成に関与することを明らかにしている。

さらに、我々はこれら臨床検体を用いた検討の中で、全ての進行性腎障害の終末像としてみられる尿細管間質線維化に、腎疾患を問わず、また、ステロイドや免疫抑制薬の使用の有無に関わらず、共通してCD163またはCD206陽性のM2型活性化MQが関与することを見出した。

近年、糖尿病や動脈硬化など生活習慣病を主とする慢性疾患、さらに関節炎、癌転移巣、アトピー性皮膚炎や気管支喘息などの慢性疾患における病変形成に疾患特異的MQが存在することが次々に明らかにされているが、腎疾患特異的MQはこれまでに同定されていない。一方、我々はこれまでに様々な腎疾患の慢性病変の形成にM2が関わることを見出している。

進展機序や病態が解明された慢性腎疾患はなく、したがって治療のターゲットが明確でないことが、慢性腎疾患の診療上最大の問題となっている現状を踏まえれば、全ての腎慢性病変の形成に関与する腎疾患特異的MQをターゲットとした治療戦略は有用と考えられ、その同定は極めて重要な試みと言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性腎疾患の進展機序において、腎組織の急性・慢性病変形成に特異的に機能する腎疾患特異的MQまたは腎組織在住型MQを同定し、その機能を明らかにするとともに、その制御法を確立することである。

3. 研究の方法

1) 各種ヒト慢性腎疾患の生検組織を用いた病変に共通するM群の抽出

対象：疾患としてステロイド依存性のため2年以上の透析療法を要した微小変化型新月腎症候群(CyA-MCNS)15例、IgA腎症(IgAN)61例、紫斑病性腎炎(HSPN)22例、ループス腎炎(LN)16例、慢性移植腎障害(CAI)28例および正常対照群として菲薄基底膜病(TBMD)9例、CyAを使用していないMCNS症例(MCNS)の腎生検組織を用い、特異抗体として抗CD68抗体(汎MQマーカー)、CD163(マクファージ受容体:M2マーカー)、抗I型コラーゲン抗体(線維化)を用いて免疫組織化学染色を行い、各疾患におけるM2浸潤および組織病変との関連を検討した。

2) In vitro 実験系による解析

MQのM2型活性化誘導と発現遺伝子の解析

正常ヒト単球をAB型血清加培地にて7日間培養しMQへ分化させた細胞に、上記各種腎疾患の治療下の腎組織環境を模倣しステロイド(デキサメタゾン:DEX)または、新月腎症候群患者にみられる高脂血症下の環境を想定し、酸化LDL(oxLDL)をそれぞれ単独または併用して添加し、48時間後にMQのmRNAを回収し、DNAアレイ法にて網羅的に遺伝子発現を比較検討した。

M2型活性化制御法の検討

の系に免疫抑制薬として臨床的に使用されるミズリチン(Miz)を添加し、遺伝子発現への影響を検討した。

3) 生検組織での関連分子発現の確認作業

上記2)の実験系で発現の増減が確認された分子について、腎生検組織での発現の増減を確認した。

4. 研究成果

1) ヒト腎生検組織における尿細管間質線維化に特異的MQ

尿細管間質の線維化の程度(間質面積当たりのI型コラーゲン陽性面積%)およびCD163⁺陽性細胞数(1顕微鏡強視野hpf当たりの細胞数)はいずれの疾患においても対照群(MCNS, TBMD)と比較して有意に高度であった(図1)

また、いずれの疾患においても間質線維化の程度と間質の CD163⁺細胞数との間に有意な相関を認めた(図2)。

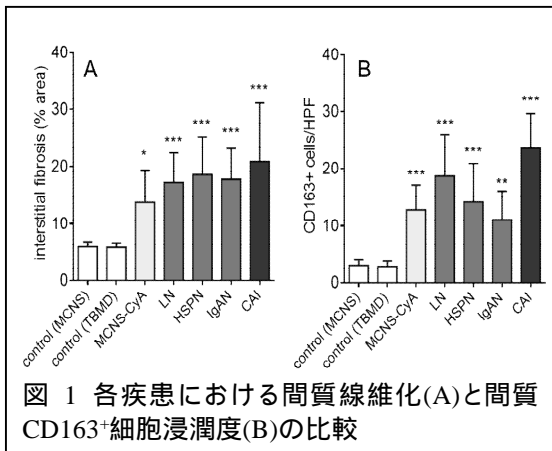


図1 各疾患における間質線維化(A)と間質CD163⁺細胞浸潤度(B)の比較

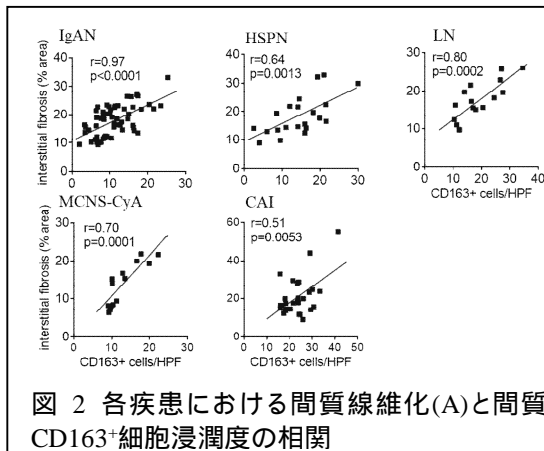


図2 各疾患における間質線維化(A)と間質CD163⁺細胞浸潤度の相関

抗 CD68 と抗 CD163 との蛍光二重染色所見では両者は一致し CD163 陽性細胞はいずれも M2 型活性化 MQ であることが確認された。さらにこれら 163⁺M2 は I 型マーカー発現部位と一致していた。以上の結果から CD163⁺MQ は炎症性(IgAN, HSPN, LN)、非炎症性(CyA-MCNS, CAI)を問わず、いずれの病態においても CD163⁺M2 が間質線維化に関与することが示唆された。

2) in vitro 実験系による M2 活性化と M2 発現因子の解析

DNA アレイ法を用いた解析の結果ステロイド(Dex)による刺激により正常ヒト単球由来の MQ の CD163 発現が増強し、TGF β , ACE, CTGF などの線維化促進因子の発現が増強した。さらに、Dex に加え oxLDL の添加により fibroblast growth factor (FGF)1, FGF2 の発現が増強し、ステロイド治療やネフローゼ症候群にみられる高脂血症と相まって組織線維化を増強する可能性が示唆された。

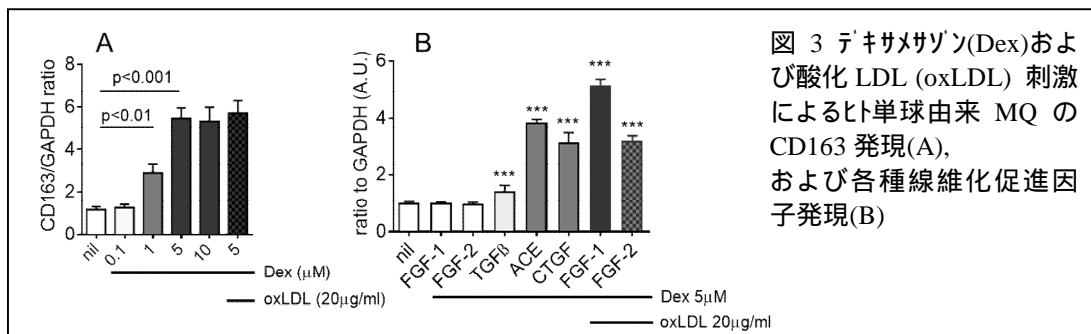


図3 デキサメサゾン(Dex)および酸化 LDL (oxLDL) 刺激によるヒト単球由来 MQ の CD163 発現(A)、および各種線維化促進因子発現(B)

上記のヒト単球由来 MQ に Dex を添加した系に MZR を加え、Dex にて発現が増強し、さらに Miz によってその発現増強が抑制される遺伝子群を DNA アレイ法にて網羅的に抽出したところ、炎症や線維化に関わる因子として FGF8, FGF21, NOS1, NOS2 などが検出された。さらにこのような Dex 刺激により発現が増強し、Miz によって抑制される分子として、単球など骨髄系細胞に発現する免疫調整分子 (CD300e) が検出された。

3) 生検組織での関連分子発現の確認

上記 2) で抽出した分子のうち FGF1 はステロイド抵抗性ネフローゼ患者の腎組織の線維化部および CD163⁺細胞が浸潤する箇所に一致して発現することを、特異抗体を用いた免疫染色にて確認した。また、ステロイド治療が腎生検に先行したループス腎炎患者において CD300e+CD163+MQ の浸潤がみられることを同様の免疫染色にて確認している。CD300e は末梢血単球や骨髄細胞に発現し、Antagonist を用いた刺激により、活性酸素の産生(活性化)とともにマイトソンの抑制により単球の寿命を延ばす機能をもつことが報告されている。

したがって、臨床でステロイド薬と併用される Miz の作用機序として、M2 型 MQ の線維化促進因子産生の抑制と、M2 型 MQ のマイトソンを促すことによる慢性病変進行の抑制効果があることが示唆された。

【結語】

末期腎不全組織の代表的な病理像である間質線維化に特異的に関与する M2 型 MQ を同定した。同 MQ は腎炎やネフローゼ症候群で汎用されるステロイド薬やネフローゼ症候群患者にみられる高脂血症下

で活性化し線維化促進因子を発現することにより慢性病変の進展と疾患の難治化に関与すると考えられた。Miz など代謝拮抗薬の一部にこの M2 活性を抑制する作用があることが示唆された。

以上の研究結果の一部は国内外学会で発表し、現在論文化作業を進めている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Matsumoto Y, Ikezumi Y, Kondo T, Nakajima Y, Yamamoto Y, Morooka M, Kisohara S, Ito T, Yoshikawa T. Urinary monocyte chemotactic protein 1 as a predictive marker of steroid responsiveness in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Fujita Medical Journal* 4: 17-22, 2018
2. 黒木 大生, 田崎 正行, 齋藤 和英, 中川 由紀, 池住 洋平, 鈴木 俊明, 山田 剛史, 長谷川 博也, 丸山 馨, 今井 直史, 高橋 公太, 富田 善彦. 新潟大学における小児腎移植の臨床的検討. *日本泌尿器科学会雑誌* 109: 14-19, 2018
3. Takahashi Y, Ikezumi Y, Saitoh A. Rituximab protects podocytes and exerts anti-proteinuric effects in rat adriamycin-induced nephropathy independent of B-lymphocytes. *Nephrology (Carlton)* 22: 49-57, 2017.
4. Nishimura H, Yaoita E, Nameta M, Yamaguchi K, Sato M, Ihoriya C, Zhao L, Kawachi H, Sasaki T, Ikezumi Y, Ouchi Y, Kashihara N, Yamamoto T. Restricted nutrition-induced low birth weight, low number of nephrons and glomerular mesangium injury in Japanese quail. *J Dev Orig Health Dis* 6:1-14, 2017
5. Koike K, Ikezumi Y, Tsuboi N, Kanzaki G, Haruhara K, Okabayashi Y, Sasaki T, Ogura M, Saitoh A, Yokoo T. Glomerular Density and Volume in Renal Biopsy Specimens of Children with Proteinuria Relative to Preterm Birth and Gestational Age. *Clin J Am Soc Nephrol* 12: 585-590, 2017
6. 池住洋平 .早産・低出生体重児の腎生検から得られた知見 .*日本腎臓学会誌* 59: 1247-1251, 2017
7. Kaneko M, Ikezumi Y, Yamada T, Hasegawa H, Kaneko U, Saitoh A. Local leukocyte proliferation as a target for cyclophosphamide in the treatment of Henoch-Schönlein purpura nephritis grade VI. *Nephrology (Carlton)* 21:68-71, 2016

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Ikezumi Y, Matsumoto Y, Kondoh T, Yamada T, Hasegawa H, Nikolic-Paterson DJ. A vicious cycle of steroid therapy, hyperlipidemia, and macrophage activation in the progression of chronic renal lesions . San Diego , CA , USA , 2018.10.25-28
2. 池住洋平, 松本祐嗣, 近藤朋美, 山田剛史, 長谷川博也 . スteroid 治療・高脂血症・マクロファージ活性化連鎖による慢性腎病変進展機序の検討 . 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 朱鷺メッセ, 新潟市, 2018.6.10.
3. 池住洋平 . マクロファージによる腎組織障害 . 第 53 回日本小児腎臓病学会学術集会 シンポジウム 1, ホテル福島グリーンパレス, 福島市, 2018.6.29.
4. Ikezumi Y, Matsumoto Y, Yamada T, Hasegawa H, Nikolic-Paterson DJ. Prognostic evaluation of pediatric IgA nephropathy using histological criteria including

macrophage accumulation . New Orleans , LA , USA , 2017.11.1-5

5. 池住洋平 . 松本祐嗣 , 長谷川博也 , 山田剛史 . マクロファージ 浸潤像を加えた組織分類による小児 IgA 腎症予後評価の検討 . 第 60 回日本腎臓学会学術総会 , 仙台国際センター , 仙台市 , 2017.5.26-5.28
6. 池住洋平 . 松本祐嗣 , 長谷川博也 , 山田剛史 . 小児 IgA 腎症の再燃予測におけるマクロファージ 浸潤像を加えた組織分類の有用性 . 第 52 回日本小児腎臓病学会学術集会 . 京王プラザホテル , 東京都 , 2017.6.1-6.3.
7. Ikezumi Y , Matsumoto Y , Yamada T , Hasegawa H , Imai N , Narita I , Nikolic-Paterson DJ . Steroid-treatment promotes a M2 pro-fibrotic macrophage phenotypic in Lupus nephritis. 2016 Annual Meeting of American Society of Nephrology .Chicago ,IL ,USA , 2016.11.15-20
8. 池住洋平 , 松本祐輔 , 山田剛史 , 長谷川博也 . 本邦小児 IgA 腎症における Oxford 分類の有用性評価 , 第 46 回日本腎臓学会東部学術大会 . 京王プラザホテル , 東京都 , 2016.10.8.
9. 池住洋平 , 長谷川博也 , 山田剛史 , 金子詩子 , 齋藤昭彦 . ループス腎炎におけるマクロファージ をターゲットとしたストロイト 作用機序の検討 . 第 51 回日本小児腎臓病学会学術集会 . ウィンクあいち , 愛知県名古屋市 , 2016.7.7.

〔図書〕(計 4 件)

1. 池住洋平 .IgA 血管炎 .今日の処方 改訂第 6 版(浦部晶夫, 島田和幸, 川合眞一総編集), 南江堂 , 東京 : 762-765 , 2019
2. 池住洋平 . 巣状分節性糸球体硬化症 . XVI. 腎・泌尿・生殖器 . 小児疾患の診断治療基準 改訂第 5 版 (「小児内科」 「小児外科」 編集委員会共編). 東京医学社 , 東京 : 658-659 , 2018
3. 池住洋平 . 腎実質性高血圧・腎血管性高血圧 . 小児の治療指針 . 小児科診療 81 巻増刊号 , 診断と治療社 , 東京 : 733-736 , 2018
4. 池住洋平 . 一次性高血圧 (本態性高血圧) の病態 , 診断 , 治療 . 高血圧 . 小児腎臓病学 改訂第 2 版 (日本小児腎臓病学会 編). 診断と治療社 , 東京 372-375 , 2017

〔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：矢尾板 永信

ローマ字氏名：Yaoita Eishin

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00157950

研究分担者氏名：山田 剛史

ローマ字氏名：Yamada Takeshi

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：90601922

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。