

平成22年4月28日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591242

研究課題名（和文） 慢性糸球体腎炎の進展機序におけるマクロファージの機能解析

研究課題名（英文） Analysis of macrophage functions in the progression of chronic glomerulonephritis.

研究代表者

池住洋平 (Yohei Ikezumi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70361897

研究成果の概要（和文）：慢性糸球体腎炎の進展機序におけるマクロファージの機能を明らかにする目的で、*in vivo*、*in vitro*の実験系解析およびヒト慢性糸球体腎炎の腎生検標本を用いて検討を行った。その結果、慢性糸球体腎炎にみられる慢性病変（糸球体メサンギウム増生、糸球体硬化、尿管質線維化）の進展にはマクロファージのM2型亜型が関与していることを明らかにした。さらに、小児および成人IgA腎症患者の腎生検標本の解析からも同様の所見が見出された。

研究成果の概要（英文）：To assess the role of macrophages in the progression of chronic glomerulonephritis (GN), we performed *in vivo*, *in vitro* studies as well as histological analyses on human biopsy specimen. An *in vivo* study using rat mesangial proliferative GN revealed that M2 type macrophages play an important role on progression of chronic lesions such as glomerular matrix expansion, glomerular sclerosis, and interstitial fibrosis. These findings are also confirmed by histological analyses of biopsy specimen in childhood and adult IgA nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：慢性糸球体腎炎、活性化マクロファージ、M2マクロファージ、糸球体硬化、間質線維化

1. 研究開始当初の背景

我が国では学校検尿制度が定着しているのにも関わらず、年約3万人の末期腎不全患者が新規に透析導入され、2005年度の統計では透析患者数はすでに25万人を越えなお増

加傾向にある。血液透析療法に要する費用はすでに年間一兆円を超えている。原疾患として糖尿病性腎症が増加していること、また慢性糸球体腎炎の病態解明や治療法の確立が未だに出来ていないことが最大の理由と考えられる。

私たちは、炎症性、非炎症性を問わず全ての進行性腎疾患に普遍的にみられる現象である炎症細胞浸潤、特にマクロファージ (MQ) 浸潤に着目し、慢性糸球体腎炎の発症・進展に関わる役割について検討を行ってきた。この中で、慢性糸球体腎炎の発症・進展過程で重要な役割を果たしており、MQ が単独で腎糸球体障害を起こしうることや、MQ の「活性化」が腎組織の障害過程で重要であることを明らかにしている。

近年この MQ の活性化様式について、リンパ球における Th1、Th2 と同様に、サイトカインの産生パターンによって分類可能な M1、M2 という 2 通りの亜型が存在するという概念が提唱され定着している。すなわち炎症性サイトカインを産生し組織障害に関わる M1 群と、抗炎症性サイトカインを産生し、組織修復もしくは線維化に関わる M2 群の二つの亜型に分類可能であることが明らかになってきた。また、これらの MQ 亜型はそれぞれ特異的な抗原を発現していることが知られている。しかし、腎疾患における M2 の関与については殆ど報告がなく、局所における MQ の機能も明らかにされていない。また、これらの特異抗原の発現を MQ に誘導する活性化条件、すなわち炎症巣局所におけるサイトカイン環境も明らかになっていない。

臨床的には多くの慢性糸球体腎炎の治療にステロイド薬が汎用され、また、近年ではミゾリピンなどの免疫抑制剤が使用され、その有用性が報告されている。しかし、これらの治療薬剤の作用機序については不明な点が多く、専門医による経験的な治療が行われているのが現状である。すなわち、慢性糸球体腎炎の治療薬として汎用されるステロイドを含む免疫抑制薬のターゲットは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、全ての進行性腎疾患に共通してみられる MQ 浸潤に焦点を当てて慢性糸球体腎炎の進展機序の解明およびその抑制機序法を確立することである。

腎生検組織などから局所に浸潤する MQ を分離することが困難なことから、これまでヒトの腎炎病巣における MQ の機能を解析する試みはほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、活性化 MQ に発現する特異抗原に着目し、その発現機序を明らかにすることによって腎炎病巣におけるサイトカイン環境を推測し、特異抗原を発現する活性化 MQ 機能の解明を試みる。さらに、これら MQ 機能を反映する特異抗原を慢性糸球体腎炎の病勢判定のためのバイオマーカーとしての利用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 臨床データの解析

臨床経過、予後あるいは治療への反応性の異なる慢性糸球体腎炎症例の組織所見、MQ 浸潤の比較検討を行う。

慢性糸球体腎炎として最も頻度の高い小児または成人 IgA 腎症の腎生検標本を用いて、MQ に発現する特異抗原に対する免疫組織染色を行い、MQ の浸潤度と臨床所見、病理所見とその関連を検討する。

MQ の機能を反映する抗原として、CD169 (sialoadhesin: 活性化 MQ 特異抗原)、M1 マクロファージ特異抗原として CCR7 (ケモカイン受容体)、M2 マクロファージの特異抗原として CD163 (ヘクトレビンスカベンジャー受容体)、CD204 (LDL スカベンジャー受容体) が知られ、これらに対する特異抗体を用いて染色を行う。

(2) 実験系による解析

a) MQ の活性化と機能分の発現誘導

培養解析系の MQ としてマウス由来細胞株 (RAW246、J744.1)、ラット由来細胞株 (NR8383) およびラットの腹腔 MQ を利用する。

MQ の活性化作用を有する既知の炎症性サイトカインまたは生理活性物質 (interferon- γ , interleukin-1, LPS など) で刺激する (M1 群)。負の対照群として MQ の機能抑制作用を有すると考えられているステロイド薬や既知の抗炎症性サイトカイン (IL-4, IL-10, IL-13, TGF β を作用する (M2 群)。それぞれの条件化における CCR7, CD169, CD163 発現についてフローサイトメトリを用いて検討し、それぞれの分子を強発現する条件を検討する。

b) 活性化 MQ 機能の解析

上記のそれぞれの機能分子を最も強く発現する条件下で刺激した際の MQ 培養上清について、ラットもしくはマウスから単離した培養糸球体に添加し、形態学的な変化を観察するとともに糸球体上皮細胞 (GEC)、メソグウム細胞に対する作用をそれぞれ糸球体上皮細胞のスリット膜関連蛋白 (nephrin, podocin, CD2AP など) の動態、メソグウム細胞増殖および基質産生、についてそれぞれ免疫染色、RT-PCR 法、Real-Time PCR による RNA 発現および Western blot 法、ELISA 法を用いて蛋白発現を定量解析する。同様に GEC 細胞株、培養メソグウム細胞を用いて解析を行う。

c) 活性化 MQ の制御法の検討

引き続き活性化 MQ の分子発現について解析、新規マーカーの同定を継続するとともに、臨床応用を視野に以下実験を進める。

① 免疫抑制剤の作用機序の検討

IFN γ あるいはLPSによるMQ活性化について、ステロイド（デキサメタゾン；DEX）またはミズリビソ（MZB）による影響をNOsの産生（Greiss assay）、TNF α の産生（ELISA）により検討する。さらに、上記の方法で同定された機能分子の発現、対する影響をフローサイトメトリーまたはReal-Time PCRによるRNA発現にて解析する。

② 糸球体細胞への直接作用の検討

単離糸球体または培養糸球体上皮細胞（GEC）、メサンギウム細胞について、上記の培養解析系にDEXまたはMZBを添加し、GEC上の機能蛋白（nephrin, podocin, CD2APなど）の動態、発現への影響およびメサンギウム細胞増殖、基質産生に対する影響をそれぞれ免疫組織学的手法、Real-Time PCR、Western blot法、ELISA法（細胞増殖解析、基質定量）により検討する。また、グルコルチコイド受容体やMZBの結合蛋白として知られる14-3-3蛋白あるいはheat shock protein (HSP)の発現への影響や、siRNAを用いた発現抑制下による影響を検討し、シグナル伝達を含めた薬剤の分子作用機序の解析をRT-PCR法およびWestern blot法により行なう。

4. 研究成果

(1) 臨床症例の検討

本邦で最も頻度の高い小児慢性糸球体腎炎であるIgA腎症の治療のなかでも、特にびまん性メサンギウム増殖や半月体等の管外性病変を伴う比較的重症例の治療として、ステロイド（プレドニゾロン：PSL）、免疫抑制薬（ミズリビソ：MZR）、抗血小板薬（ジピリダモール）および抗凝固薬（ワファリン）を用いたカクテル療法が有効であることが報告されている。本治療法の注目すべき効果として、MZRを含まないPSLを主体とした治療と比較して、2年間の治療による蛋白尿改善効果は同等であるが、糸球体硬化などの慢性化を抑制する効果がみられることが挙げられる。

筆者らは、ステロイド抵抗性を示した小児IgA腎症症例に対してMZRを加えることにより著明な尿所見の改善がみられた3症例を検討し、その効果が活性化MQの抑制によるものである可能性を見出した。また、MZRは広範な細胞に発現する14-3-3蛋白やHSP60と結合能を有することが知られているが、筆者らはこれらの蛋白がIgA腎症例の糸球体内にも発現することを確認し、これらの結果を合わせて報告した【論文⑤】。

(2) 小児と成人IgA腎症の組織学的相違に関する検討

対象として、IgA腎症小児例は10歳未満14例（平均7.1歳、男女比8:6）、

13歳以上15歳以下15例（平均12.8歳、男女比6:9）、成人例は26~45歳24例（平均30.3歳、男女比10:14）の3群とした。発症から腎生検までの平均期間はそれぞれ0.8年、0.8年、1.3年、1.2年、0.7年、0.6年で有意差はなく、また腎生検時の蛋白尿は1.8g/1.73m²/日、0.6g/1.73m²/日、0.8g/1.73m²/日、腎機能（糸球体濾過率）：107.4ml/min/1.73m²、121.1ml/min/1.73m²、107.3ml/min/1.73m²でいずれも3群間または小児計29例と成人の2群間で比較した場合にも有意差は認められなかった（one-way ANOVA, Mann-Whitney検定）。

しかし、成人24例中4例で、診断確定までに高血圧、肥満症、高コレステロール血症など何らかの生活習慣病を疾患の診断を受けた既往があったのに対して、小児計24例では該当する症例はいなかった（p=0.039 Fisher's exact test）。

糸球体メサンギウム基質および間質線維化の比較（図1）から、成人例では小児例と比較して有意にメサンギウム基質の増生および間質障害が高度であった。また、小児でも年長児ほど糸球体器質の増生が有意に高度であり、間質障害も高度となる傾向がみられた。CD163、CD204陽性MQの糸球体または間質浸潤を比較すると、いずれも成人例で有意に多くの浸潤が認められた。また、小児では年長児ほど多くの浸潤がみられた（図2）。

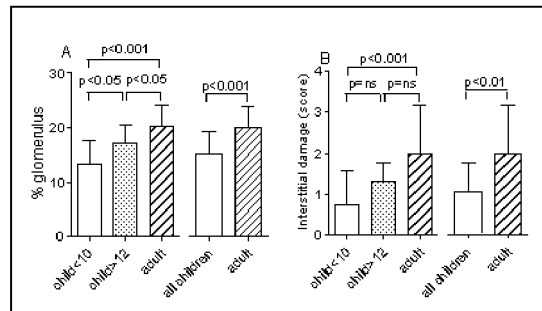


図1 A:糸球体メサンギウム基質の1糸球体切片あたりの占有率(%)およびB:間質の障害度

さらに、CD163、CD204陽性MQと糸球体基質の増生率は小児で相関が認められなかったのに対して、成人ではCD163: p=0.0034, Pearson r=0.48, CD204: p=0.009, r=0.44と相関がみられた。

間質障害度との間には小児CD163: p<0.0001, Spearman r=0.75, CD204: p=0.0012, r=0.58、成人CD163: p<0.0001, r=0.72, CD204: p<0.0001, r=0.74と小児、成人ともに有意な相関が認められた。

以上の検討から、IgA 腎症の進展機序には M2 マクロファージが関与していること、特に糸球体硬化や間質線維化といった慢性病変の形成に重要役割を果たしている可能性を見出し、報告した【論文⑨】。

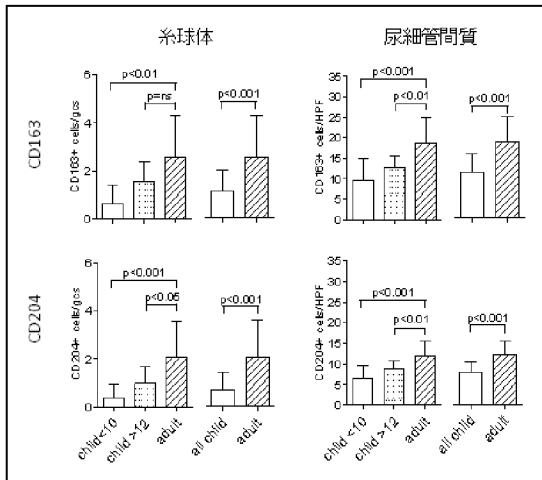


図2 CD163、CD204 陽性 MQ の糸球体または間質浸潤の比較

(3) in vitro 解析から

上述の MZR の臨床効果について、その機序を解析する目的で、培養 MQ に対する MZR ならびにステロイド（デキサメタゾン：Dex）の治療効果を検討したところ、IFN γ および LPS による MQ 活性化刺激に対して、MZR および Dex はそれぞれ単独で活性化 MQ の NOs、TNF α 、IL1 β などの炎症性サイトカインの産生を用量依存性に抑制することが確認された。さらに、この効果は MZR および Dex の共存下で増強されることも確認され、活性化 MQ の制御がステロイド抵抗性 IgA 腎症に対する治療効果の一機序であることが示唆された。

また、同様の in vitro 実験系から、MQ を IFN γ 、IL1 β などの炎症性サイトカインに暴露した後に DEX を添加することにより、組織修復・線維化に関する M2 特異抗原である CD163 の発現が増強することが確認された。

(4) 実験腎炎による検討

上述の臨床ならびに in vitro の実験結果をさらに検討する目的、ラットのメソグロムリン増殖性腎炎モデル (Thy1.1 腎炎) を用いて、MZR および PSL による治療効果を検討した。

その結果、MZR により蛋白尿、組織の改善効果が認められた一方、ステロイド薬単独療法では M2 型 MQ の増加によりむしろ硬化糸球体が増加することが明らかになった (図 3)。

また、腎炎惹起後 7 日目の単離糸球体におけるサイトカイン遺伝子発現を検討したところ、MZR/PSL 併用群で TGF β 、フィブロネクチンおよび CTGF の mRNA 発現の有意な減少が認められた。

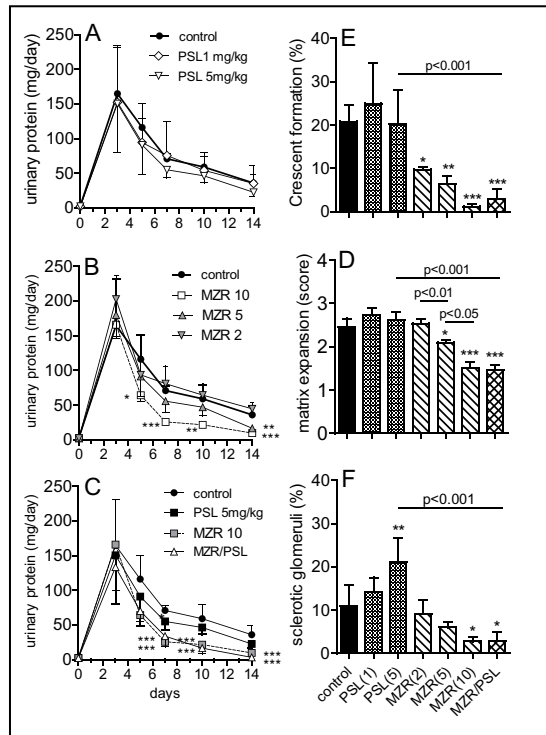


図3 ラットメソグロムリン増殖腎炎モデル (Thy1.1 腎炎) に対する、プレドニゾン(PSL)とミゾリピン(MZR)による治療効果

A, B, C: 蛋白尿に対する効果

D: 糸球体メソグロムリン基質の増生

E: 半月体形成率, F: 硬化糸球体数に対する効果

PSL 単独では蛋白尿、組織障害いずれにも効果がみられない。硬化糸球体数はむしろ増加した。MZR は単独で、用量依存性に蛋白尿、組織障害の改善が認められた。さらに、PSL による硬化糸球体の増加を抑制した。

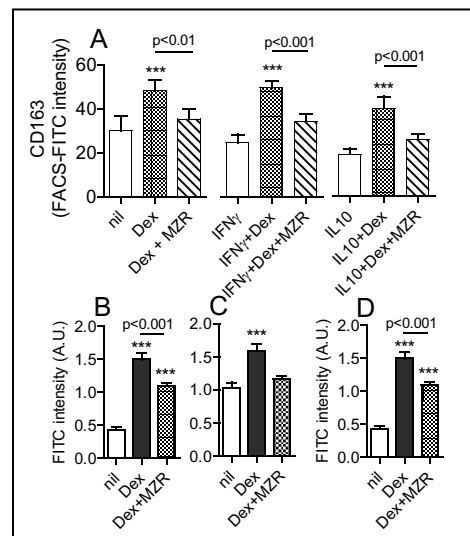


図4 ラット腹腔マクロファージに対するデキサメタゾン(DEX)とミゾリピン(MZR)の作用

A: フローサイトメトリーによる CD163 発現。Dex により CD163 発現の増強がみられ、この反応は MZR の共存下で抑制された。B-D: Dex または MZR 存在下におけるサイトカイン mRNA 発現 (B: TGF- β , C: IL10, D: CTGF)

Dex により M2 サイトカインである TGF, CTGF(connective tissue growth factor)などの線維化促進因子の発現が増強し、これらは MZR 共存下で抑制された。

すなわち、MZR/PSL 併用治療により、マシキウム基質の増生や線維化に関するこれらのサイトカインの発現を抑制された結果、14 日目の組織上の改善効果か得られた可能性が示唆された。

さらに、ラット腹腔 MQ を用いた検討により、MQ はステロイドにより M2 活性が増強し、TGF- β や CTGF といった組織線維化に関わるサイトカイン発現が増強し、同反応は MZR によって抑制されることが (図 4)。以上より、ステロイドは M2 型 MQ を誘導し、組織線維化を助長する可能性が示唆され、一方 MZR は M2 型 MQ の活性化を抑制し、腎組織の慢性化 (線維化) 抑制効果を発揮する可能性を見出し報告した【論文⑧】。

これら一連の検討から、IgA 腎症に代表される慢性糸球体腎炎の組織の慢性病変形成には CD163 や CD204 陽性 MQ などの M2 型 MQ が関与していることが明らかとなった。

特に、IgA 腎症の成人例は、高血圧症、高脂血症、肥満などの何らかの生活習慣病を合併していることが多く、これらの合併症は動脈硬化に関わる CD204 陽性 MQ などを含めた M2 型 MQ 浸潤を誘導している可能性が示唆された。

組織所見の慢性化機序として、TGF β 、CTGF などの組織の線維化に関わるサイトカイン産生が関与している可能性が示唆される。特に、多くの慢性糸球体腎炎の治療薬として用いられるステロイド薬は M2 型 MQ の誘導、さらにこれらの細胞からの CTGF や TGF β の産生誘導を介して組織線維化を助長する可能性があり、ステロイドを用いた治療については適応とタイミングを十分に検討する必要があると考えられた。

小児の重症型 IgA 腎症ではステロイド薬と免疫抑制薬 (ミゾリビン) を用いたカクテル療法が多用されているが、今回の検討から本治療法が慢性化組織形成の予防法として理にかなったものであることが示された。

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 9 件)

- ① 池住洋平. IgA 腎症～小児と成人～組織所見からみた違い. 日本小児腎臓病学会雑誌, 査読無, 20 巻, 2007, 168-175
- ② 池住洋平. 慢性糸球体腎炎における免疫抑制薬の位置づけ. Nephrology Frontier, 査読無, 6 巻, 2007, 355-361
- ③ 池住洋平. IgA 腎症カクテル療法におけるミゾリビンのマクロファージ活性化抑制作用. 炎症と免疫, 査読無, 16 巻, 2007, 115-123

- ④ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Kawachi H, et al. Activated macrophages down-regulate podocyte nephrin and podocin expression via stress-activated protein kinases. Biochem Biophys Res Commun (査読有) 376, 2008, 706-711
- ⑤ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Kawachi H, et al. Use of mizoribine as a rescue drug for steroid-resistant pediatric IgA nephropathy. Pediatr Nephrol (査読有) 23, 2008, 645-650
- ⑥ 池住洋平, 鈴木俊明, 唐澤環, 内山聖. 新潟市における学校検尿制度に基づく小児 IgA 腎症の疫学調査ならびに新潟県における特発性ネフローゼ症候群の疫学調査の試み. 日本小児腎臓病学会誌, 査読有, 21 巻, 2008, 20-25
- ⑦ 池住洋平. IgA 腎症, 急速進行性腎炎. これでわかる! 病態からみた免疫抑制薬の使い方. 小児内科, 査読無, 41 巻, 2009, 1596-1600
- ⑧ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Kawachi H, et al. Contrasting Effects of Steroids and Mizoribine on Macrophage Activation and Glomerular Lesions in Rat Thy-1 Mesangial Proliferative Glomerulonephritis. Am J Nephrol (査読有) 31, 2010, 273-282
- ⑨ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Kawachi H, et al. Identification of alternatively activated macrophages in new onset pediatric and adult IgA nephropathy. Histopathology (査読有), in press (2010 年 3 月受理)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Kawachi H, et al. Use of Mizoribine as a rescue drug for steroid-resistant pediatric IgA nephropathy. 40th Annual Meeting of American Society of Nephrology. San Francisco, California, USA, 2007
- ② 池住洋平. IgA 腎症の進展におけるマクロファージによる糸球体障害機序の検討(授賞講演). 第 30 回 IgA 腎症研究会, 東京都, 2007
- ③ 池住洋平. IgA 腎症～小児と成人 組織所見からみた違い～(教育講演). 第 42 回日本小児腎臓病学会学術集会, 横浜市, 2007
- ④ 池住洋平. IgA 腎症カクテル療法におけるミゾリビンのマクロファージ活性化抑制作用. 第 3 回 IgA 腎症カクテル療法研究会シンポジウム, 東京, 2007

- ⑤ 池住洋平. 慢性糸球体腎炎における免疫抑制薬の位置づけ (ランチョンセミナー). 第 42 回日本小児腎臓病学会学術集会, 横浜市, 2007
- ⑥ 池住洋平. マクロファージによる糸球体障害に対するミゾリビンの作用機. 第 50 回日本腎臓学会, 浜松市, 2007
- ⑦ 池住洋平. マクロファージによる糸球体障害に対するミゾリビンの作用機序の検討. 第 42 回日本小児腎臓病学会学術集会, 横浜市, 2007
- ⑧ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Kawachi H, et al. Effect of Mizoribine in rat steroid-resistant mesangial proliferative glomerulonephritis. 41st Annual Meeting of American Society of Nephrology . Philadelphia , Pennsylvania, USA, 2008
- ⑨ 池住洋平. ラットメサンギウム増殖性糸球体腎炎に対するミゾリビンおよびプレドニゾンによる治療効果. 第 51 回日本腎臓学会総会. 福岡市, 2008
- ⑩ 池住洋平. ミゾリビンおよびプレドニゾンのラットメサンギウム増殖性糸球体腎炎における作用機序. 第 43 回日本小児腎臓病学会学術集会. 福岡市, 2008
- ⑪ Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Narita I, Kawachi H, et al. Alternatively activated macrophages (M2) in IgA nephropathy. 42nd Annual Meeting of American Society of Nephrology. San Diego, California, USA , 2009
- ⑫ 池住洋平. ラットメサンギウム増殖性糸球体腎炎に対するミゾリビンおよびプレドニゾンによる治療効果. 第 52 回日本腎臓学会総会, 横浜市, 2009
- ⑬ 池住洋平. IgA 腎症の慢性化組織像形成への M2 マクロファージの関与. 第 44 回日本小児腎臓病学会学術集会, 東京都, 2009

[図書] (計 2 件)

- ① Ikezumi Y and Nikolic-Paterson DJ. Monocytes and Macrophages. In: Lai KN, ed. Recent advances in IgA nephropathy. World Scientific Publishing , Singapore, 2009, 267-287
- ② 池住洋平. ネフローゼ症候群: 小児科の視点. 専門医のための腎臓病学 (内山聖、富野康日己、今井裕一編集), 医学書院, 東京, 2009, 316-320

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池住 洋平 (Ikezumi Yohei)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 70361897

(2) 研究分担者

河内 裕 (Kawachi Hiroshi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 60242400

(3) 連携研究者

唐澤 環 (Karasawa Tamaki)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号: 30447601