

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17911

研究課題名(和文) M2マクロファージを標的としたループス腎炎新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for lupus nephritis targeting M2 macrophages

研究代表者

岸本 大河 (Kishimoto, Daiga)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：20794522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)に合併するループス腎炎の腎局所ではM2マクロファージ(M₂)が多く浸潤している。このM₂では抗炎症作用をもつhemeoxygenase(HO)-1の発現が低下しているが、この原因の一つがSLE患者で亢進している1型インターフェロン(IFN)によるものである。SLEの活動性が亢進している患者では、HO-1の発現が低下していることが予想され、臨床の場で簡便に得られる血清および尿でHO-1の発現を評価したが疾患活動性とHO-1の間には明らかな相関関係を見出すことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では血清もしくは尿中でのHO-1発現の程度とSLEの疾患活動性の関連を確認することを目的として広く検体を収集したが、新たな疾患活動性を測る指標、HO-1補充療法が適する患者の選別には適した手法ではなかった。先行研究においてはループス腎炎の腎局所のマクロファージや末梢血単核球におけるHO-1発現低下がみられていることから、引き続き各血球(特に単球)のHO-1発現と疾患活動性の関連を解析し、HO-1誘導療法がSLEの病態改善に寄与するかどうかを解析していく。

研究成果の概要(英文)：In lupus nephritis associated with systemic lupus erythematosus (SLE), M2 macrophages (M₂) infiltrate the renal foci. The expression of hemeoxygenase (HO)-1, which has an anti-inflammatory effect, is decreased in M2M₂. HO-1 expression is expected to be reduced in patients with hyperactive SLE, and HO-1 expression was assessed in serum and urine, which are readily available in clinical settings, but disease activity was and HO-1 could not find a clear correlation.

研究分野：全身性エリテマトーデス

キーワード：全身性エリテマトーデス ループス腎炎 マクロファージ ヘムオキシゲナーゼ-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SLE は全身の臓器障害を来す自己免疫疾患で、中でもループス腎炎(LN)は予後に関わる重大な病型である。標準治療法によって寛解に至らない LN 症例も依然多く、さらなる病態の解明と疾患特異的治療法の開発が必要である。SLE では主に獲得免疫を標的とした研究がなされてきたが、M などの自然免疫系も重要であることが明らかになっている。近年 M は炎症性の M1 と、抗炎症性の M2 に分類されている。M2M ではヘム分解酵素 HO-1 が高発現しているが、HO-1 は種々の炎症ストレスによって誘導され、強力な抗炎症作用を発揮することが知られている。

研究代表者は LN 腎組織の基礎研究を行い、活動性 LN の糸球体には M2M が多く、この数が尿蛋白量と相関していることを見出した。また、糸球体内 M2M では本来高発現しているはずの HO-1 発現をほとんど認めなかった。SLE では 1 型 IFN が高発現しており、病態の中心的役割を担っている。HO-1 を高発現しているヒト末梢血単球由来 M2M を 1 型 IFN で刺激すると、HO-1 の転写抑制因子 Bach1 発現が増加し、HO-1 発現が低下する。つまり SLE では 1 型 IFN により転写抑制因子 Bach1 が増加し、抗炎症蛋白 HO-1 発現が低下して、M2M が本来持つべき抗炎症作用が失われていると考えられる。研究代表者は Bach1 欠損 MRL/lpr マウスを作成し、M2M での HO-1 発現回復の効果を検討した。この Bach 欠損 MRL/lpr マウスでは M の極性が M2M に偏り、HO-1 が強発現していた。さらに Bach1+/+MRL/lpr マウスと比して Bach1 欠損 MRL/lpr マウスでは生存率及び蛋白量に有意な改善がみられた。以上より Bach1 を介した M2M への HO-1 発現増加が LN の病態を改善する可能性が示唆された(Kishimoto et al, Arthritis Res Ther.2018)。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は難治性の SLE に対して、DMF および hemin を臨床適応することである。DMF はすでに多発性硬化症で、hemin は急性ポルフィリン症に対して国内でも臨床応用されており、本研究で有用性を示せば、第 2 相試験から開始できる。M2M を標的にした SLE の治療法は開発されておらず、本研究は M2M 機能不全を回復させるという新規治療概念の開発につながる独創的な研究と考える。さらに LN の病態解明、バイオマーカーの開発も目的とした。

3. 研究の方法

先行研究により糸球体 M2M の HO-1 の発現量が重症度や腎予後と連動する可能性が高いという結果を得た。頻回な腎生検は困難であり、低～無侵襲で採取できる血液や尿の検体で HO-1 の定量検査を行い、腎糸球体 M2M の HO-1 の発現を予測することができれば、疾患活動性や腎予後の新たな指標として臨床応用できるばかりでなく、血清中の HO-1 を経時的にモニタリングして HO-1 補充療法が必要な患者を抽出できる可能性 LN の初発もしくは再燃患者で標準治療を施行し、単球の HO-1 の定量、血清および尿では ELISA 法で HO-1 の定量を行う。蛋白尿、SLEDAI (SLE Disease Activity Index)、血清補体価、抗 dsDNA 抗体等の臨床指標との関連を解析し、HO-1 が疾患活動性のマーカーとなり得るか検討する。また、治療反応性も蛋白尿 SLEDAI や LLDAS (Lupus Low Disease Activity State) 達成有無で判定し、各時点での HO-1 発現との関連を解析する。また、治療開始前の腎生検検体で LN の組織型を ISN/RPS 分類、重症度(組織型、半月体有無、activity index など)を評価し、M2M の HO-1 発現量と比較する。これにより HO-1 が LN の重症度、治療反応性や、予後の予測因子となり得るかを評価する。治療前後に HO-1 発現が低下している症例の臨床的特徴を評価し、

H0-1 誘導剤の治療反応性を予測する。

H0-1 誘導療法が M2M の抗炎症作用を回復させることを示すため、ヒト M2M での H0-1 低下を H0-1 誘導剤で改善可能であることを証明する。H0-1 を誘導する方法としては Nrf2(H0-1 転写促進因子)誘導剤、Bach1(H0-1 転写抑制因子)阻害薬の使用があげられる。それぞれ代表的な薬剤として DMF、hemin があり、ループス腎炎のモデルマウスではこれら薬剤による H0-1 発現誘導と腎炎の改善が示されている。しかし、これまでに活動性 LN で M2M の Nrf2 や Bach1 がどのような挙動を示すのか、Nrf2 誘導剤と Bach1 阻害薬のどちらがより M2M の失われた抗炎症作用を改善させるのかはわかっていない。健常人由来末梢血単球を M-CSF (50 ng/ml)の存在下に 9 日間培養し、M2M を作成する。M2M を IFN 2b (1U/ μ l)で刺激し H0-1 の発現を低下させた後に、DMF (30 μ M)、hemin (100 μ M)、placebo で刺激し、Nrf2、Bach1、H0-1 発現の程度を mRNA レベル(real time PCR)、蛋白レベル(Western blotting)で比較する。同時に IL-6、IL-10 を培養上清で評価する。同様にマウス M2cM の H0-1 低下を H0-1 誘導剤で改善可能であることを証明するために、マウス骨髓由来細胞を M-CSF (20 ng/ml)で 6 日間培養し MOM を得る。この MOM を TGF (10 ng/ml)と IL-10 (100 μ g/ml)を加え 48 時間培養し M2cM を得る。この M2cM を IFN 2b(1U/ μ l)で刺激し H0-1 の発現を低下させ、以降は上記と同様の実験を行う。最後に SLE 患者単球の H0-1 低下を H0-1 誘導剤で改善可能であることを証明する。SLE 患者の単球では H0-1 の発現が低下しているため、上記と同様に SLE 患者から得た単球を DMF、hemin、placebo で刺激し、H0-1 の発現が回復し、1 型インターフェロン産生が低下するか検証する。

腎炎誘発 MRL/lpr マウスを用いて H0-1 誘導療法の有用性を証明するために 8 週齢の雌 MRL/lpr マウスの腎動脈を一時的に結紮し虚血状態にし、再灌流させて腎炎を誘発する。このマウスに hemin (100 μ mol/kg/week), DMF (75mg/kg body weight)、placebo を投与し、12 週齢時に腎障害の程度、腎機能 (血清尿素窒素や蛋白尿)に差があるかを評価する。その際に腎糸球体の M2cM における H0-1 発現に差がみられるかを CD163(M2cM の marker)と H0-1 の免疫染色により評価する。また、補体や抗 dsDNA 抗体などの血清学的マーカーに改善がないかどうかあわせて評価を行う。

4 . 研究成果

新規 SLE 発症患者や再燃患者の検体を計画的に取得する事が困難であったため、定期外来を受診している研究に同意が得られた SLE 患者の血清および尿の保存、臨床情報を集積した。そのうえで新規 SLE 患者や再燃患者が生じた際にその都度同検体および臨床情報を集積した。患者の疾患活動性が高いときには血清および尿の H0-1 濃度が低く、症状の改善とともに H0-1 が回復していくことが予想したが、血清および尿においては疾患活動性 (SLEDAI や LLDAS 達成有無で解析)によらず H0-1 の濃度は検出感度以下となっており統計学的な有意差を見出すことはできなかった。そのため、疾患活動性やループス腎炎の組織型を血清や尿の H0-1 発現量で予測することは現段階で困難と考えている。mRNA および蛋白レベルでの単球における H0-1 発現量と疾患活動性の関連については、新規発症や再燃をきたした急性期 SLE 患者では単球分離のための検体が採取できないことも多く、解析に耐える検体数を十分量確保できていなかったため、今後も集積をすすめ解析を行う予定となっている。ヒト由来の M2M 、マウス M2cM 、SLE 単球、腎炎誘発 MRL/lpr を用いた H0-1 誘導療法の有効性については現段階で評価できていないが本報告後に学会や論文で報告を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岸本大河
2. 発表標題 全身性エリテマトーデス患者の疾患活動性と血清ヘムオキシゲナーゼ-1の関連
3. 学会等名 第66回 日本リウマチ学会総会・学術集会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kishimoto D
2. 発表標題 MicroRNA-27a can contribute to interferon signatures in systemic lupus erythematosus via the suppression of tripartite motif-containing protein 27.
3. 学会等名 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Atlanta. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------