

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22352

研究課題名（和文）尿路関連リンパ組織の発見から展開する新たな腎泌尿器免疫学

研究課題名（英文）Novel immune-related nephrology and urology evolving from the discovery of Urinary Tract-Associated Lymphoid Structure

研究代表者

市居 修（Ichii, Osamu）

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：60547769

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：局所で発達するリンパ組織は、感染防御において重要な役割を果たす。特に近年、粘膜関連リンパ組織の役割が注目されており、眼、気道や腸管等で発見されている。我々はマウスの腎泌尿器を精査し、新たな免疫関連組織“尿路関連リンパ組織，Urinary Tract-Associated Lymphoid Structure, UTALS”を見出した。これまでUTALSに関する情報は少なく、本研究はその機能や病態意義を追究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢マウスやヒト高齢者の腎臓内血管周囲に“三次リンパ組織”が形成され、炎症の遷延や腎臓の修復異常に関与することが見出されている(Yanagidaら, JCI Insight 2016)。我々の発見したUTALSと腎臓内三次リンパ組織の関係を考察すると、互いに炎症細胞を往来させて腎病態形成に関与する可能性は興味深い。UTALSは“炎症を基礎病態とする腎疾患の新規治療ターゲット組織”となる可能性を有し、本研究はその医科学的エビデンスを探求した。

研究成果の概要（英文）：Locally developed lymphoid tissue plays an important role in infection defense. In recent years, the role of mucosa-associated lymphoid tissue has been attracting particular attention, and it has been reported in the eye, respiratory tract, and intestinal tract. In this study, we have examined the kidney and urinary tracts of mice and found a new immune-related tissue called "Urinary Tract-Associated Lymphoid Structure (UTALS)". Since there is little information on UTALS, we investigated its function and pathological significance.

研究分野：獣医学、解剖学、腎泌尿器学

キーワード：獣医学 解剖学 腎泌尿器学 粘膜関連リンパ組織 腎盤・腎盂 ケモカイン 腎炎 UTALS

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身に散らばる微小リンパ組織とその臨床的意義：近年、ヒトやマウスの生体内に新たなリンパ組織が発見されており、その役割は興味深い。特に我々は、マウス縦隔内に脂肪関連リンパ組織を発見し、自然リンパ球を含み、自己免疫異常や炎症に関与することを報告した (*Front Immunol* 2018)。全身に散らばる微小リンパ組織は炎症性疾患や感染症の治療のターゲット組織として期待されている (Bénézech ら, *Nat Immunol* 2015)。粘膜関連リンパ組織 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, MALT) も生体と外界の関門を担う重要な免疫器官である。MALT は感染防御の最前線であり、リンパ球の機能的成熟も担う。また、MALT には特徴的な胞被蓋上皮が存在し、特に抗原取り込み能を有する“M 細胞”が重要である。M 細胞は外来抗原に対する粘膜免疫誘導に重要な役割を果たす。代表的な MALT として、ワルダイエルの咽頭輪に存在する扁桃や鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT)、腸管関連リンパ組織 (GALT)、眼関連リンパ組織 (EALT) が知られる。

腎盤に存在するリンパ組織：腎臓でつくられた尿は、袋状の腎盤 (腎盂とも呼ぶ) に集められ、尿管を経て膀胱に貯留する。腎盤は移行上皮と下層の結合組織で構成され、通常リンパ濾胞の形成はみられない。一方、申請者らは健常マウスの腎盤深部にリンパ組織を見出した。このリンパ組織は腎盤腔側を移行上皮で覆われ、腎盤腔の反対側には高率に葉間静脈が見られた。我々はこの構造を尿路関連リンパ組織 (Urinary Tract-Associated Lymphoid Structure, UTALS) と名付け、その形態機能、病態意義の解明や臨床応用への挑戦を着想した。これまで UTALS の意義に関する報告は無く、下部尿路 (尿管、膀胱) でも不明な点が多い。

見過ごされた腎泌尿器のリンパ組織：腎泌尿器における MALT 様構造の形成は、ヒト膀胱原発腫瘍の移行上皮で報告されているが (Venyo ら, *Adv Urol* 2014)、健常なヒトや動物の腎泌尿器で報告は少ない。しかし、生体と外界の境界には必ずリンパ組織が配備されており、扁桃、眼、鼻咽頭や腸管の MALT はその代表例である。腎泌尿器も腎臓 腎盤 尿管 膀胱 尿道 外尿道口と外界に通じる。この概念を基に我々は健常マウスの腎泌尿器を精査し、UTALS 研究の着想に至った。しかし、当該マウスは若齢の SPF 動物であったため、尿路感染歴は無い。つまり、健常時 UTALS の存在意義は不明である。

2. 研究の目的

我々はマウスの腎泌尿器を精査し、新たな免疫関連組織 “UTALS” を見出した。これまで UTALS の機能や病態意義は未知であるため、本研究は下記項目の解明に挑戦した。

- ・ UTALS の形態と機能ならびにその制御分子群を明らかにする。
- ・ UTALS - 免疫異常 腎病態の病理学的クロストークを明らかにする。
- ・ UTALS の形態機能と自己免疫異常や腎病態の治癒との関連性を明らかにする。
- ・ マウス以外の生物種における UTALS の存在を明らかにする。

3. 研究の方法

【計画1】健常マウスの UTALS の形態機能を明らかにする。

- 1) **組織解析**：雌雄の C57BL/6N マウスを用いた。新生子期、若齢期、性成熟期、加齢期で、UTALS の発達を形態計測で評価した。UTALS が良く発達する時期に絞り、UTALS を構成する細胞と組織成分、特に T 細胞、B 細胞、M や樹状細胞等の抗原提示細胞、顆粒球、自然リンパ球、血管、高内皮細静脈、リンパ管、細網組織、M 細胞および増殖細胞を組織化学・免疫染色で解析した。
- 2) **機能 (抗原取り込み) 解析**：上記マウスの片側遠位尿管を結紮し、尿管が拡張した状態(水尿管)を作出した。水尿管にガラスキャピラリーを挿入し、模倣抗原(蛍光標識ビーズ等)を腎盤腔内に投与した。膀胱についても同様の抗原に上皮を暴露した。抗原投与後 2~8 時間で、移行上皮およびその下層の UTALS における模倣抗原の局在を可視化した。

【計画2】自己免疫疾患モデルの UTALS の病態意義と制御分子を明らかにする。

- 1) **病理組織解析**：自己免疫性腎炎モデル MRL/lpr (Lpr) マウスとその野生型 MRL/MpJ (MRL) を用い、計画 1 の解析に加え、腎病理組織指標(炎症細胞浸潤、腎線維化)、腎機能指標、自己免疫異常指標(血中自己抗体濃度)を解析した。これらのパラメーターと UTALS の発達指標(サイズ、炎症細胞数等)を 2 系統間で比較し、各パラメーターの相関を明らかにした。
- 2) **分子病態解析**：Lpr と MRL の腎臓と UTALS を採取し、網羅的発現解析法で各組織の遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

健常マウスの UTALS：C57BL/6 マウスを用いて、UTALS の存在を検索した。腎臓、尿管および膀胱について検索したところ、健常マウスの腎盤および膀胱の粘膜に UTALS の形成が認められた(図 1)。特に後者は加齢マウスで発達する傾向にあった。解析した全ての個体で膀胱炎所見はみられていない。これらのリンパ組織は、T 細胞、B 細胞およびマクロファージ等で構成されていた(図 2)。いずれも、移行上皮直下に形成されており、MALT 様の形態を有した。一方、MALT にみられるような濾胞関連上皮細胞や M 細胞の存在は確認されなかった。また、腎盤の UTALS 発達は部位および個体で異なり、概して、リンパ組織内に膠原線維や細網線維を発達させた。また、腎盤、膀胱共に抗原取り込み像は観察されなかった。

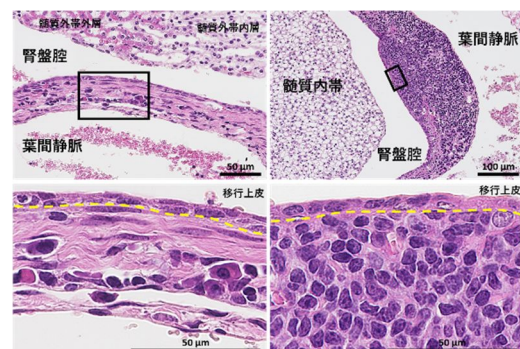


図 1. 健常マウスの腎盤 UTALS.

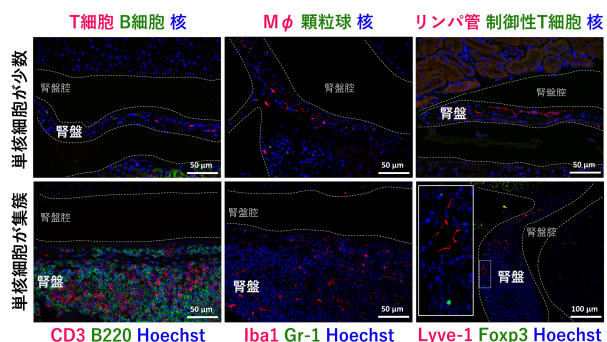


図 2. 健常マウスの腎盤 UTALS を構成する細胞.

UTALS に発現する分子群: MRL と Lpr の腎盤 UTALS の網羅的遺伝子発現解析から、サイトカイン・ケモカインおよびその受容体遺伝子が UTALS で高発現し、特に CCL・CXCL ケモカインで顕著だった(図3)。*in situ*ハイブリダイゼーションおよび免疫染色により、CCL・CXCL は主に腎盤を構成する線維芽細胞に発現していた。

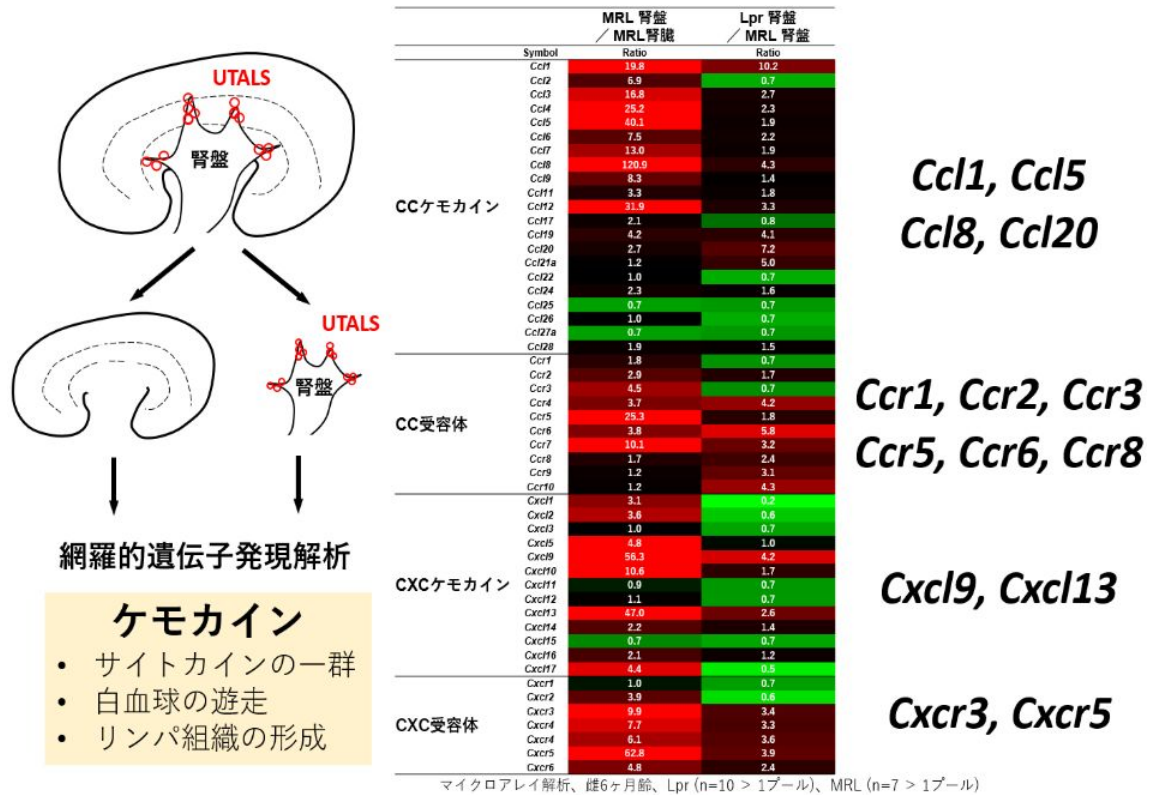


図3. マウス腎盤 UTALS に発現する分子群.

腎炎モデルの

UTALS: 自己免疫性腎炎モデルマウス (Lpr) の UTALS は顕著に発達し(図4)、UTALS における CCL・CXCL ケモカインやその受容体遺伝子発現は健常コントロール (MRL) よりも高かった(図5)。UTALS の CCL・CXCL ケモカイン発現は、腎病理スコア (糸球体傷害、尿管間質傷害等) と有意に正の相関にあった(図6)。

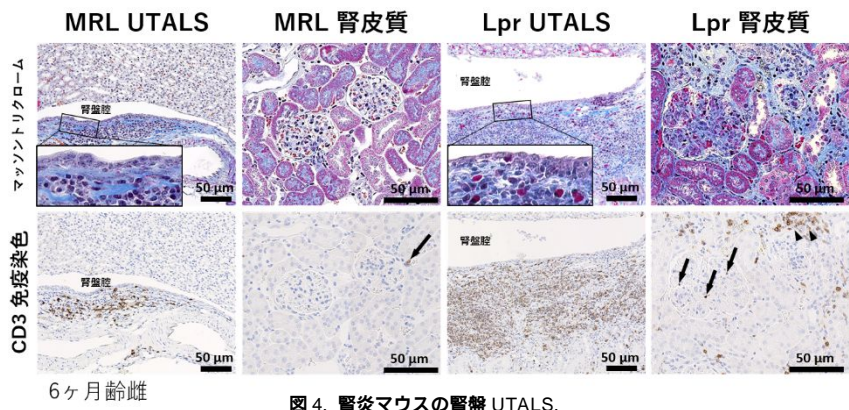


図4. 腎炎マウスの腎盤 UTALS.

図5. 腎炎マウスの腎盤 UTALS に発現するケモカイン関連遺伝子群.

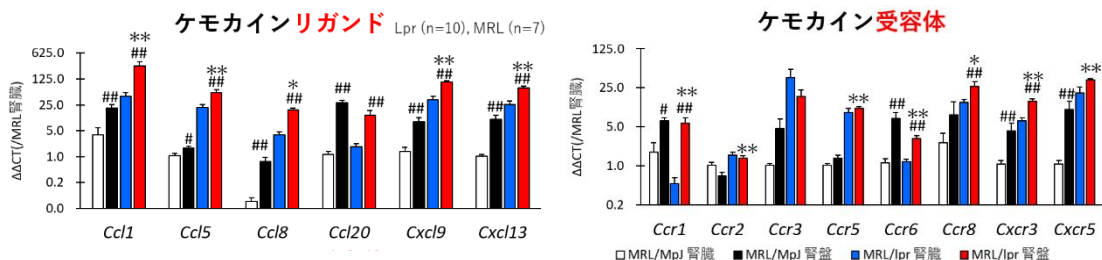


図5. 腎炎マウスの腎盤 UTALS に発現するケモカイン関連遺伝子群.

腎病理スコア 自己免疫異常スコア		腎盤内mRNA発現量													
		CCリガンド				CXCリガンド			CC受容体					CXC受容体	
		<i>Ccl1</i>	<i>Ccl5</i>	<i>Ccl8</i>	<i>Ccl20</i>	<i>Cxcl9</i>	<i>Cxcl13</i>	<i>Ccr1</i>	<i>Ccr2</i>	<i>Ccr3</i>	<i>Ccr5</i>	<i>Ccr6</i>	<i>Ccr8</i>	<i>Cxcr3</i>	<i>Cxcr5</i>
UTALS発達の指標	T細胞マーカーmRNA発現量	.667**	.706**	.656**	-.632**	.575*	.703**	-.591*	.610**	.426	.797**	-.691**	.544*	.682**	.632**
	B細胞マーカーmRNA発現量	.620**	.626**	.650**	-.726**	.600*	.709**	-.571*	.542*	.506*	.794**	-.700**	.468	.544*	.674**
腎病理スコア	糸球体のサイズ	.659**	.606*	.676**	-.459	.504	.688**	-.276	.576*	.032	.726**	-.421	.529*	.594*	.606*
腎病理スコア CD3陽性T細胞	陽性細胞集団の腎臓内占有面積	.701**	.650**	.650**	-.606*	.650**	.629**	-.403	.551*	-.335	.735**	-.721**	.615*	.632**	.700**
	尿細管間質への浸潤程度	.657**	.735**	.635**	-.485	.639*	.738**	-.276	.488*	.282	.665**	-.485	.565*	.588*	.685**
	陽性糸球体の割合	.757**	.629**	.712**	-.535*	.739**	.697**	-.215	.740**	.638**	.676**	-.665**	.456	.518*	.512*
	糸球体内の陽性細胞密度	.761**	.640**	.699**	-.952*	.757**	.696**	-.249	.761**	.661**	.737**	-.712**	.449	.517*	.546*
	糸球体内の陽性細胞数	.767**	.647**	.712**	-.503*	.775**	.735**	-.191	.730**	.603*	.676**	-.635**	.471	.538*	.521*
腎病理スコア B220陽性B細胞	陽性細胞集団の腎臓内占有面積	.647**	.559*	.612*	-.656**	.486	.591*	-.506*	.647**	.144	.774**	-.665**	.435	.571*	.676**
	尿細管間質への浸潤程度	.664**	.571*	.606*	-.582*	.489	.509*	-.394	.760**	.247	.765**	-.679**	.497	.553*	.515*
	陽性糸球体の割合	.728**	.559*	.638**	-.571*	.621*	.568*	-.365	.784**	.515*	.776**	-.741**	.509*	.512*	.529*
	糸球体内の陽性細胞密度	.779**	.618*	.724**	-.188	.671**	.509*	.000	.662**	.256	.459	-.359	.732**	.676**	.500*
自己免疫異常 の指標	血中自己抗体濃度	.676**	.700**	.762**	-.665*	.611*	.718**	-.197	.569*	.418	.832**	-.553*	.503*	.562*	.594*
	脾重量体重比	.551*	.609*	.512*	-.724**	.443	.588*	-.647**	.578*	.394	.824**	-.706**	.368	.497	.559*

Spearmanの順位相関係数, Lpr (n=10), MRL (n=7). ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$

図 6. UTALS の発達、腎病理スコア、腎盤のケモカイン関連遺伝子の発現の相関

他の動物種の UTALS : 腎機能が正常のイヌでも UTALS 様の構造がみられた。マウスと同様、このリンパ組織は腎盤腔側がやや丈の高い移行上皮で覆われ、その反対側では結合組織が発達しており、UTALS の付近には葉間動脈や葉間静脈が見られた (図 6)。

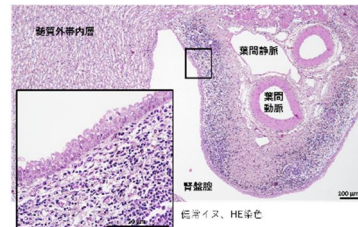


図 6. イヌの腎盤にみられる UTALS

まとめ : マウス腎盤の深部に新たな免疫関連組織“尿路関連リンパ組織(UTALS)”を見出した。これまでの解析において、マウスの腎臓、尿管、膀胱について検索したところ、健常マウスの腎盤と膀胱の粘膜に UTALS 形成が認められた。特に後者は加齢マウスで発達する傾向にあった。UTALS は、移行上皮直下で T 細胞、B 細胞およびマクロファージ等の免疫細胞で構成されていた。一方、MALT にみられるような濾胞関連上皮細胞や M 細胞の存在は確認されなかった。腎盤 UTALS の発達は部位および個体で異なったが、UTALS 内では膠原線維や細網線維が発達した。腎盤 UTALS では、サイトカイン・ケモカインおよびその受容体遺伝子が強く発現しており、特に CCL・CXCL ケモカインで顕著だった。自己免疫性腎炎モデルマウス (Lpr) の UTALS は顕著に発達し、UTALS における CCL・CXCL ケモカインやその受容体遺伝子発現は健常コントロール (MRL) よりも高かった。UTALS の CCL・CXCL ケモカイン発現は、腎病理スコア (糸球体傷害、尿細管間質傷害など) と有意に正の相関にあった。腎機能が正常のイヌでも UTALS 様の構造がみられた。このように腎盤 UTALS は様々な動物種でみられ、その形成は加齢、腎障害や全身免疫状態に強く影響されると考えられた。

以上の結果より、腎盤 UTALS の発達は局所免疫の活性化、さらには腎炎の進行に関連すると考えられた。UTALS は腎臓の病態時、特に炎症性病変における浸潤細胞の起源として興味深く、今後も引き続き動物やヒトの臨床例の解析を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masum Md. Abdul, Osamu Ichii, Yaser Hosny Ali Elewa, Yuki Otani, Takashi Namba, Yasuhiro Kon	4. 巻 11
2. 論文標題 Vasculature-Associated Lymphoid Tissue: A Unique Tertiary Lymphoid Tissue Correlates With Renal Lesions in Lupus Nephritis Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 595672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.595672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuki Otani, Osamu Ichii, Masum Md. Abdul, Takashi Namba, Teppei Nakamura, Yasuhiro Kon	4. 巻 なし
2. 論文標題 Castrated autoimmune glomerulonephritis mouse model shows attenuated glomerular sclerosis with altered parietal epithelial cell phenotype	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 1318 ~ 1329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1535370221996010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ichii Osamu, Hosotani Marina, Masum Md. Abdul, Horino Taro, Otani Yuki, Namba Takashi, Nakamura Teppei, Hosny Ali Elewa Yaser, Kon Yasuhiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Close Association between Altered Urine-Urothelium Barrier and Tertiary Lymphoid Structure Formation in the Renal Pelvis during Nephritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 88 ~ 107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2021040575	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市居 修、細谷 実里奈、Md. Abdul Masum、堀野 太郎、中村 鉄平、難波 貴志、大谷 祐紀、Yaser Hosny Ali Elewa、昆 泰寛
2. 発表標題 慢性腎炎における尿と腎盤上皮の病態連関
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市居修、小山田和央、水川葉月、中村鉄平、Yaser Hosny Ali Elewa、昆泰寛
2. 発表標題 ネコ尿管の形態と尿管結石症による変化
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Md. Abdul Masum、市居 修、難波貴志、大谷祐紀、Yaser Hosny Ali Elewa、昆泰寛
2. 発表標題 Elucidation of vasculature-associated tertiary lymphoid tissue in lupus nephritis mouse model
3. 学会等名 第16回日本獣医解剖アカデミア
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市居 修、中村 鉄平、堀野 太郎、山下 渚、細谷 実里奈、Yaser Hosny Ali Elewa、昆 泰寛
2. 発表標題 動物の尿生殖器関連リンパ組織
3. 学会等名 第12回日本獣医腎泌尿器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市居 修、中村鉄平、堀野太郎、細谷実里奈、Yaser Hosny Ali Elewa、昆 泰寛
2. 発表標題 尿路関連リンパ組織と17型コラーゲンの発現
3. 学会等名 日本解剖学会 第65回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 渚、市居 修、大谷 祐紀、Masum Md.Abdul、Yaser Hosny Ali Elewa、昆 泰寛
2. 発表標題 加齢マウスの尿生殖器における局所リンパ組織の探索
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市居 修、中村 鉄平、堀野 太郎、細谷 実里奈、Yaser Hosny Ali Elewa、昆 泰寛
2. 発表標題 動物の尿路関連リンパ組織 (UTALT) に発現する分子群
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本獣医解剖学会 (市居修他)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 学窓社	5. 総ページ数 416
3. 書名 獣医組織学 第八版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>北海道大学大学院獣医学研究院・獣医学部解剖学教室ホームページ https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/anat/index.html 北海道大学獣医学研究院解剖学教室 https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/anat/</p>

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
研究分担者	昆 泰寛 (Kon Yasuhiro) (10178402)	北海道大学・獣医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	エレワ ヤセル (Elewa Yaser) (30782221)	北海道大学・獣医学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	中村 鉄平 (Nakamura Teppei) (80786773)	北海道大学・獣医学研究院・客員研究員 (10101)	

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			
バングラデシュ	Sher-e-Bangla Agricultural University			