

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08219

研究課題名(和文) 小児CKD進展に関するM2型マクロファージ制御法の確立

研究課題名(英文) Establishment of control method for M2-type activated macrophage-mediated progression of childhood CKD.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、全ての慢性腎臓病(CKD)の終末病理所見として普遍的に認められる糸球体硬化および間質線維化といった慢性病変の形成に関わるM2型活性化マクロファージ(M2)を同定し、その詳細な機能解析および制御法の確立を目的として検討を行った。その結果、本マクロファージ群はCKD治療に汎用されるステロイドによりむしろ活性化し、抗炎症性因子の発現により腎炎の終息に貢献する一方で、同時に線維化促進因子の発現による慢性病変の進展にも関わることを明らかにした。多剤併用療法としてステロイドと併用されるミゾリピンなどの一部の免疫抑制薬にはM2の寿命を短縮し、慢性病変の進展を軽減する作用を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国の慢性腎臓病(CKD)による透析患者数は増加の一途をたどっており間もなく35万人に達する。本研究は全てのCKDの進展過程で認める腎線維化に関わるマクロファージ(MQ)群の同定とその機序の解明および制御法の確立を目的としたものである。今回の研究により腎組織の線維化に関わるMQ群としてCD163陽性M2型活性化MQ群を同定したこと、およびその制御を可能とする治療薬の一つを見出しこと、またCKDの重要な要因となる慢性糸球体腎炎の治療薬として汎用されるステロイド薬のMQを介した組織線維化への関与を明らかにしたことは、CKDの増加に歯止めをかける上で重要かつ意義ある発見といえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified M2-type activated macrophages (M2) involved in the pathogenesis of chronic lesions such as glomerulosclerosis and interstitial fibrosis, which are universally recognized as end-stage pathological findings in all chronic kidney diseases (CKD), and investigated their detailed functional analysis and establishment of a methodology for their regulation.

We found that this macrophage phenotype is activated by steroids, which are commonly used in the treatment of CKD, and contributes to the resolution of nephritis by expressing anti-inflammatory factors, while at the same time being involved in the development of chronic lesions by expressing profibrotic factors. We found that some immunosuppressive drugs such as mizoribine, which is used in combination with steroids as a multidrug therapy, have the ability to reduce the lifespan of M2 and attenuate the progression of chronic lesions.

研究分野：腎臓病学

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

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では学校腎臓検診が制度化され、慢性糸球体腎炎を主とする多くの腎疾患が小児期早期に発見されているにも関わらず、末期腎不全へと進行し透析導入される慢性腎臓病 (CKD)患者は増加を続け、その数は延べ30万人を超えている。この主要な原因として、糖尿病患者の増加から糖尿病性腎症、末期腎不全へと至る成人CKD患者の増加と、小児期発症例を含むCKDの有効な治療法が確立していないことが挙げられる。一方、原因の如何に関わらず、全てのCKDが進行によって辿り着く腎組織の終末像は糸球体硬化と尿細管間質線維化である。我々はこれまでCKD進展過程で認められるもう一つの普遍的な病理所見としてマクロファージ (MQ)浸潤があることに着目し、CKDの発症・進展機序におけるMQの役割を検討してきた。これまでに、MQがリンパ球や好中球など他の白血球の関与無く単独で腎糸球体障害を惹起し得ることや、MQの「活性化」が腎組織障害の形成に重要な役割を担う事を見出し報告してきた。MQの活性化様式にはM1(炎症性)、M2(抗炎症性、組織修復型)の2系統の存在が知られ、慢性糸球体腎炎の進展過程では、M1・M2がともに関与し、M1は主に糸球体管内増殖性病変や細胞性半月体形成などの急性・活動性病変の形成に、M2は糸球体基質の増生・硬化病変、尿細管間質線維化などの慢性腎病変の形成に関与するというように、慢性糸球体腎炎の進展過程でそれぞれ異なった役割を担うことを見出し報告した。さらに、各種慢性糸球体腎炎のみならず、シクロリンによる腎組織障害(シクロリン腎症)や慢性移植腎症など、非炎症性の慢性腎病変の形成にも主にM2型活性化MQが関与することを報告した。すなわち、全ての進行性腎障害の終末像としてみられる糸球体硬化や尿細管間質線維化に、腎疾患の原因を問わず、また、ステロイドや免疫抑制薬の使用の有無に関わらず、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。これらの研究結果を踏まえると、腎慢性病変の形成に特異的に関与するM2型活性化MQは、CKD進展を制御するための重要な治療のターゲットと言える。

## 2. 研究の目的

以上の背景のもと、本研究の目的はCKD進展におけるM2型MQによる慢性病変形成の分子生物学的機序を解明し、その制御法を確立することである。過去のこれまでの多くの研究から、古典的な活性型(炎症性)MQであるM1に対しては、慢性糸球体腎炎の治療として臨床で汎用されるステロイド薬の有効性が示されており、その制御法は確立していると言える。一方、ステロイド薬はM2に対して、その活性化をむしろ増強し、線維化促進因子などの産生を介して慢性病変の形成を助長してしまう可能性がある。すなわち、CKD進展抑制のための主要なターゲットと考えられるM2型MQの活性化を抑制する有効な薬剤や方法が無いのが現状であり、その開発が本研究における主要な目的である。

## 3. 研究の方法

CKD治療のターゲットとなる腎慢性病変特異的MQ発現分子の網羅的探索

ヒト末梢血単球をMQへ分化させた培養解析系に、IFN- $\gamma$ やリポポリサッカライド (LPS)などのM1活性化因子および(または)ステロイドや酸化LDLなどCKD治療下の腎組織中に存在すると考えられるM2活性化促進因子を順に添加して誘導される活性化M2の発現分子をDNAマイクロアレイ法にて網羅的に検出した。

上記Iで抽出したシグナル伝達経路に対する阻害薬を用いたM2活性阻害実験

上記Iと同様の培養解析系に、ステロイド薬を含め一般臨床にて使用される薬剤(各種免疫抑制薬、レニンアンジオテンシン系(RAS)阻害薬、スタチン製剤など)を用いたM2活性抑制、線維化促進因子発現の抑制効果を検討した。

ヒト腎生検標本を用いた発現解析

計画Iで抽出されたサイトカインなど発現分子について、各種慢性腎疾患の腎生検組織中における発現について特異抗体を用いた免疫染色にて確認し、発現のパターンにより治療ターゲットとしての可能性を検討した。

## 4. 研究成果

培養系実験結果

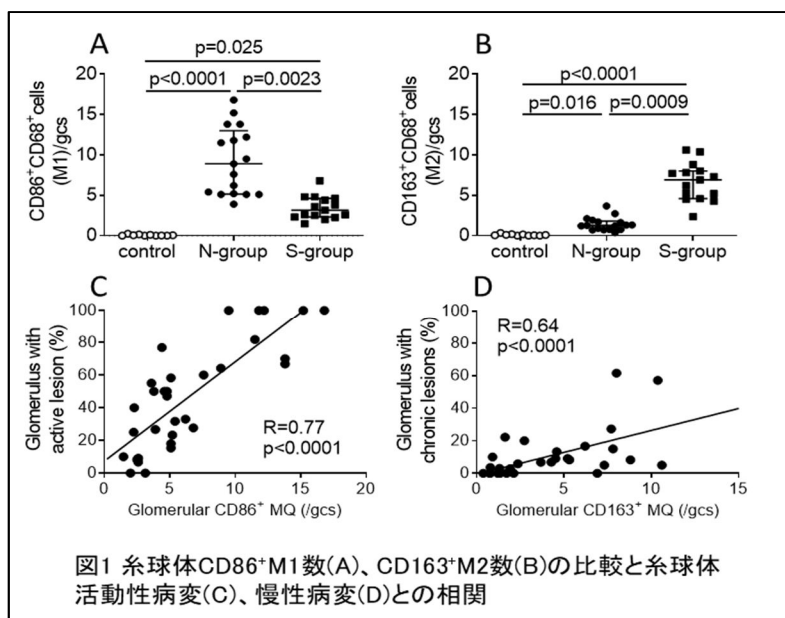
ヒト末梢血単球を20%のヒトAB型血清を添加した培地で8日間培養して分化誘導したMQにIFN- $\gamma$ 単独、またはIFN- $\gamma$ /LPSを添加しM1型(炎症性)活性刺激を行ったところ、TNF- $\alpha$ 、インターロイキン(IL)-6、IL-8、IL-12などのM1型炎症性サイトカインの発現の増強とともにM1型MQマーカーであるCD86の発現が誘導された。この系にIFN- $\gamma$ /LPS刺激の24時間後にさらにステロイド薬としてデキサメタゾン(Dex)を添加したところ、M1型活性化を誘導によって増強した炎症性サイトカインの発現が

抑制された一方で、M2 型 MQ マーカーである CD163 の発現が増強するとともに、IL-10 などの抗炎症性サイトカインまたは線維化促進因子 (TGF- $\beta$ 1, FGF-1, FGF-2, VEGF-D, angiotensinogen など) の発現が増強した。また、ステロイド (Dex) の添加は MQ における Th1 (炎症性) リンパ球の遊走阻害因子である stabilin-1 や免疫賦活化抗原 CD300e の発現を増強した。CD300e は主に単球や MQ を含む骨髓系細胞に発現し、CD300e を介した刺激により細胞死 (アポトーシス) を抑制し生存期間を延長する働きがあることが知られている。

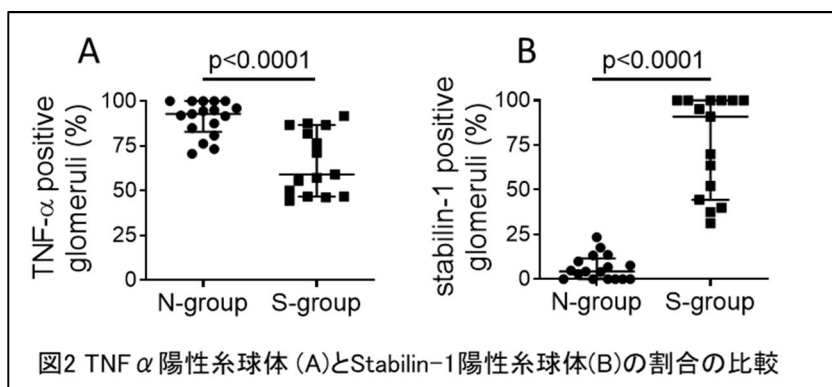
さらに、本邦の小児 IgA 腎症の治療薬として用いられるミズリチンを Dex と合わせて添加したところ、各種炎症性サイトカインの発現や CD300e の発現が抑制された。

#### 腎生検組織による検討結果

i) 腎生検施行前に無治療であったループス腎炎患者 17 名 (N-群) および腎生検前にステロイド治療が先行していた患者 15 名 (S-群) の腎生検組織における MQ 浸潤像や病理所見を比較したところ、いずれの群においても糸球体への著明な MQ 浸潤を認めたが N 群では糸球体内の CD86 陽性 M1 型 MQ の浸潤が有意に多く、管内細胞増殖や細胞性半月体などの糸球体活動性病変を有する糸球体の割合が有意に多く、糸球体 M1 型 MQ 数と糸球体活動性病変の間に有意な相関を認めた。これに対し、S 群においては CD163 陽性 M2 型 MQ 数が有意に多く、分節性・全節性硬化などの慢性病変が有意に多く、M2 型 MQ 数と糸球体慢性病変との間に有意な相関を認めた (図 1)。



また、N 群では糸球体内の CD86 陽性 MQ1 による炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の発現が認められたのに対し、S 群では TNF- $\alpha$  の発現は消失または減弱がみられた一方で、CD163 陽性 M2 型 MQ による Stabilin-1 の発現を認めた (図 2)。



ii) 小児 IgA 腎症の 90 例を免疫抑制薬としてステロイド薬 (プレドニゾロン) のみを使用した群 (P 群 42 例) とプレドニゾロンとミズリチンを併用した群 (PM 群 48 例) に分けて臨床経過、MQ 浸潤像や病理所見を検討したところ、2 年間の治療により両群とも蛋白尿や血尿などの尿所見の改善を認めたものの、2 年後の腎生検所見では P 群においてのみ糸球体マクrophage 基底質の増生や全節性硬化および間質線維化といった慢性病変が有意に増加していた (図 3)。

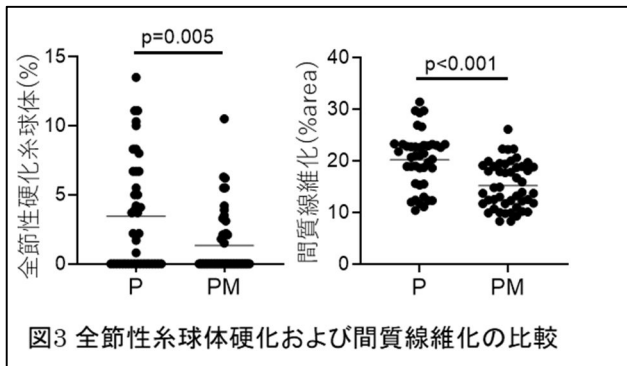


図3 全節性糸球体硬化および間質線維化の比較

また、両群ともに糸球体への間質への CD163 陽性 M2 型 MQ 浸潤を認め 2 年間の治療によりともに減少したものの、P 群では糸球体および間質の CD163 陽性 M2 型 MQ 数が有意に多かった。また、糸球体、間質への CD163 陽性 M2 型 MQ 数と糸球体マシキ<sup>®</sup> ム基質の増生や間質線維化などの慢性病変との間に有意な相関を認めた (図 4)。

さらに P 群では糸球体および間質の CD163 陽性 M2 型 MQ による CD300e の発現を認めたのに対し、PM 群においては CD163 陽性細胞の浸潤は認められるものの、CD300e の発現は認められなかった。

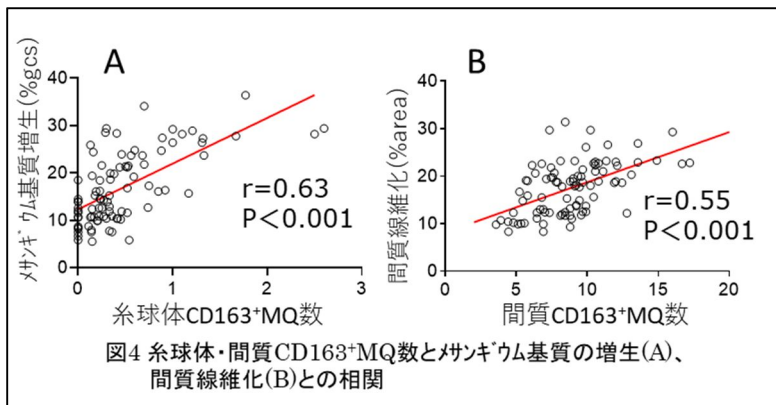


図4 糸球体・間質CD163<sup>+</sup>MQ数とマシキ<sup>®</sup> ム基質の増生(A)、間質線維化(B)との相関

[結果のまとめと結論]

以上 i)、ii)と培養実験結果と合わせ、ステロイド薬は慢性糸球体腎炎の治療において、M1 型炎症性 MQ を抗炎症性 M2 型 MQ に変化させ、抗炎症性作用を発揮し活動性病変の形成を抑制する作用を有するものと考えられた。さらにステロイド薬は M2 型 MQ による CD300e の発現を介して、その寿命を延長することにより、抗炎症作用を持続させる作用があることが示唆された。

一方、M2 型 MQ の誘導は同時に線維化促進因子の発現の増強を伴うことから、糸球体硬化などの慢性病変の形成を助長する可能性が示唆された。これに対し、IgA 腎症の治療薬としてステロイドと併用されるジメチルスルホンには MQ の M2 型活性化を制御し、組織線維化を抑制する作用を有するものと考えられた。

ループス腎炎の治療でもジメチルスルホンと同様の機序で作用する核酸合成阻害薬ニコチン酸エチルがステロイドと併用して用いられるが、こうした免疫抑制薬の多剤併用療法の意義として、薬剤に対する反応性が異なる複数のターゲットを同時に制御する効果があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikezumi Y, Kondoh T, Matsumoto Y, Kumagai N, Kaneko M, Hasegawa H, Yamada T, Kaneko U, Nikolic-Paterson DJ.	4. 巻 36
2. 論文標題 Steroid treatment promotes an M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in childhood lupus nephritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Nephrology	6. 最初と最後の頁 349-359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00467-020-04734-w.	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 -

1. 著者名 Ikezumi Y, Yoshikane M, Kondoh T, Matsumoto Y, Kumagai N, Kaneko M, Hasegawa H, Yamada T, Suzuki T, Nikolic-Paterson DJ.	4. 巻 38
2. 論文標題 Mizoribine halts kidney fibrosis in childhood IgA nephropathy: association with modulation of M2-type macrophages.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatric Nephrology	6. 最初と最後の頁 1831-1842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00467-022-05786-w.	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池住洋平, 近藤朋実, 松本祐嗣, 熊谷直憲, 金子昌弘, 長谷川博也, 山田剛史
2. 発表標題 ステロイド治療下の高脂血症が関与するネフローゼ症候群の腎組織障害機序の検討
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池住洋平
2. 発表標題 腎生検、初めの一步ともう一步
3. 学会等名 第56回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池住洋平
2. 発表標題 ステロイド治療下の高脂血症が関与するネフローゼ症候群の腎組織障害機序の検討
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池住洋平
2. 発表標題 マクロファージをターゲットとした慢性糸球体腎炎治療におけるステロイド作用機序の検討.
3. 学会等名 第57回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池住洋平
2. 発表標題 ループス腎炎の治療における活性化マクロファージをターゲットとしたステロイド作用機序の検討.
3. 学会等名 第31回日本小児リウマチ学会 総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池住洋平
2. 発表標題 マクロファージをターゲットとした慢性糸球体腎炎治療におけるステロイドの作用機序.
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	長尾 静子 (Nagao Shizuko)  (20183527)	藤田医科大学・病態モデル先端医学研究センター・教授  (33916)	
研究分担者	熊谷 直憲 (Kumagai Naonori)  (40400329)	藤田医科大学・医学部・講師  (33916)	
研究分担者	山田 剛史 (Yamada Takeshi)  (90601922)	新潟大学・医歯学総合病院・助教  (13101)	

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
---------	---------