

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590600

研究課題名（和文）腎障害の発症進展ならびに修復機転におけるマクロファージの多面的作用の解析

研究課題名（英文）Role of macrophages in the development and repair of renal injury

研究代表者

三浦 克之（MIURA KATSUYUKI）

大阪市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00183624

研究成果の概要（和文）：腎尿細管間質の線維化は進行性腎障害の進展を一義的に規定する因子として知られている。本研究では腎障害の発症進展ならびに修復機転におけるマクロファージの役割についてマウス一側尿管閉塞モデルを用いて検討した。その結果、樹状細胞以外の単球系細胞が腎線維化の発症早期に関与すること、線維化の進行とともにマクロファージを含む単球系細胞数は増えるにも関わらず線維化病変への関与が低下することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Tubulointerstitial fibrosis is a main determinant that leads to an irreversible loss of renal function in chronic diseases. The present study was conducted to elucidate the role of mononuclear phagocyte system in the development and repair of renal injury by using mouse unilateral ureteral obstruction. It was found in this animal model that mononuclear phagocytes but not dendritic cells were involved in the development of fibrosis whereas the contribution of these mononuclear phagocytes became less with progression of the disease despite the increase in number of the infiltrating mononuclear cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、応用薬理学

キーワード：薬物治療学

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病においては初期病変の如何に関わらず尿細管間質病変が持続遷延することに伴う腎間質の線維化が腎機能の持続的な荒廃につながる。腎間質へのマクロファージの浸潤は尿細管間質病変の早期から認められることは臨床的にも実験的にもよく知られた事実であり、細胞浸潤を伴う炎症反応が多くの腎障害の発症・進展に深く関与していると考えられてきた。腎障害モデルの一つである腎虚血再灌流モデルではマクロファージを除去するような操作を加えると腎臓の障害が軽減されるのに対し、回復期に除去すると逆に尿細管破壊とアポトーシスが增强されることが報告された。このようにマクロファージを中心とする単球系細胞は異なった表現形があり組織障害性に働く細胞以外に組織の修復や治癒過程に作用する細胞が存在することが示唆されてきた。

2. 研究の目的

マウス一側尿管閉塞モデルを用いて腎障害の発症進展ならびに修復機転における単球系細胞の役割を明らかにする

3. 研究の方法

(1) 循環血中の単球（マクロファージおよび樹状細胞の前駆細胞）除去の効果の検討
図1に腎組織における炎症細胞を示す。

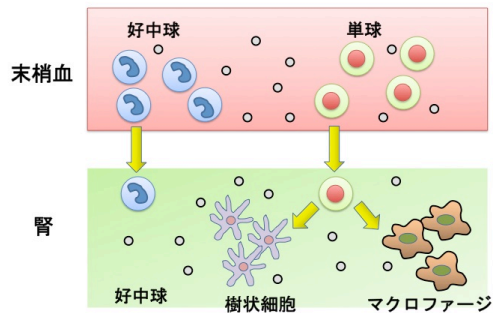


図1. 腎組織への炎症細胞の浸潤

マウスの一側尿管閉塞により経時的に尿細管間質における炎症細胞の増加とともに腎間質の線維化が観察される。このように間質に増加した炎症細胞が如何なる細胞であるか、さらに循環血中に存在する単球系細胞に由来するかを明らかにするために循環単球除去作用が知られるリポソームに包埋したクロドロネートを静脈内に投与し、マウス一側尿管閉塞モデルの腎線維化発症期における効果を検討した。なお、腎に浸潤した炎症細胞の組成を検討するため、腎組織をコラゲナーゼで処理して細胞浮遊液を作成、炎症細胞を識別できる細胞表面マーカーに対する特

異的抗体を用い、フローサイトメトリーを行った。さらに得られた腎組織の組織学的検討、炎症や線維化に関連する分子の遺伝子発現を検討した。

(2) TRECK法により作成されたトランスジェニックマウスを用いた急性および慢性尿細管間質障害の時期の違いにおけるマクロファージと樹状細胞除去の効果の検討
単球系細胞は組織に浸潤後、マクロファージか樹状細胞に分化する(図1)。今回の研究では樹状細胞に特異的に発現するCD11cのプロモータにヒトジフテリア毒素受容体DTRを発現するよう遺伝子改変を行ったマウス(CD11c DTRマウス)とすべての単球系細胞に発現するCD11bのプロモータにヒトジフテリア毒素の受容体を発現するよう遺伝子改変を行ったマウス(CD11b DTRマウス)を入手し実験に用いた(図2)。

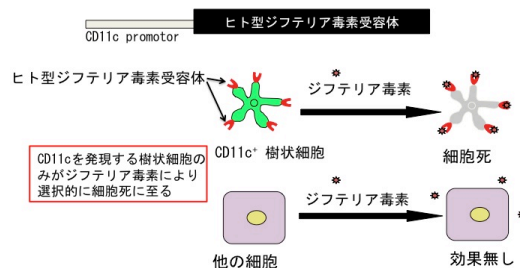


図2. 遺伝子改変マウスを用いた選択的樹状細胞除去

これらの動物にジフテリア毒素を投与すると選択的に樹状細胞、単球系細胞を除去できる。但し、ジフテリア毒素投与で一時的に細胞除去は可能であるが、持続的に効果を示すにはこれらの遺伝子改変マウスの骨髄キメラマウスを用いる必要がある。従って以降の実験はCD11c DTRマウスおよびCD11b DTRマウスの骨髄キメラマウスを用いた。

①腎線維化発症早期における単球系細胞の役割

一側尿管閉塞後5日目に見られる早期の腎線維化における樹状細胞と単球系細胞の関与を検討するため、上記のキメラマウスを用い、ジフテリア毒素を閉塞1日前から処置した。

②腎線維化進行期における単球系細胞の役割

一側尿管閉塞後15日目に見られる早期の腎線維化における樹状細胞と単球系細胞の関与を検討するため、上記のキメラマウスを用い、ジフテリア毒素を閉塞9日目から処置した。

4. 研究成果

(1) 循環血中の単球（マクロファージおよび樹状細胞の前駆細胞）除去の効果

尿管閉塞により F4/80+マクロファージ、F4/80+樹状細胞、F4/80-樹状細胞に加え、少ないながら好中球およびT細胞の増加が観察された。リポソームクロドロネート処置により F4/80+マクロファージ、F4/80+樹状細胞の増加は著しく抑制されたが、その他の細胞数には影響を与えなかった。さらに尿管閉塞時に認められた腎線維化および尿細管細胞のアポトーシスは著しく抑制された（図3）。

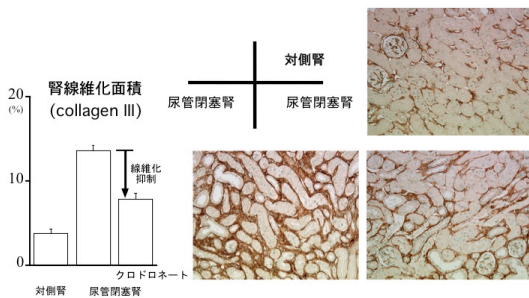


図3 リポソームクロドロネートによる腎線維化の抑制

さらに TNF-alpha, TGF-beta および collagen III の遺伝子発現も尿管閉塞により著明に亢進したが、これらの変化はリポソームクロドロネートにより抑制された。これらの結果よりリポソームクロドロネートは循環血中の単球を減じ、尿管を閉塞した腎への浸潤を抑制した結果、腎 F4/80+マクロファージおよび樹状細胞に選択的に減少させることが明らかになった。さらにこれらの細胞が TNF-alpha, TGF-beta 産生の上昇を介して閉塞腎の早期における尿細管細胞のアポトーシスと線維化病変を惹起している可能性が示唆された。以上の成果は論文②に報告している。論文公表後、既に一流国際誌に 10 回引用されており、評価されているものと考えている。

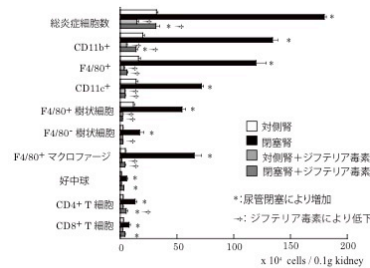
(2) TRECK 法により作成されたトランスジェニックマウスを用いた急性および慢性尿細管間質障害の時期の違いにおけるマクロファージと樹状細胞除去の効果

①腎線維化発症早期における単球系細胞の役割

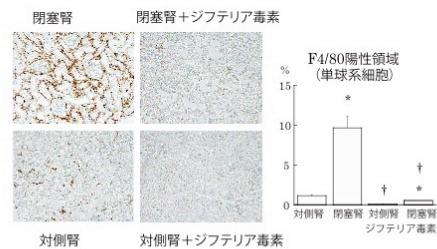
上記の結果より尿管閉塞時の腎線維化発症早期において単球由来の樹状細胞とマクロファージが線維化促進性に働くことがわかったが、いずれの細胞群が関与しているかは明らかでなかった。そこでまず樹状細胞に注目し CD11c DTR キメラマウスの一側尿管閉塞を行い、ジフテリア毒素を投与すると選択的

に樹状細胞数の増加を抑制することが出来たがマクロファージの増加には影響を与えなかった。一方、TNF-alpha, TGF-beta および collagen III の遺伝子発現の上昇および腎線維化に対しては全く影響を認めなかった。従って腎線維化発症早期における樹状細胞の腎線維化への関与は少ないと考えられた。そこで樹状細胞以外の単球系の細胞の腎線維化早期における関与を検討した。CD11b DTR キメラマウスの一側尿管閉塞を行い、ジフテリア毒素を投与すると樹状細胞を含む全ての単球系細胞の腎組織への浸潤が抑制できた（図4）。

A



B



ジフテリア毒素により単球系細胞はほぼ消失

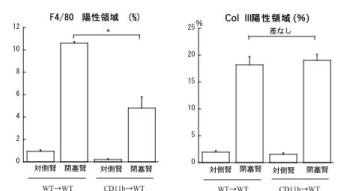
図4. CD11b DTR骨髄キメラマウス用いた腎線維化早期の単球系細胞の除去効果

また尿管閉塞後5日目に見られる腎線維化は、ジフテリア毒素を投与すると有意に抑制された。同時に TGF-beta および collagen III の遺伝子発現も尿管閉塞により著明に亢進したが、これらの変化は単球系細胞の選択的除去に伴い抑制された。以上の結果を合わせて考えると樹状細胞以外の単球系細胞が腎線維化の発症には重要であることが明らかとなった。この結果は論文①に報告しており Nature Rev Immunol, Kidney Int に引用されており、Am J Pathol 180:91, 2012 において樹状細胞の関与しない点について追認されている。

②腎線維化進行期における単球系細胞の役割

腎線維化の進行期における単球系細胞の役割を検討するために CD11b-DTR 骨髄キメラマウスを用い尿管閉塞後 15 日における腎線維化における単球系細胞を除去の効果を検討した。対照として野生型マウスの骨髄を野

生型マウスに移植し、両群に尿管閉塞 9 日目より 14 日目まで毎日ジフテリア毒素を投与した。ジフテリア毒素投与により単球系細胞の増加は抑制されたが、腎線維化には全く影響を示さなかった (図 5)。



WT→WT: 野生型マウス骨髄を野生型マウスに移植
 CD11b→WT: CD11b DTRマウス骨髄を野生型マウスに移植
 腎線維化の進行期では単球系細胞の除去によっても腎線維化に影響なし
 図5. CD11b DTR骨髄キメラマウス用いた腎線維化進行期の単球系細胞の除去効果

同様の検討は CD11c DTR キメラマウスを用いても行ったが腎線維化の抑制効果は認められなかった。従って進行期においては尿管閉塞に伴って腎組織に浸潤した樹状細胞は腎線維化の進行には重要でないと考えられた。このように腎線維化発症進展の時期によって単球マクロファージの線維化における意義が異なることが明らかとなった。しかしながら、腎虚血再灌流の回復期に認められるような組織修復性マクロファージの存在は証明できなかった。このような違いは腎虚血再灌流モデルでは障害刺激が虚血再灌流時に限られているのに対し、尿管閉塞モデルでは尿管閉塞による腎盂内圧上昇が持続することにより障害刺激が継続されているためかも知れない。今後、尿管閉塞を解除したモデルを用いて障害刺激を除いた状態で単球マクロファージの機能の多様性を検討する必要がある。

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 3 件)

- ① Y. Machida, K. Kitamoto, Y. Izumi, M. Shiota, J. Uchida, Y. Kira, T. Nakatani, K. Miura. Renal fibrosis in murine obstructive nephropathy is attenuated by depletion of monocyte lineage, not dendritic cells. J Pharmacol Sci 査読有り, vol. 114, 2010, 464-473
DOI: 10.1254/jphs.10246FP
- ② K. Kitamoto, Y. Machida, J. Uchida, Y. Izumi, M. Shiota, T. Nakao, H. Iwao, T. Yukimura, T. Nakatani and K. Miura. Effects of Liposome Clodronate on Renal Leukocyte Populations and Renal Fibrosis in Murine Obstructive Nephropathy. J. Pharmacol. Sci. 査読有り, vol. 111, 2009, 433-439
DOI: 10.1254/jphs.09227FP

[学会発表] (計 7 件)

- ① Y. Machida et al. Role of renal dendritic cells and macrophages on renal fibrosis in obstructive nephropathy. 23th International Congress of The Transplantation Society. 2011, Aug 16, Vancouver
- ② Y. Machida et al. Effects of conditional depletion of renal dendritic cells on renal fibrosis in obstructive nephropathy. 2009 American Society of Nephrology Renal Week. San Diego
- ③ 北本 興市郎 他 マウス腎一側尿管閉塞(UUO)モデルにおける Liposome Clodronate の腎間質線維化抑制効果の検討 第 45 回日本移植学会総会 2009 年 9 月 16 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 克之 (MIURA KATSUYUKI)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号: 00183624

(2) 研究分担者

泉 康雄 (IZUMI YASUKATSU)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号: 10347495

(3) 連携分担者

該当なし