

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659440

研究課題名（和文）新規病原体センサー・内因性リガンド系が織りなす急性腎不全の新たな制御機構の解明

研究課題名（英文）Role of a novel pathogen sensor in the pathophysiology of acute renal failure

研究代表者

菅波 孝祥（SUGANAMI TAKAYOSHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授

研究者番号：50343752

研究成果の概要（和文）：

最近、TLRやC型レクチンに代表される病原体センサーは、組織障害に際して死細胞や障害細胞より放出される内因性リガンドを認識し、非感染性炎症にも関与することが明らかになってきた。本研究において、代表的な急性腎不全モデルである腎虚血再灌流障害の発症・進展に新規病原体センサーMincleが関与することが明らかになった。Mincleは、腎障害に伴って浸潤する炎症促進性マクロファージに発現し、未同定の内因性リガンドを認識して、腎障害の病態形成に関わると想定される。

研究成果の概要（英文）：

Accumulating evidence suggests that pathogen sensors such as TLRs and C-type lectin families are capable of sensing endogenous ligands released from damaged and stressed cells and tissues, thereby inducing sterile inflammation. Here we demonstrate that macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) is involved in the pathophysiology of renal ischemia-reperfusion injury, an experimental model of acute renal failure. Our data also suggest that Mincle is mainly expressed in proinflammatory macrophages that infiltrate into the damaged kidney.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：腎虚血再灌流障害、マクロファージ、急性腎不全、炎症

1. 研究開始当初の背景

従来、Toll様受容体（TLR）やC型レクチンを代表とするパターン認識受容体は、病原体の構成成分を認識する病原体センサーとして、生体の感染防御に中心的な役割を果たすことが知られている。最近、病原体センサーは、組織障害に際して死細胞や障害細胞より放出される内因性リガンドを認識し、非感染性炎症（sterile inflammation）にも関与することが明らかになってきた。一方、急性腎不全の病態生理に関しては、虚血再灌流障害モデルを用いた検討が数多く行われており、マクロファージや炎症性サイトカインが病態形成に重要な役割を果たすため、急

性腎不全の少なくとも一部は非感染性炎症性疾患と考えることができる。

Macrophage-inducible C-type lectin (Mincle or Clec4e)は、マクロファージに発現するC型レクチンであり、細胞膜上に局在する。リポポリサッカライド（LPS）刺激により誘導されることが1999年に報告されているが、その機能は長らく不明であった。最近、結核菌や病原性真菌に対する病原体センサーとして、炎症性サイトカインの産生を誘導し、感染防御に働く可能性が報告された。一方、死細胞に対するセンサーとしても作用することが報告され、非感染性炎症における意義も示唆されている。しかしながら、病態におけ

る意義はほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、新規病原体センサーMincle とその内因性リガンド系が織りなす非感染性炎症の新たな制御機構の解明を通して、急性腎不全の新しい病態生理の解明と医学応用の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1)腎虚血再灌流障害モデル:

右腎を摘出後、左腎を30分間クランプして作製し、7日目まで観察した。

(2)Real-time PCR:

腎障害惹起後、6時間、1日、3日、5日、7日目にサンプリングし、Real-time PCR法によりmRNAレベルを測定した。

(3)フローサイトメーター解析:

腎障害3日目の腎臓をコラゲナーゼ処理し、定法に従って、CD45陽性細胞をCD11bとF4/80で展開し、F4/80(hi)、F4/80(lo)マクロファージ分画を調整した。

(4)組織学的解析:

腎障害3日目の腎臓を用いて、マクロファージの局在をIba-1免疫染色で、Mincleの発現を *in situ* hybridization で検討した。

(5)培養細胞:

尿細管上皮細胞としてmProx24マウス尿細管上皮細胞株を、マクロファージとしてRAW264マクロファージ細胞株、マウス腹腔内マクロファージ、マウス骨髄由来マクロファージを用いた。骨髄由来マクロファージは、骨髄細胞をmacrophage colony-stimulating factor (M-CSF)にてマクロファージに分化誘導し、さらに、interferon- γ (IFN- γ)やinterleukin-4 (IL-4)を添加して、炎症促進性M1、炎症抑制性M2マクロファージを誘導した。

(6)質量顕微鏡解析:

対照sham群、腎障害6時間および24時間後の腎組織を用いて、質量顕微鏡解析を行った。

4. 研究成果

(1)腎虚血再灌流障害におけるMincleの病態生理的意義の検討:

Mincle欠損マウスに腎虚血再灌流モデルを作製したところ、野生型マウスと比較して血中BUN、クレアチニンの上昇が軽度にとまった(図1)。マクロファージマーカーF4/80 mRNAレベルはgenotype間で差を認めなかったが、interleukin-6、MCP-1 mRNAはMincle欠損マウスにおいて上昇が軽度にとまっていた(図2)。骨髄移植法により作製した骨髄細胞特異的

Mincle欠損マウスにおいても、同様の表現型が認められ(図3)、腎虚血再灌流障害に伴ってMincle陽性骨髄由来細胞が腎局所に浸潤し、腎障害の病態形成に関与すると考えられた。

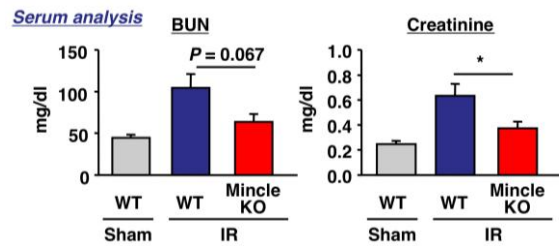


図1. 腎虚血再灌流障害におけるMincleの意義(腎機能) * $P < 0.05$, $n = 6$

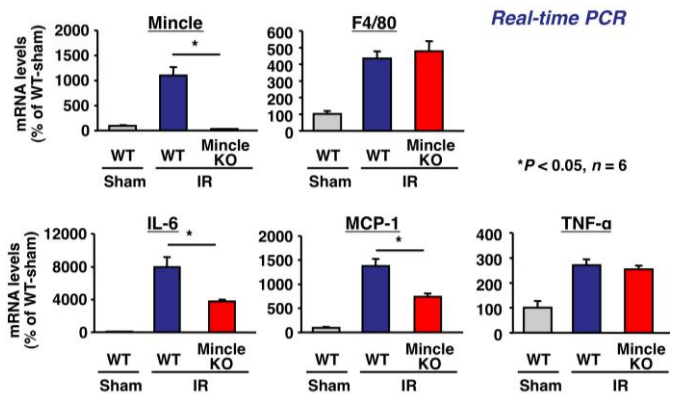


図2. 腎虚血再灌流障害におけるMincleの意義(遺伝子発現)

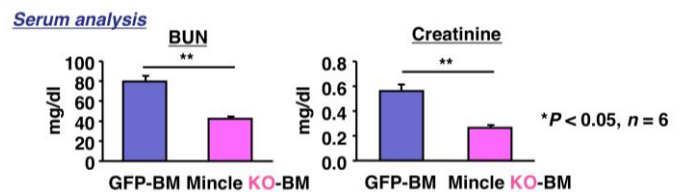


図3. 腎虚血再灌流障害におけるMincleの意義(腎機能、骨髄特異的Mincle欠損マウス)

(2)Mincle発現細胞に関する検討:

腎障害惹起後6時間よりMincle発現の顕著な上昇が認められ、3日目まで持続した(図4)。骨髄移植法により作製した骨髄細胞特異的Mincle欠損マウスでは、腎障害に伴うMincleの発現上昇が全く認められなかった。組織学的に、マクロファージの一部にMincle発現細胞が認められた(図5)。フローサイトメーターを用いた解析により、炎症促進性マクロファージ(F4/80(lo))にMincleの高発現を認めた。骨髄由来マクロファージをIFN- γ やIL-4を用いてM1、M2マクロファージに分化誘導し、Mincle発現を検討したところ、MincleはM1マクロファージ選択的に発現が認められた(図6)。以上より、腎障害に伴って浸潤する炎症促進性マクロファージにMincleが発現すると考えられた。

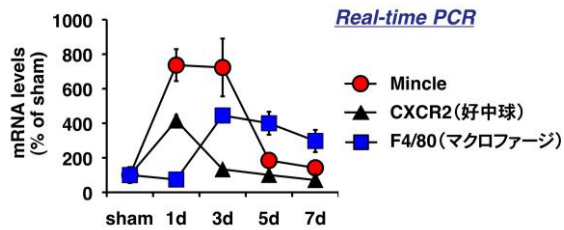


図4. 腎虚血再灌流障害におけるMincle発現の経時変化

青; Mincle *in situ* hybridization
 茶; Iba1 (マクロファージマーカー) 免疫染色

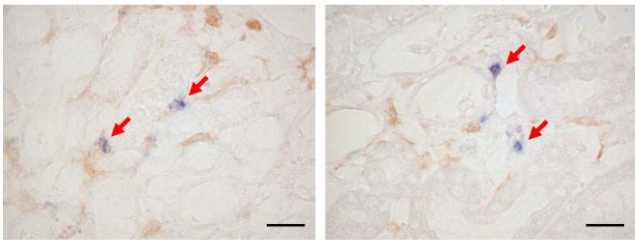


図5. 虚血再灌流障害腎におけるMincle発現細胞 scale bars, 25 μm

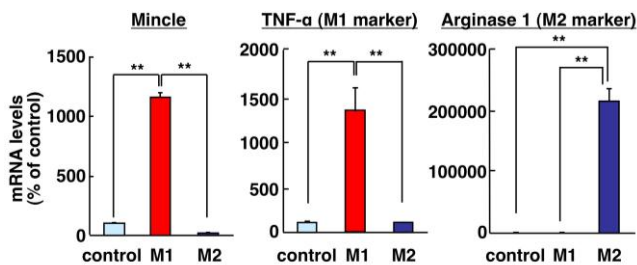


図6. M1, M2マクロファージにおけるMincle発現 **P < 0.01, n = 4

(3) 尿細管上皮細胞とマクロファージの相互作用の検討:

尿細管上皮細胞株 mProx24 とマクロファージ (マクロファージ細胞株 RAW264、腹腔内マクロファージ) を共培養したところ、interleukin-6, MCP-1 など種々の炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現が上昇し、尿細管上皮細胞とマクロファージの細胞間相互作用が示唆された。

(4) 腎代謝変化の網羅的解析: 対照 sham 群、虚血再灌流 6 時間および 24 時間における代謝産物の変化を質量顕微鏡法により検討した。リン脂質を中心に多彩な代謝産物を同定し、腎内の部位特異的に存在することを確認した。対照腎と比較して虚血再灌流障害では、その発現量や局在がダイナミックに変化することを見出した。皮質から髓質を経て腎門部に至る線上において、リン脂質の変化を経時的に比較したところ、5 つのクラスターに分類できた (図 7)。このうち、皮髓境界で発現量が大きく変化するものに注目したところ、数種類のフォスファチジルコリンを同定した (図 8)。

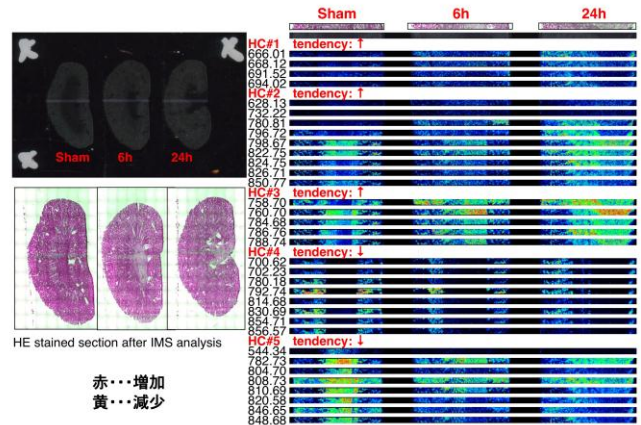


図7. 腎虚血再灌流障害における質量顕微鏡分析の結果

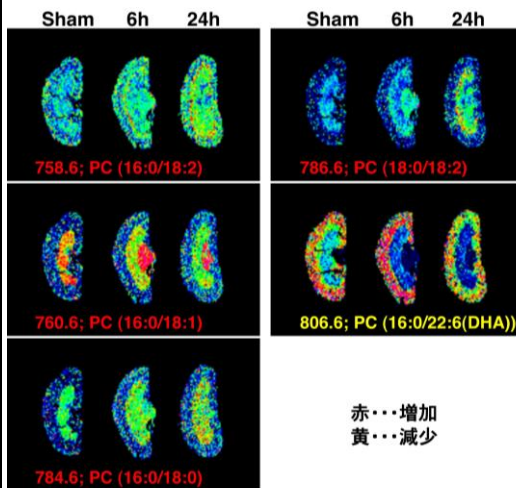


図8. 腎虚血再灌流障害部位において増減するリン脂質

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 2 件)

1. T. Suganami, M. Tanaka, Y. Ogawa. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. **Endocr. J.** 59: 849-857, 2012.
2. M. Ichioka, T. Suganami, N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, N. Satoh-Asahara, Y. Shimoda, M. Tanaka, M. Kim-Saijo, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, Y. Ogawa. Increased expression of macrophage-inducibile C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. **Diabetes** 60: 819-826, 2011. 10.2337/db10-0864

[学会発表] (計 2 件)

1. 萱波孝祥、田中 都、越智 梢、白川伊吹、池田賢司、小宮 力、小川佳宏; 腎虚血再灌流障害における新規病原体センサー Mincle の

- 意義、第56回日本腎臓学会、2013年5月10日～2013年5月12日、東京
2. 菅波孝祥、小川佳宏;病原体センサーと慢性炎症、第32回日本肥満学会、2011年9月23日～2011年9月24日、淡路

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/prm/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅波 孝祥(SUGANAMI TAKAYOSHI)

(東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授)

研究者番号:50343752

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

瀬藤 光利(浜松医科大学分子イメージング先端研究センター・教授)

研究者番号:20302664

山崎 晶(九州大学生体防御医学研究所・教授)

研究者番号:40312946