

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460464

研究課題名(和文) 多重染色FACSを用いた腎組織病理診断に替わる糸球体腎炎の診断・病態解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of polychromatic FACS analysis for diagnosis of glomerulonephritis instead of pathology

研究代表者

岩堀 徹 (Iwahori, Toru)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00366105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糸球体腎炎の発症進展は、自己免疫寛容の破綻と、樹状細胞(DC)、T細胞、マクロファージ(M ϕ)を初めとする各種免疫担当細胞やサイトカインネットワークによる細胞性免疫や液性免疫の増強が関与する。我々は、臨床におけるANCA関連血管炎や各種糸球体腎炎疾患症例の末梢血単核球の多重染色フローサイトメトリー法を用いた解析から循環免疫担当細胞ネットワークの特徴を明らかにした。また治療のための摘出扁桃腺内の免疫担当細胞や免疫環境と比較検討し、各種糸球体疾患における免疫応答の特徴を明らかにする基礎を構築した。

研究成果の概要(英文)：Progression of glomerulonephritis is associated of cellular- and humoral-immunological enhancement due to cytokine network including dendritic cell, T cell, macropahage and so on and also break of autoimmunne system. We have distinguished the network of immunne system in blood by analysis of polychromatic flow cytometry. We also established a basic analysis system for analyzing of association of blood and tonsil.

研究分野：免疫学

キーワード：多重染色フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

糸球体腎炎の発症進展は、自己免疫寛容の破綻と、樹状細胞(DC)、T細胞、マクロファージ(Mφ)を初めとする各種免疫担当細胞やサイトカインネットワークによる細胞性免疫や液性免疫の増強が関与している。私たちは、臨床における ANCA 関連血管炎や各種腎疾患症例の循環免疫担当細胞ネットワークの特徴を末梢血単核球の多重染色フローサイトメトリー法 (polychromatic flow cytometry ; PFC) を用いて検討している。腎疾患症例の末梢血の炎症細胞、腎生検検体や治療のための摘出扁桃を用いて免疫担当細胞や免疫環境を検討し、各種腎疾患における全身や炎症局所での免疫応答の特徴を解析している。

2. 研究の目的

この研究により、ANCA 関連血管炎をはじめとする各種腎疾患の末梢血を用いた病態解析や炎症活動性の評価、さらには治療効果判定法を構築し、最終目標として侵襲性の腎生検に替わる腎疾患の病態や活動性評価法の確立と、免疫ネットワーク制御による各種腎疾患の治療法の開発を目指している。

3. 研究の方法

PFC は、細胞を複数種類の蛍光色素で標識しフローサイトメトリー法 (flow cytometry) で多種類のマーカーを同時に検出する方法である。それぞれの蛍光色調がダブらないように補正することが重要で、この光学補正をすることで複数種類のマーカーを正確に同時に認識することを可能にしている。この多重染色法を用いたマルチカラー解析を行えば、一つの細胞に対して多くの情報を同時に得ることができ、細胞の情報が格段に向上する。一般的に 5 種類以上の多重染色後にフローサイトメトリー法で解析する技術を総称して PFC と呼んでいる。近年、FACS 装置 (FACS は fluorescence activated cell sorting の略であり、現在ではフローサイトメーター全般のことを指し、パラメータの解析機器 アナライザーと、分取機能を備えた機器 セルソーターを含む) の発達と光学補正技術の進歩によりその精度も格段に向上している。また、免疫学において、近年、多くの細胞種が発見される中でその検出に複数マーカーの必要性も高まっている。多数の抗体を

異なる蛍光色素で染色した場合に検出器への光漏れこみ現象が問題となっていたが、光学補正法によりその問題は克服されている。

近年、フローサイトメトリー法を用いて、複数染色により CD4 陽性 CD25 陽性 FoxP3 陽性の免疫制御性 T 細胞 (Treg)、CD45RO と CD62L を用いた各種メモリー細胞やナイーブ細胞、CD68 陽性 CD40 陽性 Mφ、HLA-DR 陽性 BDCA2 陽性 CD123 陽性形質細胞様樹状細胞 (pDC) などが相次いで発見された。最近では、この手法を用いた腎疾患の病態解析の報告もみられるようになった。Turner らは Treg の腎局所からの消失が腎炎増悪に関与し、Lee らは IgA 腎症に CD45RO 陽性細胞群が重要であることを報告した。Wilson らは腎障害に Mφ が関与し、Marco らは IV 型のループス腎炎では末梢血中から pDC が減少する一方で、腎糸球体に集積して病変形成に関与することを報告した。しかし、どの報告も各免疫担当細胞群のネットワークに関しての解析はなされていない。筆者は、Stanford University FACS facility, Stanford, USA にて PFC 法を習得、Stanford Blood Center Flowcytometry Lab にて 3 レーザー計 10 色検出可能な PFC を構築し、正確な免疫担当細胞の同定と高純度ソーティング法を確立している。私たちは PFC 確立の経験やこれまでの報告をもとに、ANCA 関連血管炎を含め各種腎疾患での免疫担当細胞群の動態を明らかにするために PFC を用いて解析を進めている。

4. 研究成果

免疫はネットワークを構築しているため、免疫ネットワークの特徴の解明が疾患の本質の解明に重要である。私たちは、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) やスタチンが糸球体腎炎の糸球体内で炎症細胞数を減少させるばかりではなく、炎症局所で組織傷害性の M1 Mφ から抗炎症性の M2 Mφ に変化させ糸球体腎炎を抑制していることを明らかにした。炎症環境により浸潤炎症細胞の性格は絶えず変化している。臨床での糸球体疾患の病態、活動性、治療反応における免疫応答の変化を検討するためには、経時的に複数回の解析が必要である。PFC は 1mL 程度の末梢血で解析を行うことができ、経時的な複数回の多種類の免疫

担当細胞ネットワークの解析が可能である。末梢血の免疫担当細胞の PFC による経時的な評価は、腎生検診断の強力な補助診断になるばかりではなく、ゆくゆくは組織診断に匹敵する詳細な評価を可能にし、腎生検を行わずに各種系球体疾患の病態や活動性を評価できる強力な診断法に発展させる必要がある。ソーティングにより分取した疾患に特異な免疫担当細胞群の *in vitro* での検討は、*in vivo* での直接制御法や *in vitro* での細胞教育後の細胞移入療法の開発につながり、さらには、免疫細胞群の選択的治療による疾患制御に応用が可能で、多様な治療戦略の構築に役立つと考えている。

私たちは、2 レーザー 6 色検出可能な BD FACS Canto を用いて ANCA 関連血管炎や各種系球体疾患の PFC を行っている。抗体カクテルは DC カクテル、Naïve/Memory/Treg/iNKT カクテル、M ϕ カクテル、骨髄由来抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cells: MDSC) カクテルの 4 種類を作成している。これまでの検討で、同一採血サンプルからナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞、Treg、iNKT、各種 M ϕ (M1、M2a、M2b、M2c)、DC、MDSC の検出を行い、これら多免疫細胞群の動態を検討し、疾患による特徴やそれぞれの疾患活動性による変化の検討を進めている。

3. ANCA 関連血管炎における免疫ネットワーク異常

ANCA 関連血管炎は T 細胞異常が原因であるとの報告もあるが、単一の原因でその病態が説明できるものではないことは明らかである。私たちは末梢血を用いて健常者と ANCA 関連血管炎症例の免疫担当細胞群の変化を PFC で解析している。

ANCA 関連血管炎の活動期では、Lineage⁻ HLA-DR⁻ CD123⁺ BDCA2⁺ の形質細胞様 DC (pDC) が減少していた。健常者 pDC の 66.7% が CD45RO⁻CD62L⁻ のエフェクタータイプ、22.2% が CD45RO⁺CD62L⁻ のエフェクターメモリータイプ、11.1% が CD45RO⁻CD62L⁺ のナイーブタイプであったものが、ANCA 関連血管炎症例では 100% が CD45RO⁺CD62L⁺ のセントラルメモリータイプであった。また ANCA 関連血管炎症例では CD4⁺ヘルパー T 細胞総数が減少するも、CD25⁺CD127^{low/-} の Treg は増加していた。CD4 陽性細胞中ナイーブ T 細胞は減少し、エフェクターメモリー T 細胞は増加、さらに、CD14⁻CCR7⁺ の M1 M ϕ と CCR7⁻CD150⁺ の M2c M ϕ が減少していたが、CD163⁺CD206⁺ の M2a M ϕ に変化はみられなかった。

ANCA 関連血管炎においては pDC は減少し、構成はメモリー型に偏っていた。メモリー型 pDC についての報告はこれまでにないが、リンパ球系の機能を持つ pDC のメモリー型が集積していることは ANCA 関連血管炎の病態に関連していると考えている。その一方で Treg は増加していたが、これは反応性に抑制系の Treg が増加していると思われる。また炎症性と抑制性の M ϕ は共に減少していたが、作働型の免疫細胞が枯渇しておりメモリータイプの細胞の比率が上昇していることを考えると、メモリータイプ細胞の細胞移植が ANCA 関連血管炎に有効である可能性が示されている。ANCA 関連血管炎の免疫応答本態を明らかにするために症例のさらなる蓄積が重要である。

4. IgA 腎症、ならびに扁桃腺摘出 (扁桃摘) 治療前後における免疫担当細胞の変動

ANCA 関連血管炎に限らず糸球体腎炎の発症進展は、自己免疫寛容の破綻と各種免疫担当細胞やサイトカインネットワークの異常が関与していると思われる。IgA 腎症において扁桃摘出ステロイドパルス療法が行われおり、その有効性が報告されている。しかし、扁桃摘出の適応や効果は未だ十分に議論されておらず、扁桃摘出による免疫抑制効果の機序の詳細も明らかにされていない。IgA 腎症の活動性や扁桃摘出による免疫ネットワークの変化について、末梢血における多種免疫細胞の動態から解析している。

IgA 腎症例の PFC 解析では Lineage⁻HLA-DR⁺CD123⁺BDCA2⁺ の pDC が増加し、CD62L⁻のナイーブ型がやや多い傾向、CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}の Treg は両方で差がみられないが、CD3⁺6B11⁺の iNKT は多く、CD14⁺CCR7⁺の M1 Mφ や CD163⁺CD206⁺ の M2a Mφ も増加、CD105⁺CCR7⁻の M2c Mφ は減少傾向にあった。扁桃摘出後では、CD4T 細胞の総数は有意差を認めないが、Treg と pDC は減少傾向、iNKT は増加していた。これらの細胞においてナイーブ型とメモリー型の差は認められなかった。扁桃摘出後では M1 Mφ は低下、M2c Mφ は増加、CD150⁺CCR7⁺ Mφ は減少した。MDSC は扁桃摘出後で変化は認めなかった。IgA 腎症においては、Treg、pDC と iNKT が多く、免疫制御機構破綻に関与していると考えている。扁桃摘出後に炎症性 M1 Mφ は減少し、抗炎症性 M2c Mφ は増加している。IgA 腎症の発症や扁桃摘出による免疫抑制効果に、Mφ のバランス異常が関係していることが示唆された。検出されている CD150⁺CCR7⁺ Mφ や MDSC の役割については不明であり、今後のデータの集積が必要であると考えている。

5. 摘出された扁桃の免疫担当細胞

免疫担当細胞バランス異常への扁桃摘出の影響を確認するために扁桃摘出 PFC を行っている。末梢血に比べて扁桃では、単位細胞数あたりの pDC、CD4T 細胞総数、CD8T 細胞総数、Treg は増加し、iNKT、MDSC は減少していた。M1 Mφ と CD150⁺CCR7⁺ Mφ は扁桃で増加していた。扁桃細胞での免疫細胞構成は末梢血と違いがみられ、扁桃摘出によってその構成が変動した可能性がある。特に Treg や pDC は扁桃で多く、扁桃摘出後に末梢血で減少していることから扁桃に集簇したこれらの細胞群が除去された可能性がある。臨床での扁桃摘出の治療効果機序の解明のために治療目的で得られた扁桃の PFC による解析を行いながら、今後症例数を増やし臨床経過との関連をさらに検討する必要がある。末梢血という全身の免疫ネットワークと、腎や扁桃という局所での免疫応答を比較検討し、糸球体疾患の病態、活動性、治療反応との関係を明らかにすることが重要だと考えている。

おわりに

PFC により末梢血における循環免疫担当細胞群の動態を観察することで、糸球体疾患における全身の免疫系の解析が可能になった。腎生検からの腎臓局所での免疫応答ばかりではなく、PFC による全身の免疫ネットワークの動態と糸球体疾患の病態、活動性や治療反応との関係を明らかにし、腎疾患を腎臓局所と全身の免疫系の双方から評価することが重要である。PFC で同定された免疫担当細胞群の、糸球体疾患の病態や治療反応による変化の特徴を明らかにし、腎生検に加えて行う強力な補助診断として、さらには腎生検などの侵襲を伴う検査に替わる非侵襲性で、繰り返し行うこと

ができる有用な検査法として、今後、実際の臨床診断に活用できるように構築していくことが重要である。

研究者番号：

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 1 件)

岩堀 徹、アレルギーの臨床、2016 年 36 巻 5 月号、p48-55

多重染色フローサイトメトリー法を用いた ANCA 関連血管炎、糸球体腎炎における末梢血免疫細胞解析

〔学会発表〕(計 1 件)

池田まり子、多重染色フローサイトメトリー法を用いた、糸球体腎炎の腎生検時における末梢血免疫細胞解析、日本腎臓学会、2015.6.5、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩堀 徹 (IWAHORI, Toru)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00366105

(2)研究分担者

清水 章 (SHIMIZU, Akira)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00256942

(3)連携研究者

()