

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25460656
研究課題名(和文)腎線維化病変に浸潤するマクロファージの機能解析

研究課題名(英文)Role of macrophage in renal fibrosis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：進行性腎障害の予後規定因子である腎線維化の病変形成に浸潤マクロファージは重要な役割を果たしているが、浸潤マクロファージの活性化調節機構は未だ不明な点が多い。本研究は腎線維化病変に浸潤するマクロファージの低酸素誘導因子-1 (HIF-1)の役割について検討した。マクロファージのHIF-1は腎臓の線維化を抑制する方向に働くことがわかったがマクロファージを含め腎全体のHIF-1を抑制すると線維化に対する効果は消失した。これらの結果から、腎線維化病変に存在するHIF-1は細胞種により線維化に対する態度が異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Monocyte/macrophages play an important role in the pathogenesis of renal fibrosis that is a main determinant that leads to irreversible loss of renal function in chronic kidney disease. However, precise mechanisms by which the activities of infiltrating macrophages are controlled remain to be established. Present study was performed to clarify the role of macrophage hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in renal fibrosis. We found that macrophage HIF-1 suppresses renal fibrosis but these effects were abolished when renal HIF-1 was totally ablated. These results indicate that roles of HIF-1 in renal fibrosis were different among cells within the kidney.

研究分野：薬効安全性学

キーワード：腎線維化 マクロファージ 低酸素

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病において炎症は尿細管間質における細胞障害と線維化を結びつける重要な機序であり、とりわけマクロファージは炎症のプロセスを媒介する主要な浸潤免疫細胞である。私共は liposome clodronate 投与や樹状細胞、単球系細胞を選択的に除去できる遺伝子改変マウスを用いた検討から循環血由来の樹状細胞以外の単球/マクロファージがこの線維化に重要であることを明らかにしてきた。病変局所に浸潤したマクロファージの機能や表現型炎症局所の微小環境により変化する。炎症局所は低酸素環境に晒されていることから、低酸素がマクロファージ機能に影響している可能性が示唆されてきた。低酸素誘導因子 HIF は低酸素で活性化する転写因子で低酸素環境に対する細胞の適応に重要な役割を果たすことが知られているが、腎線維化病変におけるマクロファージ HIF の役割は明かではない。

2. 研究の目的

腎間質線維化におけるマクロファージ HIF-1 の役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損マウスを用いた検討

LysM-Cre HIF-1 α flox/flox マウスを用いマクロファージ特異的に HIF-1 α の遺伝子破壊を行い、マウス一側尿管閉塞モデルを用いて腎線維化におけるマクロファージ HIF-1 α の関与を対照の Cre(-) HIF-1 α flox/flox 野生型マウスと比較検討した。

(2) 全身性誘導性 HIF-1 α 欠損マウスを用いた検討

HIF-1 α 欠損マウスは胚性致死であるため、ubc-Cre-ERT2 HIF-1 α flox/flox マウスを用いタモキシフェン投与により時期特異的に全身の HIF-1 α 欠損を誘導し、腎臓全体の HIF-1 α の腎線維化における役割を対照の Cre(-)HIF-1 α flox/flox 野生型マウスと比較検討した。

4. 研究成果

(1) マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損マウスを用いた検討

マクロファージ HIF-1 α の除去効率

マウスの骨髓液を採取し骨髓由来マクロファージを培養し、低酸素下で培養したところ、野生型マウスでは HIF-1 α 蛋白は約 6 倍に増加したが、マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損マウスでは誘導されなかった。また腎線維化部位より調製したマクロファージにおける HIF-1 α 遺伝子発現もマクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損マウスで約 60%の抑制が認められたことから、今回用いたマウスで HIF-1 α の蛋白および遺伝子発現がマクロファージにおいて効果的に抑制されることが示された。

腎間質線維化におけるマクロファージ HIF-1 の役割

腎臓の線維化の程度をコラーゲン III の免疫染色で検討した。尿管閉塞によりコラーゲン III の陽性面積は著しく増加したが、マクロファージ HIF-1 α 欠損によりさらに増強された(図1)。同様に腎組織におけるコラーゲン I、コラーゲン III の遺伝子発現は尿管閉塞で著しく亢進したが、マクロファージ HIF-1 α 欠損により、これらの細胞外基質の発現は増強された(図2)。以上の事からマクロファージの HIF-1 α 欠損により腎線維化が増強されることが明らかとなった。

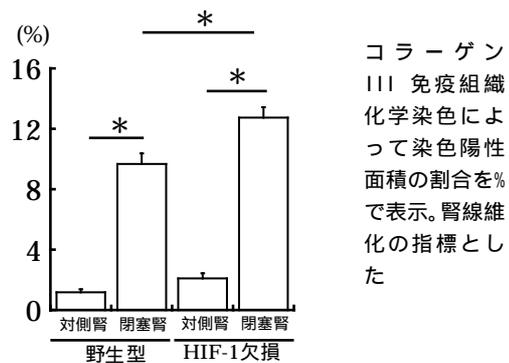


図1. マクロファージ HIF-1 α 欠損の腎線維化に対する影響(尿管閉塞7日目)

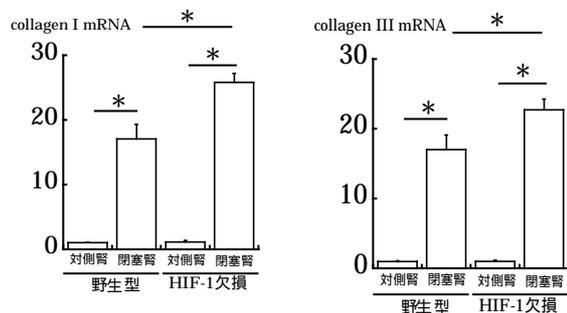


図2. 尿管閉塞に伴う細胞外基質遺伝子発現の亢進に対するマクロファージ HIF-1 α 欠損の影響(尿管閉塞7日目)

マクロファージ HIF-1 α 欠損による腎線維化増強に関与する機序の探索

次に腎組織へ浸潤するマクロファージ数の増加がマクロファージの HIF-1 α 欠損による腎線維化の増強効果に関与しているのかを検討する目的でマクロファージの浸潤度を F4/80 免疫染色で検討したが、尿管閉塞でマクロファージの浸潤は増加するもののマクロファージの HIF-1 α 欠損と野生型に差は認められなかった。従って浸潤マクロファージの増加が HIF-1 α 欠損による腎線維化の増強に関与する可能性はないと考えられた。マクロファージは表現形の異なる組織障害性の M1 マクロファージと組織修復性の M2 マクロファージが存在することが知られている。そこで、腎線維化組織から単離細胞を調製しマクロファージ表面マーカーである CD11b 磁気ビーズを用い、マクロファージを採取、M1、M2 マーカー遺伝子の発現を比較検討したが HIF-1 α 欠損マクロファージの遺伝子発現は

野生型と差を認めなかった。またフローサイトメトリーを用いて F4/80 と CD11b の発現の違いからも同様に M1、M2 マクロファージの割合に差がないか検討したが両群間に差を認めなかった。以上の結果より今回認められた HIF-1 α 欠損に伴う腎線維化の増強効果は M1、M2 マクロファージの量的変動では説明できないものと考えられた。慢性腎障害における尿細管障害や尿細管細胞のアポトーシスは線維化の程度と相関することが知られている。そこでマクロファージ HIF-1 α 欠損の尿細管障害に対する影響を PAS 染色した腎組織標本でスコア化し検討したが両群に差を認めなかった(図3)。従ってマクロファージによる尿細管障害の程度の差が今回認められた腎線維化病変の増強を説明出来ないと考えられた。

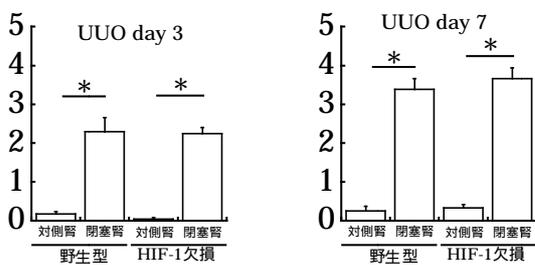


図3. マクロファージ HIF-1 α 欠損の尿細管障害に対する影響
次に腎組織における線維化関連分子の遺伝子発現に対するマクロファージ HIF-1 α 欠損の影響について検討した(図4)。

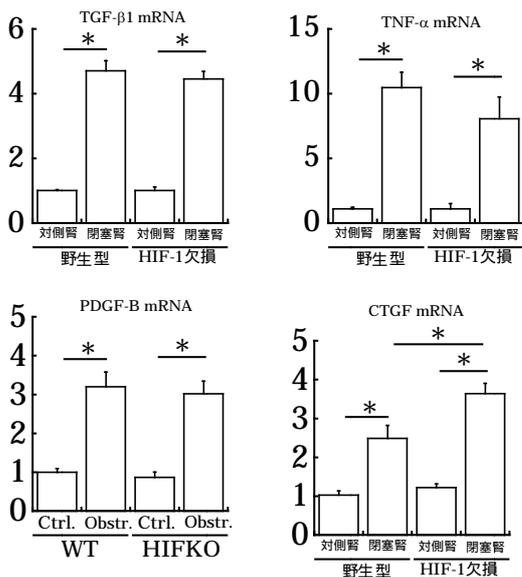


図4. マクロファージ HIF-1 α 欠損の腎線維化関連分子遺伝子発現に対する影響(7日目) 線維化促進サイトカインである TGF- β 1、PDGF-B の遺伝子発現は尿管閉塞で増加したがマクロファージ HIF-1 α 欠損によって影響を受けなかった。同様に TNF- α の遺伝子発現も尿管閉塞によって増加したが HIF-1 α 欠

損により影響を受けなかった。一方、connective tissue growth factor (CTGF)の遺伝子発現は尿管閉塞で増加し、HIF-1 α 欠損によりさらには発現の亢進が認められた。そこで CTGF の蛋白発現を腎組織より抽出した蛋白を用いウェスタンブロットで検討したところ、遺伝子発現と同様、マクロファージ HIF-1 α 欠損により CTGF 蛋白の明らかな増加が認められた(図5)。

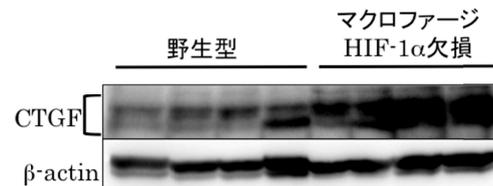


図5. マクロファージ HIF-1 α 欠損の腎組織 CTGF 蛋白発現に対する影響

以上の結果からマクロファージ HIF-1 α 欠損に伴う腎線維化の増強機序に CTGF の発現亢進が関与している可能性が示された。次に CTGF の発現亢進に関わる細胞を明らかにするため、HIF-1 α 欠損マウスより調製した単離腎細胞を CD11b 磁気ビーズにてマクロファージを含む骨髓系細胞とそれ以外の腎臓の細胞に分離し CTGF の遺伝子発現量を比較した(図6)。その結果、CTGF は主にマクロファージ以外の細胞で産生されていることが明らかとなった。

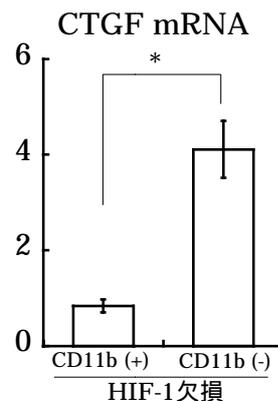


図6. マクロファージ HIF-1 α 欠損マウスの閉塞腎における CTGF 遺伝子発現部位

以上の結果からマクロファージの HIF-1 α 欠損により腎線維化が亢進することから、マクロファージの HIF-1 α は腎線維化に抑制的に働いていること、その機序の一つとしてマクロファージ以外の腎細胞における CTGF 発現の変化が関与している可能性が示唆された。

(2) 全身性誘導性 HIF-1 α 欠損マウスを用いた検討

今回の検討では一側尿管閉塞マウスにおける腎線維化に対しマクロファージ HIF-1 は保護的に働くことが明らかとなったが、一方 Higgins ら(J Clin Invest 117, 3810-20,

2007)は近位尿細管特異的に HIF-1 α 欠損させた実験において尿細管 HIF-1 がマクロファージの浸潤を増強し腎線維化促進に働くと報告している。そこで何れの作用が重要か、また腎臓全体で HIF-1 を抑制すると腎線維化に対してどのような影響が認められるのか明らかにする目的で全ての細胞でタモキシフェン依存性に Cre recombinase を発現する hif-1lox/lox マウスを用いて、全身性に HIF-1 α を欠失させた。図7に腎組織における HIF-1 α 遺伝子発現を示す。

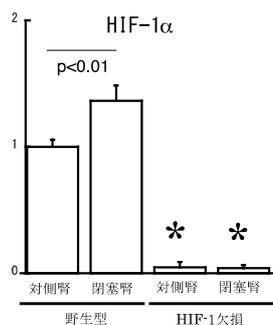


図7. 全身性HIF-1 α 欠損マウスの腎におけるHIF-1 α 遺伝子発現の抑制

野生型では閉塞腎で軽度 HIF-1 α 遺伝子発現が増加するのに対し、全身性 HIF-1 α 欠損マウスでは閉塞腎、対側腎ともに HIF-1 α 遺伝子発現はほぼ完全に抑制されたことから、このモデルを用いることで腎臓全体の HIF-1 の腎線維化に対する意義を明らかにすることが可能である。そこで腎線維化とマクロファージ浸潤に対する HIF-1 α 遺伝子欠損の影響を検討した(図8)。

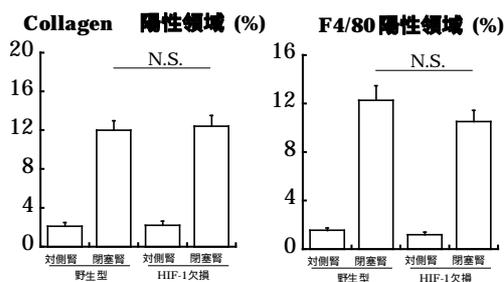


図8. 全身性HIF-1 α 欠損マウスの腎におけるHIF-1 α 遺伝子発現の抑制

コラーゲン III の陽性面積で示される腎線維化は HIF-1 α の発現をほぼ完全に抑制した条件でも同程度であった。また閉塞腎に見られるマクロファージの浸潤も HIF-1 α の抑制で影響を受けなかった。従って今回用いた腎線維化モデルではマクロファージの HIF-1 は腎線維化抑制的に働くものの、おそらく他の腎細胞の HIF-1 は逆に線維化促進的に働きトータルとしては腎臓の HIF-1 の線維化に対する影響がないことが明らかとなった。近年 HIF を標的とした治療の臨床開発が進められている中で、今回得られた情報は腎臓の HIF-1 の意義に関する貴重な情報を提供するもの

と考えられる。今後は腎線維化における HIF-2 の意義について明らかにする必要がある。また、今回の研究では HIF-1 を欠損させる実験系であったが HIF の活性化の腎線維化に及ぼす効果についても検討する必要があると思われる。

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1件)

Y. Tateishi, M. Osada-Oka, M. Tanaka, M. Shiota, Y. Izumi, E. Ishimura, K. Motoyama, M. Inaba, K. Miura, Myeloid HIF-1 attenuates the progression of renal fibrosis in murine obstructive nephropathy, J Pharmacol Sci, 査読有り 127 (2015) 181-189.
doi:10.1016/j.jphs.2014.12.011.

[学会発表](計4件)

立石悠、石村栄治、稲葉雅章、三浦克之 腎線維化における単球/マクロファージの HIF-1 の役割 第56回日本腎臓学会学術総会 2013年5月10日 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
立石悠、岡真優子、三浦克之 単球/マクロファージ HIF-1 の腎線維化における役割 第一回低酸素研究会 2013年7月6日 早稲田大学 先端生命医科学センター (東京都新宿区)
立石悠、岡真優子、塩田正之、泉康雄、三浦克之 単球/マクロファージ HIF-1 の腎線維化における役割 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19日 仙台国際センター (宮城県仙台市)
三浦克之、立石悠、壁井和也、田中昌子、塩田正之、富田修平 腎線維化における HIF-1 の役割 第129回日本薬理学会近畿部会 2016年6月24日 広島医師会館 (広島県広島市)

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)連携研究者

岡 真優子 (OKA, MAYUKO)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 40347498