

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461618

研究課題名(和文) M2型マクロファージを介した慢性腎疾患(CKD)進展機序の解明と制御法の確立

研究課題名(英文) Studies on the role of M2 type-activated macrophage in the progression of chronic kidney diseases (CKD).

研究代表者

池住 洋平 (Ikezumi, Yohei)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70361897

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)：慢性腎疾患の進展機序における抗炎症型活性化マクロファージ(M2)の機能およびその制御法について、腎生検標本を用いた免疫組織学的手法およびヒト単球由来マクロファージを用いたin vitro実験系を用いて検討した。

その結果、M2は腎病変の局所において抗炎症作用を発揮する一方で、腎組織の慢性病変の形成に関与する可能性を見出した。さらに、腎疾患治療で汎用されるステロイド薬はM2作用を増強するが、慢性病変の進行を助長する可能性があり、CKD治療におけるM2制御には、ステロイドによるM2活性化の抑制効果を有する代謝拮抗薬等の免疫抑制薬の併用が有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The role of alternatively activated macrophages (M2) in progression of chronic kidney disease was examined by immunohistological staining of biopsy specimen and in vitro studies using human monocyte-derived macrophage.

We found that M2 exerted an anti-inflammatory effect at the site of inflamed-tissue, while playing a role in the progression of chronic lesions. In addition, we found that steroid, a widely used drug in the treatment of kidney diseases, could augment the chronic lesion. Combined treatment with antimetabolite could counteract the steroid-induced M2 activation, and might be useful for the treatment of CKD.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：M2型活性化マクロファージ 慢性腎臓病 尿細管間質線維化 糸球体硬化

1. 研究開始当初の背景

わが国では学校腎臓検診制度が定着しているのにも関わらず、毎年3万以上の末期腎不全患者が新規に透析導入され、透析患者数はすでに30万人を越えなお増加傾向にある。これは、成人以降に発症がみられる糖尿病性腎症の増加により、学校検診の成果が十分に発揮されていないこと、さらに、慢性糸球体腎炎の治療法が確立していないことから、学校検診によって早期発見された症例も成人へとキャリアオーバーすることが最大の原因と考えられる。

個々の慢性腎疾患 (Chronic kidney disease: CKD) の発症機序は糖尿病や、感染症を含む免疫学的機序など様々であるが、CKD 進展過程および終末像としてみられる糸球体硬化、間質線維化は、炎症性・非炎症性を問わず全ての腎疾患にみられる共通病理所見である。さらに、我々は全ての CKD 進展過程みられるもう一つの普遍的な現象であるマクロファージ (Mφ) 浸潤に注目し、慢性糸球体腎炎の発症・進展過程における Mφ の役割について検討を続けてきた。特に活性化 Mφ は、その活性化様式として炎症性 (M1) と抗炎症性または組織修復型 (M2) の 2 系統が存在することが知られ、M1(CD86⁺CD163⁻Mφ) は糸球体の管内増殖性病変や細胞性半月体などの急性活動性病変の形成に関与し、M2(CD163⁺または CD206⁺ Mφ) は糸球体基質の増生や間質線維化などの慢性病変の形成に関与することを見出し報告した。さらに、M2 は臨床的に用いられるステロイド薬によってむしろ活性化されることが知られ、動物実験からステロイド薬を使用するタイミングによりある種の腎炎は M2 を介した慢性病変をむしろ増悪する可能性を見出してきた。

これら研究結果をもとに考察すれば、全ての CKD の終末像である糸球体硬化、間質線維化の形成に関与する M2 型活性化 Mφ の制御法を確立することが CKD の進行を防ぐ治療戦略上、重要な課題と言える。

臨床的には、多くの CKD の治療に免疫抑制薬やアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) などの降圧薬が腎保護作用を有するという観点から使用され、小児領域においても保存期腎不全の治療として用いられている。これらの薬剤は降圧薬でありながら、CKD における腎組織の線維化抑制作用を有することが報告されている。また、我々は、高コレステロールを伴うステロイド抵抗性ネフローゼ症候群では LDL 受容体 (LDL-SR: CD36, CD204) 陽性 M2 浸潤が有意に多く、これら M2 が ACE を含む線維化促進因子を産生し、治療への抵抗性に寄与している可能性を見出している。すなわち、臨床で汎用される ACE 阻害薬や ARB の一つのターゲットが、活性化 M2 の産生する ACE である可能性が示唆されるが、これら薬剤の作用機序に関する詳細は不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記背景を基に、CKD 進展過程における M2 型活性化 Mφ にターゲットを絞り、その機能および活性化機構を明らかにするとともに、制御法について in vitro 実験系を用いて解明を試みるものである。

3. 研究の方法

(1) ヒト腎生検組織を用いた検討

CKD 対象疾患として、IgA 腎症、ループス腎炎、シロアリの長期投与下にある小児特発性ネフローゼ症候群の腎生検標本を用いて、炎症細胞群に発現する各種特異マーカーに対する抗体を用いた免疫組織染色を主とした手法で解析を行った。

汎 Mφ マーカー (CD68)、M1 マーカー (CD11c, CD86)、M2 マーカー (CD163, CD204, CD36)、T リンパ球 (CD3) に対する特異抗体、および抗 I 型コラーゲン、抗 α-smooth muscle actin (αSMA) を組織線維化マーカーとして用い、二重染色法を含む免疫組織染色を行い、Mφ 浸潤像と組織病変、局在、臨床像との関連を解析し、ステロイド投与下、免疫抑制薬投与下、高脂血症下での M2 浸潤の臨床的意義 (慢性病変形成への関与、治療抵抗化への関与) を検討した。

(2) in vitro 解析

上記の病理組織および臨床解析にて得られた情報に基づき、ステロイド薬、LDL コレステロール他、各種サイトカインを加えた培地でヒト単球由来 Mφ (HuMφ) を培養し、発現するサイトカイン群を DNA マイクロアレイ法、RT-リアルタイム PCR 法にて網羅的に解析した。

このうち、特に組織線維化に関与する因子およびマイクロアレイ解析により上位に抽出された高発現分子については、腎生検組織での染色を試み、ヒト CKD での実際の発現を確認するとともに、その病的意義を考察した。

4. 研究成果

(1) 腎生検標本を用いた解析

IgA 腎症における Mφ 浸潤

腎生検にて中等症以上の IgA 腎症と診断され、2 年間のステロイド治療により蛋白尿が消失し、再腎生検にて組織学的にも改善を得た 73 例について解析を行った。この内、治療薬の漸減または中止により再燃がみられた症例が 11 例みられ、臨床データ、腎生検組織中における Mφ 浸潤像について、再燃例と非再燃例 62 例との違いを比較検討した。

その結果、初回 (診断時) 腎生検時には Mφ 浸潤像および病理所見 (急性活動性病変、慢性病変の程度) に有意な違いは認められなかった。一方、治療開始 2 年後に行った再生検時の病理所見では、全系球体に占める硬化糸球体数 (3.6 vs 8.1%, $p < 0.05$) および尿細管間質線維化の程度 (18.3 vs 21.6%, $p < 0.05$) と再燃群で有意に慢性病変の進行が認められた。また、再生検時の糸球体の CD163⁺ M2

型活性化 M ϕ 数 (0.25 vs 0.54/糸球体切片, $P < 0.001$) および尿管間質の M2 (8.6 vs 11.8/強視野, $P < 0.001$) と有意に再燃群における M2 浸潤が多かった。さらに、再燃群、非再燃群を合わせたホトの解析において、糸球体基質の増生 (糸球体切片に占める基質の割合) および間質線維化の程度と、それぞれ糸球体および間質の M2 数との間に有意な相関を認められた (図 1)。

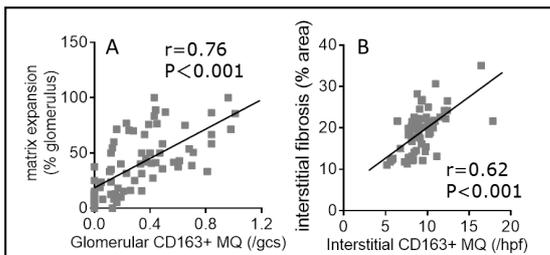


図 1 IgA 腎症における糸球体硬化(A)と尿管間質線維化(B)と CD163⁺M2 型活性化 M 数との相関

以上の結果から、IgA 腎症において、活性化 M2 は腎組織障害の特に慢性病変の進展に関与している可能性が示唆された。また、近年、診断時腎生検の病理組織分類により、予後評価が行なわれるが、今回の検討では、再燃群と非再燃群の間で初回腎生検時の組織像には有意な違いが認められず、むしろ治療 2 年後の組織において M ϕ 浸潤像を含む組織学的相違が認められた。このことから、特に学校検尿制度を有するわが国の小児 IgA 腎症の重症度分類は、診断時の組織学的評価よりも、治療後の組織像を含む治療への反応性の評価が、その後の臨床的な予後を推測する上で有用と考えられた。

ループ腎炎における M ϕ 浸潤

新潟大学医歯学総合病院小児科および腎臓内科で診療を受けている SLE 患者 43 例について、ステロイド治療に先行して腎生検を施行した 24 例(男:女=2:12、腎生検時平均年齢 20.0 歳)およびステロイド治療開始後に腎生検を施行した症例 19 例(男:女=2:17、平均年齢 20.2 歳)に分け、病理所見および M ϕ 、T リンパ球浸潤像を比較検討した。

その結果、ステロイド先行群では CD163⁺M2 型活性化 M ϕ の糸球体浸潤が 18.9 ± 5.4 vs 13.7 ± 3.7 /糸球体切片, $P < 0.01$ と有意に多く、CD3⁺T リンパ球が 10.1 ± 3.5 vs 17.1 ± 3.5 /糸球体切片, $P < 0.05$ と有意に少なかった。また、病理所見ではステロイド先行群で活動性病変である管内細胞増殖が有意に少なく (19.3 ± 20.0 vs 35.0 ± 25.6 , $P < 0.05$)、慢性病変である糸球体基質の増生 (20.3 ± 4.8 vs 15.2 ± 2.6 , $P < 0.001$)、硬化病変 (8.2 ± 14.5 vs 1.3 ± 4.2 , $P < 0.001$) および尿管間質線維化 (20.8 ± 8.5 vs 15.5 ± 5.7 , $P < 0.05$) が有意に多かった。

また、IgA 腎症での検討と同様にステロイド先行群、非投与群を合わせたホトでの解析では、糸球体または間質における CD163⁺M2 細胞数は、それぞれ糸球体基質増生の程度および

間質線維化の程度と有意な相関が認められた (図 2)。

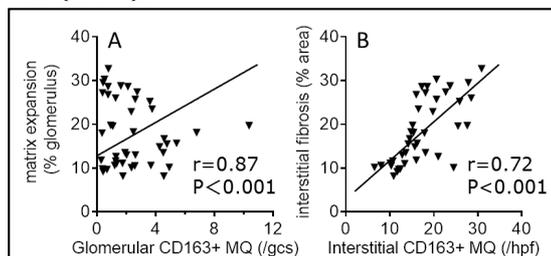


図 2 ループ腎炎における糸球体基質の増生(A)と間質線維化(B)と CD163⁺M2 型活性化 M 数との相関

(2) in vitro 実験系による解析

ステロイド、LDL コレステロールによる M ϕ 活性化
正常ヒト末梢血由来単球を、AB 型正常ヒト血清を 20% 添加した培地で 8 日間培養を行い分化させた M ϕ (HuM ϕ)を用い、各種検討を行った。

デキサメタゾン(Dex)の刺激により CD163 発現が増強し、M2 型活性化が誘導されることを、以前に行った実験からすでに見出していたが、今回は無治療群、Dex 刺激群に加え、難治性腎炎や難治性初老症候群における病態を考慮し、高度蛋白尿下やステロイド投与によって生じる高脂血症を合併している状態を想定した Dex/酸化 LDL(oxLDL)共刺激群を作成し、無治療群と比較して発現する mRNA をマイクロアレイ法にて網羅的に抽出した。

その結果、Dex の単独刺激により発現が増加する分子として CD163 の他、分泌型分子として、gastrokine 1、gliomedin、interleukin 28B、thrombin、stabilin 1 などが、この順に発現の増強が認められた。また、線維化に関わる因子としては、Transforming growth factor- β (TGF β)、Connective tissue growth factor (CTGF)、ACE の発現増加を認めた。一方、Dex や ox-LDL それぞれ単独では発現の増強は認められないが、Dex/ox-LDL の共存下で発現が増強する因子として fibroblast growth factor 1 (FGF1)、angiotensinogen、leptin、FGF2 などが抽出された (図 3)。

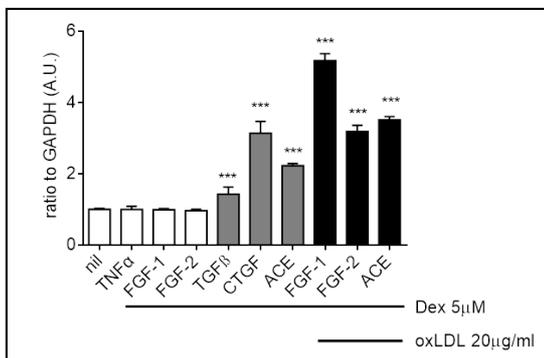


図 3 Dex または Dex/ox-LDL 刺激による HuM のサイトカイン産生。*** $P < 0.001$ (無刺激 nil との比較)

代謝拮抗薬による M2 活性化抑制

上述の HuM ϕ の in vitro 系を用い、Dex 刺激による M2 活性化に対するミズリピン(Miz)

およびミコファン酸メチル(MMF)など代謝拮抗薬の抑制作用を検討した。

その結果、これらの代謝拮抗薬は Dex 刺激による HuMφ からの ACE 産生作用を用量依存性に抑制した (図 4)。

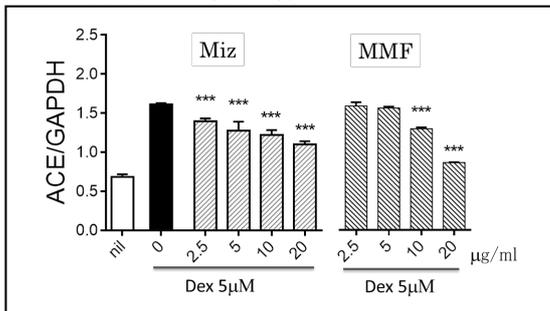


図 4 ミズリボン(Miz)、ミコファン酸メチル(MMF)による M2 活性化抑制作用。*** P < 0.001 (Dex 単独刺激時との比較)

(3) ヒト腎生検組織におけるサイトカイン発現の確認

In vitro 実験系で得られた結果を検証する目的で、実験 2 で抽出されたいくつかの発現上位のサイトカインについて、ヒト腎生検組織における発現を特異抗体による免疫染色にて検討した。

その結果、ループ腎炎のステロイド治療先行群において、CD163+Mφ による stabilin-1 の発現を認めた。また、ステロイド治療に抵抗性を示す難治性初発患者の腎生検組織において、間質線維化部に相当して FGF1 の発現がみられ、Mφ 浸潤との局在が一致していた。

以上の結果から、ループ腎炎では無治療の段階では M1 型炎症性 Mφ の関与により組織障害をもたらされるが、汎用されるステロイド薬は腎組織における M1 型活性化 Mφ を M2 へと転換する作用を有することが示唆された。さらに、今回同定された stabilin-1 は、Th1 型 T 細胞の活性化抑制作用を有することが知られ、ループ腎炎におけるステロイド作用機序の一環として、糸球体 M1 型活性化 Mφ の M2 への転換とともに Th1 活性化抑制因子 (stabilin-1) 発現増強による、T リンパ球抑制が関与していることが示された。

また、ステロイド治療に抵抗性を示す難治性腎疾患では、ステロイド投与量の増加と、高度蛋白尿とともに高脂血症を呈している場合が多く、今回の検討結果から、このような高用量ステロイド使用下における高脂血症環境下では、腎組織に浸潤する Mφ の M2 活性を助長し、線維化促進因子の発現を介した慢性病変形成の増悪をもたらす可能性が示唆され、ステロイド抵抗性をさらに助長する悪循環の形成が、難治化機序の一環を担っていることが示された。このようなステロイド依存性の病態においては、治療薬としてステロイド薬は無効であり、M2 活性化抑制作用を有する代謝拮抗薬の併用が有用と考えられた。

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 13 件)

Ikezumi Y, Uemura O, Nagai T, Ishikura K, Ito S, Hataya H, Fujita N, Akioka Y, Kaneko T, Iijima K, Honda M. Beta-2 microglobulin-based equation for estimating glomerular filtration rates in Japanese children and adolescents. Clin Exp Nephrol 19: 450-457, 2015 (査読有)

Ikezumi Y, Suzuki T, Yamada T, Hasegawa H, Kaneko U, Hara M, Yanagihara T, Nikolic-Paterson DJ, Saitoh A. Alternatively activated macrophages in the pathogenesis of chronic kidney allograft injury. Pediatr Nephrol 30: 1007-1017, 2015 (査読有)

山田剛史, 池住洋平, 長谷川博也, 金子昌弘, 星名 哲, 齋藤昭彦. 腹膜透析を導入し在宅管理に移行し得た, 左心低形成症候群を合併した低形成腎の 1 例. 日本小児腎不全学会雑誌 35: 150-152, 2015 (査読有)

Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Kaneko U, Yamada T, Hasegawa H, Nagata M, Saitoh A. Glomerular epithelial cell phenotype in diffuse mesangial sclerosis: A report of two cases with markedly increased urinary podocyte excretion. Human Pathol 45: 1778-1783, 2014 (査読有)

山田剛史, 池住洋平, 鈴木俊明, 長谷川博也, 齋藤昭彦. 腹膜透析患者 3 例における 24 時間持続血糖モニタリング. 日本小児腎不全学会雑誌 34: 148-450, 2014 (査読有)

長谷川博也, 池住洋平, 鈴木俊明, 金子詩子, 山田剛史, 齋藤昭彦. 心電図異常で発見され、低カリウム血症による失神が疑われた腎血管性高血圧の一例. 日本小児高血圧研究会誌 11: 21-25, 2014 (査読無)

山田剛史, 池住洋平, 鈴木俊明, 長谷川博也, 齋藤昭彦. 肉眼的血尿を契機に発見された ossifying renal tumor of infancy の男児例. 日本小児腎臓病学会誌 27:25-29, 2014 (査読有)

Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Yamada T, Hasegawa H, Nishimura H, Uchiyama M. Low birthweight and premature birth are risk factors for podocytopenia and focal segmental glomerulosclerosis. Am J Nephrol 38:149-157, 2013 (査読有)

Yata N, Uemura O, Honda M, Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, Nagai T, Ikezumi Y, Fujita N, Ito S, Iijima K, Saito M, Keneko T, Kitagawa

T. Reference ranges for serum cystatin C measurements in Japanese children by using 4 automated assays. Clin Exp Nephrol 17:872-876, 2013 (査読有)

Ikezumi Y, Honda M, Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, Yata N, Nagai T, Fujita N, Ito S, Iijima K, Kaneko T, Uemura O. Establishment of a normal reference value for serum β_2 microglobulin in Japanese children: reevaluation of its clinical usefulness. Clin Exp Nephrol 17: 99-105, 2013 (査読有)

馬場恵史, 林 雅子, 大野 武, 星名 潤, 齋藤なか, 吉田 宏, 伊藤末志, 長谷川博也, 山田剛史, 唐澤 環, 金子詩子, 鈴木俊明, 池住洋平, 齋藤昭彦. 腎静脈レニンサンプリングにより診断された Ask-Upmark 症候群の一例. 小児高血圧研究会誌 10:27-31, 2013 (査読無)

伊藤由美, 河野恵美子, 吉田一浩, 今井直史, 山崎裕幸, 中川由紀, 齋藤和英, 唐澤 環, 鈴木俊明, 池住洋平, 齋藤昭彦, 高橋公太, 成田一衛. 抗体関連型拒絶反応の克服に向けて C4d 陽性の抗体関連型拒絶反応の 1 例. 今日の移植 26:188-194, 2013 (査読無)

羽深理恵, 鈴木俊明, 長谷川博也, 唐澤環, 金子詩子, 池住洋平, 大橋 伯, 赤坂紀幸, 遠山 潤, 西尾久英, 齋藤昭彦. 劇症肝不全を発症した脊髄性筋委縮症の 1 例. 日本小児科学会雑誌 117: 1031-1036, 2013 (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

Ikezumi Y. Alternatively activated CD163+ macrophages are a common feature in progressive interstitial fibrosis. 2015 Annual Meeting of American Society of Nephrology. San Diego, CA, USA, 2015 年 11 月 14 日

池住洋平. 尿細管間質線維化に関わる腎疾患特異的 M2 マクロファージの同定と機能解析. 第 50 回日本小児腎臓病学会学術集会, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市) 2015 年 6 月 19 日

池住洋平. 尿細管間質線維化に関わる腎疾患特異的 M2 マクロファージの機能解析. 第 58 回日本腎臓学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市) 2015 年 6 月 6 日

Ikezumi Y. Pro-inflammatory CD11c+CD68+ mononuclear phagocytes promote glomerular injury in lupus nephritis. 2014 Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 2014 年 11 月 15 日

池住洋平. 小児ループス腎炎における M1、M2 型マクロファージの対照的な機

能の検討. 第 57 回日本腎臓学会総会. パシフィコ横浜会議センター (神奈川県・横浜市) 2014 年 7 月 5 日

池住洋平. ループス腎炎の組織障害における M1、M2 型活性化マクロファージの対照的機能に関する検討. 第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会. 秋田ビューホテル (秋田県・秋田市) 2014 年 6 月 6 日

Ikezumi Y. Contrasting roles for M1 and M2 type macrophages in childhood IgA nephropathy. 2013 Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, GA, USA, 2013 年 11 月 8 日

池住洋平. マクロファージをターゲットとした慢性糸球体腎炎の治療戦略. 第 28 回新潟腎シンポジウム, 新潟大学医学部有壬記念館 (新潟県・新潟市) 2013 年 8 月 23 日

池住洋平. 「腎疾患ガイドライン: 専門的利用法と今後の課題」. CKD 診療ガイドライン 2013: 小児 CKD の診断. 第 48 回日本小児腎臓病学会学術集会, あわぎんホール (徳島県・徳島市) 2013 年 6 月 29 日

池住洋平. The kidney in multi-organ systemic disease in Japanese children: 低出生体重児におけるネフロン形成異常と腎疾患. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区) 2013 年 5 月 11 日

Ikezumi Y. Mechanism of nephritis: Macrophage as a therapeutic target for childhood chronic glomerulonephritis. In: Continuous Professional Development: Current Issues in Pediatric Nephrology. The 11th Korea-Japan Pediatric Nephrology Seminar, Seoul, Korea, 2013 年 4 月 7 日

〔図書〕(計 8 件)

池住洋平. 腎性高血圧. 今日の小児治療指針. (水口 雅, 市橋 光, 崎山 弘総編集). 医学書院, 東京: 606-608, 2015 (1006 頁)

池住洋平. 腎性高血圧. 腎・泌尿器科疾患. 小児疾患診療のための病態生理. (小児内科・小児外科編集委員会共編), 東京医学社, 東京: 小児内科 47 増刊号 634-639, 2015 (1072 頁)

池住洋平, 他. 小児慢性腎臓患者への予防接種. 日本小児感染症学会 編. 小児の臓器移植および免疫不全状態における予防接種ガイドライン 2014. 協和企画: 東京:70-76, 2014 (127 頁)

池住洋平. 腎実質性高血圧・腎血管性高血圧. 小児の治療指針. 小児科診療 77 巻増刊号, 診断と治療社, 東京: 716-718,

2014 (1041 頁)

池住洋平. 小児の急性腎炎症候群. 今日の治療指針 2014(福井次矢, 高木 誠, 小室一成 総編集). 医学書院, 東京: 1275-1276, 2014 (2014 頁)

池住洋平, 貝藤裕史, 近藤秀治. 小児CKDの診断. 日本腎臓学会 編. エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2013 .163-167 ,東京:東京医学社, 2013 (259 頁)

池住洋平, 田中征治. 一般療法: 予防接種・感染予防. 日本小児腎臓病学会 編. 小児特発性ネフローゼ症候群診療ガイドライン 2013 . 70-75 ,東京:診断と治療社, 2013 (80 頁)

池住洋平. 薬物中毒. 小児急性血液浄化療法ハンドブック (伊藤秀一, 和田尚弘 編集). 東京医学社, 東京: 196-203 , 2013 (239 頁)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

池住 洋平 (Ikezumi Yohei)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 70361897

(2)研究分担者

河内 裕 (Kawachi Hiroshi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 60242400

鈴木 俊明 (Suzuki Toshiaki)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 50419305

(3)連携研究者

成田 一衛 (Narita Ichiei)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 20272817