

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461615

研究課題名(和文)急性・慢性腎障害の発症・進展過程におけるDAMPsの役割とその制御システムの検討

研究課題名(英文)The control and the role of DAMPs in acute and chronic renal injury

研究代表者

川崎 幸彦 (KAWASAKI, Yukihiro)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00305369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性・進行性腎障害の発症・進展過程におけるDAMPsの制御機構を検討するため、HUSモデルマウス作製時にDAMPs抑制因子であるトロンボモジュリン(rhTM)とプラセボ薬を投与し腎機能や腎組織像の変化、サイトカインや凝固機能の変化を比較した。

rhTM群は全匹生存し腎機能や腎組織障害度の軽症化がみられ、投与後24時間後の血清HMGB1、IL-6、IL-1、TNF- α や血清MCP-1濃度、血清C5-9濃度、FDP濃度が有意に低値であった。これらの結果は、DAMPs抑制因子であるrhTMが、今後、HUSも含めた急性腎障害の病態を制御しうる有効な薬剤になり得る可能性を示唆する所見である。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin (rhTM) for the treatment of typical hemolytic uremic syndrome(t-HUS), we examined changes in renal damage in t-HUS mice treated with rhTM or vehicle alone. We used severe and moderate t-HUS mice injected with shiga toxin(Stx) and lipopolysaccharide(LPS). The severe t-HUS mice were divided into two subgroups [an rhTM subgroup(Group A) and a saline subgroup(Group B)] along with the moderate t-HUS mice [an rhTM subgroup(Group C) and a saline subgroup(Group D)]. Groups E and F were healthy animals mice treated with rhTM or saline, respectively. All mice in Group A remained alive. Serum creatinine level, and endothelial injury scores in the t-HUS mice treated with rhTM were lower than those in t-HUS mice treated with saline. Serum IL-6, TNF- α , and FDP levels at 24 hours after administration in Group A were lower than those in Group B. These results indicate that rhTM might afford an efficacious treatment for t-HUS.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：Acute renal injury DAMPs HUS rhTM

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内で梗塞や壊死などにより大量の細胞死が起こると、細胞死や細胞損傷によりダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) が放出され、これが免疫細胞の受容体に認識され炎症反応が惹起されるという概念が知られている。DAMPsを代表する分子群には High-mobility group box1(HMGB1)やS100蛋白質があり、DAMPs受容体と結合することで獲得免疫が活性化される。

HMGB1は、DNA結合蛋白でありReceptor for advanced glycation end products(RAGE)に作用して自然免疫、止血、侵襲局所の修復を誘導し敗血症やDICなどの病態と深く関与している。また、単球や好中球から放出されるS100A8,A9(myeloid related protein)は炎症に関連するS100蛋白質で、それぞれDAMPs受容体と結合することで、炎症増悪に関連し、炎症性腸疾患や関節リウマチ、川崎病などの疾患活動性と相関性がみられる。

(2) 一方、進行性腎障害は、将来末期腎不全に移行するハイリスク因子であり、速やかに腎障害を改善し、炎症進展を阻止することが腎機能低下の予防に重要である。腎障害による細胞死によっても、DAMPsの放出と受容体結合による炎症進展経路があるものと推測される。しかしながら、現在まで腎障害に関するDAMPsの報告は非常に少なく、病態への関連性やその役割は依然不明のままであり、その制御法も確立していない。

2. 研究の目的

今回、私達は、急性・進行性腎障害の発症、進展過程における DAMPs の役割と制御機構を検討するために各種急性腎障害動物モデルやヒトの腎障害時における腎障害後の経時的 HMGB1 と S100A8,A9 蛋白である MRP8,14 などの DAMPs の血中濃度と腎組織中の発現や局在を検索し、炎症進展や修復・再生過程における関連性を検討した。さらに、これらの動物モデルに DAMPs 抑制因子であるトロンボモジュリン (rhTM) を投与した場合の腎機能や腎組織所見について検討する。

3. 研究の方法

1) 6週齢の C57BL/6 マウスに LPS(100, 300 μ g/kg) と Stx2(225ng/kg) を腹腔内に投与することでそれぞれ軽症型 HUS マウスと重症型 HUS マウスを作製し経時的な組織病変の推移を解析した。また、投与後 3, 6, 12, 24, 48 時間, 1, 2, 4 週間に経時的にと殺を行い、血液を採取して、HMGB1、各種サイトカインやケモカイン濃度、VEGF とアンジオポエチン 1 濃度を測定し腎組織障害度との関連性を検討した。

2) 軽症型・重症型 HUS マウスと正常マウスに LPS と Stx2 投与前 6 時間、投与時、投与 6 時間後に rhTM あるいはプラセボを 3 回腹腔内投与し、その後の体重変化や生存率を

検討した。(A 群: rhTM 投与重症 HUS マウス、B 群: プラセボ投与重症 HUS マウス、C 群: rhTM 投与軽症 HUS マウス、D 群: プラセボ投与軽症 HUS マウス、E 群: rhTM 投与正常 HUS マウス、F 群: プラセボ投与正常 HUS マウス)。マウスは投与後 24, 72 時間, 1, 2 週間にと殺、その経時的腎機能や腎組織像の変化、サイトカインプロファイリング (Luminex analysis) に加え、補体活性や凝固機能の変化について比較した。

3) 微小変化、IgA 腎症、紫斑病性腎炎、巣状分節性糸球体硬化症、急性腎炎でネフローゼ症候群を呈した患者の血清 S100A8,9 (MRP8,14) 蛋白濃度と腎組織上の発現度を比較した。

4. 研究成果

1) 重症型 HUS マウスモデル群において内皮細胞障害とメサンギオリーシスが LPS+Stx2 投与後 3 時間から 72 時間をピークにみられた。血清 HMGB1 濃度は 3 時間後ですでにピーク濃度に達し、12 時間後には前値に復した。GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-5、IL-6、IL-12、IL-13、MCP-1、TNF- α は 6 時間後にピークを認め、その後、減少した。また、抗炎症性サイトカインである IL-10 は 3-24 時間にかけて上昇傾向がみられた。軽症型 HUS マウスモデル群では、回復期において VEGF とアンジオポエチン 1 濃度が上昇し、組織内発現が強く出現した。重症型 HUS マウスモデル群において発症早期に HMGB1 が出現し、その後、経時的に炎症性、抗炎症性サイトカインが誘導されていた。さらに、腎障害からの回復期には VEGF とアンジオポエチン 1 などの血管新生因子の関与が示唆された。

2) B 群マウスは、全匹 LPS と Stx2 投与 72-84 時間内に死亡し、S-Cr の上昇と腎組織において高度な内皮細胞障害とメサンギオリーシスと赤血球や血漿のうっ滞がみられた。A 群は全匹生存、死亡例はなく、体重減少も軽度であり S-Cr は有意な低値を示した。腎組織の検討では、プラセボ投与群でみられた高度な内皮細胞障害やメサンギオリーシスの程度は軽度から中等度の障害度であった。また、軽症 HUS マウス群で C 群 D 群を比較すると、C 群にて体重減少もより軽度で、S-Cr の低下も少なく、投与後 6 時間後の破碎赤血球数の数は D 群と比較して少なく、血小板数やヘモグロビン値は有意に高値を呈した。腎組織の検討でも、内皮細胞障害やメサンギオリーシスの程度は軽微であった。これらの結果から、rhTM は軽症、重症どちらの HUS マウスモデルにおいても HUS の病態を明らかに改善することが示された。サイトカインプロファイリングによると A 群マウスにおいては、投与後 24 時間後の血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α などの炎症性サイトカインや血清 MCP-1 濃度、血清

C₅₋₉ (膜侵襲複合体濃度、membrane attack complex, MAC)、FDP濃度がB群マウスと比較して有意に低値を呈した。RhTMは、炎症性サイトカインやケモカイン、補体の活性化状態や血液凝固亢進状態の改善を介してHUSマウスモデルの発症病態を改善するものと考えられた。すなわち、rhTM投与はHUSモデルマウスにおいてその生存率を高め、腎機能障害や腎病変を軽症化することが明らかになり、ヒトHUSの制御の可能性が示唆された。

3) 各群間において血清蛋白、アルブミン濃度や尿素窒素値および一日蛋白尿量に差はなかった。血清MRP8/14濃度(ng/ml)は2群患者において1群患者やコントロール群と比較して有意に高値であった(2851±3532 vs 296±165, p<0.05, 2851±3532 vs 211±52, p<0.05)。さらに、1群患児、IgA腎症患児群、紫斑病性腎炎患児群、FSGS患者群、急性腎炎群における血清MRP8/14濃度(ng/ml)は、それぞれ294±130, 1993±1847, 2211±859, 1526±1087, and 8112であった。糸球体内MRP8陽性スコアは1群患児、IgA腎症患児群、紫斑病性腎炎患児群、FSGS患者群、急性腎炎群においてそれぞれ0.0±0.1, 1.2±0.6, 2.0±0.4, 0.4±0.3, 1.4であった。また、間質内MRP8陽性スコアは1群患児、IgA腎症患児群、紫斑病性腎炎患児群、FSGS患者群、急性腎炎群においてそれぞれ0.1±0.1, 1.1±0.3, 1.0±0.3, 0.7±0.2, 0.5であった。2群患者における糸球体内MRP8陽性スコアは1群患者と比較して有意に高値であった。

これらの実験によりHUSマウスモデルにおいてHMGB1などのDAMPsの発現とその後の炎症性、抗炎症性サイトカイン誘導との関連性が明らかになり、さらに腎障害回復期における血管新生因子の関連性が示された。また、これらHUSマウスモデルにDAMPs抑制因子であるrhTMを投与することでHUS病変の著明な改善が得られ、重症例においても全例生存が可能であった。これらの機序としてrhTMによる活性化プロテインCを介した抗凝固作用による微小血栓の形成抑制による急性腎不全への進展予防作用や赤血球の破壊を抑制することで溶血性貧血の改善、rhTMによる抗炎症作用、抗サイトカイン作用による血小板凝集の抑制、LPSやHMGB1の直接的な吸着作用、補体の活性化抑制などが挙げられた。

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14件)

1. KAWASAKI Y, Maeda R, Kanno S, Suzuki Y, Ohara S, Suyama K, Hosoya M, Long-term follow up of pediatric immunoglobulin A

nephropathy treated with tonsillectomy plus methylprednisolone pulse therapy, *Pediatr.Int.*, 査読有, 2017, 59, 41-47. DOI: 10.1111/ped.13074.

2. Kobayashi S, Kawasaki Y, Sano H, Mochizuki K, Hosoya M, Kikuta A, Long-term remission of HSCT-related NS after a second allogenic stem cell transplant, *Pediatr.Nephrol.*, 査読有, 2016, 31, 679-682. DOI: 10.1007/s00467-015-3254-8.

3. Kawasaki Y, Kanno S, Ono A, Suzuki Y, Ohara S, Sato M, Suyama K, Hashimoto K, Hosoya M, Differences in clinical findings, pathology, and outcomes between C3 glomerulonephritis and MPGN, *Pediatr. Nephrol.*, 査読有, 2016, 31, 1091-1099. DOI: 10.1007/s00467-015-3307-z.

4. Ohara S, Kawasaki Y, Maeda R, Kanno S, Suzuki Y, Suyama K, Hosoya M, Serum myeloid-related protein 8/14 level in minimal change- and glomerulonephritis-related nephrotic syndrome, *Pediatr.Int.*, 査読有, 2016, 58, 998-1002. DOI: 10.1111/ped.12947.

5. Sakai N, Kawasaki Y, Waragai T, Oikawa T, Kaneko M, Sato T, Suyama K, Hosoya M, Successful therapy with tonsillectomy plus pulse therapy for the relapse of pediatric IgA nephropathy treated with multi-drugs combination therapy, *Fukushima J.Med.Sci.*, 査読有, 2016, 62, 68-73. DOI: 10.5387/fms.2016-3.

6. Suyama K, Kawasaki Y, Miyazaki K, Kanno S, Ono A, Suzuki Y, Ohara S, Hosoya M, Rituximab and low-dose cyclosporine combination therapy for steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis, *Pediatr.Int.*, 査読有, 2016, 58, 219-223. DOI: 10.1111/ped.12804.

7. Hattori M, Iwano M, Sako M, Honda M, Okada H, Akioka Y, Ashida A, Kawasaki Y, Kiyomoto H, Terada Y, Hirano D, Fujieda M, Fujimoto S, Masaki T, Maruyama S, Mastuo S, Transition of adolescent and young adult patients with childhood-onset chronic kidney disease from pediatric to adult renal services: a nationwide survey in Japan, *Clin.Exp.Nephrol.*, 査読有, 2016, 20, 918-925. <https://www.jasn.or.jp/journal/>

8. Kawasaki Y, Ohara S, Miyazaki K, Kanno S, Ono A, Suyama K, Sato M, Suzuki S, Maeda R, Nagasawa K, Hosoya M, Incidence and prognosis of Systemic

- Lupus Erythematosus over a 35-year period in Fukushima, Japan, *Pediatr. Int.*, 査読有, 2015, 57, 650-655. DOI: 10.1111/ped.12588.
9. Suyama K, Kawasaki Y, Miyazaki K, Kanno S, Ono A, Ohara S, Sato M, Hosoya M, The efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin for the treatment of shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome model mice, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 査読有, 2015, 30, 969-977. DOI: 10.1093/ndt/gfv004.
 10. Kawasaki Y, Suyama K, Miyazaki K, Kanno S, Ono A, Suzuki Y, Sato M, Hashimoto K, Hosoya M, Resistance factors for the treatment of immunoglobulin A nephropathy with diffuse mesangial proliferation, *Nephrology(Carlton)*, 査読有, 2014, 19, 384-391. DOI: 10.1111/nep.12232.
 11. Kawasaki Y, Isome M, Ono A, Suzuki Y, Takano K, Suyama K, Hosoya M, Two children with obesity-related glomerulopathy identified in a school urinary screening program, *Pediatr. Int.*, 査読有, 2014, 56, 115-118. DOI: 10.1111/ped.12213.
 12. Kawasaki Y, Suyama K, Maeda R, Yugeta E, Takano K, Suzuki S, Sakuma H, Nemoto K, Sato T, Nagasawa K, Hosoya M, Incidence and index of severity of hemolytic uremic syndrome in a 26 year period in Fukushima Prefecture, Japan, *Pediatr. int.*, 査読有, 2014, 56, 77-82. DOI: 10.1111/ped.12193.
 13. Ono A, Kawasaki Y, Kanno S, Ohara S, Sakai N, Suyama K, Hosoya M, A case of a child with SLE presenting with HPS as a primary manifestation, *Fukushima J. Med.*, 査読有, 2014, 60, 181-186. DOI: 10.5387/fms.2013-24.
 14. Sekine H, Kawasaki Y, Ohara S, Suyama K, Hosoya M, Focal bacterial nephritis without pyuria in a boy presenting with high urinary β 2-MG and NAG levels, *Fukushima J. Med.*, 査読有, 2014, 60(1), 91-94. <http://www.fmu.ac.jp/home/lib/F-igaku/kikanshi.html>.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 8件)

1. 川崎幸彦, *Thrombosis Medicine*, HUSの発症機序と動物モデル, 先端医学社, 2014, 47-51. 5ページ
2. 川崎幸彦, *Thrombosis Medicine*, 補体制御異常症と微小循環血栓, 先端医学社, 2014, 63-68. 6ページ

3. 川崎幸彦, 周産期感染症2014, 新生児の尿路感染症, 東京医学社, 2014, 587-591. 5ページ
4. 川崎幸彦, 日本臨床 免疫症候群(第2版) 小児期発症全身性エリテマトーデス, 日本臨床社, 2015, 843-847. 5ページ
5. 川崎幸彦, 小児疾患診療のための病態生理2, IgA腎症、増殖性糸球体腎炎, 東京医学社, 2015, 520-525. 6ページ
6. 川崎幸彦, 今日の治療指針 - 私はこう治療している - 小児の急性腎炎症候群, 医学書院, 2016, 1436-1437. 2ページ
7. 川崎幸彦, 腎と透析 診療指針2016 IgA腎症の治療(小児), 東京医学社, 2016, 245-249. 5ページ
8. 川崎幸彦, 今日の治療指針 - 私はこう治療している - 小児のヘノッホ・シェーンライン紫斑(IgA血管炎), 医学書院, 2017, 1377-1379. 3ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

川崎 幸彦(KAWASAKI, Yukihiro)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00305369

(2)研究分担者

細矢 光亮(HOSOYA, Mitsuaki)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80192318

橋本 浩一(HASHIMOTO, Kouichi)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50322342

陶山 和秀(SUYAMA, Kazuhide)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90423798

大原信一郎(OHARA, Shinichiro)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00566846

鈴木 順造(SUZUKI, Junzo)
福島県立医科大学・看護学部・教授
研究者番号: 20171217