

厚生科学研究研究費補助金

特定疾患対策研究事業

白血球浸潤を標的とした進行性腎障害の進展抑制に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 名取泰博

平成 13 (2001) 年 3 月

## 目次

I. 総括研究報告書	
白血球浸潤を標的と進行性腎障害の進展抑制に関する研究 . . . . .	1
主任研究者 名取泰博	
II. 分担研究報告書	
1. 動物モデル及び臨床における白血球浸潤とケモカインに関する研究 . . . . .	7
主任研究者 名取泰博	
2. 腎実質上皮細胞のmacrophage化に関する研究 . . . . .	11
分担研究者 堀田修	
3. 糸球体腎炎の組織における白血球浸潤と長期予後に関する研究 . . . . .	14
分担研究者 齋藤喬雄	
4. 腎臓への白血球浸潤におけるケモカインの役割 . . . . .	18
分担研究者 今井俊夫	
III. 研究結果の刊行に関する一覧表 . . . . .	25

白血球浸潤を標的とした進行性腎障害の進展抑制に関する研究

主任研究者 名取 泰博 国立国際医療センター 臨床薬理部長

研究要旨

IgA 腎症や糖尿病性腎症など多くの腎疾患において、間質繊維化に伴う肥満細胞の増加が報告されているが、腎病変の進展における役割は不明である。そこで動物モデルを用いて、間質及び糸球体の病変の進展における肥満細胞の役割を検討した結果、肥満細胞は間質の繊維化には促進的ではなくかえって抑制的に作用することを明らかにし、さらに2種の糸球体腎炎動物モデルの病初期においてはヒトでは全く報告の無い糸球体への肥満細胞浸潤が観察されることを示した。また種々の進行性腎障害の進展速度が巨大化マクロファージ（脂肪球）の出現と相関することを示すとともに、尿中巨大化マクロファージを簡便に測定するために尿中微量コレステロール測定系の系を開発し、この値が種々の腎症の進展と良く相関することから新規診断法としての有用性を示唆した。さらに腎炎ばかりでなく糖尿病性腎症においてもその進展にはマクロファージが関与する可能性を示した。今後の進行性腎障害の診断及び治療の新たな標的の探求の一環として、キラーリンパ球特異的なケモカイン・フラクタルカインを同定し、その解析に有用な種々の抗体を作製した。

分担研究者

- ・堀田 修 仙台社会保険病院腎センター 部長
- ・斎藤喬雄 福岡大学第4内科 教授
- ・今井俊夫 カン研究所 主幹研究員

腎疾患においてもその発症・進展に白血球が関与する可能性が考えられている。また白血球浸潤から繊維化へと続く尿細管間質病変の進展を抑制することは腎機能維持に重要との認識が広まりつつある。本研究では糖尿病性腎症を含めた種々の腎疾患の進展、特に糸球体病変から二次的に起きる尿細管間質病変の進展過程における(1)白血球（特にマクロファージ、肥満細胞）及びケモカインの役割に関する解析、(2)これらの成果を踏まえた診断・治療への応用、について研究を行う。

A. 研究目的

種々の腎疾患で白血球浸潤が観察される。間質への単球や T リンパ球の浸潤は多くの腎疾患で見られ、また半月体性糸球体腎炎など炎症性の強い疾患ではこれらの細胞の糸球体浸潤も観察される。さらに現在では、ほとんど炎症性変化がないと言われている

## B. 研究方法

### 1. 肥満細胞に関する研究

野性型及び肥満細胞欠損ラット (WsRC-Ws/Ws ; c-kit 遺伝子の一部が欠損している) の左腎を摘出した後に、ピューロマイシンアミノヌクレオシド (PAN) を 1.5 mg/kg を計 4 回投与して腎症を惹起した。半月体性糸球体腎炎は WKY 系ラットに抗糸球体基底膜抗体 (0.25 mL/kg) を投与することにより、腎間質繊維症はミク로스フェアーを腎動脈に投与することによりそれぞれ惹起し、上記と同様の解析を行った。間質の繊維化はマッソントリクローム染色による定性的解析及びヒドロキシプロリン量の測定によるコラーゲン量の定量により判定した。肥満細胞の検出は同細胞の特異的マーカーとされる rat mast cell protease I (RMCPI) の免疫染色で行った。

### 2. 腎生検標本及び尿に存在する巨大化マクロファージ (GM) に関する研究

各種腎疾患における腎生検標本を用い GM の存在の有無とその程度、ならびに GM の発現する抗原を検索した。各種腎疾患における尿中の GM の存在とその数、ならびに尿中 GM が発現する抗原について解析した。尿中落下細胞を培養し培養細胞における CD68 抗原の発現の有無を検索した。尿中微量コレステロール (主体は HDL コレステロール) を測定し尿中 GM との関連について解析した。

### 3. 糖尿病性腎症におけるマクロファージの役割に関する研究

糖尿病性腎症 43 例と対照群の非糖尿病 10 例の腎生検標本で、各種白血球表面抗原マーカーとともに、糖酸化物であるカルボキシルメチルリジン、脂質過酸化物であ

る酸化ホスファチジルコリンおよびマクロファージ・スカベンジャー受容体に対するモノクローナル抗体を用い、免疫組織化学染色を行った。陽性細胞を各糸球体毎に計測し、糸球体の病変 (Gellman 分類、結節の有無) の程度と比較検討した。

### 4. フラクタルカイン及びフラクタルカイン受容体 (CX3CR1) に関する研究

抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体、抗ヒトフラクタルカインモノクローナル抗体及び抗マウス CX3CR1 モノクローナル抗体はそれぞれ適切な合成ペプチドを KLH に結合させたものを抗原としてウサギあるいはマウスを免疫して調製した。CX3CR1 を有する白血球の解析は我々が作製した抗ヒト CX3CR1 モノクローナル抗体 (2A9-1) を用いて行った。すなわちヒト末梢血由来白血球懸濁液に同抗体及び他のさまざまな細胞表面マーカーや他のケモカイン受容体に対する直接蛍光標識抗体を組み合わせて反応させて測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体 (腎生検標本、血液、尿) については患者の人権に十分に配慮してインフォームドコンセントを得てから採取し、動物モデルに関しては動物愛護に十分に配慮して実験を行った。いずれにおいても当該研究施設の規定にのっとり、倫理委員会等の承認を得る必要がある場合にはその審査を受けた。

## C. 研究結果

c-kit 遺伝子の一部が欠損したラット (WsRC-Ws/Ws) においては正常に比べて肥満細胞数が非常に少ない (通常この動物は「肥満細胞欠損」と呼ばれている)。この

ラットを用いて腎炎モデルにおける肥満細胞浸潤と間質繊維化との関連を調べた結果、肥満細胞の集積は間質繊維化に先行するが、肥満細胞数の少ないラット（同モデルの腎では少ないながら肥満細胞が検出されたため「肥満細胞欠損」ではなかった）においても繊維化が進行し、その程度は正常ラットよりも有意に強いことが明らかとなった。またヒト腎疾患では肥満細胞は糸球体内には見られないと報告されているが、動物モデルにおいてはその初期に糸球体内肥満細胞が観察されることがわかった。

正常腎組織には GM は存在せず、非選択的蛋白尿を有する症例において尿細管腔内を中心に GM をみとめた。症例の一部では尿細管上皮細胞の一部、Bowman's capsule の一部、糸球体上皮細胞の一部にも CD68 の陽性所見をみとめた。腎組織の GM は CD68、25F9、vimentin 陽性で cytokeratin 陰性、胞体内にしばしば脂肪球を有することがわかった。また腎組織中の単位尿細管腔数当たりの GM 数は非選択的蛋白尿の程度と相関した。尿中 GM の一部はサイトケラチン陽性であることが判明し、同細胞の起源として尿細管上皮細胞が推測された。さらにヒト尿から尿細管上皮細胞を培養し、その性質を調べたところ、マクロファージのマーカーである CD68 が陽性であることがわかり、この推測が支持された。生体内では尿細管上皮細胞は CD68 陰性であることから、培養の過程で形質転換が起こったと考えられる。また GM は多くの脂質を含むことから尿中脂質の重要性を考え、新たに開発した尿中微量コレステロールの測定系を用いて検討したところ、この値が種々の腎症の進展とよく相関

することを明らかにし、診断的有用性を示した。また腎症患者尿中のリポ蛋白質は電荷のない HDL が主体であった。

糖尿病性腎症において、マクロファージの糸球体への浸潤は病変の進展とともに増加した。また、結節病変を有する糸球体では有意な増加が見られたが、リンパ球ではその傾向は明らかでなかった。カルボキシルメチルリジンは拡大したメサンギウム領域と結節の一部に認められ、過半数のマクロファージ内にも陽性であった。カルボキシルメチルリジン陽性マクロファージも病変の進展とともに増加し、結節性病変を有する糸球体では有意に増加していた。また、酸化ホスファチジルコリン陽性マクロファージでも同様の所見が得られた。カルボキシルメチルリジン陽性および酸化ホスファチジルコリン陽性マクロファージの過半数にはスカベンジャー受容体が発現していた。

ヒト末梢白血球を用いたフラクタルカイン受容体 (CX3CR1) 発現細胞の解析から、フラクタルカインはキラーエフェクターリンパ球に特異的な初めてのケモカインであることがわかった。フラクタルカインは血管内皮細胞上に発現されることから、キラーリンパ球を特異的に組織に動員するという役割を果たすと考えられる。またマウス CX3CR1 に対するモノクローナル抗体の作製に成功し、今後の腎疾患動物モデルへの利用が可能となった。

#### D. 考察

種々の腎疾患動物モデルを用いて、腎疾患における肥満細胞の役割を調べた。その結果、臨床検体を用いた研究から示唆されている間質繊維化への肥満細胞の関与につ

いては、促進的ではなくかえって抑制的に作用することが示唆された。これは動物モデルを用いて初めて得られる結果であり、本研究の大きな成果と考えている。但し、「肥満細胞欠損」ラットにおいても少ないながら肥満細胞の集積が見られたことから、今後は他の手法も用いてその詳細を検討する。また本研究において初めて発見された糸球体への肥満細胞集積についても欠損動物などを用いることによりその役割を明らかにし、診断や治療の標的となる可能性を調べる予定である。

GM は成熟型マクロファージの形質を有するが、本研究からその由来は protein-loading cytopathy (HDL が関与?)を受けた上皮細胞（尿細管上皮細胞、Bowman 上皮細胞、糸球体上皮細胞）である可能性が示された。これまでこれらの上皮細胞がマクロファージ関連抗原を有するようになることが臨床及び動物を用いた研究から報告されているが、本研究によりこれらの現象が疾患の進展と関連する可能性が示され、診断や治療の標的となり得ることが示唆された。また実際、尿中 GM の解析は非選択的蛋白尿に伴う protein-loading cytopathy の視標となり得ることが本研究から明らかとなり、予後の推定、治療効果の評価に有用であると考えられた。

一方、糖尿病性腎症でもマクロファージの浸潤は病変の進展に関与すると考えられる。本研究で、病変の進行とともにカルボキシルメチルリジン陽性および酸化ホスファチジルコリン陽性マクロファージが増加し、スカベンジャー受容体の発現も見られたが、このような所見については従来報告がない。この結果は、糖尿病においてメサ

ングウムに沈着した糖酸化物や脂質酸化物は浸潤したマクロファージにおいて発現したスカベンジャー受容体を介して取り込まれ、病変形成やその進行に関与することを示唆する重要な意義を含んでいる。

ケモカイン受容体 CX3CR1 は、キラーリンパ球に特異的なケモカイン受容体であり、他のケモカイン受容体 CCR5 などには見られない発現様式を示していることが明らかとなった。したがって、進行性腎疾患における細胞浸潤には、CX3CR1-フラクタルカイン系の働きが関与している可能性がさらに濃厚となった。また本研究により得られた種々のポリクローナル及びモノクローナル抗体は臨床検体や動物モデルを用いた腎疾患の研究には極めて有用であり、今後これらを用いて腎疾患におけるフラクタルカインの役割についても解析を進める予定である。

## E. 結論

進行性腎障害の病態解析の一環として、肥満細胞は腎間質繊維化に抑制的に作用すること、種々の腎炎への関与が指摘されてきたマクロファージは代謝性疾患である糖尿病性腎症においても関与することを示した。また進行性腎障害に対して広く応用可能な新規診断法として、尿中コレステロールの測定の有用性を示した。種々の腎疾患への関与が示唆されているキラーリンパ球に特異的なケモカインとしてフラクタルカインを同定し、さらに今後の腎疾患研究への応用に有効なフラクタルカイン及びその受容体に対する種々の抗体を作製した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ou ZL, Natori Y, Natori Y: Transient and sequential expression of chemokine mRNA in glomeruli in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron* 85:254-257, 2000.
2. Ou ZL, Nakayama K, Natori Y, Doi N, Saito T, Natori Y: Effective methylprednisolone dose in experimental crescentic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 37:411-417, 2001.
3. Hotta O, Yusa N, Kitamura H, Taguma Y: Urinary macrophages as activity markers of renal injury. *Clinica Chemica Acta* 297:123-133, 2000.
4. 大高徹也、相馬淳、佐藤寿伸、佐藤博、齊藤喬雄：IgA 腎症における糸球体メサンギウム細胞の形質転換について。東北大医短部紀要 9(2):137-144, 2000
5. Soma J, Ootaka T, Sato H, Ito S, Saito T: Tubulointerstitial changes are less important in membranoproliferative Glomerulonephritis than in IgA nephropathy. *Nephron* 86(2):230-231, 2000
6. 今井俊夫：ケモカイン受容体。別冊・医学のあゆみ 7 回膜貫通型受容体研究の新展開，医歯薬出版 90-95, 2001 年。
7. 今井俊夫、梅原久範：フラクタルカインによる細胞遊走機構。免疫・Immunology Frontier 11(1): 30-35, 2001 年。
8. 今井俊夫：CX3CR1。ケモカインハンドブック，秀潤社 215-219, 2000 年。
9. 今井俊夫：fractalkine。ケモカインハンドブック，秀潤社 142-145, 2000 年。
10. 今井俊夫：細胞接着、細胞浸潤とケモカイン。細胞工学 19(5): 717-722, 2000 年。
11. Goda, S., T. Imai, O. Yoshie, O. Yoneda, H. Inoue, Y. Nagano, T. Okazaki, H. Imai, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara: CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 164(8): 4313-4320, 2000.
12. Yoneda, O., T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara: Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol* 164(8): 4055-4062, 2000.

学会発表

1. 宮澤しのぶ，欧周羅，名取有美子，堀田修，名取泰博。ラット半月体形成性糸球体腎炎モデルの進行期間質病変における mast cell の関与。第 43 回日本腎臓学会総会，2000 年。
2. 宮澤しのぶ，欧周羅，スザナ・デニチナ，名取有美子，堀田修，名取泰博。腎間質繊維化における mast cell の役割：mast cell 欠損ラットを用いた検討。第 44 回日本腎臓学会総会，2001 年。

3. 大高亮彦、相馬淳、大高徹也、佐藤寿伸、斉藤喬雄、伊藤貞嘉：培養糸球体上皮細胞の形質に関する転写因子 WT1 及び Pax の発現解析. O-394 第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年

4. 木村朋由、相馬淳、大高徹也、佐藤寿伸、斉藤喬雄、伊藤貞嘉：半月体形成性糸球体腎炎(CrGN)における上皮マーカーの検討. P-233 第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年

5. 大高徹也、相馬淳、佐藤寿伸、佐藤博、伊藤貞嘉、斉藤喬雄：IgA 腎症におけるメサンギウム細胞形質転換の経時的推移について. P-010 第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年

6. Ohtaka A, Sato T, Ootaka T, Sato H, Saito T, Soma J, Ito S :  
Significance of the early phenotypic change of podocyte as detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). A2901, 33rd American Society of Nephrology Meeting, 2000.

7. Ootaka T, Saito T, Sato T, Sato H, Ohtaka A, Ito S: The phenotypic transformation of glomerular mesangial cells in IgA nephropathy: A longitudinal immunohistochemical study. A2902, 33rd American Society of Nephrology Meeting, 2000.

8. Imai T, Yoshie O: Lymphocyte subsets and chemokine receptors.  
第 30 回日本免疫学会シンポジウム

9. 西村美由希、米田 修、梅原久範、堂前尚親、今井俊夫、義江 修：エフェクターキラーリンパ球に選択的に発現する

Fractalkine レセプター. 第 30 回日本免疫学会

10. 梅原久範、合田征司、米田 修、井上 博、今井俊夫、義江 修、今井久夫、堂前尚親：単球と血管内皮細胞との接着における接着性ケモカイン, fractalkine の機能. 第 30 回日本免疫学会

11. 米田 修、合田征司、井上 博、今井俊夫、義江 修、今井久夫、梅原久範、堂前尚親：Fractalkine による NK 細胞の活性化と IFN- $\gamma$  産生能. 第 30 回日本免疫学会

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

動物モデル及び臨床における白血球浸潤とケモカイン

分担研究者 名取 泰博 国立国際医療センター 臨床薬理部長

研究要旨

腎疾患の進展における肥満細胞の役割を明らかにするために動物モデルを用いた解析を行った。ピューロマイシンアミノヌクレオシド（PAN）腎症を惹起したラットでは、糸球体病変の進展に伴い尿細管間質病変も進行する。そこで c-kit 遺伝子の一部が欠損しているために正常に比べて肥満細胞数が非常に少ないラット（WsRC-Ws/Ws；通常この動物は「肥満細胞欠損」と呼ばれている）に PAN 腎症を惹起したところ、同ラットにおいても繊維化が進行したことから、肥満細胞は間質繊維化の進展に必須ではないことが示唆された。さらに、肥満細胞欠損ラットにおける間質繊維化の程度は対照とした野性型ラットよりも有意に強いことが明らかとなった。これらの結果から、腎間質の繊維化（コラーゲンの蓄積）に対して肥満細胞は促進的ではなく、かえって抑制的に作用することが示唆された。一方、ヒトでは全く報告の無い糸球体への肥満細胞浸潤が2種の糸球体腎炎動物モデルの病初期において観察された。今後、肥満細胞と糸球体病変との関連を検討する予定である。

A. 研究目的

近年、組織の繊維化における肥満細胞の役割が注目され、腎疾患においても臨床検体を用いた研究から腎間質繊維化と肥満細胞集積との相関が報告されている。すなわち急速進行性糸球体腎炎や糖尿病性腎症などの様々な糸球体疾患に伴う尿細管間質病変において肥満細胞の集積が観察され、その程度が病態の進行の程度と相関することが示されている。しかし腎疾患動物モデルを用いた肥満細胞の研究は無いために、その役割については推測の域を出ない。そこで本研究では腎間質繊維化における肥満細胞の役割を明らかにすることを目的として、

まず最初に肥満細胞の集積の見られる腎疾患モデルを確立し、次に肥満細胞が欠損していると言われるラットに同モデルを惹起してその病態の進行の解析を行った。

B. 研究方法

野性型及び肥満細胞欠損ラット（WsRC-Ws/Ws；c-kit 遺伝子の一部が欠損している）の左腎を摘出した後に、ピューロマイシンアミノヌクレオシド（PAN）を 1.5 mg/kg を1回、0.43 mg/kg を3回腹腔内投与して腎症を惹起し、間質病変が起きる初期である2週目と繊維化が進行した6週目にラットを屠殺し

た。間質の繊維化はマッソントリクローム染色による定性的解析及びヒドロキシプロリン量の測定によるコラーゲン量の定量により判定した。肥満細胞の検出は同細胞の特異的マーカーとされる rat mast cell protease I (RMCPI)の免疫染色で行った。

半月体性糸球体腎炎は WKY 系ラットに抗糸球体基底膜抗体 (0.25 mL/kg)を投与することにより、腎間質繊維症はミクロスフェアを腎動脈に投与することによりそれぞれ惹起し、上記と同様の解析を行った。

### C. 研究結果

最初に、尿細管間質病変を伴ういくつかの腎疾患動物モデルにおける間質肥満細胞の集積を調べた。その結果、半月体性糸球体腎炎モデル、腎間質繊維症及び PAN 腎症モデルにおいて、いずれも間質病変の初期から肥満細胞の集積が観察された。また半月体性糸球体腎炎モデルにおいてその経時的变化を調べたところ、間質繊維化に先行して肥満細胞の集積が起きることが明らかとなった。

次に肥満細胞欠損ラットを用いた実験を行うために、最初にこのラットの肥満細胞の有無について皮下 RMCPI 陽性肥満細胞の観察を行ったところ、野性型ラットでは散在する肥満細胞が観察されたが、欠損ラットでは全く見られず、肥満細胞欠損ラットとして利用可能と考えられた。そこで次に野性型及び肥満細胞欠損ラットに PAN 腎症モデルを惹起した。その結果、尿蛋白及び血清尿素窒素量は6週目まで野性型及び肥満細胞欠損ラットの両群の間に差がなかった。一方、間質の肥満細胞は2週目か

ら既にいずれの群においても増加が観察され、その細胞数は2週目(Wild  $3.44 \pm 1.36$  vs WsRC-Ws/Ws  $1.50 \pm 0.62/\text{mm}^2$ ,  $p < 0.05$ )及び6週目( $4.70 \pm 1.95$  vs  $0.96 \pm 0.46/\text{mm}^2$ ,  $p < 0.05$ )ともに肥満細胞欠損ラットでは有意に抑制されていた。但し、腎症を惹起した場合には「肥満細胞欠損ラット」にも肥満細胞の集積が見られることがわかった。

マッソントリクローム染色による染色の結果、2週目には皮髄境界領域に繊維化が観察され、6週目には皮質の全域に繊維化が観察された。また繊維化の程度は野性型に比べ肥満細胞欠損ラットの方がやや強いように見られた。そこで次に繊維化を定量的に比較するために、腎皮質のコラーゲン量を測定した。その結果、2週目には両群間に差は無かったが、6週目には WsRC-Ws/Ws 群の方が有意に高値を示し ( $892 \pm 62$  vs  $1029 \pm 65$  ng/mg,  $p < 0.05$ )、顕顕所見と一致していた。これらの結果から、肥満細胞は繊維化の進展には必ずしも必須ではなく、かえって繊維化に抑制的に作用する可能性が示唆された。

上記の尿細管間質病変の解析の過程で、半月体性糸球体腎炎モデル及び PAN 腎症モデルの病初期には糸球体内に肥満細胞が観察された。これまでの臨床検体を用いた研究では、糸球体内には肥満細胞の集積はない、と報告されているが、それは病初期のヒト検体が入手困難のためと考えられる。

### D. 考察

調べた尿細管間質病変を呈する3種類の腎疾患動物モデルにおいて、いずれも間質への肥満細胞の集積が起きることが明らか

となった。さらに半月体性糸球体腎炎においては間質の繊維化に先行して肥満細胞集積が見られた。これまでの臨床検体を用いた解析と合わせ、この結果は肥満細胞が間質の繊維化に関与する可能性を示すと考えられた。そこで次に肥満細胞の役割を直接調べるために、肥満細胞欠損ラットを用いる実験を行った。上述の半月体性糸球体腎炎モデルは WKY 系ラットにおいてのみ惹起可能であるため、欠損ラットの実験には応用できない。そこで他のモデルとして PAN 腎症モデルについて検討した。PAN 腎症は、その病初期は一過性のネフローゼのモデルとして広く用いられているが、腎摘や反復投与を繰り返すことにより巣状糸球体硬化症を呈するようになり、広範な尿細管間質病変を伴う不可逆的なモデルとしても用いることができる。そこでこのモデルを肥満細胞欠損ラットに惹起して、腎間質繊維化における肥満細胞の役割を調べたところ、野性型に比較し欠損ラットの方がかえって繊維化が強いことが明らかとなり、肥満細胞が繊維化に抑制的に作用することが示唆された。

この欠損ラットにおいても、程度は弱いながら肥満細胞の集積が観察されたことから、同細胞の関与を完全になくす系としては不十分であった。このラット (WsRC-Ws/Ws) は c-kit 遺伝子の一部が欠損しているために肥満細胞がほとんどないと言われているが、c-kit 遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死であることから WsRC-Ws/Ws 系ラットにおける欠損では c-kit 遺伝子の機能が一部残存していると考えられ、その結果、数は少ないながら肥満細胞の集積が見られたものと思われる。

本研究から糸球体病変の病初期には糸球体への肥満細胞の集積が起きることがわかった。ヒト腎生検標本を用いた研究では糸球体内には肥満細胞はないと言われており、今後、動物モデルを用いて糸球体病変への肥満細胞の寄与についても検討を進める予定である。

#### E. 結論

臨床検体を用いた解析から、腎間質繊維化における肥満細胞の関与が示唆されているが、肥満細胞欠損動物を用いた本研究から腎間質の繊維化 (コラーゲンの蓄積) に対しては肥満細胞は促進的ではなく、かえって抑制的に作用することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Ou ZL, Natori Y, Natori Y: Transient and sequential expression of chemokine mRNA in glomeruli in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron* 85:254-257, 2000.
2. Ou ZL, Nakayama K, Natori Y, Doi N, Saito T, Natori Y: Effective methylprednisolone dose in experimental crescentic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 37:411-417, 2001.

##### 学会発表

1. 宮澤しのぶ, 欧周羅, 名取有美子, 堀田修, 名取泰博. ラット半月体形成性糸球

体腎炎モデルの進行期間質病変における mast cell の関与. 第 43 回日本腎臓学会総会、2000.

2. 宮澤しのぶ, 欧周羅, スザナ・デニチナ, 名取有美子, 堀田修, 名取泰博. 腎間質繊維化における mast cell の役割: mast cell 欠損ラットを用いた検討. 第 44 回日本腎臓学会総会、2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

腎実質上皮細胞の macrophage 化に関する研究

分担研究者 堀田 修 仙台社会保険病院腎センター部長

研究要旨

尿中出现する大型の macrophage 様細胞（我々は Giant Macrophage, GM と名づけた）の形質的特徴、ならびに臨床的意義について検討した。尿中 GM は CD68、25F9 陽性で成熟型 macrophage の形質を有する。また、GM は細胞質に脂肪を含みいわゆる脂肪球と相同である。一方、GM の一部は上皮細胞の形質である cytokeratin 陽性である。尿中落下細胞から得た尿細管上皮細胞は culture 状態下で CD68 抗原の発現を認める。正常腎組織では GM は存在しないが、非選択的蛋白尿を有する進行性糸球体疾患では主に尿細管腔内に存在し、一部の尿細管上皮細胞、Bowman's capsule 上皮細胞、糸球体上皮細胞陽性である。臨床的には腎症の進行速度ならびに非選択的蛋白尿の尿中排泄の程度と有意な相関を認めた。以上より、GM は protein-loading cytopathy にともない、上皮系細胞が形質転換し成熟型 macrophage の形質を有するに至ったものと考えられる。また、尿中の GM の解析は protein-loading cytopathy の評価に役立つ

研究目的

糸球体疾患に特徴的な macrophage として尿中には大きさが末梢血単球と同じである CD16 抗原 (Fc $\gamma$ RIII) の炎症惹起性 macrophage と大型で macrophage の形質である CD68 抗原を発現しその多くは脂肪を含有する macrophage 様細胞がある（我々はこの細胞を giant macrophage, GM と名づけた）。前者は炎症惹起性 macrophage との性格を有し糸球体急性炎症病変の形成に積極的に関与している。一方、GM に関してはその起源を含め臨床的意義についての検討はこれまでほとんどなされていない。今回、我々は GM の起源、病的意義を明らかにする目的で尿中細胞、腎生検標本等を用い種々の解析を加えた。

研究方法

1. 各種腎疾患における腎生検標本を用い GM の存在の有無とその程度、ならびに GM の発現する抗原を検索した。

2. 各種腎疾患における尿中の GM の存在とその数、ならびに尿中 GM が発現する抗原について解析した。

尿中落下細胞を培養し培養細胞における CD68 抗原の発現の有無を検索した。

尿中微量コレステロール（主体は HDL コレステロール）を測定し尿中 GM との関連について解析した。

（倫理面への配慮）

患者検体の採取に際しては、インフォームドコンセントを行った。

D. 研究結果及び考察

1. 正常腎組織には GM は存在せず、非選択的蛋白尿を有する症例において尿細管腔内を中心に GM をみとめた。症例の一部では尿細管上皮細胞の一部、Bowman's capsule の一部、糸球体上皮細胞の一部にも CD68 の陽性所見をみとめた。

腎組織の GM は CD68、25F9、vimentin 陽性で cytokeratin 陰性、胞体内にしばしば脂肪球を有する。腎組織中の単位尿細管腔数当たりの GM 数は非選択的蛋白尿の程度と相関した。

3. 尿中 GM の大半は脂肪を含有し CD68 に加え 25F9、vimentin 陽性であり、cytokeratin 陰性であったが、一部の GM は CD68 と cytokeratin の両者が陽性であった。

4. 尿中 GM の排泄量は非選択的蛋白尿の程度と相関し、大量の尿中 GM 排泄が認められる症例は腎機能の低下速度が速い。(Fig.1, Fig.2)

Fig. 1

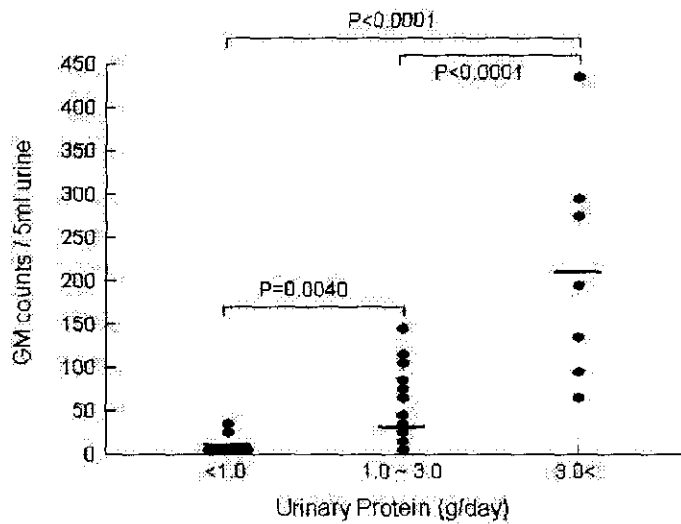
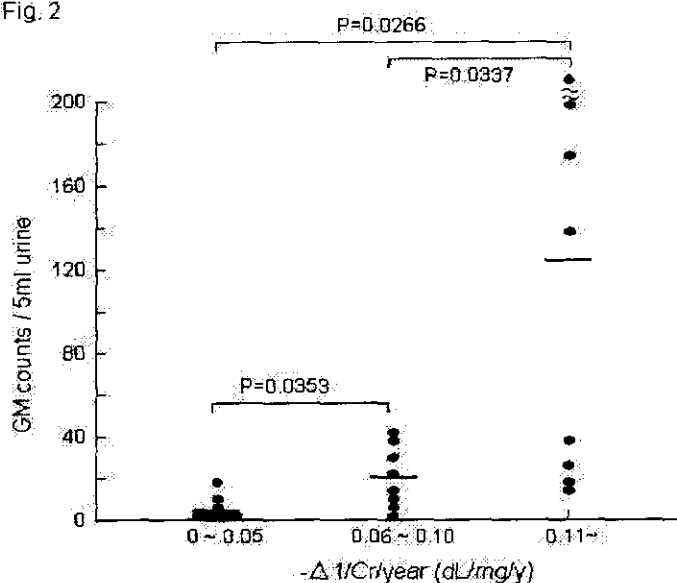


Fig. 2



培養尿細管上皮細胞に CD68 の発現を認め  
た。

尿中微量コレステロール（主に HDL コレ  
ステロール）排泄の程度と尿中 GM 数との  
間に有意な相関を認めた。

#### E. 結論

GM は成熟型 macrophage の形質を有す  
るがその由来は protein-loading  
cytopathy(HDL が関与?)を受けた上皮細  
胞（尿細管上皮細胞、Bowman 上皮細胞、  
糸球体上皮細胞）である。

尿中 GM の解析は非選択的蛋白尿に伴う  
protein-loading cytopathy の視標となり  
予後の推定、治療効果の評価に有用である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

- Hotta O, Yusa N, Ooyama M, Unno K, Furuta T, Taguma Y: Detection of urinary macrophages expressing the CD16 (Fc  $\gamma$  RIII) molecule: a novel marker of acute inflammatory glomerular injury. *Kidney Int* 1999;55:1927-1934
  - Hotta O, Furuta T, Chiba S, Yusa N, Taguma Y: Immunosuppressive effect of deoxyspergualin in proliferative glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 1999;34:894-901
- Hotta O, Yusa N, Kitamura H, Taguma Y: Urinary macrophages as activity markers of renal injury. *Clinica Chemica Acta* 2000;297:123-133

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

糸球体腎炎の組織における白血球浸潤と長期予後に関する研究

分担研究者 齊藤 喬雄 福岡大学医学部内科学第4講座教授

研究要旨

進行性腎障害の原因疾患である糸球体腎炎では炎症性白血球である単球、顆粒球、マクロファージの浸潤がメサンギウム細胞の増殖および $\alpha$ 平滑筋アクチンの発現を見る形質転換に関与し、病変の進展や予後の悪化を招くことが示された。また、マクロファージの浸潤はやはり進行性腎障害の原因疾患として重要な糖尿病性腎症においても代謝産物を取り込んで病変の形成や進展に影響を与えることが示唆された。

A. 研究目的

糸球体腎炎は難治性かつ進行性であり、やがて腎不全になり透析療法を必要とするものが少なくない。透析療法は腎不全患者の生命予後を延長する画期的な方法とはいえ、患者の社会復帰が難しく、また莫大な医療費を費やすなど、厚生行政上問題も多い。このため、厚生科学特定疾患対策研究事業のうち、進行性腎障害に対する調査研究では、IgA腎症や急速進行性糸球体腎炎などの糸球体腎炎が重点的に取り上げられ、その治療方針の確立が急務とされており、われわれもその研究に協力してきた。さらに、糖尿病性腎症では、これらの腎炎をしのぐ勢いで末期腎不全に至る患者が増加しており、治療の対策が叫ばれている。この疾患の本質的な変化は腎糸球体の硬化といわれているが、我々が明らかにしてきたとおり、マクロファージなど炎症性白血球の浸潤も病因に関わっており、腎炎との

共通点が見いだせる。我々はこのような腎不全の重要な原因疾患である慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症において、その進行に白血球系細胞浸潤がどのように関わるか、今まで研究を重ね発表してきた。ここでは、この内容をさらに発展させ、疾患の重要な鍵を握ると思われる組織細胞の形質転換や糖化最終産物(AGE)の蓄積を白血球の細胞浸潤との関係から明らかにし、それに関連するインテグリンや接着因子の関与を検討する。さらに、組織障害度および臨床的パラメータを計測し、予後との関係を推測する。

B. 研究方法

1) IgA腎症での検討：慢性糸球体腎炎のなかでその大半を占めるIgA腎症50例の腎生検標本とその対照例として糸球体病変のほとんど見られない単独血尿例10例の腎生検標本について、エタノール固定パ



ラフィン包埋切片を用い、酵素抗体法による免疫染色を実施した。検索対象は、 $\alpha$ 平滑筋アクチン(SMA)、平滑筋ミオシン(SMM)、カルボニン(CLP)、高分子カルデスモン(HCLD)など各種平滑筋骨格蛋白、各種白血球表面抗原およびインテグリン、ICAM1 および ICAM3 などの接着因子であり、糸球体におけるこれらの細胞や物質の発現を検討するためにそれぞれのモノクローナル抗体を用いた。物質の発現は4段階評価、陽性細胞については糸球体毎に算定し、各症例で平均値を求めた。各症例の臨床的パラメータのほかに、組織上の糸球体障害指数(IGL)、間質容積(%IV)を計測し、免疫染色で得られた結果とそれぞれの値の相関を検討した。

2) 糖尿病性腎症での検討： 糖尿病性腎症 43 例と対照群の非糖尿病 10 例の腎生検標本で、各種白血球表面抗原マーカーとともに、糖酸化物であるカルボキシメチルリジン(CML)、脂質過酸化物である酸化ホスファチジルコリン(Ox-PC)およびマクロファージ・スカベンジャー受容体(MSR)に対するモノクローナル抗体を用い、免疫組織化学染色を行った。陽性細胞を各糸球体毎に計測し、糸球体の病変(Gellman 分類、結節の有無)の程度と比較検討した。

倫理的な面についての配慮として、腎生検およびそれぞれの検査について対象となる患者に説明しその同意を得た。また、「腎生検標本を利用した各種腎疾患の病態解析」について福岡大学医に関する倫理委員会の承認 (No.79) を得た。なお、本研究の研究結果に関して、個人のデータが特定されるような危険性はない。

## C. 研究結果

1) IgA 腎症での検討： 各平滑筋骨格蛋白は IgA 腎症および対照例の動脈中膜に均等に発現した。しかし、糸球体においては IgA 腎症でその活動性に応じて糸球体に SMA の発現のみが観察された。この糸球体における SMA の発現の程度は、CD15 陽性単球/顆粒球やインテグリンの一つである CR3 陽性細胞の浸潤、ICAM3 の発現、IGL および臨床的に尿蛋白と有意の相関を示した。しかし、そのほかの検索したパラメータとの間に相関はなかった。

2) 糖尿病性腎症での検討：マクロファージの糸球体への浸潤は病変の進展とともに増加した。また、結節病変を有する糸球体では有意な増加が見られたが、リンパ球ではその傾向は明らかでなかった。CML は拡大したメサンギウム領域と結節の一部に認められ、過半数のマクロファージ内にも陽性であった。CML 陽性マクロファージも病変の進展とともに増加し、結節性病変を有する糸球体では有意に増加していた。また、Ox-PC 陽性マクロファージでも同様の所見が得られた。CML 陽性および Ox-PC 陽性マクロファージの過半数には MSR が発現していた。

## D. 考察

IgA 腎症で、SMA の発現に見られるメサンギウム細胞の形質転換と、CD15 陽性単球/顆粒球や CR3 陽性細胞の浸潤、ICAM3 の発現などとの因果関係を明確に説明することは難しい。しかし、形態学的に CR3 陽性細胞の多くは円形細胞であり、CD15 陽性細胞との相関が極めて高いところから、単球/顆粒球、マクロファージの

うちで CR3 陽性細胞の浸潤が、SMA 発現に強く関与していると考えられる。従来の実験腎炎モデルやヒト腎組織での検討結果を考慮すると、糸球体に浸潤したこれらの細胞から放出されるサイトカインがメサンギウムの増殖やその形質転換を誘導している可能性が考えられる。一方、我々は、IgA 腎症のようなメサンギウム増殖性糸球体腎炎において、メサンギウム増殖の程度を示す IGL が予後と相関することをすでに報告している。また、IgA 腎症において、単球/顆粒球およびマクロファージと、予後に関係深い尿蛋白量との間に密接な関係があることも報告している。このように、白血球浸潤やメサンギウム細胞増殖と、病変の進展にともなう予後悪化の関係が示唆される過程で、今回の研究における SMA 発現に示されたようなメサンギウム形質転換は重要な要因である。SMA 等の平滑筋収縮蛋白の発現は、アンギオテンシンⅡ(AⅡ)に対するメサンギウムの反応性亢進を示唆する所見ともいわれ、ACE 阻害薬や AⅡ受容体拮抗薬の有効性とも関係づけられる可能性がある。

一方、糖尿病性腎症でもマクロファージの浸潤は病変の進展に関与すると考えられる。我々の研究で、病変の進行とともに CML 陽性および Ox-PC 陽性マクロファージが増加し、MSR の発現も見られたが、このような所見については従来報告がない。この結果は、糖尿病においてメサンギウムに沈着した糖酸化物や脂質酸化物は浸潤したマクロファージにおいて発現したスカベンジャー受容体を介して取り込まれ、病変形成やその進行に関与することを示唆する重要な意義を含んでいる。

## E. 結論

進行性腎障害である IgA 腎症などの糸球体腎炎において単球、顆粒球、マクロファージなどの炎症性白血球浸潤が、メサンギウムなど組織細胞の形質転換を促し、予後悪化の要因となっていることが示唆された。また、やはり進行性腎障害として重要な糖尿病性腎症は、一般には炎症とは考えられないが、炎症性細胞が代謝産物を取り込んで進展し、予後を悪化させることが示唆された。このように原因疾患は異なっても炎症性白血球浸潤の進行性腎障害に対する役割は極めて重要と思われるが、今後、さまざまな原因疾患での炎症性白血球浸潤が及ぼす機序の共通性を検討し、治療の開発に関連付けたい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 大高徹也、相馬淳、佐藤寿伸、佐藤博、齊藤喬雄：IgA 腎症における糸球体メサンギウム細胞の形質転換について。東北大医短部紀要 9(2):137-144, 2000

2) Soma J, Ootaka T, Sato H, Ito S, Saito T: Tubulointerstitial changes are less important in membranoproliferative Glomerulonephritis than in IgA nephropathy. Nephron 86(2):230-231, 2000

### 2. 学会発表

1) 大高亮彦、相馬淳、大高徹也、佐藤寿伸、齊藤喬雄、伊藤貞嘉：培養糸球体上皮細胞の形質に関与する転写因子 WT1 及び

Pax の発現解析. O-394 第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年

2) 木村朋由、相馬淳、大高徹也、佐藤寿伸、斉藤喬雄、伊藤貞嘉：半月体形成性糸球体腎炎(CrGN)における上皮マーカーの検討. P-233 第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年

3) 大高徹也、相馬淳、佐藤寿伸、佐藤博、伊藤貞嘉、斉藤喬雄：IgA 腎症におけるメサンギウム細胞形質転換の経時的推移について. P-010 第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年

4) Ohtaka A, Sato T, Ootaka T, Sato H, Saito T, Soma J, Ito S: Significance of the early phenotypic change of podocyte as detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). A2901, 33rd American Society of Nephrology Meeting, 2000.

5) Ootaka T, Saito T, Sato T, Sato H, Ohtaka A, Ito S: The phenotypic transformation of glomerular mesangial cells in IgA nephropathy: A longitudinal immunohistochemical study. A2902, 33rd American Society of Nephrology Meeting, 2000.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

腎臓への白血球浸潤におけるケモカインの役割

分担研究者 今井 俊夫 カン研究所 主幹研究員

## 研究要旨

ケモカイン受容体 CX3CR1 はヒト細胞障害性リンパ球と単球に選択的に発現し、そのリガンドである fractalkine はこれら細胞の浸潤を特異的に誘導する。進行性腎疾患における浸潤細胞の特性は、CX3CR1-fractalkine 系によって浸潤が制御される細胞の特徴と酷似している。本研究は、進行性腎疾患の細胞浸潤における CX3CR1-fractalkine 系の役割を解明することを主体として実施した。

ヒト検体における研究では、正常人リンパ球上での CX3CR1 と他のケモカイン受容体の発現状態を解析し、CX3CR1 のみがキラー細胞に選択的に発現していることを確認した。また、組織染色、ELISA に適用可能な抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体、組織染色に適応可能な抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体の作製を行った。したがって、ヒト検体の探索に必要な研究材料と理論的傍証が得られたと考えられる。

進行性腎障害の原因の解明や治療法の確立には、動物モデルを用いた解析・治療実験が必要となる。ところが、CX3CR1 の発現は、ヒトとマウスでは異なり、マウスではリンパ球には CX3CR1 が発現していないとの報告がある。そこで、allo 脾臓細胞移植により CTL を誘導した場合の、キラーリンパ球での CX3CR1 の発現の検討を行った。マウス CX3CR1 に対するモノクローナル抗体を作製し、FACS で解析を行った結果、GVHD マウスの脾臓、肝臓に存在する T 細胞に CX3CR1 の発現が確認された。これら CX3CR1 発現 T 細胞の多くは、移植した脾臓細胞由来の CD8 陽性 T 細胞であり、エフェクターキラー細胞と考えられた。したがって、CX3CR1-fractalkine 系の腎疾患における役割を、マウスの腎疾患モデルを用いて解析・治療実験を実施するための基盤的知見が得られたと考えられる。

### A. 研究目的

進行性腎障害においては、浸潤免疫細胞による腎組織の不可逆的損傷を抑制することにより、腎障害の進展抑制が可能である。免疫細胞の活性を抑制するには、抗原特異的な活性化反応・サイトカインによる増

殖・細胞遊走因子と接着分子による細胞浸潤のいずれかを抑制することが必要である。疾患や病態により浸潤している免疫細胞の特性が異なることは、知られていたが、このような特異的細胞浸潤のメカニズムは長らく不明であった。最近の細胞遊走因子ケ