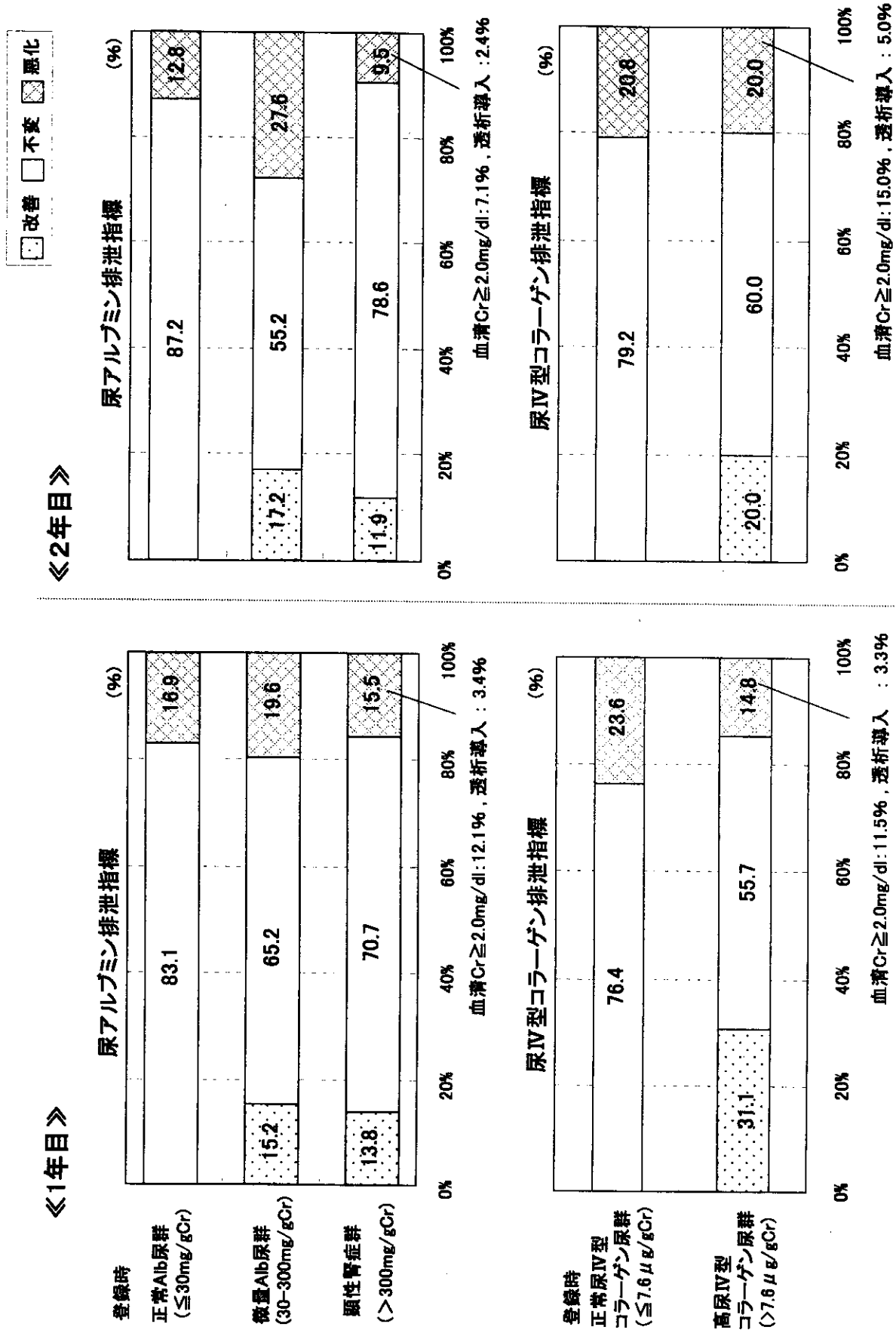




# 糖尿病性腎症：新たな指標による病期進展

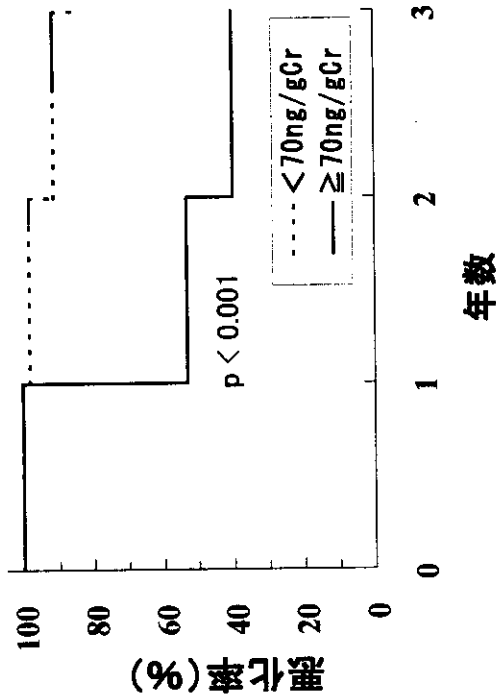
《図2》



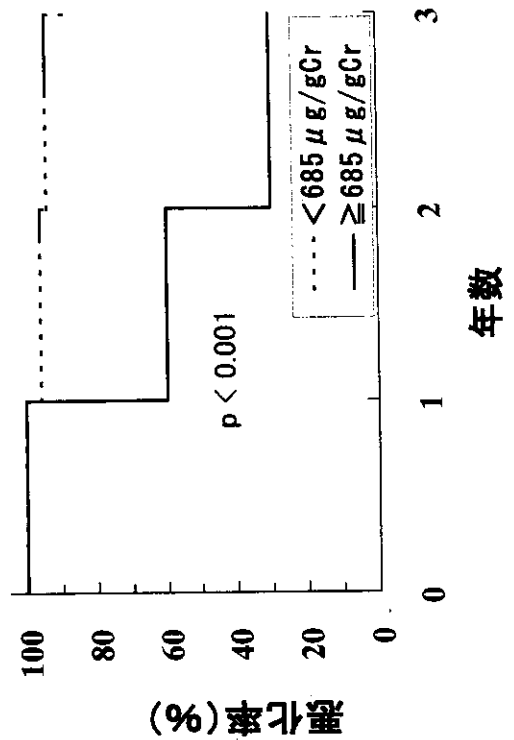
《図3》

糖尿病性腎症：  
 新たな指標による進展危険因子  
 (Kaplan-Meier解析)  
 対象：顕性腎症群

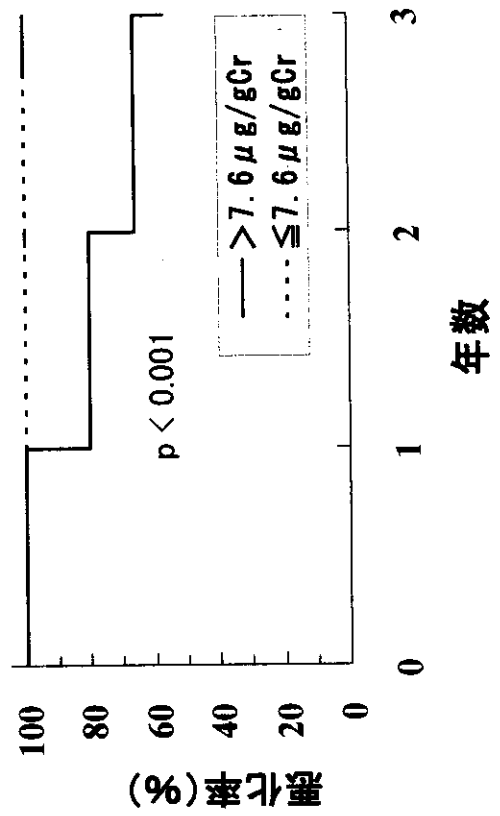
《尿中MIG(登録時)》



《尿中フィブロネクチン(登録時)》



《尿中IV型コラーゲン(登録時)》



厚生科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)  
分担研究報告書

難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成と  
それに基づく治療指針作成に関する研究

(I)糖尿病性腎症進展に対する CXG ケモカインの関与の可能性と  
臨床的意義に関する研究

分担研究者 齋藤 康 千葉大学大学院医学研究院細胞治療学講座教授

研究協力者:

八木一夫 千葉大学大学院医学研究院細胞治療学講座

日暮真由美 千葉大学大学院医学研究院細胞治療学講座

城 謙輔 国立佐倉病院 (現:国立千葉東病院)

山田研一 国立佐倉病院 (現:国立千葉東病院)

A.研究目的

糖尿病性腎症は緩徐に経過しながらも進行性であり、糖尿病全体の約20-30%が最終的には末期腎不全に至ると推定されている。なぜこのような高い確率で糖尿病性腎症が進行していくのかを解明するために、数々の研究が行なわれており、これまでのところアンジオテンシンを中心とした糸球体内血行動態の異常の関与、AGE、酸化ストレス、血小板凝固線溶系異常、遺伝などの関与の可能性が考えられている。

それ以外にも、特に最近では、糖尿病性腎症においても炎症の機序が関与するという説が注目されている。活性化単球・マクロファージは各種炎症性サイトカイン・ケモカインを放出し、組織線維化に強く関与しているとされており、近年、動物実験において糖尿病性腎症

の進展に活性化マクロファージ系の関与が報告されている。また、アンジオテンシンが糸球体内血行動態に関係する機序とはまったく別に、TGF- $\beta$ やMCP-1といったサイトカイン、ケモカインの分泌に関与し、マクロファージを活性化する可能性も示唆されており、ヒト糖尿病性腎症進展過程における同系の役割の解明が期待されている。

ケモカインとは白血球走化の作用を示すサイトカインの総称であるが、ケモカインについては、糖尿病以外のヒトの腎疾患においては、尿の分析によりすでに数種類の関与が解明されつつある(表1)のに比べ、糖尿病性腎症においてははまだ CC ケモカインの一つである MCP-1 の研究が中心であり、そのほかのケモカインについてはまだほとんど目が向けられていない。

そこで私たちは、糖尿病以外の腎疾患において関与がすでに報告されているいくつかのCXC ケモカインに注目した。CXC ケモカインは、活性化マクロファージに関連する炎症の指標としてとらえることができると考えられるが、糖尿病の腎において活性化マクロファージがこれらケモカインの関与を介して、腎臓内の細胞外マトリックス蛋白の蓄積をもたらすことに関わるのではないかと想定した。細胞外マトリックス蛋白の蓄積は、糸球体硬化や間質の繊維化を進行させ、糖尿病性腎症を進展させると考えられる。

このことを検証するため、糖尿病患者における尿中、血中のCXC ケモカインを測定し、また、腎線維化の指標としてフィブロネクチンを同様に測定して、両者間の関係や腎機能、腎症進展度との関連を比較検討することとした。

## B. 研究方法

### <研究1>

#### a) 対象

対象は2型糖尿病患者48人、原発性腎疾患患者42人、健康成人22人。原発性腎疾患でステロイド治療を行っているものは対象からはずした。悪性疾患や感染症、その他全身性あるいは局所的炎症性疾患の合併が疑われるものは対象から省いた。

#### b) 方法

2型糖尿病患者、原発性腎疾患患者、健康成人の早朝尿および血清にて、CXC ケモカイン(IL-8、monokine induced by interferon  $\gamma$  (Mig)、epithelial derived neutrophil

attractant-78 (ENA-78))、およびフィブロネクチンを測定した。

糖尿病群、原発性腎疾患群をそれぞれCre 1.5 を境に腎機能正常群と障害群に分けて、ケモカインと腎機能との関連を解析し、比較検討した。

また、糖尿病群、原発性腎疾患群をそれぞれ1日蛋白尿量1g未満、1g以上2g未満、2g以上の3群に分け、同様にケモカインとの関連を解析し、比較検討した。

### <研究2>

#### a) 対象

対象は2型糖尿病患者10人、およびコントロールとしてMinor glomerular abnormalityと診断された6人と生体腎移植のドナー3人の計9人の腎生検組織を用いた。

#### b) 方法

腎生検組織のパラフィン切片および凍結切片を作製した。これらにおいて、CXC ケモカインとそのレセプター(CXCR1、CXCR2、CXCR3)、ケモカインの標的と考えられている各種炎症細胞の免疫組織学的染色を行い、computer-aided morphometric analysis systemを用いて解析を行った。

## C. 研究結果

a) 健康成人群を含め、5つの群間で、男女差、年齢、BMIには有意差を認めなかった。また、健康成人群を除く4つの群間で、高血圧の有無、ACEI/ARB、HMGCoA reductase inhibitor、抗血小板剤等の使用率には群間の有意差は認めなかった。HbA1cは糖尿病の腎機能正常

群においては他よりも有意に高値であったが、糖尿病教育入院患者の割合が多かったためと考えられる。

b) 尿中 IL-8、Mig、フィブロネクチンは糖尿病患者群、原発性腎疾患患者群共 Cre1.5 以上の群でそれぞれ 1.5 未満の群と健康成人群より有意に高値であった。尿中 ENA-78 は糖尿病患者の Cre1.5 以上の群が糖尿病の Cre1.5 未満の群および原発性腎疾患患者の両群、健康成人群に対して有意に高値であった(図 1)。

c) 糖尿病患者群では一日尿蛋白排泄量が増加するに従い尿中 IL-8、Mig、ENA-78、フィブロネクチン値は増加したが、原発性腎疾患患者群では尿蛋白量との間にそのような有意な関係は認めなかった(図 2、図 3)。

d) 糖尿病患者群の尿中 IL-8、Mig、ENA-78、フィブロネクチンは 1/s-Cre と逆相関を認め、尿中 Mig、ENA-78 は尿中フィブロネクチンと相関を認めた(表 2)。

e) 糖尿病患者の生検腎における免疫組織学的染色の結果、IL-8、Mig、ENA-78 およびこれらケモカインのレセプター(CXCR1、CXCR2、CXCR3)の染色域はコントロール群ひ比べて有意に増加していた。また、これらケモカインの標的となる好中球、リンパ球、マクロファージ等の炎症細胞の染色の結果、糖尿病患者群ではコントロール群に比べて有意に染色細胞数が増加していることが認められた。

#### D. 考察

今回、2 型糖尿病患者における腎内の活性化マクロファージに関連した炎症の指標として

のケモカインが、腎線維化の指標としてのフィブロネクチンと関連することが認められた。腎組織線維化をもたらす糖尿病性腎症の進展には、活性化MΦに関連した CXC ケモカインが関与する可能性が高いことが示唆された。

ケモカインは単球・マクロファージより産生されるほか、*in vitro* の研究ではメサンギウム細胞や尿細管上皮などの腎の固有細胞からも産生されることが報告されている。今回の免疫組織学的染色の結果、ケモカインやケモカインレセプターの染色部位が腎固有細胞にも認められていた。今後、腎生検組織における検討を症例数を追加して行なうほか、*in situ* hybridization 法によりケモカインの産生細胞の同定についてもさらに検討をする予定である。

#### F. 研究発表

学会

日暮真由美、八木一夫、齋藤 康、他

演題名:糖尿病性腎症進展に対する CXC ケモカインの関与の可能性と臨床的意義

1. 第 46 回日本糖尿病学会年次学術集会(2003 年 5 月)

2. 第 46 回日本腎臓学会学術総会(2003 年 5 月)

3. 第 15 回日本糖尿病性腎症研究会(2003 年 12 月)

Mayumi Higurashi, Kazuo Yagui, Yasushi Saito, et.al

演題名:Involvement of CXC Chemokines in the Development of Diabetic Nephropathy

4. 第 36 回アメリカ腎臓病学会(2003 年 11 月)

**表1 Chemokines expressed in human renal diseases**

	CXC chemokine		CC chemokine
	ELR(+)	ELR(-)	
Glomerulonephritis	IL-8	Mig IP-10	MIP-1 $\alpha$ MCP-1
Tubulointerstitialnephritis			MCP-1
Urinary tract infection	IL-8 ENA-78		
Renal allograft rejection	IL-8 ENA-78		MCP-1
Diabetic nephropathy	IL-8		MCP-1

**表2 Correlation analysis**

<Patients with type 2 diabetes>

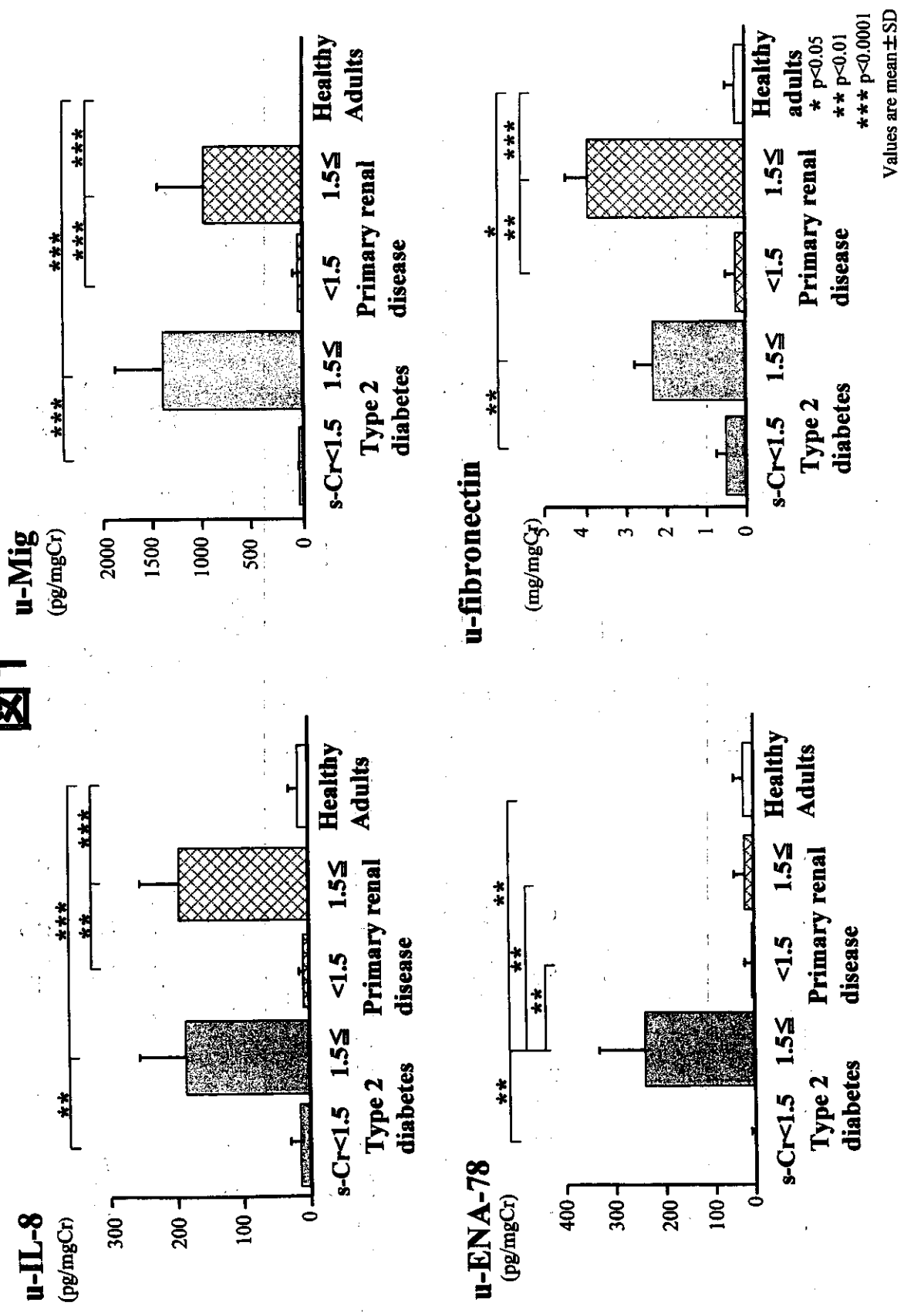
	IL-8	Mig	ENA-78	Fibronectin
1/s-Cr	r= -0.477	r= -0.833	r= -0.658	r= -0.763
	p=0.0062	p<0.0001	p=0.0002	p<0.0001
Fibronectin	r=0.397	r=0.721	r=0.649	
	p=0.0472	p=0.0003	p=0.0012	

<Patients with primary renal disease>

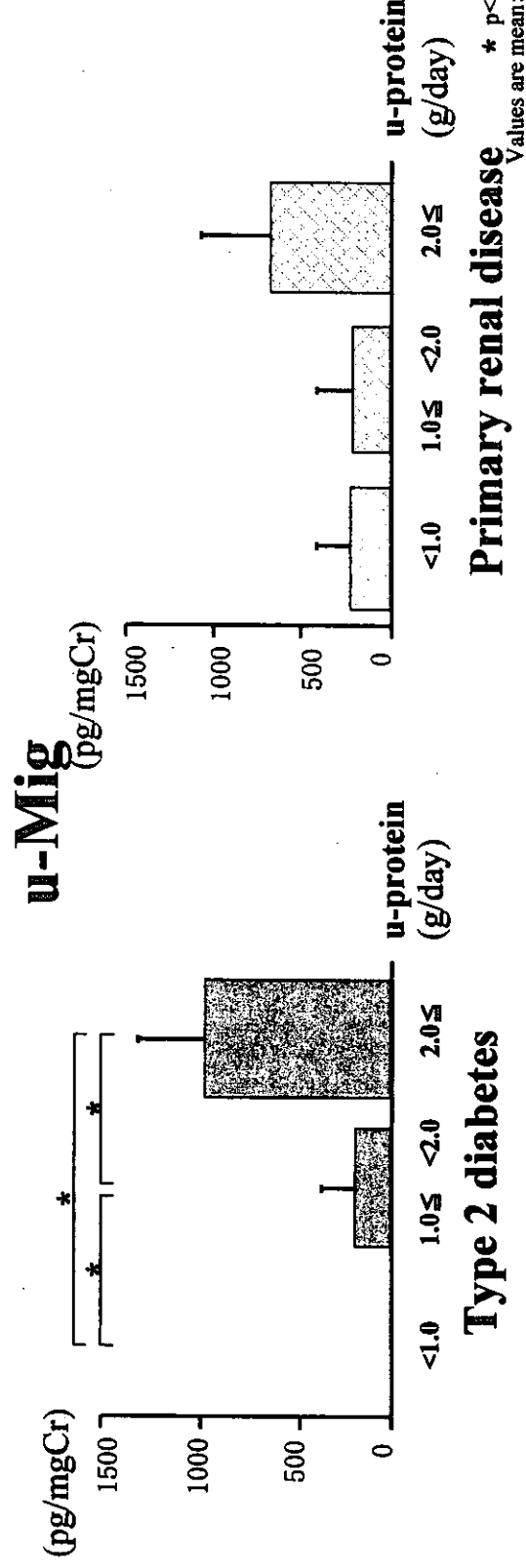
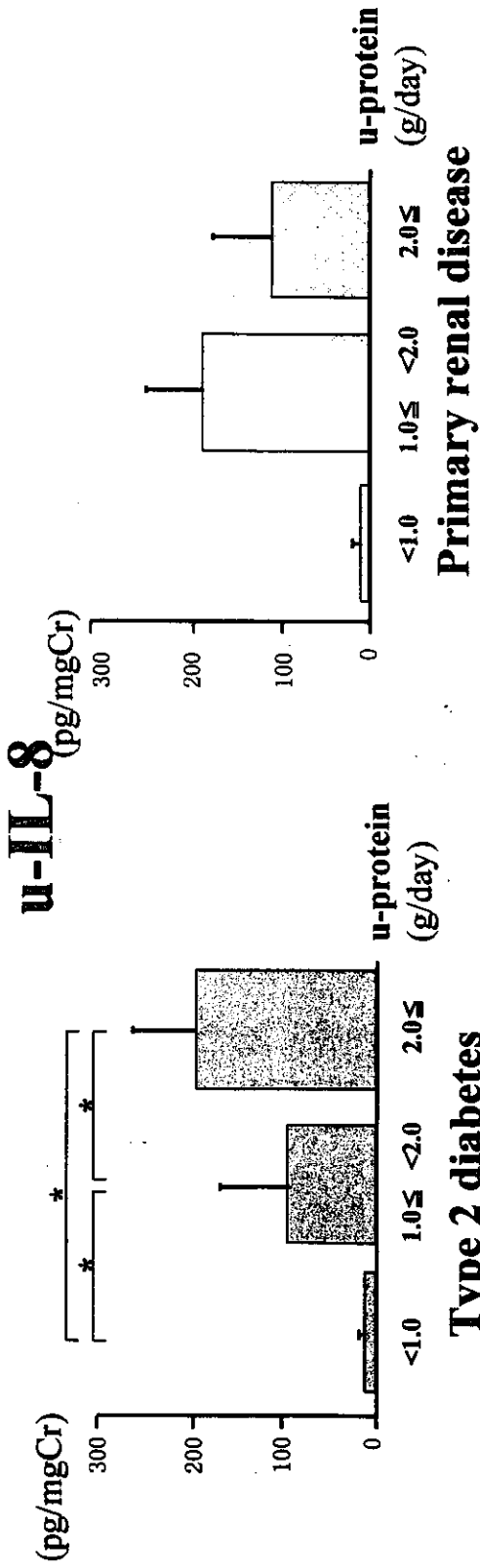
	IL-8	Mig	ENA-78	Fibronectin
1/s-Cr	r= -0.648	r= -0.884	r= -0.175	r= -0.771
	p=0.0076	p=0.0003	p=0.4710	p=0.0020
Fibronectin	r=0.537	r=0.606	r= -0.387	
	p=0.0528	p=0.0290	p=0.1624	



图 1



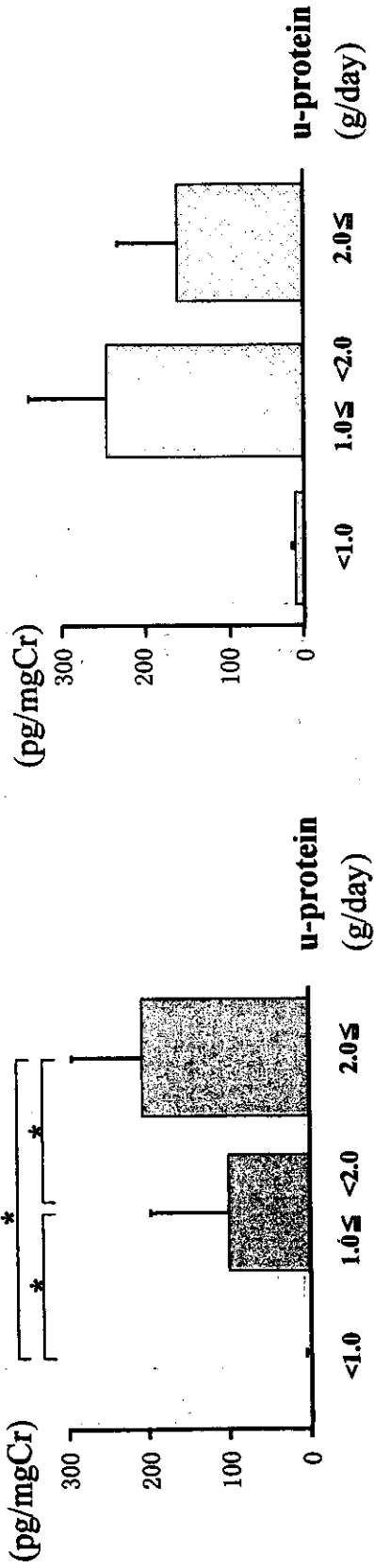
**图 2**



\*  $p < 0.01$   
Values are mean  $\pm$  SD

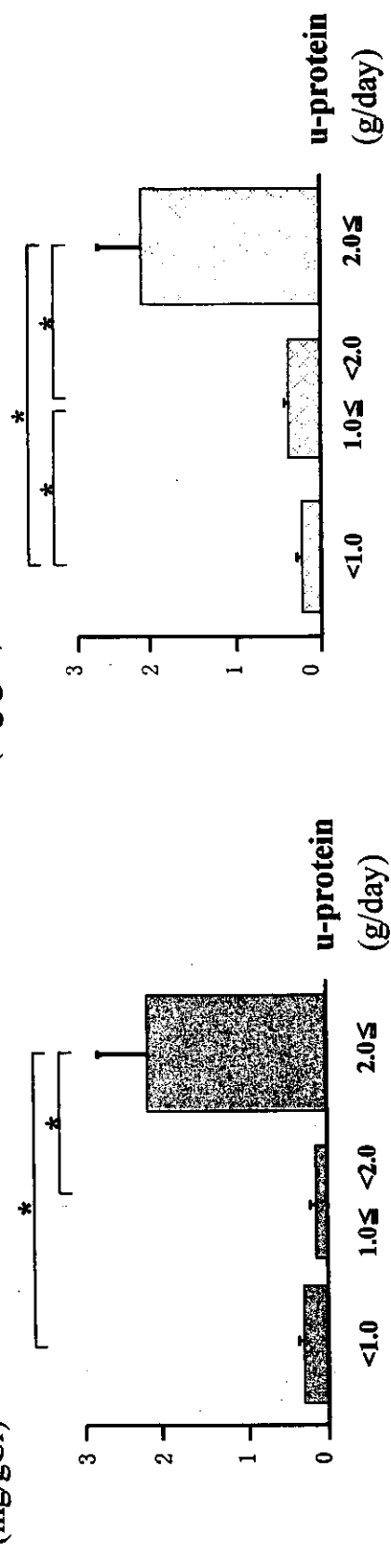
**图3**

**u-ENA-78**



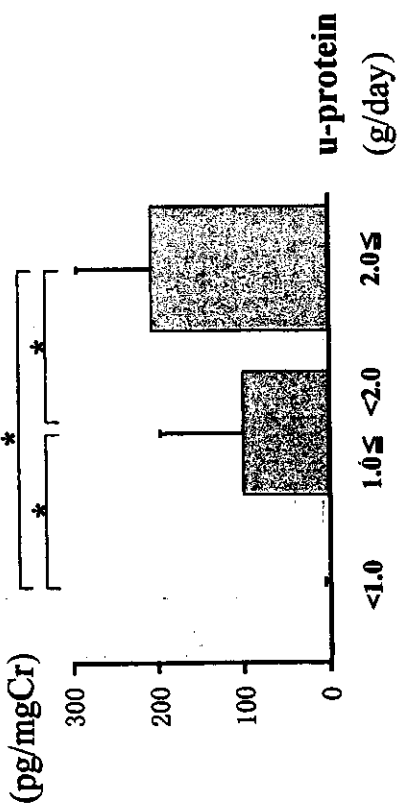
**Primary renal disease**

**u-fibronectin**  
(mg/gCr)

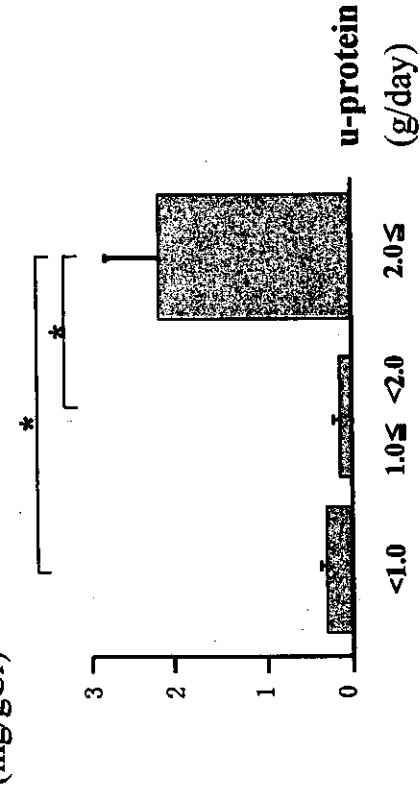


**Primary renal disease**  
\* p<0.01  
Values are mean ± SD

**Type 2 diabetes**



**u-fibronectin**  
(mg/gCr)



**Type 2 diabetes**

分担研究報告書

難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成に関する研究

(Ⅱ)高グルコース、高インスリン状態におけるAngiotensin II 受容体(AT1、AT2)の発現および糖尿病性血管合併症の発症・進展抑制に対するAngiotensin II 受容体拮抗薬 olmesartan の効果

分担研究者 齋藤康

研究協力者 金子堅太郎, 八木一夫

【目的】高グルコース下におけるAngiotensin II (ANG) 受容体(AT1、AT2)の発現調節、および高インスリン(Ins)存在下におけるAngiotensin II 受容体拮抗薬(ARB) olmesartan (以下 olm)の有用性についての検討。【方法】WKY由来のSMCを2種類のglucose条件下(5.6mM (NG) vs 25.6mM (HG))で培養し、ATの発現調節を検討した。またolmのANG、Ins刺激による細胞増殖能への影響を検討した。【結果】mRNAレベルではHGにおいて両受容体の発現はNGと比較して経時的に増加した。蛋白レベルではNGでは両受容体の発現は平行して減少し、HGではAT2の発現が経時的に増加した。olmはIns存在下でANGによる増殖作用を強力に抑制した。【考察】グルコース濃度、刺激因子への暴露時間に依存した受容体発現の変化に伴いリガンドの効果も変化する可能性が示唆された。olmがIns存在下でANGによる増殖作用を強く抑制したことは、本剤が特に高Ins状態でより有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

Angiotensin II (ANG) 受容体(AT)の糖尿病性血管合併症における役割、およびその発症進展抑制に対するAngiotensin II 受容体拮抗薬(ARB) olmesartan (以下 olm)の有用性について培養血管平滑筋細胞において検討した。

B. 研究方法

Wister-Kyoto rat (WKY)の胸部大動脈から抽出した血管平滑筋細胞(RASMC)をNormal glucose (5.6mM, NG)とHigh glucose (25.6mM, HG)で7日間培養し、ATの発現の変化をRT-PCR法、Western blotting法により検討した。またolmの細胞増殖能への影響を検討するためA10 SMCを用いANG、インスリン(Ins)刺激時のDNA合成をBrdU取り込み(以下増殖能)により検討した。ラットの扱いに際しては、本学の動物実験倫理規定に準拠した。

C. 研究結果

本実験で用いたRASMCにおいてmRNAレベルではAT1に加えAT2の発現を認めた。発現の程度はAT1の方がdominantであった。

経時的な推移を検討するために二種類のグルコース条件下で7日間培養を行ったところHGでは両受容体の発現は共にNGと比較して増強していた。蛋白レベルではNGではAT1、AT2の発現は共に平行して減少した(64%, 74% vs Day 0)。一方HGではAT2の発現が経時的に増加した(123% vs Day 0)。

24時間starvation(静止期)の後に測定したA10 SMCの増殖能は①血清刺激のみ、②Ins前処置なし、Ins+ANG、③Ins前処置あり、Ins+ANG、④ANG単独刺激の順で亢進していた(183%, 169%, 131%, 125%)。olm添加によりIns前処置あり、Ins+ANGの群で増殖能は強力に抑制された(130→80%)。増殖期、及び48時間starvationの後に行った同様の検討では各刺激因子およびolmに対する反応性が異なっていた。

D. 考察

糖尿病合併症、特に腎症、および大血管症の予防や進展に関して、高血圧が重要な役割を果たしていることは、近年の大規模試験、UKPDS、Micro-Hope、RENAAL試験などにより明らかにされつつある。Angiotensin II 変換酵素阻害薬とARBは、非糖尿病患者に比し糖尿病患者において顕著に合併症を抑制すると報告され、その作用機序として、全身の血圧の低下に加えて、何らかの効果の存在が指摘されている。糖尿病患者、またはインスリン抵抗性におけるこれら薬剤の有用性は臨床的に確認されているが、詳細な機序はいまだ明らかではない。

糖尿病性腎症は通常微小血管障害の範疇に含められることが多いが、体血圧のコントロールが腎症の進展過程に大きな影響を及ぼすことを踏まえると大血管症の一端とも見なし得る。

今回我々は高グルコース、高インスリン状態における培養大動脈平滑筋細胞でのangiotensin II 受容体の発現について検討を行なった。インスリンがangiotensin IIの増殖刺激効果を増強することから、Renin-Angiotensin系とインスリン情報伝達系との間に、細胞増殖の点でも密接なクロストークがあることが示唆され、このことは既報の結果と一致する。

高グルコース、高インスリン状態ではAT2の発現が誘導され、相対的にAT2の比率が高くなり、olmでAT1シグナルを遮断することにより、AT2の刺激効果が増強された可能性がある。

E. 結論

インスリンによる前処置した群でolmesartanによる増殖抑制効果が大きかったことは、本剤が特に高インスリン状態、即ちインスリン抵抗性を伴う糖尿病、高血圧、高脂血症の患者において腎症を含めた血管合併症の発症・進展抑制により有効である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
第46回日本糖尿病学会年次学術集会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）  
分担研究報告書

難治性腎疾患の進展抑制の為に新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成に関する研究

分担研究者 今井 潤

東北大学大学院薬学研究科医療薬学講座臨床薬学分野

研究要旨

近年、人口の高齢化とともに腎硬化症由来の腎不全罹病率・有病率の増加が認められている。本研究においては、現状の本邦における降圧治療の現状を調べ、今後の介入に備えるようにするものである。本邦高血圧患者の高血圧治療者で、十分な降圧目標レベルに達成しているものは20%に過ぎず、今後の更なる介入は、将来の腎不全発症増加の予防に連なる。

A. 研究目的

腎疾患の予後を決定する最大の危険因子は高血圧である。本研究の目的は、全国の主治医の外来降圧薬治療を受けている本態性高血圧患者における大規模調査により、今日のおが国における家庭血圧測定の応用状況・評価状況を定量的に把握することである。

B. 研究方法

日本全国の降圧薬を使用している 49,509 名の医師リストから、6686 名の医師を無作為に抽出し、HOMED-BP 研究への参加医師 668 名を含む合計 7354 名に、本研究の調査概要を説明した。参加を承諾を得た 1478 名の医師のもとで家庭血圧自己測定を行っている降圧薬服用中の本態性高血圧患者のうち、4 月 30 日時点で調査可能であった 1533 例について、以下の項目に関する調査を実施した。

(1) 主治医の自記式アンケート調査

性、年齢、身長、体重・家庭血圧測定前後の外来随時血圧値（2回測定の平均値）・既往歴・危険因子・合併症・降圧薬の処方状況。

（血圧コントロールに関する主治医の評価については続報に報告予定）

(2) 対象患者の家庭血圧値に関する調査

対象患者に家庭血圧値の記録用紙を配布し、毎朝1回・起床後1時間以内・服薬前に起座位にて2週間測定した値を記録し、主治医に持参するように求めた。

2週間の測定値の平均値を算出し、各対象患者の早朝家庭血圧値として分析に用いた。

2. 分析方法

早朝家庭血圧値および外来随時血圧値に基づき、対象者を以下の4群に分類した。それぞれの高血圧基準値は、JSH2000<sup>2)</sup>、JNC-7<sup>3)</sup>、ESH/ESC2003<sup>4)</sup>に基づき、早朝家庭収縮期血圧値 135 mmHg、および外来随時収縮期血圧値 140 mmHg とした。大迫研究において、早朝家庭収縮期血圧値が拡張期血圧値より優れた心血管死亡予測能を有することが示されているため、ここでは収縮期血圧を用いて分類を行った<sup>5)</sup>。

正常血圧群：早朝家庭血圧 < 135 mmHg かつ 外来随時血圧 < 140 mmHg

外来高血圧群：早朝家庭血圧 < 135 mmHg かつ 外来随時血圧 ≥ 140 mmHg

早朝家庭高血圧群：早朝家庭血圧 ≥ 135 mmHg かつ 外来随時血圧 < 140 mmHg

高血圧群：早朝家庭血圧 ≥ 135 mmHg かつ 外来随時血圧 ≥ 140 mmHg

上記の4群について、対象者の特性を比較した。統計学的検定は、連続変数については分散分析を、カテゴリー変数についてはカイ二乗検定を用いて行い、P < 0.05 を有意水準とした。

C. 研究結果

早朝家庭収縮期血圧値と外来随時収縮期血圧値の間には有意な正の相関があった（ $r=0.35$ ,  $p<0.001$ ）。

全対象者 1533 人中、正常血圧群は 320 人 (21%)、外来高血圧群は 228 人 (15%)、早朝家庭高血圧群は 322 人 (21%)、高血圧群は 663 人 (43%) であった。985 人 (全対象者の 64%) において、早朝家庭収縮期血圧は 135 mmHg 以上と高値であった。

対象者全体の平均年齢は 66 歳、女性が 54% であった。現在喫煙者は 14%、BMI 25kg/m<sup>2</sup> 以上の過体重者は 34% であった。脳血管障害・虚血性心疾患の既往はそれぞれ 9%・8% に認められた。対象者の 13%・41%・13% がそれぞれ糖尿病・高脂血症・高尿酸血症を有していた。早朝家庭血圧平均値は 140/82 mmHg、測定回数の平均は 13 回であった。外来血圧平均値は 144/82mmHg であった。平均服薬期間は 2.3 年、平均服用降圧薬数は 1.7 剤であり、単剤投与者が 48%、2 剤併用者が 36%、3 剤以上の降圧薬併用者は 16% であった。降圧薬種別では、カルシウム拮抗薬 (Ca-A) を投与者が 70% と最も多く、続いて AT II 受容体遮断薬 (ARB) 投与者 43%、ACE 阻害薬投与者 16%、の順であった。2 剤以上の降圧薬併用者のうちでは、Ca-A と ARB の併用者が 44% と最多であった。

正常血圧群・外来高血圧群・早朝家庭高血圧群・高血圧群の 4 群についてみると、早朝家庭高血圧群および高血圧群は、正常血圧群および外来高血圧群にくらべ高齢で、早朝家庭血圧値が高値であり、平均服用降圧薬数も多く、単剤服用者の割合が最小であった (いずれも  $p < 0.01$ )。外来高血圧群・高血圧群の外来随時血圧値は、正常血圧群および早朝家庭高血圧群にくらべ有意に高値であった (いずれも  $p < 0.001$ )。また早朝家庭高血圧群において、狭心症の既往を有するものの割合 (9%) は正常血圧群 (5%) に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。BMI 25kg/m<sup>2</sup> 以上の過体重者の割合は、高血圧群において 39% と、他の 3 群に比べ有意に高かった ( $p < 0.05$ )。外来高血圧群は他の 3 群に比べ、女性の割合が 67%、高脂血症の割合が 47% と有意に高く、飲酒者の割合が 24% と有意に低かった (いずれも  $p < 0.05$ )。

#### D. 考察

本研究は、わが国初の、降圧薬服用中の本態性高血圧患者の大規模集団において実施され

た、家庭血圧のコントロール状況についての調査である。

本調査の結果、降圧薬服用中の本態性高血圧患者 1533 例のうち 63% において、早朝家庭収縮期血圧  $\geq 135$  mmHg であった。ここで用いた基準値 (135mmHg) は、JSH2000、JNC-7、ESH/ESC2003 に示されている家庭収縮期血圧の基準値であり、大迫研究がその根拠の一つとなっているものである。本調査の結果より、一般的に降圧治療を受けている高血圧患者の少なくとも半数は、各ガイドラインの基準値によれば、家庭血圧コントロールが十分でないと推測された。コントロール不十分群は降圧薬服用数が多く、一部には多剤投与にもコントロール困難な重症高血圧患者が含まれていると考えられる。

本調査では、対象患者の 58% において随時収縮期血圧が  $\geq 140$  mmHg であり、JNC-7、ESH/ESC 2003 ガイドラインの基準値によれば、外来血圧コントロールが不十分であった。しかしながら本対象患者の平均年齢は 66 歳であり、70 歳以上の高齢者の割合も 43% と半数近くを占めていた。70 歳以上の高齢高血圧者の外来収縮期血圧の降圧目標について、JSH 老年者高血圧ガイドラインでは忍容可能であれば 140mmHg 未満を理想としながらも、70-79 歳で 150mmHg 未満、80 歳以上で 160mmHg 未満、と高めの目標値も提唱している。今回、対象患者の 58% において、外来収縮期血圧は 140mmHg 以上であった。この結果は、JSH 老年者ガイドラインにおける降圧目標に沿った外来血圧コントロール状況を反映したものである可能性もある。家庭血圧については、いずれのガイドラインにおいても年齢ごとの降圧目標は提唱されていない。しかしながら、家庭血圧高値群は他の群に比べ高齢であり、外来血圧と同様に家庭血圧においても高齢高血圧者において降圧目標が高めに設定されていた可能性もある。

#### E. 結論

本邦における降圧療法中の高血圧人口のうち良好な血圧コントロールを受けているものは 20% にすぎない。人口の高齢化に伴う腎硬化症と

腎不全の予防には早期に十分な血圧コントロールが不可欠である。今後、血圧コントロール状況の改善が待たれる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

大久保孝義、小原拓、舟橋仁、菊谷昌宏、橋本潤一郎、今井潤：家庭血圧コントロール状況に関する全国調査（J-HOME 研究）中間発表. *Ther. Res.* 24: 1849-1855, 2003.

Imai Y, Otsuka K, Kawano Y, Shimada K, Hayashi H, Tochikubo O, Miyakawa M, Fukiyama K: Japanese Society of Hypertension (JSH) Guidelines for self-monitoring of blood pressure at home. *Hypertens. Res.* 2003; 26:771-782.

##### 2. 学会発表

大久保孝義他：家庭血圧コントロール状況に関する全国調査研究第一次報告：対象者の特性および主治医による家庭血圧値の評価「家庭血圧コントロール状況に関する全国調査研究グループ」を代表して. 第26回日本高血圧学会総会.2003;宮崎.

#### G. 研究協力者

大久保 孝義、小原 拓、舟橋 仁、菊谷 昌治、橋本 潤一郎



厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）  
分担研究報告書

「難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成  
に関する研究」

-腎ネットワークを活用した半月体形成性腎炎（急速進行性糸球体腎炎症候群）  
の発症・進展機序解明とその予防・治療法の確立に関する研究 -

分担研究者 木田 寛 国立金沢病院

研究協力者 金沢大学医学部附属病院血液浄化療法部 和田 隆志, 横山 仁,  
国立金沢病院内科 吉村 光弘, 伊勢 拓之

研究要旨

研究要旨 病理学的に半月体形成を特徴とするヒト半月体形成性腎炎は臨床的に急速進行性糸球体腎炎症候群(RPGN)を呈し予後不良な疾患群である。その予後にはたす間質病変の重要性が示されているが詳細な分子機序は不明である。本研究では1.RPGN群において、治療前尿中ケモカインであるMCP-1値は、非RPGN群および健常者群に比し有意に高値であり、急性型、潜行型ならびに病因による治療前尿中MCP-1値に有意差はなかった。2.尿中MCP-1値は、線維細胞性・線維性半月体形成率および間質CD68陽性細胞数と正相関を認めた。3.MCP-1発現が尿細管上皮細胞、尿細管周囲毛細血管内皮細胞および間質内浸潤単核細胞において確認された。4.ステロイド治療にて、RPGN群の尿中MCP-1値は有意に低下した。以上より、MCP-1は病因、病型にかかわらず間質病変を中心に、RPGNの発症・進展の共通因子として重要な役割をはたしていることが示された。

A. 研究目的

半月体形成性腎炎に代表される急速進行性糸球体腎炎症候群(RPGN)は糸球体硬化・間質線維化という共通の病理所見を示し腎不全に至る。この過程において、予後を規定する間質病変の発症・進展機序を明らかにすることは病態のさらなる理解とともに治療法の確立にむけ意義深いものと考えられる。しかしながら、病理学的な特徴

である半月体形成ならびに間質病変を生じる共通の分子生物学的背景については十分な検討がなされていない。

RPGN においては、その病因および病型を問わず糸球体ならびに間質にマクロファージ(MΦ)の浸潤を認めることが特徴である。MΦはサイトカイン、ケモカインといった各種炎症性メディエーターを放出することに加え、糸

球体上皮細胞はじめ腎固有細胞との相互作用により、半月体形成をはじめとする RPGN の病態に重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方、近年 MΦ/単球の遊走・活性化に monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 の重要性が指摘されている。

そこで本研究においては、RPGN の発症・進展における共通因子として、MΦ の浸潤・活性化に注目し、その遊走・活性化因子である MCP-1 の意義を病型・病因別に検討するとともに、ステロイド治療に伴う MCP-1 の動態についても検討した。

## B. 研究方法

腎組織生検または剖検にて腎病変を確認しえた 69 例と、健常者 20 例の計 89 例(男性 45 例, 女性 44 例, 平均年齢  $52.9 \pm 2.0$  歳)を対象とした。69 例のうち 30 例は全糸球体の 50%以上に半月体形成を認め臨床的に RPGN を呈した。その内訳は、抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連型 22 例, 免疫複合体(IC) 型 8 例であった。残りの 39 例は、半月体形成を認めず臨床的にも RPGN を呈さなかった IgA 腎症 15 例, ループス腎炎 18 例, 微小変化型ネフローゼ症候群 5 例, クリオグロブリン血症 1 例であった。また、血清クレアチニンの逆数( $1/Cr$ )を経時的にプロットして求めた近似直線の傾きから、RPGN 群を急性型(傾き  $-1.0 \times 10^{-2} dl/mg/day$  未満)と、潜行型(傾き  $-1.0 \times 10^{-2} dl/mg/day$  以上)の 2 群に分類した。

さらに尿中 MCP-1 値を測定し尿中クレアチニン値で補正した。腎内の MCP-1 の局在を確認し、病理学的指標とともに検討した。なお倫理面への配慮は十分にされている。

## C. 結果

### 1. RPGN における尿中 MCP-1 値

治療前尿 MCP-1 値は、RPGN 群で  $21.8 \pm 4.5 pg/mg \cdot creatinine$  と、非 RPGN 群  $11.6 \pm 3.5 pg/mg \cdot creatinine$  および健常者群  $1.0 \pm 0.1 pg/mg \cdot creatinine$  に比し有意に高値( $P < 0.01$ )であった。一方、非 RPGN 群も健常者群に比し有意に高値( $P < 0.05$ )であった(図 1)。

### 2. 病型別における尿中 MCP-1 値

RPGN 群を急性型 12 例(傾き;  $-2.0 \pm 0.3 \times 10^{-2} dl/mg/day$ ; 男性 8 例, 女性 4 例, 平均年齢 68.2 歳)と潜行型 18 例(傾き;  $-0.4 \pm 0.1 \times 10^{-2} dl/mg/day$ ; 男性 10 例, 女性 8 例, 平均年齢 58.6 歳)の 2 群に分け、治療前尿中 MCP-1 値を比較検討した。尿中 MCP-1 値は急性型 ( $25.4 \pm 10.4 pg/mg \cdot creatinine$ )、潜行型 ( $20.4 \pm 3.7 pg/mg \cdot creatinine$ )ともに非 RPGN 群、健常者群に比し有意に高値であったが( $P < 0.01$ )、両病型間には有意差は認められなかった。

### 3. 病因別における尿中 MCP-1 値

また、RPGN 群を病因により ANCA 関連型 22 例(男性 12 例, 女性 10 例; いずれも P-ANCA 陽性)と IC 型 8 例(男性 6 例, 女性 2 例; ループス腎炎 3 例, IgA 腎症 4 例, クリオグロブリン血症 1 例)の 2 群に分け、同様に比較検討した。ANCA 関連型 ( $25.3 \pm 7.1 pg/mg \cdot$

creatinine), IC 型( $17.8 \pm 3.0$ pg/mg · creatinine)の, いずれも非 RPGN 群, 健常者群に比し有意に高値であった ( $P < 0.01$ )が, 両病因間に有意差は認められなかった.

#### 4.尿中 MCP-1 値と組織所見との相関

RPGN30 例において, 治療前尿中 MCP-1 値は線維細胞性・線維性半月体形成率と有意な正相関が認められた ( $r=0.455, P < 0.05, n=31$ ). しかし総半月体形成率とは相関の傾向を示すのみで ( $r=0.422, P=0.05, n=31$ ), 細胞性半月体形成率との間には相関を認めなかった. 一方, 治療前の尿中 MCP-1 値と間質病変との比較において, 間質内 CD68 陽性細胞数と有意な正相関が認められた ( $r=0.749, P < 0.01$ ).

#### 5.MCP-1 の腎における局在

腎局所での MCP-1 の局在を明らかにするため, 免疫組織染色を施行した. MCP-1 は間質, とくに尿細管上皮細胞, 尿細管周囲毛細血管内皮細胞および浸潤単核細胞に陽性であった. なお, マウスコントロール IgG ならびに, リコンビナントヒト MCP-1 で吸収した抗体を用いた染色では, いずれも陰性であった.

#### 6.ステロイド治療に伴う尿中 MCP-1 の動態

RPGN 群 30 例全例に, メチルプレドニゾロン(m-PSL)療法に加えて経口ステロイドが投与され, そのうち急性型 6 例(男性 5 例, 女性 1 例), 潜行型 7 例(男性 3 例, 女性 4 例)の計 13 例は, 治療前後で検体を採取し尿中 MCP-1

値を測定しえた. この RPGN 群 13 例において尿中 MCP-1 値は, 治療前  $15.9 \pm 2.3$ pg/mg · creatinine, 治療後  $8.3 \pm 2.2$ pg/mg · creatinine と疾患活動性の低下に一致して有意に低下した ( $P < 0.01$ , 図 2a).

さらに病型別では, 急性型ならびに潜行型のいずれにおいても, 治療前  $14.2 \pm 1.3$ pg/mg · creatinine,  $17.4 \pm 4.2$ pg/mg · creatinine からそれぞれ治療後  $7.8 \pm 2.1$ pg/mg · creatinine,  $8.7 \pm 3.7$ pg/mg · creatinine へと有意に低下した(各々  $P < 0.05$ , 図 2b, c).

#### D. 考察

今回の検討より, MΦの遊走・活性化因子である MCP-1 は, 治療前 RPGN 群において, その病型・病因を問わず非 RPGN 群および健常者に比し有意に高値であることが判明した. 加えて, MCP-1 が RPGN の両病型および両病因に差が認められなかったことより, RPGN の発症・進展における共通因子として, MCP-1 の重要性が推測された.

これまで MCP-1 は, ループス腎炎における糸球体内細胞浸潤および急性間質性腎炎における間質内細胞浸潤に深く関与する可能性が示されてきた. さらに細胞浸潤のみならず線維化をはじめ慢性期の間質病変の進展に重要な役割をはたすことも IgA 腎症をはじめとする種々の腎疾患および動物実験モデルにおいて指摘されてきた. すなわち, 炎症性腎疾患において MCP-1 は間質病変を中心として, 急性期の細胞浸潤から硬化・線維化に

至る一連の過程における重要性が考えられている。今回の結果により、MCP-1 が発症様式を問わず急性型、潜行型いずれにも深く関与することが示され、共通の進展因子としての MCP-1 の重要性を再認識させるものと考えられる。

また、尿中 MCP-1 は、RPGN の ANCA 関連型ないし IC 型といった病因にかかわらず上昇していた。ANCA 関連腎炎においては、その病態に ANCA-cytokine sequence theory が提唱されており、TNF- $\alpha$  をはじめとした炎症性サイトカインの病態への関与が指摘されている。かかる炎症性サイトカインは、腎固有細胞であるメサングウム細胞および尿細管上皮細胞において MCP-1 産生の重要な刺激因子である。一方 IC 型においても、臨床的に RPGN を呈した症例も含めて、ループス腎炎、IgA 腎症など各種ヒト腎疾患において糸球体および間質病変の形成に TNF- $\alpha$  の関与が示されている。このことから、RPGN においては ANCA 型、IC 型といった病因にかかわらず、炎症性サイトカイン発現を介した MCP-1 の発現が共通病態として推測された。

さらに、尿中 MCP-1 値と組織所見を検討したところ、MCP-1 は線維細胞性・線維性半月体形成率、間質 CD68 陽性細胞数と有意な正相関を認めた。また、免疫組織染色法にて、MCP-1 は尿細管上皮細胞、尿細管周囲毛細血管内皮細胞および間質内浸潤単核細胞に陽性であった。これらより RPGN

の発症・進展において、腎局所で産生された MCP-1 は、線維細胞性・線維性半月体のみられる病期を中心に、主として間質病変に深く関与している事が示唆される。近年、腎機能低下には、糸球体病変に比し、間質病変がより密接な関係があることが報告されている。この点に関しこれまでわれわれは種々の実験腎炎モデルで MCP-1 の間質病変における重要性を指摘してきた。MCP-1 を介した間質病変への関与の機序として、M $\Phi$  の局所への遊走ならびに活性化が重要と考えられる。すなわち、活性化 M $\Phi$  は、腎組織障害をもたらすライソゾーム酵素の分泌やスーパーオキシドの産生にくわえて、間質線維化との関連が指摘されている TGF- $\beta$  も産生する。このことから、IL-1, TNF- $\alpha$  などの炎症性刺激により活性化された腎固有細胞あるいは浸潤細胞から産生された MCP-1 が、病因・病型を問わず共通因子として、さらなる M $\Phi$  の遊走・活性化を介して、ことに間質病変に対して重要な役割をはたしている可能性が考えられる。これまでループス腎炎、IgA 腎症において間質細胞浸潤、線維化および尿細管萎縮の進展とともに尿中 MCP-1 は高値をとることを報告しており、間質病変の進展と MCP-1 の関与が示唆される。

RPGN 群において、m-PSL パルス療法による疾患活動性の低下とともに、病型に関係なく尿中 MCP-1 値は有意に低下した。このことから、尿中 MCP-1 値は RPGN の疾患活動性を反