

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「ラット馬杉腎炎における TLR の発現」

研究協力者 柴田孝則  
昭和大学医学部腎臓内科准教授

研究要旨

complete adjuvant (CA)によるWKYラット馬杉腎炎の増悪機序を検討するため、本モデルにおける腎病変局所のtoll-like receptor (TLR) の発現について、nephrotoxic serum (NTS) 静注後、day 4, 7, 14, 21で免疫組織化学的に検討した結果、CA前処置馬杉腎炎群では、CA未処置馬杉腎炎群に比し、有意に強いTLR 1, 6の発現を認めた。その発現はday 7で強くなりday 21まで持続した。TLR 3, 4の発現は認めなかった。なお、ED-1陽性細胞（マクロファージ：Mφ）の浸潤はday 4～7がピークであった。また、ED-1とTLR 6の二重染色の結果、TLR 6は浸潤Mφのみならず、それ以外の部位でも発現を認めた。

A. 研究目的

慢性糸球体腎炎の患者においては急性上気道炎などの感染症がしばしば増悪因子となるが、これには感染による toll-like receptor (TLR) を介した自然免疫の活性化が関与している可能性が考えられる。我々は、既に、complete adjuvant (CA) 単独を前処置した WKY ラットではごく軽度の馬杉腎炎を惹起する量のラビット抗ラット糸球体基底膜抗血清 (nephrotoxic serum: NTS) の投与でも馬杉腎炎が著しく増悪することを報告した。今回、この腎炎増悪機序に自然免疫活性化が関与する可能性を考え、腎病変局所における TLR の発現について検討した。

B. 研究方法

CA と PBS のエマルジョンを 14 日前に皮内に注射した WKY ラットと PBS 処置の WKY

ラットに対し、day 0 にごく軽度の馬杉腎炎を誘導する量の NTS (1.25  $\mu$ l/ラット) を 1 回静注し馬杉腎炎を惹起させ、蛋白尿と腎の組織病変を比較検討した。TLR の発現については免疫組織化学的に検討した。

(研究の倫理面への配慮)

昭和大学動物実験委員会の承認を得て実験を行った。

C. 結果

CA 前処置 WKY ラット馬杉腎炎群 (CA 群) では有意な蛋白尿が day 2 で出現し、day 14 以降高度となったのに対し、PBS 前処置 WKY ラット馬杉腎炎群 (PBS 群) では軽微な蛋白尿を認めるのみであった。病理組織学的には、CA 群では、day 4 で糸球体に半月体が出現し、day 14 で半月体形成率は高度となった。PBS 群の半月体形成率は day 7 の

約 10% をピークに以後減少した。CA 群では、ED-1 陽性細胞（マクロファージ：Mφ）の顕著な浸潤を認めたが、PBS 群ではわずかに認めるのみであった。TLR に関する免疫組織化学的検討では、CA 群では day 7 をピークに TLR 1 と 6 が糸球体に認められ、TLR 3 と 4 は陰性であった。また、ED-1 と TLR 6 の二重染色の結果、TLR 6 は浸潤 Mφ のみならず、それ以外の部位でも発現を認めた。Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞は、day 7 をピークに糸球体内の細胞および尿細管細胞で顕著に増加していた。また、興味深いことに、CA 群では脾臓においても PCNA 陽性細胞の有意な増加を認めた。

#### D. 考察

近年、Mφ や樹状細胞などの自然免疫担当細胞における TLR による病原体構成成分の認識が、炎症性サイトカインや副刺激分子の遺伝子発現を誘導し自然免疫を活性化させること、また、以前から免疫学的には、CA は抗原を免疫する際に免疫賦活剤としての作用をもつことが知られているが、これは樹状細胞上の TLR を介した自然免疫系の活性化によるものであることが明らかとなっている。今回、CA 単独を前処置した WKY ラットに微量の NTS を静注するモデルにおける馬杉腎炎の増悪機序として、CA と免疫担当細胞における TLR との interaction を推測し、腎炎増悪における自然免疫の関与について腎炎局所で検討した結果、有意な TLR 1 と TLR 6 の発現を糸球体に認めた。実際、CA には TLR のリガンドとなる活性物質が含まれていることから、それが Mφ などの TLR と反応し自然免疫を活性化し病変

の進展に関与した可能性が考えられる。TLR の局在、時間経過を含めた PBS 群との比較についてはさらに検討中である。

また、腎における TLR の mRNA の発現や、脾臓、リンパ節における TLR の発現については今後の検討課題である。

#### E. 結論

CA による WKY ラット馬杉腎炎の増悪に、TLR を介した自然免疫活性化が関与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

#### H. 研究発表

準備中

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「I g A腎症の腎生検時における蛋白尿および腎機能と腎組織との相関に関する統計学的解析」

研究協力者

城 謙輔<sup>1)</sup>、中里 毅<sup>2)</sup>、小池健太郎<sup>1)</sup>、今澤俊之<sup>1)</sup>、北村博司<sup>1)</sup>、吉村 光弘<sup>3)</sup>、鈴木理志<sup>4)</sup>  
国立病院機構千葉東病院免疫病理研究部<sup>1)</sup>、同病院内科<sup>2)</sup>  
国立病院機構金沢医療センター内科<sup>3)</sup>  
聖隷佐倉市民病院内科<sup>4)</sup>

研究要旨

IgA腎症の組織学的障害度分類を作製するにあたり、腎生検時の組織病変とその臨床予後（透析導入率）との関連が機軸となっている。しかし、腎生検が治療方針の決定に役立つためには、臨床予後の情報のみならず、腎生検時の臨床情報と組織病変との関連に関する情報が必要となる。そこで、I g A腎症患者の腎生検時における蛋白尿と腎機能の程度の組み合わせで、活動性ならびに慢性病変の進行をどこまで予測できるかの統計学的証拠を得ることを目的とした。まず、成人417例を対象に、各組織病変を独立変数として蛋白尿ならびに腎機能への予測を回帰分析でおこなった。次に、一日蛋白尿 腎機能（eGFR）の程度を3段階に分けて9通りの組み合わせから臨床像を特徴づけ、一方、各病変を持つ糸球体の%の平均値を算出し、蛋白尿ならびに腎機能の高低と病変パラメーターとの相関を2元配置分散分析にて解析した。その結果、成人I g A腎症患者の腎生検時の蛋白尿ならびに腎機能は、いずれも慢性病変との相関が主体で活動性病変単独での関与は少なかった。そのため、腎生検による活動性病変の発見が重要である。また、活動性病変の取り扱いが、治療面からみたりリスク層別化分類において注目点となる。

A. 研究目的

IgA腎症の組織学的障害度分類を作製するにあたり、腎生検時の組織病変とその臨床予後（透析導入率）との関連が機軸となっている。しかし、腎生検が治療方針の決定に役立つためには、臨床予後の情報のみならず、腎生検時の臨床情報と組織病変との関連に関する情報が必要となる。

今回の研究は、I g A腎症患者の腎生検時における蛋白尿の程度と腎機能の程度との組み合わせで、どこまで腎組織を予測できるかについて統計学的な証拠を得ることを目的とした。

B. 研究方法

成人I g A腎症417例を対象に、一日

蛋白尿の程度を 1.0g/day 未満 (UP0) , 1.0g/day 以上 3.0g/day 未満 (UP1), 3.0g/day 以上 (UP2) の 3 段階に、腎機能の指標として eGFR (男:  $186.3 \times \text{血清クレアチニン値} \text{Cr}^{-1.154} \times \text{年齢}^{-0.203}$ , 女:  $\text{男 eGFR} \times 0.742$ ) を用い、eGFR が 60ml/min 未満 (GFR0) , 60ml/min 以上 90ml/min 未満 (GFR1) , 90ml/min 以上 (GFR2) の 3 段階に分けて、その 9 通りの組み合わせから臨床像を特徴づけた。組織像では、疾患活動性 (A) を示す病変として、メサンギウム細胞増殖 (AGm)、活動性管内病変 (AGi)、管外性の細胞性 (線維細胞性) 半月体 (AGe), そして、間質内炎症細胞浸潤のひろがり (Ai) を、疾患の慢性 (C) を示す病変として、球状糸球体硬化 (CGs), メサンギウム基質増加 and/or 虚脱 (CGi)、線維性半月体 or 癒着 (CGe), 間質中の線維性拡大のひろがり (Ci) に着目し、全糸球体数における上記病変糸球体の占める割合を % で表示した。

統計的手法では、上記の病理パラメーターによる蛋白尿ならびに腎機能の予測を回帰分析で行い、蛋白尿の高低ならびに腎機能の高低と病変パラメーターとの相関を 2 元配置分散分析で行った。

#### (研究の倫理面への配慮)

本研究に関する患者情報および病理診断のデータベース蓄積の利用に関しては、疫学的手法を用いた研究等の適正な推進の在り方に関する専門委員会による「疫学的手法を用いた研究等に関する倫理指針」に準拠して倫理委員会の承諾を得た。腎生検に際しては、十分な説明のもとに患者から書面にて同意書を取った。研究データは、特定の個人表示がないような形で処理された。

## C. 結果

組織病変を独立変数として、蛋白尿ならびに腎機能の予測を回帰分析でおこなった結果、蛋白尿の予測では、単回帰において、AGm, AGi, AGe, Ai, CGs, CGi, CGe, Ci の決定係数 ( $R^2$ ) は、それぞれ、0.08, 0.05, 0.02, 0.19, 0.13, 0.20, 0.22, 0.21 であった ( $p < 0.01$ )。重回帰においては、CGe, Ci, AGi, CGi が選ばれ ( $R^2 = 0.34$ )、それぞれの寄与度はそれぞれ 0.22, 0.04, 0.04, 0.02 であった ( $p < 0.01$ )。腎機能の予測では、単回帰において、AGm, AGi, AGe, Ai, CGs, CGi, CGe, Ci の  $R^2$  は、0.01\*, ns, ns, 0.10, 0.22, 0.10, 0.08, 0.21 であった ( $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , NS: not significant)。重回帰では、CGs と Ci が選ばれ ( $R^2 = 0.25$ )、それぞれの寄与度は 0.22, 0.03 であった ( $p < 0.01$ ) (図 1)。

次に、PU0, 1, 2 と GFR0, 1, 2 の組み合わせによる 9 群において、各組織病変の % の平均値を算出し、蛋白尿の高低ならびに腎機能の高低と病変パラメーターとの相関を見るために 2 元配置分散分析をおこなった。その結果、蛋白尿の高低は、AGm, AGe, Ai, CGs, CGi, CGe, Ci において有意な相違をみとめた ( $p < 0.01$ )。腎機能 eGFR の高低は、Ai, CGs, CGi, CGe, Ci において有意な相違をみとめた ( $p < 0.01$ )。蛋白尿の高低ならびに腎機能の高低は、Ai, CGi, CGe, and Ci において、交互作用を認めた ( $p < 0.01$ ) (図 2)。以上、成人 IgA 腎症患者の蛋白尿ならびに腎機能は、いずれも慢性病変との相関が主体で、急性病変単独での関与は少ないため、急性病変の発見には腎生検が必須であると思われた。

## D. 考察

リスク層別化分類において、組織学的重症度が同じでも、活動性病変が主体であると臨床的 stage が軽症になり、慢性病変が主体であると stage が重症となる (図3)。その取り扱いが、治療面からみたリスク層別化分類において今後の注目点となる。

## E. 結論

腎生検を治療方針の決定に役立てるため、腎生検時の臨床情報と組織病変との関連に関する統計学的証拠を提出した。

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Joh K, Koike K, Kitamura H, Imasawa T, Nakazato T, Histological lesions as predictors for clinical prognosis and effectiveness of steroid therapy in IgA nephropathy; Uni- and multivariate analysis on 275 adult patients. *Nephrol Frontier*, 6:314-315, 2007

2. Joh K, Koike K, Kitamura H, Imasawa T, Nakazato T. Histological scoring predicts progression of renal failure in adult IgA nephropathy patients without steroid therapy. *Contr Nephrol* 157:195-196, 2007

3. Joh K. Pathology of glomerular deposition diseases. *Pathol Int* 57:551-565, 2007

4. Joh K. Pathology of glomerular deposition diseases and fibrillary glomerulopathies associated with

paraproteinemia and haematopoietic disorder. *Nephrology* 12, s21-24, 2007

5. Walker PD, Ferrario F, Joh K, Bonsib S M. Dense deposit disease is not a membranoproliferative glomerulonephritis. *Modern Pathology* 20, 605 - 616, 2007

6. Kitamura H, Udagawa J, Imasawa T, Koike K, Kurayama H, Joh K. Response of the steroid therapy and histological parameters of childhood IgA nephropathy. *Contr Nephrol* 157:210-211, 2007

7. Koike K, Nakazato T, Imasawa T, Kitamura H, Joh K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis selects histological parameters and determines their severity for renal functional impairment of IgA nephropathy. *Contr Nephrol* 157:196-197, 2007

15. 城謙輔、小池健太郎、北村博司、小此木英男、宇都宮保典、川村哲也。IgA腎症病理診断の標準化。腎と透析。64巻43-50, 2008。

16. 城謙輔。代表的腎生検の病理診断。腎疾患を外来で診る。編集。林松彦、飯野靖彦。診断と治療社 東京、pp252-275, 2007

### 2. 学会発表

1. Joh K, Koike K, Imasawa T, Kitamura H. Statistical analysis on the correlation between grade of proteinuria, as well as eGFR, and histological parameters in adult IgA nephropathy. October, San Francisco, USA. *J Am Soc Nephrol* 18, 219A, 2007

2. Kitamura H, Imasawa T, Koike K, Miyashita A, Joh K. Kinetics of lymphatic capillary during the development of interstitial fibrosis. October, San Francisco, USA. J Am Soc Nephrol 18, 220A, 2007

3. Tuboi N, Kawamura T, Okonogi H, Koike K, Ishii T, Hirano K, Miyazaki Y, Ogura M, Kitamura H, Joh K, Utsunomiya Y, Hosoya T. Glomerular density predicts a long-term renal prognosis in the early stage of IgA nephropathy. October, San Francisco, USA. J Am Soc Nephrol 18, 320A, 2007

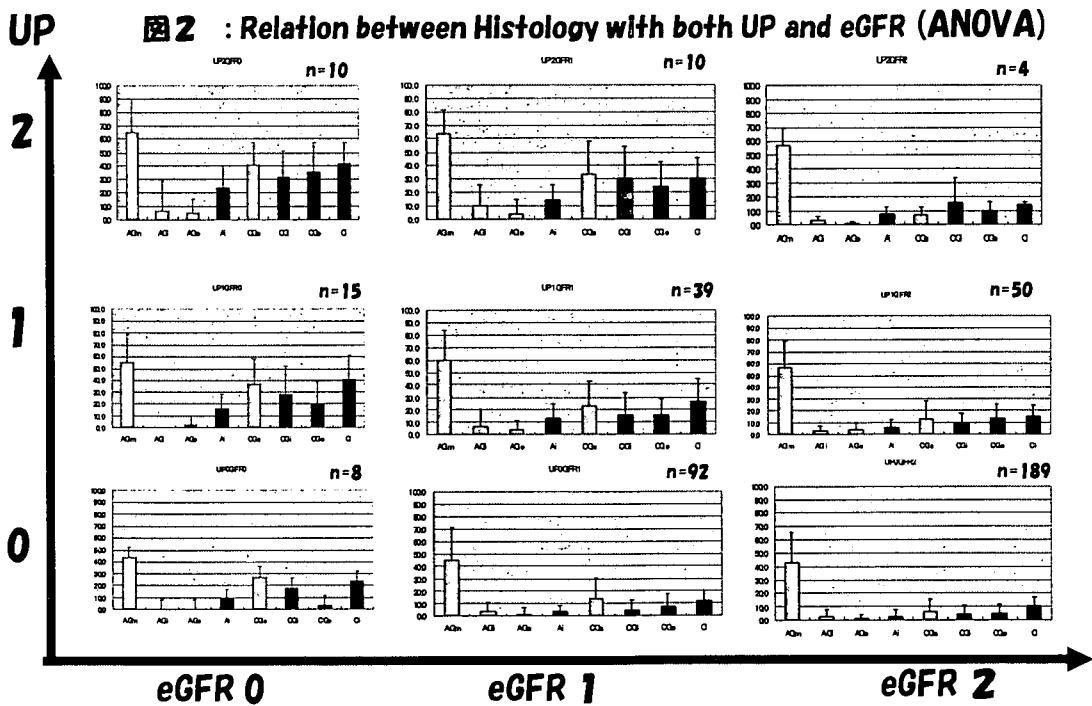
4. Monkawa T, Sekine M, Taya C, Matsuoka K, Inukai M, Morizane R, Yoshino J, Joh K, Itoh H, Yayashi M, Suzuki A, Yonekawa H. Selective ablation of tubular cells in proximal tubules S3 segment mediated by Diphtheria Toxin receptor. October, San Francisco, USA. J Am Soc Nephrol 18, 386A, 2007

5. Joh K. Standardization of renal biopsy diagnosis on membranoproliferative glomerulonephritis. The 3rd Korean-Japanese Renal Pathology Conference. October 27, Jeju, Korea, 2007

6. Joh K. Pathology of Glomerular Deposition Disease and Fibrillary Glomerulopathies associated with Paraproteinemia and Hematopoietic Disorder. The 5th Korea-Japan Nephrology Forum. Glomerular diseases. March 17. Busan, Korea, 2007

**図1** : A grade of correlation between histology and UP as well as eGFR (expressed by coefficient of determination (R2) using linear regression analysis) (P<0.01 \* =P<0.05 in each parameter)

R2		AGm メサンチウム	AGI 急性管内	AGe 急性管外	Ai 間質炎症	CGs 糸球体硬化	CGi 虚脱	CGe 慢性管外	CI 間質線維化	
UP 蛋白尿	simple regression	0.08	0.05	0.02	0.19	0.13	0.20	0.22	0.21	
	multiple regression		0.04				0.02	0.22	0.04	0.35
eGFR	simple regression	0.01*			0.10	0.22	0.10	0.08	0.21	
	multiple regression					0.22			0.03	0.25



**図3：IgA腎症患者の透析導入リスクの層別化（案）**

臨床病期 \ 組織学的重症度	Grade (A+C) (A>C)	Grade (A+C) (C>A)	
Stage 1	↑	↓	
Stage 2			
Stage 3			

↑  
蛋白尿と腎機能の程度により分類



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「小児期発症IgA腎症に対する扁桃摘出+後療法ミゾリビン治療の  
中期的効果」

研究協力者 服部元史  
東京女子医科大学腎臓小児科教授

研究要旨

【背景】小児 IgA 腎症に対する経口ステロイド治療ではステロイド中止後に再燃する症例が少なからず存在し、再燃例ではステロイドの副作用、とくに成長障害が問題となる。ステロイドの副作用を軽減し、また腎炎の完全寛解を目指した、扁桃摘出+ステロイドパルス+ミゾリビン後療法（以下、扁桃摘出パルス）を試み、その中期的治療効果を検討した。【方法】血尿+蛋白尿を呈し、10%以上の糸球体に急性分節性病変を認めた小児期発症 IgA 腎症 19 例（初回治療群 9 例、ステロイド治療後の慢性再発群 10 例）を対象とした。扁桃摘出後、ステロイドパルス 3 クール、後療法としてミゾリビンを 1 年間投与し、治療開始 2 年後の治療効果を検討した。【結果】完全寛解（血尿、蛋白尿とも陰性）率は初回治療群 44.4%、慢性再発群 20%であった。初回治療群に血尿+蛋白尿の持続や再燃はなかったが、慢性再発群の 50%は血尿+蛋白尿が持続し、半数は感染に伴う肉眼的血尿で再燃した。【結論】扁桃摘出パルスは、発症後早期に行えば臨床寛解が期待できる。しかし慢性再発例のなかには、感染に伴う腎炎増悪の連鎖が断ち切れない症例が存在した。

A. 研究目的

小児 IgA 腎症に対する経口ステロイド治療ではステロイド中止後に再燃する症例が少なからず存在する。再燃例に対してステロイドを繰り返し投与する場合には、ステロイドの副作用、とくに成長障害が問題となる。近年、扁桃腺摘出+ステロイドパルス療法+ステロイド後療法が、IgA 腎症を完治させ得る可能性が示されつつある。そこで、小児期発症 IgA 腎症を完治させる治療プロトコルの確立を目指し、ステロイ

ドの副作用にも十分配慮して後療法としてミゾリビン単剤を投与するプロトコール、扁桃腺摘出+ステロイドパルス療法+ミゾリビン後療法（以下、扁桃摘出パルス）を試みてきた。今回、小児期発症 IgA 腎症に対する、本治療プロトコールの中期的治療効果を検討したので報告する。

B. 研究方法

血尿+蛋白尿を呈し、10%以上の糸球体に急性分節性病変を認めた小児期発症 IgA

腎症 19 例（初回治療 A 群；9 例、ステロイド治療後の慢性再発 B 群；10 例）を対象とした。19 例の平均発症年齢は 12.0 歳、本治療プロトコール開始時平均年齢は 19.4 歳であった。

扁桃摘出後、ステロイドパルス（メチルプレドニゾロン 20 mg/kg/回、最高 500 mg）3 クール、後療法としてミゾリピンを 1 年間投与し、治療開始 2 年後の尿所見、臨床完全寛解（尿異常なし）の有無、治療中の有害事象について、A 群、B 群に分けて検討した。

### C. 結果

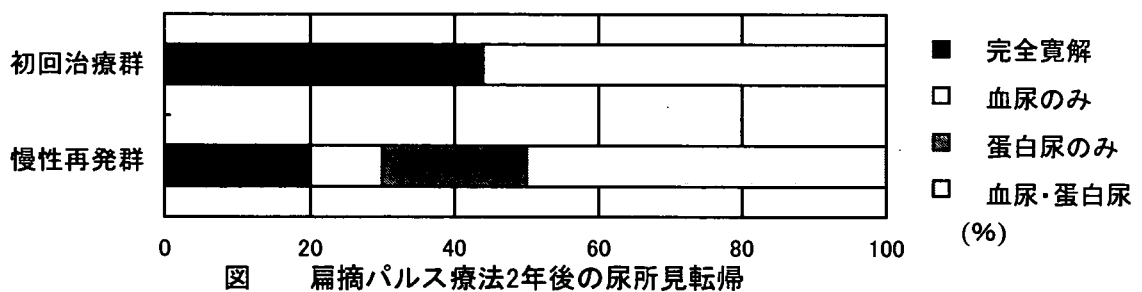
完全寛解（血尿、蛋白尿とも陰性）率は初回治療群 44.4%、慢性再発群 20%であった。初回治療群に血尿＋蛋白尿の持続や再燃はなかったが、慢性再発群の 50%は血尿＋蛋白尿が持続し、5 例中 3 例は感染に伴う肉眼的血尿で再燃した（図）。全対象例で治療に伴う重篤な有害事象は認められなかった。

特に、蛋白尿＋血尿を認める症例では、慢性病変の蓄積に加えて、急性炎症の持続が示唆され、今後慢性腎不全に進行することが危惧される。

近年、持続する急性炎症を断ち切ることを目的として、扁桃摘パルス＋ステロイド後療法プロトコールが、IgA 腎症を完治させ得る可能性が示されている。しかし、ステロイドが小児の身体発育に及ぼす弊害は避けがたい。

本研究では、小児期発症の IgA 腎症に対し、長期ステロイド内服による成長障害や肥満などの問題を回避する目的で、後療法にミゾリピンを投与

する扁桃摘パルス＋ミゾリピン後療法を試み、その中期的治療効果を検討した。その結果、本治療を発症後早期に行えば臨床完全寛解が期待でき、尿所見が残存した症例も軽微な血尿のみであり、治療終了後の再燃がない点でも、本治療の有効性が示された。一方、慢性再発例では、臨床完全寛解率は 20%に止まり、寛解に至らなかった症例中には、



### D. 考察

小児 IgA 腎症の中には、ステロイド治療にて短期的な効果（とくに蛋白尿減少効果）は得られるものの、その後のステロイド減量・中止過程で再燃し、成人期までキャリアオーバーする症例が少なからず存在する。

上気道感染に伴う肉眼的血尿から再燃している症例が認められたことから、慢性再発例の中には、扁桃摘パルス＋ミゾリピン後療法でも IgA 腎症増悪のプロセスから脱することができない症例があることが示された。

## E. 結論

扁桃摘パルスは、発症後早期に行えば臨床完全寛解が期待できる。しかし慢性再発例のなかには、感染に伴う腎炎増悪の連鎖が断ち切れない症例が存在することが明らかにされた。

## F. 健康危険情報

該当せず

## G. 知的所有権の出現登録状況

該当せず

## H. 研究発表

### 1. 学会発表

1) Y Akioka, K Takahashi, M Fujieda, T Sawai, O Hotta, M Hattori: Tonsillectomy and steroid pulse therapy followed by mizoribine therapy for pediatric patients with severe IgA nephropathy. 11<sup>th</sup> International Symposium on IgA Nephropathy, 2006

2) Y Akioka, K Takahashi, M Fujieda, T Sawai, O Hotta, M Hattori: Treatment of tonsillectomy and steroid pulse therapy followed by mizoribine therapy for pediatric patients with severe IgA nephropathy. 2<sup>nd</sup> Congress of Asian Society of Pediatric Reserch, 2006

3) 秋岡祐子、高橋和浩、藤枝幹也、澤井 俊宏、服部元史：小児期発症の慢性、再発性IgA腎症に対する扁桃摘パルス＋後療法ミゾリビン療法の短期治療成績. 第42回日本小児腎臓病学会学術集会、2007

4) 秋岡祐子、高橋和浩、藤枝幹也、堀田修、服部元史：小児期発症の慢性、再発性IgA腎症に対する扁桃摘パルス＋後療法ミゾリビン療法の短期治療効果. 第30回IgA腎症研究

会、2007

5) Y Akioka, K Takahashi, M Fujieda, T Sawai, M Hattori: Treatment of tonsillectomy and steroid pulse therapy followed by mizoribine for pediatric patients with chronic relapsing severe IgA nephropathy. 14<sup>th</sup> congress of the international pediatric nephrology association, 2007

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「アドリアマイシン腎症におけるエリスロポエチンの腎保護効果の検討」

研究協力者 宮崎正信

長崎大学医学部・歯学部附属病院第二内科助教授

研究要旨

糸球体腎炎に伴う尿細管間質障害においてエリスロポエチン(EPO)の腎保護効果を検討するため、ヒトFGSモデルであるアドリアマイシン腎症(AN)マウスを用い研究を行った。ANマウスでは尿蛋白の増加に伴い尿細管間質障害の進行と腎機能障害を認めたが、EPO投与により組織障害と腎機能の改善を認めた。EPO投与群では腎皮質部の虚血改善やアポトーシスの抑制効果を認め、これらの作用によるEPOの腎保護効果が考えられた。以上の結果より糸球体腎炎に伴う尿細管間質障害に対しEPOが保護的作用を有することが示唆された。

A. 研究目的

エリスロポエチン(EPO)は赤血球前駆細胞上のレセプターに作用し、赤血球の産生を促進する造血ホルモンとして臨床の間でも幅広く利用されている。しかし近年、赤血球前駆細胞のみならず、腎組織におけるEPO受容体の存在が示されており、EPOが貧血改善作用を介さず、直接的に腎局所に作用し効果を発揮することが示唆されている。我々はFGSモデルであるアドリアマイシン腎症(AN)モデルマウスを用いて、糸球体腎炎に伴う尿細管間質障害に対するEPOの腎保護効果を検討した。

B. 研究方法

BALB/cマウスに尾静脈よりアドリアマイシンを投与しANを惹起した。7日目よりEPO(600IU/kg)を週1回腹腔内投与し(EPO

投与群)、14、28日目における腎組織、腎機能変化、ヘマトクリット値をEPO非投与群(AN群)と比較した。

(研究の倫理面への配慮)

長崎大学動物実験施設の規則に従って施行した。

C. 結果

AN群では14日目、28日目ともに著明な尿細管障害と間質の線維化を認めたが、EPO投与群では14、28日目ともにこれらの障害が有意に改善された。血液検査では、ヘマトクリット値は両群間で有意な差を認めなかったが、血清クレアチニン値の有意な改善を認めた。尿蛋白量はEPO投与群においてAN群と比較して減少傾向がみられたが、統計学的有意差は得られなかった。

また、AN 群では CD34 陽性の尿細管周囲毛細血管 (PTC) 領域の減少を認めたが、EPO 投与群では PTC 領域が温存されていた。更に AN 群では低酸素検出試薬である Pimonidazole を用いた染色により、腎皮質の虚血性変化が認められたが、EPO 投与群ではこの虚血変化は著明に減少していた。また EPO 投与群では AN 群と比較して、HSP70 発現の亢進、TNUEL 陽性細胞数の減少を認め、細胞のアポトーシス誘導カスケードに重要な Active caspase 3 の発現も減少を認めた。

#### D. 考察

アドリアマイシン腎症(AN)は高度の蛋白尿をきたし、ヒトの FGS と類似の組織像を呈する実験モデルである。多量の蛋白尿に伴い尿細管障害、間質の線維化を認め、腎機能障害を呈する。

今回我々は AN マウスに EPO を投与することで、糸球体腎炎に伴う尿細管間質障害とそれに伴う腎機能障害の改善を得た。また EPO は AN における PTC の温存と腎皮質における虚血の改善、HSP70 の誘導と caspase 3 発現減少に見られる尿細管上皮のアポトーシスの抑制効果を示し、この作用により EPO の AN における腎間質障害軽減の効果が得られたものと考えられた。また本実験では EPO 投与によるヘマトクリット値の上昇を認めなかった。これは EPO の腎保護作用が貧血の改善を介さず、腎組織への直接的な作用によることを示唆している。

#### E. 結論

FGS モデルであるマウスアドリアマイシン腎症において EPO 投与により、尿細管間質

障害の軽減と腎機能の改善を認めた。EPO が糸球体腎炎における尿細管間質障害に対して保護効果を有することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 知的所有権の出現登録状況

特になし

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Miyake-Ogawa C, Miyazaki M, Abe K, et al: Tissue-Specific Expression of Renin-Angiotensin System Components in IgA Nephropathy. *Am J Nephrol.* Jan 7; 25(1): 1-12, 2005

2) Obata Y, Yamamoto K, Miyazaki M, et al.: Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem* May 6; 280(18): 18355-60, 2005

3) Nishioka Y, Horita Y, Miyazaki M, et al.: Mizoribine induces remission of relapsed ANCA-associated renal vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* (online)

4) Ashizawa M, Miyazaki M, Furusu A, et al.: Nephronophthisis in two siblings. *Clin Exp Nephrol.* Dec;9(4):320-5.2005

5) Kimura M, Asano M, Miyazaki M, et al.: Role of atrophic changes in proximal tubular cells in the peritubular deposition of type IV collagen in a rat renal ablation model. *Nephrol Dial Transplant.* Aug;20(8):1559-65. 2005

6) 原田孝司、阿部克成、宮崎正信 他： V. その他 3. 溶血性尿毒症症候群，血栓

性血小板減少性紫斑病 日本内科学会誌  
94(5); 925-929, 2005

7) 宮崎正信：〈腎臓に対する専門医の立場からのコメント：慢性腎疾患〉；血圧 12 (1)；114-115, 2005

8) 西野友哉、宮崎正信、河野 茂：特集「病氣と薬の説明ガイド 2005」腎炎(急性・慢性)；薬局 56 増刊号；602-612, 2005

9) 西岡克章、宮崎正信、河野 茂：CASE STUDY 1.脱水の診断と治療 臨床医 31(6)；686-690, 2005

10) 古巢 朗、宮崎正信、河野茂：§4 カリウム濃度の異常 輸液・水電解質異常 専門医にきく最新の臨床 中外医学社；78-99, 2005

11) 宮崎正信：2章 腎尿路疾患患者への一般的アプローチ ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑯ ⑰ ⑱ ⑲ ⑳ ㉑ ㉒ ㉓ ㉔ ㉕ ㉖ ㉗ ㉘ ㉙ ㉚ ㉛ ㉜ ㉝ ㉞ ㉟ ㊱ ㊲ ㊳ ㊴ ㊵ ㊶ ㊷ ㊸ ㊹ ㊺ ㊻ ㊼ ㊽ ㊾ ㊿ ㊿ どういうときに腎尿路疾患を疑うかー糸球体疾患を疑うとき レジデントのための腎疾患診療マニュアル医学書院；37-41, 2005

12) 宮崎正信：4章 原発性糸球体腎疾患患者へのアプローチ①病歴，臨床像による鑑別診断 ②蛋白量，腎機能の評価と検査，治療計画 ③慢性腎炎症候群・ネフローゼ症候群の診断と治療 レジデントのための腎疾患診療マニュアル 医学書院；173-205, 2005

13) 宮崎雅也、宮崎正信、河野 茂：IV. 腎疾患 12.ループス腎炎 14.アミロイドーシス 内科疾患診療マニュアル 中外医学社；481-486, 2005

14) 宮崎正信：The Expert Update Meeting - VALUE を臨床にどう応用するのかー 〈腎臓に対する専門医の立場からのコメント：慢性腎疾患〉；血圧 12 (1)；114-115,

2005

## 2. 学会発表

1) Nakazawa Y, Abe K, Miyazaki M, et al.: Recombinant human erythropoietin attenuates renal injury in adriamycin induced nephropathy. American Society of nephrology 38<sup>th</sup> Annual renal week meeting 2005

2) Obata Y, Miyazaki M, Abe K, et al.: HGF Gene Transfer by Macrophages Ameliorates Progression of Peritoneal Fibrosis in Mice. American Society of nephrology 38<sup>th</sup> Annual renal week meeting 2005

3) Abe K, Miyazaki M, Obata Y, et al.: Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) Enhances the Fibrotic Area in Chlorhexidine Gluconate Induced Peritoneal Fibrosis Model in Mice. American Society of nephrology 38<sup>th</sup> Annual renal week meeting 2005

4) Miyazaki M, Abe K, Xia Z, et al.: Heat shock protein47 (HS47) SiRNA ameliorates tubulointerstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. Nephrology 10 (Suppl.) A14, 2005

5) Horita Y, Tadokoro M, Miyazaki M, et al: Aldosterone breakthrough during combined angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker in patients with IgA Nephropathy. Nephrology 10(Suppl.) A37, 2005

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「脳卒中自然発症高血圧ラット(SHRSP)におけるアゼルニジピンとオルメサルタンの腎保護効果と浸潤マクロファージ並びに apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)の関連」

研究協力者 古巣 朗

長崎大学医学部・歯学部付属病院第二内科 講師

研究要旨

我々は SHRSP において、アゼルニジピンとオルメサルタンが腎組織のマクロファージ浸潤抑制を伴った腎保護効果を有することを報告してきた。今回、両薬剤のマクロファージ浸潤抑制機序を解明するため、腎組織における AIM の発現を検討した。vehicle、ヒドララジン群と比し、アゼルニジピン、オルメサルタン群で浸潤マクロファージ数、間質障害度の有意な低下を認めた。腎間質における AIM 陽性細胞数/マクロファージ数は、vehicle 群と比しアゼルニジピン、オルメサルタン群で有意に減少した。アゼルニジピンとオルメサルタンは AIM の発現制御を介し、腎局所におけるマクロファージの浸潤を抑制している可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、腎局所における浸潤マクロファージが、腎症の発症・進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。AIM は、酸化 LDL を取り込んだマクロファージから放出され、マクロファージ自身のアポトーシスを抑制する。

我々は SHRSP の腎組織において、有意な浸潤マクロファージ数の増加を伴った間質の線維化を認め、アゼルニジピンとオルメサルタン投与により浸潤マクロファージ数の抑制と腎保護効果を認めることを報告してきた。今回、両薬剤のマクロファージ浸潤抑制効果の機序を解明する目的で、腎組織における AIM の発現を検討した。

B. 研究方法

SHRSP(20週齢)を1群: vehicle 群、2群: アゼルニジピン群(10mg/kg/day)、3群: オルメサルタン群(3mg/kg/day)、4群: ヒドララジン群(20mg/kg/day)の4群に分け12週間経口投与し、32週齢での血圧、腎機能、腎組織障害度、腎組織における浸潤マクロファージ数並びに AIM の発現を検討した。

(研究の倫理面への配慮)

長崎大学動物実験施設の規則に従って施行した。

C. 結果

2~4群は1群と比し有意な血圧低下を認め、2~4群間でその低下度に有意差はなかった。1, 4群に比し2, 3群では、糸球体・間質障害、浸潤マクロファージ数の有意な低下を認めた。腎間質における AIM 陽性細胞数/マクロファ

ージ数は、1 群と比し 2, 3 群で有意に減少した。

#### D. 考察

SHRSP は、高血圧を呈すると共に腎間質の線維化と有意なタンパク尿の増加を認める動物モデルである

今回我々は、アゼルニジピン、オルメサルタン投与群で、腎間質における AIM 陽性細胞数 / マクロファージ数が vehicle 群、ヒドララジン群に比し有意に減少していることを明らかにした。これは、腎局所における浸潤マクロファージ数と相関しており、アセルニジピンとオルメサルタンは、AIM 発現の抑制を介して浸潤マクロファージ数が減少し、腎保護効果を有する可能性が考えられた。本実験では、各降圧剤間で降圧の程度に有意差はなかった。このことより、アゼルニジピンとオルメサルタンは降圧作用によらない AIM 発現抑制作用を有し、マクロファージの浸潤を制御することで腎保護効果を有している可能性が考えられた。

#### E. 結論

アゼルニジピンとオルメサルタンは腎局所におけるマクロファージの浸潤を抑制し、その機序に AIM の発現が関与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 知的所有権の出現登録状況

特になし。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Alique M, Lucio-Cazaña FJ, Moreno V, Xu Q, Konta T, Nakayama K, Furusu A, Sepulveda JC, Kitamura M. Upregulation of cyclooxygenases by retinoic acid in rat mesangial cells. *Pharmacology*. 79(1): 57-64, 2007
- 2) Furusu A, Nakayama K, Xu Q, Konta T, Kitamura M. MAP kinase-dependent, NF-kappaB-independent regulation of inhibitor of apoptosis protein genes by TNF-alpha. *J Cell Physiol*. 210(3): 703-10, 2007
- 3) Horita Y, Tadokoro M, Taura K, Ashida R, Hiu M, Taguchi T, Furusu A, Kohno S. Prednisolone Co-Administered with Losartan Confers Renoprotection in Patients with IgA Nephropathy. *Renal Failure* 29(4): 441-446, 2007
- 4) 阿部克成、宮崎正信、古巢 朗、河野 茂. 【特集 サイトカインと透析療法】IVCAPD と サイトカイン—腹膜硬化をめぐって— 臨牀透析 23(4): 469-478, 2007、日本メディカルセンター
- 5) 古巢 朗、宮崎正信、河野 茂. IgA 腎症. 炎症と免疫 15(3): 97-105, 2007、先端医学社
- 6) 古巢 朗、宮崎正信、河野 茂. 維持腹膜透析導入の最適な時期と透析方法, 条件はどのように決めるべきか? EBM 透析療法 2008-2009: 39-45, 2007、中外医学社
- 7) 李 嘉明、船越哲、山口耕太郎、橋口純一郎、坂田英雄. 急速に末期腎不全に陥り、直腸腫瘍および肺出血を併発した症例. 臨牀透析 23(8): 125-133, 2007、日本メディカルセンター
- 8) Tetsuya B, Hidemoto N, Kenji K, Satoru K, Tokuichirou S, Masaki N, Chieko H, Ryuicyi F,



Hirofumi H, Masako K, Masaki M, Tadashi Tomo, Masanobu. Effects of Icodextrin on Glycemic and Lipid Profiles in Diabetic Patients Undergoing Peritoneal Dialysis. *Nephrology* 27; 409-415, 2007

9) 原田 孝司、古巢 朗、関 雅文、河野 茂. 透析患者における呼吸器感染症. *日本透析医会雑誌* 22(2): 169-175, 2007

10) 宮崎 正信、河野 茂. 巣状分節状糸球体硬化症[成人]. *日本医師会雑誌特別号* 第136巻 特別号(2): S156-157, 2007

## 2. 学会発表

1) 中沢将之、マウス腹膜透析モデルにおける血中レプチンの線維化進展への影響、第50回日本腎臓学会学術総会、2007

2) 浦松 正、腹直筋鞘血腫を認めた血液透析患者の1例、第52回日本透析医学会学術集会・総会、2007

3) 新井英之、マウス腹膜透析モデルにおけるサリドマイドの腹膜線維化抑制効果、第52回日本透析医学会学術集会・総会、2007

4) 西野友哉、THE AQUAGLYCEROPORIN CHANNEL AQP7 PLAYS A METABOLIC ROLE IN THE VISCERAL PERITONEUM、The 5th International Meeting of Aquaporin、2007

5) 西野友哉、Aquaporin-1 Modulates Vascular Proliferation and Inflammatory Response During Acute Infection、The 5th International Meeting of Aquaporin、2007

6) 中沢将之、In situ localization of leptin synthesis in experimental model of peritoneal fibrosis、The American Society of Nephrology 40th Annual Meeting and Scientific Exposition、2007

7) 廣瀬弥幸、Vitamin D analogues prevent the progression of peritoneal fibrosis in a mouse model with chlorhexidine gluconate、The American Society of Nephrology 40th Annual Meeting and Scientific Exposition、2007

8) 新井英之、Thalidomide induced antiangiogenic action prevents the progression of peritoneal fibrosis、The American Society of Nephrology 40th Annual Meeting and Scientific Exposition、2007

9) 中沢将之、LOCAL PRODUCTION OF LEPTIN MAY REFLECT THE PROGRESSION OF PERITONEAL FIBROSIS IN A MOUSE MODEL WITH CHLORHEXIDINE GLUCONATE、The 3rd Asian Chapter Meeting of the International Society for peritoneal Dialysis、2007

10) 中沢有香、Synthetic retinoid Am80, an inhibitor of Kr ppe1-like factor5 (KLF5) suppresses the progression of mouse peritoneal fibrosis、The 3rd Asian Chapter Meeting of the International Society for peritoneal Dialysis、2007

11) 廣瀬弥幸、22-OXACALCITRIOL PREVENTS THE PROGRESSION OF PERITONEAL FIBROSIS IN A MOUSE MODEL WITH CHLORHEXIDINE GLUCONATE、The 3rd Asian Chapter Meeting of the International Society for peritoneal Dialysis、2007

12) 新井英之、THALIDOMIDE INDUCED ANTIANGIOGENIC ACTION PREVENTS THE PROGRESSION OF PERITONEAL FIBROSIS、The 3rd Asian Chapter Meeting of the International Society for peritoneal Dialysis、

2007

13) 新井英之、当院における腹膜透析(PD)患者の現状、日本腹膜透析研究会、2007

14) 新井英之、CAPD カテーテル抜去後に腹水を認め、カテーテル再挿入による腹水除去により軽快傾向を呈した被嚢性腹膜硬化症(EPS)の一例、第40回九州人工透析研究会総会、2007

15) 西野友哉、Fasting Induces Functional and Structural Changes Mediated by the Regulation of AQP1 and AQP7 in the Peritoneum、The American Society of Nephrology 40th Annual Meeting and Scientific Exposition、2007

16) 西野友哉、Aquaporin-1 Modulates Vascular Proliferation and Inflammatory Response During Acute Infection、The American Society of Nephrology 40th Annual Meeting and Scientific Exposition、2007

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「IgA腎症における尿細管間質の線維化には肥満細胞由来キマーゼ非依存性の  
アンジオテンシンII合成系が関与している」

研究協力者 堀越 哲

順天堂大学腎臓内科 助教授

共同研究者 井原朋子、鈴木祐介、来栖厚、山下倫史、富野康日己

研究要旨

腎間質線維化における腎組織レニン-アンジオテンシン系の役割は大きく、アンジオテンシンII受容体拮抗薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬が進行性腎障害における腎間質線維化を抑制することが臨床的にも明らかになっている。一方、肥満細胞に特異的な蛋白分解酵素であるキマーゼは、ヒトではアンジオテンシンIIの合成をアンジオテンシン変換酵素と異なった経路を通じて制御していることが知られている。私たちは、肥満細胞がIgA腎症の進行と関連し、特に腎間質線維化に病理学的役割をもつことを報告しているが、IgA腎症の腎局所における肥満細胞とアンジオテンシンIIの関連性については不明である。本研究では、48名のIgA腎症患者の腎生検標本におけるトリプターゼ・キマーゼ・アンジオテンシンIIの陽性細胞出現率と組織障害度および臨床検査値との関係を分析した。IgA腎症では微小変化型ネフローゼ症候群と比較し、トリプターゼ・キマーゼ陽性細胞、キマーゼ単独陽性細胞がともに有意に多く浸潤しており、組織障害度と有意に相関していた。トリプターゼ・キマーゼ両陽性細胞数は組織障害度と特に強い相関を示し、臨床所見のなかでも血清クレアチニン値と平均血圧に強い相関を認めた。アンジオテンシンII陽性細胞の多くは浸潤T細胞であり、一部大きな核を持った尿細管細胞も認められた。予後不良群では、アンジオテンシンII陽性細胞数とトリプターゼ・キマーゼ両陽性細胞数およびトリプターゼ単独陽性細胞数がともに有意に相関した。しかしながら、トリプターゼ・キマーゼ両陽性細胞とアンジオテンシンII陽性T細胞の局在は、必ずしも一致していなかった。これらの結果から腎間質線維化における肥満細胞の関与は、キマーゼに依存しないアンジオテンシンII合成系によることが示唆された。

A. 研究目的

肥満細胞にはトリプターゼとキマーゼの両方をもつものとトリプターゼのみをもつものとの2種類がある。このうちトリプターゼのみをもつ肥満細胞は免疫防御に働き、

両者をもつものは血管新生や組織修復にかかわると考えられている。一方、肥満細胞のもつキマーゼは、進行性腎障害における尿細管・間質の線維化促進因子とされる組織アンジオテンシンIIの合成に関与してい

る。本研究は、IgA 腎症における腎線維化に、肥満細胞と組織レニン-アンジオテンシン系がどのように関与しているかを分析することを目的とした。

## B. 研究方法

48名のIgA腎症患者と5名の微小変化型ネフローゼ症候群の腎生検標本におけるトリプターゼ・キマーゼ・アンジオテンシンIIの陽性細胞出現率と組織障害度(IgA腎症診療指針における予後判定基準を用いた)および臨床検査値との関連性を分析した。

(研究の倫理面への配慮)

腎生検組織の研究利用に関し順天堂大学倫理委員会による承認を受け、患者本人の同意を得た。患者データは、連結可能な匿名化によって個人の特定ができないように配慮した。

## C. 結果

肥満細胞は糸球体内には認められず、尿細管・間質にのみ出現していた。特に予後不良群では尿細管・間質に広く認められたが、微小変化型ネフローゼ症候群ではわずかであった。肥満細胞は、トリプターゼとキマーゼの両方をもつものが多かったが、トリプターゼ単独陽性細胞も認められた。キマーゼ単独陽性細胞は認められなかった。単位間質面積当りの総肥満細胞数は、IgA腎症組織障害度と相関したが、トリプターゼ・キマーゼ両者陽性肥満細胞数がより強く相関した( $p < 0.01$ )。臨床パラメーターのなかで、平均血圧( $p < 0.001$ )と血清クレアチニン値( $p < 0.0001$ )が各肥満細胞数とも強く相関した。しかし、血清IgA・C3値、尿蛋白排泄量には相関が認められなかった。

アンジオテンシンII陽性細胞は、予後不良群における間質浸潤細胞群のなかのCD4陽性T細胞に認められ、CD8陽性T細胞にも散見した。また、アンジオテンシンII陽性細胞は、CD68陽性尿細管細胞にも認められた。しかしながら、肥満細胞とは共存していなかった。

## D. 考察

進行性腎障害における尿細管・間質の線維化促進因子として組織アンジオテンシンIIが重要視され、本研究班IgA腎症分科会でもアンジオテンシン変換酵素阻害薬とアンジオテンシンII受容体拮抗の効果に対する臨床試験が進行中である。しかし、腎障害の進行阻止効果発現の機序については明確ではない。一方、肥満細胞がIgA腎症の予後不良群の腎間質に多く浸潤し、間質の線維化と良く相関していることは、私たちもすでに報告している。この肥満細胞に特異的に存在するキマーゼは、アンジオテンシン変換酵素とは異なる経路でアンジオテンシンIからアンジオテンシンIIへと変換している。これらのことから、IgA腎症における腎間質障害の進展機序における肥満細胞とアンジオテンシンII相互関係に焦点を当てた。肥満細胞-特にトリプターゼとキマーゼの両方をもつ細胞-とアンジオテンシンII産生細胞は、各々独立して腎間質障害と強く相関したが、肥満細胞とアンジオテンシンIIを発現する細胞とは浸潤部位が必ずしも一致せず、相互関係は明らかではなかった。形質転換を思わせる尿細管細胞がアンジオテンシンIIを発現していることが認められ、浸潤細胞による発現ばかりでなく組織固有細胞が発現するアンジオテン