

Fig.1:糸球体急性障害度(Gg)と糸球体内MPO陽性細胞数スコア

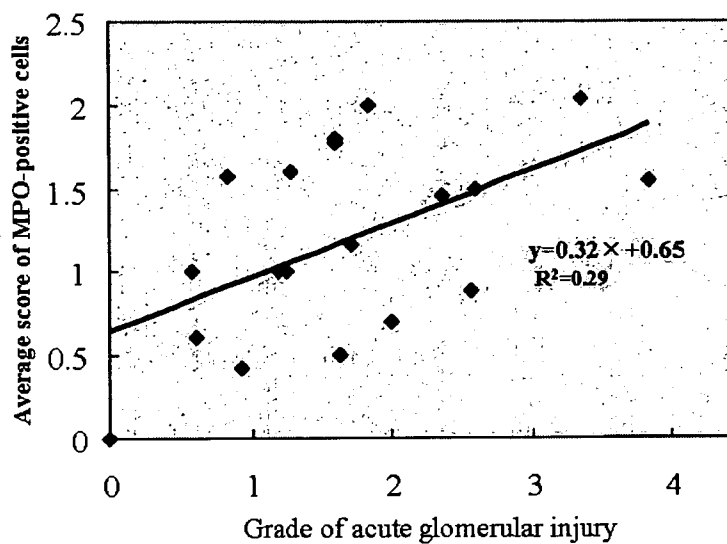


Fig. 3.

Fig.2 :糸球体急性障害度(Grade) 、進行度(Stage)と糸球体内MPO陽性細胞数スコア

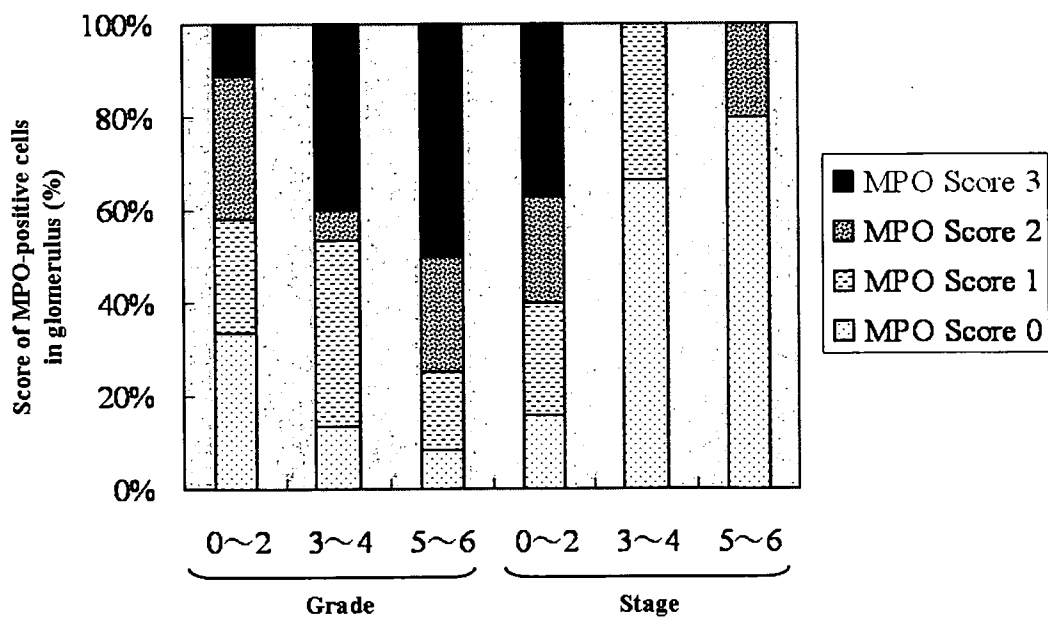
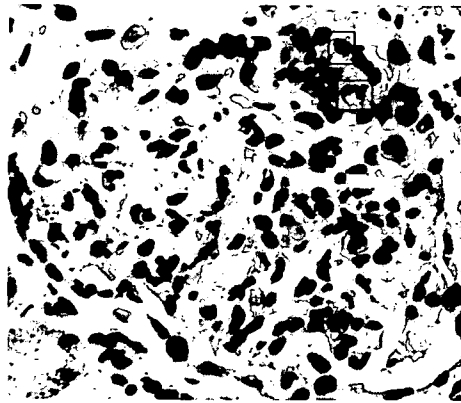


Fig. 4.

Fig.3: MPO-ANCA関連腎炎の糸球体におけるMPO陽性細胞の存在と細胞外MPOの局在



A: 糸球体の多数のMPO陽性細胞浸潤を認める

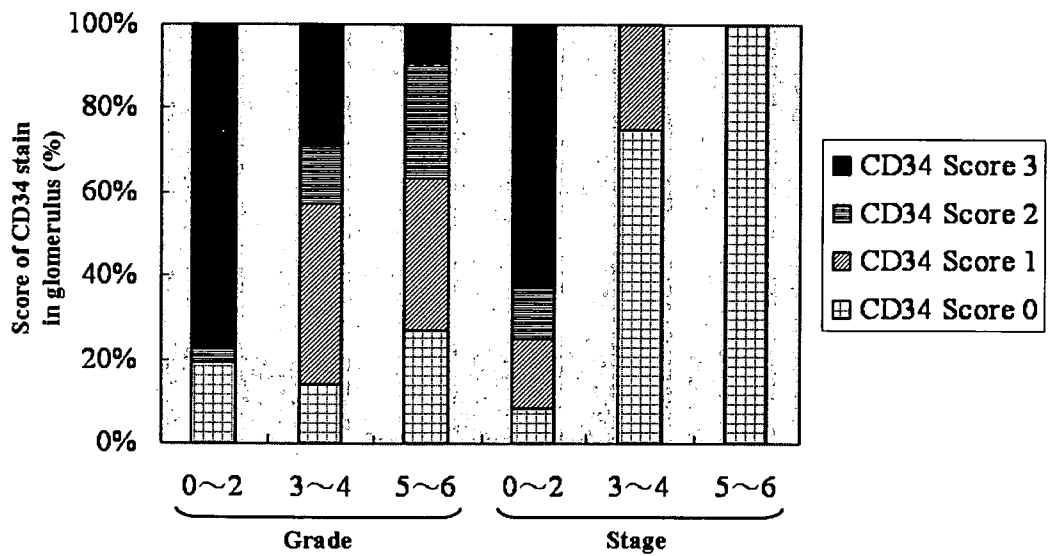


B: MPO陽性細胞



C: 糸球体毛細血管壁のMPO

Fig.4: 糸球体急性障害度(Grade)、進行度(Stage)とCD34染色面積スコア

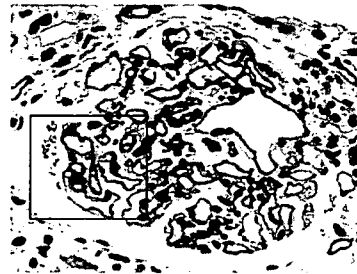


F.

Fig.5: 糸球体病変の軽微な糸球体における
MPOの局在とCD34染色



A: MPO染色



B: CD34染色

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

「半月体形成性腎炎における high mobility group box chromosomal protein
(HMGB)-1 の関与」

研究協力者 和田 隆志 金沢大学大学院医学系研究科腎臓内科 講師
協力研究者 金沢大学医学部附属病院血液浄化療法部 部長 横山 仁
金沢医療センター 院長 木田 寛

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(CrGN)は、臨床的に急速進行性糸球体腎炎症候群(RPGN)を呈する予後不良な疾患群である。その半月体形成の詳細な分子機序は不明である。本研究では1.CrGN群において、high mobility group box chromosomal protein-1(HMGB-1)が半月体形成部、メサンギウム領域および間質内浸潤細胞に陽性であった。CrGNではその陽性細胞数が他の腎疾患に比して多く見られた。2. 二重染色によりHMGB-1陽性細胞の一部はCD68陽性マクロファージならびに好中球であった。3. 糸球体内HMGB-1陽性細胞数は半月体形成率のうち、総形成率ならびに病期が進んでいると考えられる線維性-線維細胞性半月体形成率と相関した。4. 間質内HMGB-1陽性細胞数は間質線維化と相関した。加えてHMGB-1陽性細胞は糸球体・間質ともCD68陽性マクロファージ/好中球数と相関した。5. ステロイド療法前後で腎生検をした例において、糸球体内および間質内HMGB-1陽性細胞数は有意に低下した。6. IL-1 β およびTNF- α の刺激により、培養メサンギウム細胞からHMGB-1が産生された。以上より、HMGB-1は半月体形成をはじめとする糸球体ならびに間質病変の進展機序に関与することが示された。

A. 研究目的

病理学的に半月体形成性腎炎(CrGN)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、半月体形成の発症・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

じる共通の分子機序・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(M ϕ)の浸潤を認めることが特徴である。M ϕ 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。

high mobility group box chromosomal protein-1(HMGB-1)は本来核内にあり、転写やDNA機能を行うDNA結合タンパクとして知られている。一方、壊死細胞もしくは活性化Mφでは核内から遊離し、HMGB-1の受容体であるreceptor for advanced glycation end products (RAGE)を介して炎症や臓器不全を惹起することが判明してきた。しかしながら半月体形成性腎炎はじめ進行性腎疾患の進展過程におけるHMGB-1の関与は未だ検討されていない。そこで本研究では、ヒト半月体形成性腎炎の進展機序におけるHMGB-1の関与を検討し、ステロイド治療に伴うHMGB-1の動態についても検討した。

B. 研究方法

腎生検または剖検にて腎病変を確認しえた各種腎疾患119例(男48例, 女71例, 平均48才)を対象とした。内訳はCrGN29例, 全身性エリテマトーデス(SLE)35例, 糖尿病性腎症(DM)25例, IgA腎症15例および疾患コントロールとして巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)5例, 微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)5例, 基底膜菲薄症候群(TBMD)5例であった。

CrGN例の内訳は、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連型22例, 免疫複合体(IC)型7例であった。腎内のHMGB-1の局在を確認し、病理学的指標との関連を検討した。HMGB-1陽性細胞を同定するため、CD68/好中球エラスターゼとの二重染色を施行した。さらにラット培養メサンギウム細胞を用い、IL-1 β (10ng/ml), TNF- α (10ng/ml)共存下で、24時間および48時間培養した。HMGB-1発

現をELISA法ならびにreal time RT-PCRにて検討した。なお倫理面への配慮は十分にされている。

C. 結果

1. HMGB-1陽性細胞の腎での局在

免疫組織染色により各種腎疾患例においてHMGB-1の局在を検討した。HMGB-1は半月体形成部, メサンギウム領域および間質内浸潤細胞に陽性所見を認めた。これらの染色部位はいずれの腎疾患でも同様だった(図1)。なおHMGB-1・CD68の二重染色では、HMGB-1陽性細胞は一部CD68陽性であった。HMGB-1・好中球エラスターゼの二重染色でも同様に、HMGB-1陽性細胞の一部は好中球エラスターゼ陽性であった。

2. 各腎疾患におけるHMGB-1陽性細胞数

FSGS/MCNSならびにTBMDでは糸球体/間質ともにほとんど陽性細胞はみられなかった。RPGN, LN, IgA腎症, DM例では糸球体ならびに間質で増加した(図2)。

3. CrGNにおけるHMGB-1陽性細胞数と病理学的指標との相関

今回の検討で、最もHMGB-1陽性細胞が多くみられたCrGNについて、糸球体および間質病変におけるHMGB-1の関与を検討した(表1)。まず、糸球体内HMGB-1陽性細胞数は半月体形成率のうち、総形成率ならびに病期が進んでいると考えられる線維性-線維細胞性半月体形成率と相関した。しかしながら半月体極期である細胞性半月体形成率とは相関はみられなかった。一方、間質内HMGB-1陽性細胞数は間質線維化と相関した。加えてHMGB-1陽性細胞は糸球体・間質ともCD68陽性Mφ数ならびに好中球数と相関した。

4.ステロイド療法による HMGB-1 陽性細胞数の推移

ステロイド療法前後で腎生検をした6例において、糸球体内 HMGB-1 陽性細胞数はステロイド療法前で疾患活動性の低下とともに減少した。(15.8個/mm²から7.9個/mm²). さらに間質も同様に平均435.8個/mm²から178.3個/mm²へと減少した

5. IL-1 β およびTNF- α によるメサンギウム細胞からの HMGB-1 産生

IL-1 β およびTNF- α の刺激により、培養メサンギウム細胞から HMGB-1 の蛋白レベルが経時的に増加することが示された(図3). さらに HMGB-1 mRNA 発現は刺激前に HMGB-1/ACT b 比は0.08であった. 一方、かかる刺激下で24時間後に0.18, 48時間後に0.48と経時的に増加した. このメサンギウム細胞からの HMGB-1 の直接の産生は、免疫組織染色の結果を支持するものと考えた.

D. 考察

本研究により、腎局所の浸潤細胞ならびに腎固有細胞から産生される HMGB-1 が、CrGN に代表される各種腎疾患の進展機序に深くかかわっている可能性が示された.

これまで HMGB-1 の主要産生細胞は CD68 陽性 M ϕ と考えられていた. 実際、二重染色により HMGB-1 陽性細胞の一部は M ϕ ならびに好中球であることが確認された. さらに今回の検討において、IL-1 β ならびに TNF- α の存在下で M ϕ に加えて、培養メサンギウム細胞から HMGB-1 が産生されたことは注目される. 一方、TBMD, FSGS/MCNS では HMGB-1 陽性細胞がみられなかった. これまで関節リウマチに代表

される炎症では、局所で産生された HMGB-1 が炎症の増幅に関与すると報告されている. したがって腎疾患においても、HMGB-1 は炎症増幅経路を活性化させ、半月体形成や間質細胞浸潤から間質線維化に至る機序に関与することが推測された.

本研究において、ステロイド療法により疾患活動性の低下により腎内 HMGB-1 陽性細胞が減少した. これまで皮膚筋炎・多発筋炎例において、筋組織に発現が亢進した HMGB-1 は、ステロイド療法によりその発現が抑制されたことが報告されている. これは HMGB-1 を介した炎症増幅機構にステロイド療法が有用であることを示している. しかしながら、HMGB-1 の産生機序ならびにステロイド療法による抑制機序は目下のところ十分に解明されておらず今後の検討課題である.

HMGB-1 の受容体は receptor for advanced glycation end products (RAGE)であることが報告されている. 最近になり、この RAGE には C 末端が切断され endogenous secretory RAGE が存在することが判明してきた. これは RAGE の可溶性アイソフォームであり、デコイとして機能することが示されつつある. また、血管内皮細胞にあり凝固との関連が深いトロンボモデュリンの N 末端レクチン様ドメインも HMGB-1 と結合して抗炎症効果を有することが示されるようになってきた. 今後はかかる受容体との相互関連も視野にいれて半月体形成性腎炎に代表される進行性腎疾患の進展機序への関与を検討する必要がある. さらに腎疾患の進展機序に果たす HMGB-1 の役割を十分に検討するためには、HMGB-1 投与もしくは HMGB-1 機能中和による評価が不可欠であ

る。今後、実験腎炎モデルにおいて抗HMGB-1中和抗体等を用いて詳細に機能評価を行いたいと考えている。

E. 結論

ヒト半月体形成性腎炎において、HMGB-1は半月体形成をはじめとする糸球体ならびに間質病変の進展機序に関与することが示された。このことよりHMGB-1制御は半月体形成性腎炎に対する新たな治療戦略として有用である可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

1-1

Sakai N, Wada T, Furuichi K, Shimizu K, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Matsushima K, Yokoyama H, Kaneko S. MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. J Leukoc Biol Jan 13, 2006, Epub ahead of print

1-2

Sakai N, Wada T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K, Kokubo S, Kobayashi M, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Takasawa K, Takeda S, Yoshimura M, Kida H, Yokoyama H: Involvement of extracellular signal-regulated

kinase (ERK) and p38 in human diabetic nephropathy. Am J Kidney Dis 45:54-65, 2005

2. 学会発表

平成18年日本腎臓学会学術総会発表予定
半月体形成性腎炎における high mobility group box chromosomal protein-1(HMGB-1)の関与

和田 隆志, 岩田 恭宣, 坂井 宣彦, 山端 潤也, 原 章規, 横山 仁

図1. 半月体形成腎炎における HMGB-1 陽性細胞の局在

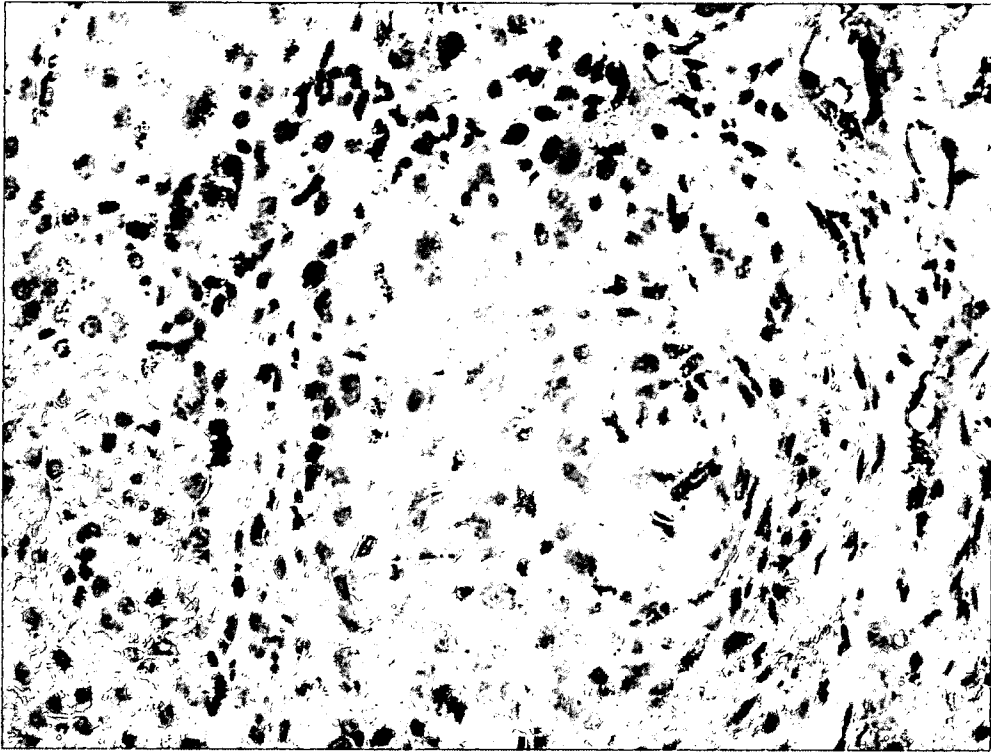


図2. 各種腎疾患における HMGB-1 陽性細胞 *p<0.05

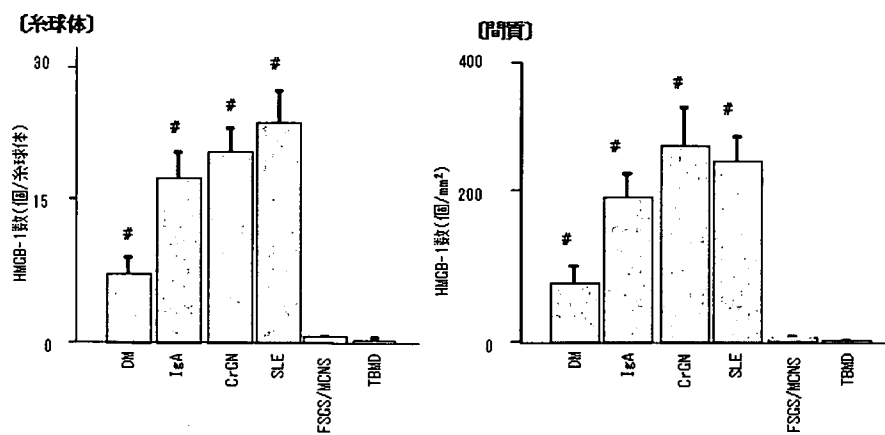


図 3. ラットメサンギウム細胞からの HMGB-1 産生

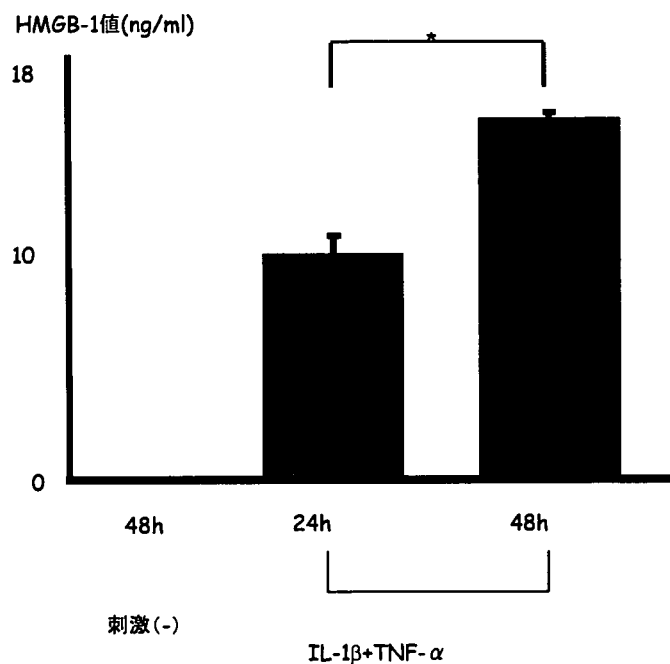


表 1. 半月体形成性腎炎における HMGB-1 陽性細胞数と病理学的指標との関連

【糸球体】	r	p 値
総半月体形成率	0.44	0.01
線維性～線維細胞性半月体形成率	0.65	<0.01
細胞性半月体形成率	0.16	0.38
好中球数	0.44	<0.05
CD68 陽性マクロファージ数	0.81	<0.01

【間質】	r	p 値
線維化	0.48	<0.05
好中球数	0.44	<0.05
CD68 陽性マクロファージ数	0.63	<0.05

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

「半月体形成性腎炎における VEGF の役割」

研究協力者 和田 隆志 金沢大学医学部附属病院血液浄化療法部助教授
共同研究者 原 章規 坂井 宣彦 古市 賢吾
金沢大学医学部附属病院腎臓内科

研究要旨

Wistar-Kyoto ラット半月体形成性腎炎における Vascular endothelial growth factor (VEGF) の役割を検討した。VEGF 活性阻害効果を有する VEGF1 型受容体アイソフォームである可溶性 FLT-1(sFLT-1)プラスミドを作成3日前および14日後に筋肉内投与した。その結果、sFLT-1 による VEGF 機能阻害により蛋白尿が増加した。ネフリンの発現低下を認め、足突起癒合が観察された。腎炎惹起後 56 日目には sFLT-1 群において内皮細胞数の減少を伴う糸球体硬化の増悪ならびに間質線維化の進行がみられた。臨床的に sFLT-1 群において、腎炎惹起後 56 日目に腹水、血清総蛋白濃度の低下ならびに腎機能障害が認められた。

【結論】 VEGFは半月体形成性腎炎において、糸球体上皮細胞の機能維持ならびに蛋白尿出現機序に重要な役割を果たし、糸球体基底膜透過性の制御に関与していることが示された。さらに VEGFは進行性腎障害における糸球体および間質病変に対して防護的に作用していると考えられる。

A. 研究目的

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管内皮細胞の遊走、増殖、分化ならびに再生を誘導する強力な血管新生因子である。マウス腎においては VEGF はその発生に不可欠の分子である。また障害糸球体ならびに間質毛細血管網の修復に必要であることが判明している。

これらの VEGF の作用は主に血管内皮細胞上に発現している VEGF1 型受容体である Flt-1 および VEGF2 型受容体である Flk-1 を介して発現する。一方、Flt-1 のアイソフォームである可溶性 Flt-1(sFLT-1)は VEGF と結合しその活性を抑制することが知られ

ている。

近年、VEGF が蛋白尿に関連することが示唆されている。蛋白尿は糸球体障害の結果であると同時に間質障害を惹起し最終的に末期腎不全に至る危険因子である。この蛋白尿が VEGF 中和抗体、あるいは可溶性 Flt-1 による循環血液中の VEGF 機能阻害により正常腎で誘発されることが報告されている。加えて癌に対する臨床試験において抗 VEGF 抗体療法の副作用として蛋白尿が知られるようになった。しかしながら蛋白尿出現機序ならびに糸球体上皮細胞に対する VEGF の役割については目下のところ不明である。

病理学的に半月体形成性腎炎(CrGN)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、糸球体病変や蛋白尿の発症・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、この点に関して分子機序・背景については十分な検討がなされていない。

そこで本研究ではラット糸球体腎炎において VEGF は蛋白尿に関与する糸球体濾過障壁の維持に関わっているという仮説を立てた。この仮説を検証するため VEGF 活性を阻害する可溶性 Flt-1 プラスミドを遺伝子導入したラットを用い、半月体形成性腎炎における VEGF の蛋白尿、上皮細胞関連分子ならびに微小血管系へおよび役割を検討した。

B. 研究方法

Wistar-Kyoto ラットの抗糸球体基底膜抗体型半月体形成性腎炎を用い、VEGF 活性阻害のため腎炎の発症 3 日前および 14 日後に可溶性 Flt-1 プラスミドを筋肉内投与しエレクトロポレーションによって遺伝子導入をした。

腎炎ラットを 6 日目あるいは 56 日目にと殺し腎組織、血液を採取した。腎病理については光顕にて糸球体硬化および間質線維化を評価した。電顕で上皮細胞足突起の癒合を評価した。また血清総蛋白濃度および尿素窒素を測定した。加えて尿蛋白および尿中 sFlt-1 を測定した。プラスミド導入部位での sFlt-1 の発現、糸球体における浸潤細胞、PCNA 陽性細胞、VEGF とその受容

体、内皮細胞マーカーとしてのトロンプモジュリン、糸球体上皮細胞マーカーとしてのデスミンならびに上皮細胞関連分子の発現を免疫組織染色、Real-time RT-PCR および Western blot 法により解析した。

C. 結果

(1) 遺伝子導入した sFlt-1 の発現

sFlt-1 を導入した筋組織における sFlt-1 染色陽性領域を認めた。加えて導入部位における sFlt-1 mRNA の発現を認めた。さらに 6 日目において尿中 sFlt-1 は高値を示した。この結果より筋肉内投与した sFlt-1 が局所で発現し循環血液中から尿腔に移行したことが確認された。

(2) sFlt-1 投与に伴う病理学的所見

腎炎発症後 6 日目には両群の糸球体において管内性増殖、壊死性病変ならびに半月体形成が認められた。しかしながら、両群間には半月体形成率、総細胞数ならびに浸潤細胞数に差はなかった。

VEGF 阻害の長期的効果を検討する目的で、腎炎惹起後 56 日目の組織学的所見を検討した。コンピュータ画像処理により糸球体硬化はマトリックスの沈着部分を、間質線維化はアザン染色で青に染まる部分を抽出し解析した。コントロール群に比較し sFlt-1 群で糸球体硬化ならびに間質線維化が進行していた。

次に電子顕微鏡所見にて検討した。腎炎惹起 6 日目には糸球体上皮細胞足突起の癒合が見られた。一方、sFlt-1 群においてはコントロール群に比して著明な足突起の癒合を認めた。

(3) 蛋白尿ならびに血清総蛋白濃度の推移

正常ラットにおいて、sFlt-1 プラスミド導

入後軽度の蛋白尿が惹起された。以後 28 日目まで蛋白尿は持続したが、56 日目にはほぼ正常レベルまで減少した。一方、腎炎ラットにおいては、6 日目以降蛋白尿は経時的に増加した。sFlt-1 群において高度の尿蛋白を認めた(図 1)。加えて sFlt-1 群では低蛋白血症が増悪し、と殺時に大量の腹水が認められネフローゼ状態を呈したものと推測した(図 2a)。

(4) 腎機能の推移

各群における腎機能を評価する目的で BUN の推移を検討した。腎炎惹起 56 日目には BUN の上昇を認めたが sFlt-1 群でさらに上昇した。以上より VEGF の阻害により糸球体硬化・間質線維化の増悪を反映して腎機能障害が進行したことが判明した(図 2b)。

(5) 上皮細胞関連分子の発現の検討

糸球体上皮細胞障害のマーカーであるデスミンの免疫組織染色を施行した。腎炎惹起により上皮細胞におけるデスミンの発現が見られたが、sFlt-1 群でその発現の亢進を認めた。以上より VEGF 阻害による糸球体上皮細胞障害ならびに蛋白尿の増悪が示された。

糸球体上皮細胞の障害機序をさらに検討する目的で糸球体上皮細胞関連分子について解析した。はじめに抗蛋白尿効果に重要な役割を果たしているネフリンの発現を示す。腎炎惹起によりネフリンの腎内 mRNA 発現は減少したが、VEGF 阻害によりさらに減少した。ウェスタンブロット法によるネフリン蛋白の発現も腎炎により低下したが sFlt-1 群においてさらに低下した(図 3)。代表的な糸球体における免疫組織染色においても同様の所見が得られた。

さらにポドシン、ポドカリキシンおよびポドプラニンといった上皮細胞関連分子の発現を示す。腎炎惹起によりこれらの分子の mRNA 発現はいずれも低下した。ネフリンの発現とは対照的にポドシン、ポドプラニンおよびポドカリキシンといった分子の発現は sFlt-1 による変化がなかった。Western blot 法および免疫組織染色でのポドカリキシン蛋白を検討した結果についても同様に sFlt-1 による変化はみられなかった。以上の結果から、VEGF 機能阻害によりネフリンの発現が低下し、蛋白尿が誘導されたことが示唆された。

(6) 腎内 VEGF ならびにその受容体発現

VEGF は糸球体上皮細胞に発現していた。腎炎の惹起により VEGF の発現が経時的に低下したが sFlt-1 群ではさらに低下していた。

VEGF2 型受容体である Flk-1 は糸球体内皮細胞および傍尿細管毛細血管に発現していた。腎炎惹起によりその発現が糸球体および間質において経時的に低下したが sFlt-1 ではさらに低下していた。

VEGF1 型受容体である Flt-1 は正常糸球体においては上皮細胞に発現していることが確認された。いずれの群においても腎炎惹起により Flt-1 の発現はほとんど認められなかった。

(7) 腎内内皮細胞の動態

次に VEGF の内皮細胞に及ぼす影響を検討する目的で、糸球体および傍尿細管毛細血管をトロンボモジュリンにて同定した。腎炎惹起 6 日後には糸球体におけるトロンボモジュリン染色領域は減少した。sFlt-1 群ではより染色領域が減少していた。

腎間質におけるトロンボモジュリンも糸球体と同様に腎炎により染色領域は減少し、

sFlt-1 群でさらに減少した。このことから、糸球体・間質とも sFlt-1 群においてより高度の内皮細胞の消失が生じているものと考えた。

D. 考察

ラット半月体形成性腎炎モデルに VEGF 活性阻害作用を有する sFlt-1 を導入した。その結果をまとめると、上皮細胞で産生・分泌された VEGF は Flt-1 を含む受容体を介して上皮細胞へオートクラインならびにパラクラインの因子として作用すると考えられる。sFlt-1 にて VEGF 機能を抑制することによりこの機構が破綻しネフリンの発現低下を介して蛋白尿が誘導されることが推測された。抗糸球体基底膜抗体型半月体形成性腎炎においては内皮細胞、基底膜の障害に加え糸球体上皮細胞障害によりさらに大量の蛋白尿が惹起されたものと考えられた。さらに sFlt-1 によりオートクライン・パラクラインの障害が進行し蛋白尿が増悪したことが考えられた。

さらに長期に観察した結果、VEGF 活性阻害作用により病理学的には糸球体硬化ならびに間質線維化が進行していた。これは、上皮細胞障害に加え糸球体内皮細胞障害ならびに蛋白尿自体の進行のため糸球体硬化が進展したものと考えた。さらに間質においては蛋白尿の増加と内皮細胞障害から線維化が進展したものと推測された。

一方、本研究と同じラット半月体形成性腎炎モデルにおいて VEGF を持続投与した結果が報告されている。VEGF 投与により糸球体硬化が抑制され、臨床的には蛋白尿が減少し腎機能が保持された。糸球体上皮細胞に関する検討はなされてはいないもの

の、VEGF の役割については本研究結果を裏付けるものと考えられる。

E. 結論

VEGF は進行性腎障害において上皮細胞の機能維持に重要な役割を果たし、糸球体および間質に対して防衛的に作用していることが示された。

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) **Wada T**, Yokoyama H, Kaneko S, Matsushima K: Lymphocyte migration to the kidney, *Lymphocyte Trafficking in Health and Disease*, 151-165, Ed. Badolato R, Sozzani S, (Birkhauser Verlag, Basel) 2006

2) Yamahana J, **Wada T**, Furuichi K, Sakai N, Yokoyama H, Kaneko S: TAK-603, an anti-inflammatory compound, reduces crescentic glomerulonephritis and preserves renal function in WKY rats. *Nephrol Dial Transplant* 21, 2736-2744, 2006

3) Furuichi K, **Wada T**, Iwata Y, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Sugaya T, Iwakura Y, Matsushima K, Asano M, Yokoyama H, Kaneko S: Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury.

Crit Care Med 34, 2447-2455, 2006

4) **Wada T**, Azuma H, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Iwata Y, Matsushima K, Takahara S, Yokoyama H, Kaneko S: Reduction in chronic allograft nephropathy by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase.

Am J Nephrol 26, 319-325, 2006

5) Hara A, **Wada T**, Furuichi K, Sakai N, Kawachi H, Shimizu F, Shibuya M, Matsushima K, Yokoyama H, Egashira K, Kaneko S: Blockade of VEGF accelerates proteinuria, via decrease in nephrin expression in rat crescentic glomerulonephritis.

Kidney Int 69, 1986-1995, 2006

6) Sakai N, **Wada T**, Yokoyama H, Lipp M, Ueha S, Matsushima K, Kaneko S: Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis.

Proc Natl Acad Sci USA. 103, 14098-14103, 2006

2. 学会発表

原章規、和田隆志、中屋来哉、坂井宣彦、古市賢吾、横山仁、河内裕、清水不二雄

Role of VEGF in progressive nephropathy

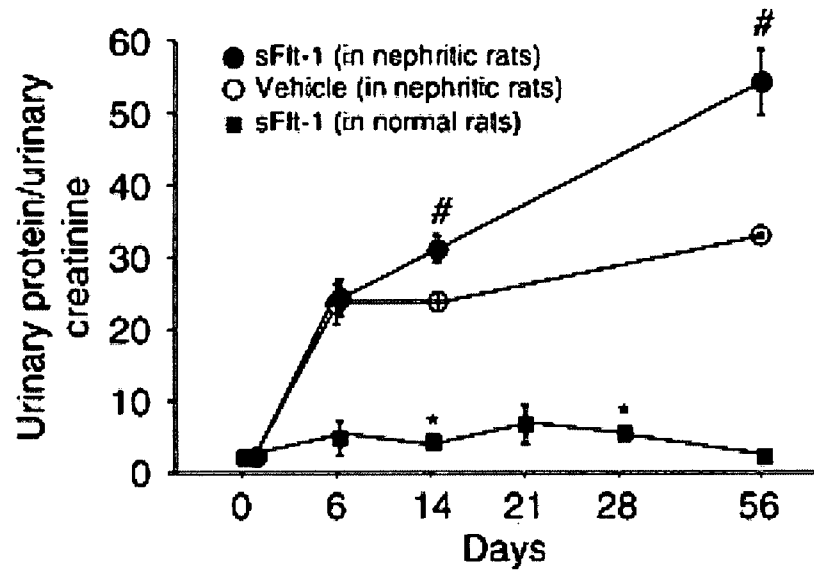
日本腎臓学会学術総会 2005

図 1

蛋白尿の推移

#:p<0.05 compared with vehicle-treated rats

*:p<0.05 compared with a level of proteinuria on day 0



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

「ヒト慢性腎臓病における fibrocyte の関与」

研究協力者 和田 隆志 金沢大学大学院医学系研究科血液情報統御学 教授
協力研究者 坂井 宣彦* 古市 賢吾**
金沢大学医学部附属病院血液浄化療法部 准教授** 特任助教*

研究要旨

腎線維化は半月体形成性腎炎に代表される進行性腎障害の共通進展機序であり、その解明と治療戦略構築は重要な課題である。これまで末梢血中に存在し、白血球抗原を有し、かつコラーゲン産生能を有する fibrocyte に注目してきた。Fibrocyte はケモカイン CCL21/CCR7 シグナリングを介して腎間質線維化に関与していること、さらに renin-angiotensin 系阻害薬の新しい治療標的細胞としての可能性を示してきた。本研究では、半月体形成性腎炎 28 例を含むヒト慢性腎臓病 113 例における fibrocyte の関与を検討した。Fibrocyte は間質を中心に認められ、半月体形成性腎炎例で最も浸潤 fibrocyte 数が多く認められた。さらに、浸潤 fibrocyte 数と血清 Cr 値に代表される腎機能、腎線維化と相関した。さらに、再生検例において、ステロイド療法に伴う疾患活動性の低下とともに fibrocyte 浸潤数は低下した。

【結論】 Fibrocyte は半月体形成性腎炎に代表されるヒト慢性腎臓病において、間質を中心に浸潤し腎線維化に関与することが推測された。

A. 研究目的

腎臓病は半月体形成性腎炎はじめ原疾患にかかわらず、腎線維化という進行性腎障害の共通進展過程をとり末期腎不全に至る。したがって、腎線維化の機序の解明と治療戦略構築は重要な課題である。

腎線維化関連細胞には、腎固有線維芽細胞や尿細管上皮細胞由来の線維芽細胞ならびに単球/マクロファージが報告されている。しかし、いずれも腎線維化を完全に説明しうるものではなく、新たな細胞の存在が推測される。近年、骨髄由来の白血球系細胞である fibrocyte と組織線維化が注

目されている。Fibrocyte は健常人末梢血中に 0.1-0.5% 存在する細胞集団である。また CD45 などの白血球抗原に加え、I 型コラーゲンなど細胞外基質産生能を有することを特徴とする。さらに fibrocyte は CCR7 などのケモカインレセプターを発現し、種々のサイトカイン、ケモカイン産生能も有することが報告されている。これまで我々は、マウス進行性腎間質線維化モデルにおいて、fibrocyte が線維化に関与すること、ならびに fibrocyte 浸潤・活性化抑制により線維化が抑制されることを報告してきた。しかしながら半月体形成性腎炎を

はじめヒト慢性腎臓病 (CKD) における検討はいまだなされていない。

そこで、本研究では半月体形成性腎炎に代表されるヒト CKD の進展機序、ことに線維化に fibrocyte が関与するという仮説を立て臨床病理学的に検討を行った。

B. 研究方法

対象：金沢大学医学部附属病院 旧第 1 内科にて腎生検を施行し、CKD の定義を満たす各種腎臓病 113 例を対象とした。このうち男性 55 例、女性 58 例、平均 50.9 才であった。この CKD の内訳は、急速進行性糸球体腎炎症候群 (RPGN) を示し病理学的に半月体形成腎炎を示す 28 例、糖尿病性腎症 (DM) 26 例、全身性エリテマトーデス (SLE) 23 例、IgA 腎症 (IgA) 7 例、メタボリック シンドローム (MS) 9 例、腎硬化症 (NS) 7 例、膜性腎症 2 例、急性腎不全 3 例、アミロイドーシス 2 例、巣状分節性糸球体硬化症 1 例にくわえて、疾患コントロール群として糸球体基底膜菲薄化症候群 (TBMD) 5 例であった。

方法：

1. 免疫組織染色 (二重染色)

ヒト腎生検パラフィン包埋ホルマリン固定標本を用い、CD45 白血球抗原ならびに I 型プロコラーゲンの二重染色にて fibrocyte の腎での局在を検討した。さらに fibrocyte のケモカインレセプター発現を検討するため、CCR7 と I 型プロコラーゲンの二重染色を施行した。それぞれの一次抗体としてマウス抗ヒト CD45 モノクローナル抗体、ラット抗ヒト I 型プロコラーゲン抗体、ヤギ抗ヒト CCR7 ポリクローナル抗体を用い、

ENVISION を使用しアルカリフォスファターゼとペルオキシダーゼで各々発色した。なお、fibrocyte 数は間質 5 視野 (×400) あたりで計測した。

2. 臨床学的指標と腎内 fibrocyte 数との相関

尿潜血、尿蛋白、血清尿素窒素 (BUN) 値、クレアチニン (Cr) 値、CRP 値、HbA1c および 24 時間クレアチニンクリアランス値と腎内 fibrocyte 数との関連を検討した。

3. 病理学的指標と腎内 Fibrocyte 数との相関

間質線維化や間質 CD68 陽性細胞等の病理学的指標と腎内 fibrocyte 数との関連を検討した。

4. ステロイド治療前後での fibrocyte 数の変化

ステロイド治療前後で腎生検をした 16 例 (RPGN9 例, SLE4 例, IgA2 例, 巣状分節性糸球体硬化症 1 例) において治療前後の fibrocyte 数を比較した。

C. 結果

1. Fibrocyte の腎での局在

免疫組織染色において各種腎臓病の fibrocyte の局在を検討した。CD45、I 型プロコラーゲン二重陽性 fibrocyte は腎間質を中心に浸潤を認めた。また CCR7、I 型コラーゲン二重陽性 fibrocyte も同様に間質を中心に陽性であった。これらの局在様式は、いずれの疾患でもほぼ同様であった。

2. CKD における間質内 fibrocyte 数

間質内 fibrocyte 数は CKD において、疾患コントロールである TBMD に比し増加した。さらに、TBMD に比し RPGN、DM、IgA ならびに NS において高値であった。また RPGN は

その他の全疾患に比し高値であった。一方、SLE ならびに MS は TBMD に比し有意差を認めなかった (図 1)。

3. Fibrocyte 数と臨床学的指標との相関
間質内 fibrocyte 数は尿潜血、BUN 値、Cr 値ならびに CRP 値と正の相関を認めた。さらに間質内 fibrocyte 数は 24 時間クレアチニンクリアランスと負の相関を認めた (表 1)。

4. Fibrocyte 数と病理学的指標との相関
間質内 fibrocyte 数は間質において、CKD 全例では間質内 CD68 陽性細胞数と相関を認めた (表 1)。このうち、RPGN 例において、間質線維化と fibrocyte 数は $r=0.40$ 、 $p<0.01$ と相関を認めた。

5. ステロイド療法前後における fibrocyte 数の変化

ステロイド治療前後で腎生検をしえた 16 例において経時的に検討した。治療前 fibrocyte 数は平均 8.4 個であったが、ステロイド治療後平均 5.0 個へと疾患活動性の低下に一致して減少した (図 2)。

D. 考察

本研究において、fibrocyte がヒト CKD の腎間質に浸潤し、コラーゲン産生を介して、腎機能および間質線維化と相関することが示された。

Fibrocyte はコラーゲン産生にくわえて、tumor necrosis factor- α や interleukin-1 などの炎症性サイトカインや、単球/マクロファージの走化活性化因子である monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 などのケモカインを産生することが報告されている。本研究において、間質内 fibrocyte 数と CD68 陽性マクロファージ数との間に相関を

認めた。マクロファージは活性酸素産生による組織障害や transforming growth factor- β 産生により組織線維化との関与が報告されている。このことから、fibrocyte はみずからのコラーゲン産生にくわえて、マクロファージ浸潤を介してさらなる線維化進展に関与する可能性が考えられた。

Fibrocyte の腎浸潤経路についての詳細はいまだ明らかとなっていない。これまで我々は、マウス線維化腎において、皮髄境界領域に CCR7 のリガンドである secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21) を発現した high endothelial venules (HEVs) が出現し、ここを介して CCR7 陽性 fibrocyte が腎浸潤することを明らかにしてきた。同様にヒト腎臓病においても、皮髄境界領域に HEVs が発現することを確認している。今回の研究において、腎に浸潤した fibrocyte が CCR7 を発現していることを確認しえた。以上より、ヒト CKD においても、HEVs を介した CCR7 陽性 fibrocyte の腎浸潤経路の存在が推測される。しかしながら CCR7 のリガンドである SLC のヒト腎での局在は検討がなされておらず今後の検討課題と考える。

今回の検討において、臨床的に RPGN を示す半月体形成性腎炎で最も間質内 fibrocyte 数が多かった。臨床的に腎予後が不良であること、腎機能の低下例が多く含まれる事を考慮すると、fibrocyte のもつ生物学的意義が推測できとも興味を持たれる。ステロイド療法により、有意に fibrocyte 数が低下するものの、むしろ腎機能が低下する腎予後不良例では、治療後に残存した fibrocyte こそが将来の腎予後を規定する可能性も考えられる。今後も、

治療後に fibrocyte 残存した例も含めて長期予後を厳重に観察していきたい。

ステロイド治療による疾患活動性の低下に一致して、間質内 fibrocyte 数は減少した。ステロイドは様々なサイトカインやケモカイン発現を調節する転写因子、nuclear factor- κ B の活性化を阻害することが知られている。これまで我々はステロイド治療により腎局所でのケモカイン発現が抑制されることを報告してきた。Fibrocyte は CCR7 のみならず、CCR2 や CXCR4 など各種ケモカインレセプターを発現する。よってステロイド治療による腎内ケモカイン産生抑制により、fibrocyte の腎浸潤が抑制された可能性が考えられた。すでに我々はマウス腎間質線維化モデルにおいて、fibrocyte 制御による腎線維化改善を確認している。今後、fibrocyte の浸潤・活性化機序がさらに明らかとなり、その制御により CKD の治療につながることを期待したい。

E. 結論

Fibrocyte は半月体形成性腎炎に代表されるヒト慢性腎臓病において、間質を中心に浸潤し腎線維化に関与することが推測された。

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) Sakai N, Wada T, Yokoyama H, Lipp M,

Ueha S, Matsushima K, Kaneko S: Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA. 103, 14098-14103, 2006

2) Wada T, Matsushima K, Kaneko S: Chemokines and the kidney. In: Progress in Chemokine Research, Ed. W.P. Linkes, chapter 13, 179-186 (Nova Science Publishers, Hauppauge) 2007

3) Wada T, Sakai N, Matsushima K, Kaneko S: Fibrocytes: a new insight into kidney fibrosis. Kidney Int 72:269-273, 2007

4) Wada T, Matsushima K, Kaneko S: The role of chemokines in glomerulonephritis. Frontiers in Bioscience in press

5) Sakai N, Wada T, Iwai M, Horiuchi M, Matsushima K, Kaneko S. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. J Hypert in press

2. 学会発表

1) 第50回日本腎臓学会学術総会
2007年

ワークショップ2

腎臓病進行の分子メカニズム

腎間質線維化における fibrocyte の関与
和田隆志, 坂井宣彦

2) 第28回日本炎症・再生医学会
2007年

シンポジウム4-2 慢性炎症とケモカイン

慢性腎臓病とケモカイン

和田隆志 金子周一 松島綱治

3) 8th World Congress on Inflammation

2007 年

S-03 Symposium

Inflammation-associated tissue damage,
repair and regeneration medicine

Chemokines in renal injury

Wada T, Kaneko S, Matsushima K

4) 第 37 回 日本腎臓学会西部学術大会

2007 年

ワークショップ 1

腎障害と免疫・凝固異常

WS 1-3

炎症・免疫担当細胞からみた腎臓病進展機
序

和田隆志、岩田恭宜、坂井宣彦、古市賢吾