

骨髓由来細胞を介した新規の腎線維化機序の解析

著者	和田 志
著者別表示	Wada Takashi
雑誌名	平成19(2007)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2006-2007
ページ	12p.
発行年	2008-05
URL	http://doi.org/10.24517/00050736



骨髓由来細胞を介した新規の腎線維化機序の解析

18590887

平成 18 年度—平成 19 年度
科学研究費補助金(基盤研究 C)成果報告書

平成 20 年 5 月

研究代表者 和田 隆志

金沢大学大学院医学系研究科教授

金沢大学附属図書館



1300-05175-2

は し が き

腎疾患が進展し腎不全に至る過程において、糸球体硬化ならびに間質線維化という共通のプロセスをとることが特徴である。このうち糸球体硬化に比して腎間質線維化が腎予後により深く関連することから、腎間質線維化が治療の標的として重要である。この腎線維化ではマクロファージに代表される炎症・免疫担当細胞の腎局所への浸潤と活性化が発症・進展に重要と考えられている。現在まで炎症・免疫担当細胞とケモカインに着目し、腎線維化進展機序への役割と治療への応用について検討してきた。すでに interleukin-8 (IL-8) の急性期病変への関与(Kidney Int, 1994, J Exp Med, 1994)を報告した。さらに monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)について、ヒトループス腎炎, IgA 腎症および糖尿病腎症の発症・進展において間質線維化に深く関与することから、MCP-1 は病因を問わず共通の進展因子であることを報告した (J Leukoc Biol 1998, Kidney Int 1996, 2000)。加えて進行性腎炎・腎線維化モデルに対し MCP-1 とその受容体 CCR2 を阻害したところ腎機能保持効果、間質線維化改善を確認した (FASEB J, 1996, J Am Soc Nephrol 2003, 2004, Am J Pathol 2004)。MCP-1/CCR2 に代表されるケモカインの発現ならびに受容体のシグナル伝達に重要な p38 mitogen activated protein kinase(MAPK)阻害薬を用いることによりケモカインの抑制を介して進行性ループス腎炎(J Am Soc Nephrol 2003)ならびに糸球体硬化・間質線維化(J AM Soc Nephrol 2000, Am J Kidney Dis 2001)の進展抑制効果を示してきた。以上より、ケモカインを介した炎症・免疫細胞の制御は腎線維化の重要な治療標的となりうる。

一方、最近になり CD45 といった白血球マーカーが陽性であることに加えて、I型コラーゲン等間葉系細胞マーカーを発現する末梢血中の骨髓由来細胞、fibrocyte の存在が示され線維化との関連で注目されている。単球系、T細胞、B細胞マーカーが陰性であるが免疫応答を司る MHC 等の分子をもつユニークな白血球である。fibrocyte には CCR7 に代表されるケモカイン受容体が発現しているが、その浸潤・活性化ならびに腎線維化との関連は目下のところ不明である。

そこで fibrocyte ならびにそれに発現するケモカイン受容体 CCR7 に着目し、進行性腎線維化への関与とその制御による腎不全進展阻止の可能性にむけた研究を行った。さらに、fibrocyte とレニン・アンジオテンシン系との関連に着目し、臨床的に腎線維化抑制効果が示されているレニン・アンジオテンシン系阻害薬の治療標的細胞としての可能性につき検討した。

研究組織

研究代表者：和田 隆志（金沢大学大学院医学系研究科教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	1,800,000	0	1,800,000
平成19年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

研究発表

(1) 雑誌論文

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, Sakai N, Matsushima K, Kaneko S.

Fibrocytes: a new insight into kidney fibrosis.

Kidney Int 72, 269–273, 2007

3) Nakaya I, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Yokoyama H, Ishida Y, Kondo T, Sugaya T, Kawachi H, Shimizu F, Narumi S, Haino M, Gerard C, Matsushima K, Kaneko S.

Blockade of IP-10/CXCR3 promotes progressive renal fibrosis.

Nephron Exp Nephrol 107, e12–21, 2007

4) 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 Hypertens 26, 780-790, 2008

5)Furuichi K, Wada T, Kaneko S, Murphy PM.

Roles of chemokines in renal ischemia reperfusion injury.

Frontiers in Bioscience 13,4021-4028, 2008

6)Sakai N, Wada T, Matsushima K, Kaneko S.

Fibrocyte: New participant in the pathogenesis of renal fibrosis.

Inflammation and Regenarion 28, 20-26, 2008

7)Wada T, Matsushima K, Kaneko S.

The role of chemokines in glomerulonephritis.

Frontiers in Bioscience 13, 3966-3974, 2008

(2) 学会発表

1) 和田隆志、坂井宣彦

第 50 回 日本腎臓学会学術総会

平成 19 年 5 月 25 日 浜松

ワークショップ 2

腎間質線維化における fibrocyte の関与

2) Wada T, Kaneko S, Matsushima K.

8th World Congress on Inflammation

平成 19 年 6 月 17 日 コペンハーゲン

Symposium S-O3

Chemokines in renal injury

3) 和田隆志、金子周一、松島綱治

第 28 回日本炎症・再生医学会

平成 19 年 8 月 3 日 東京

シンポジウム 4-2

慢性腎臓病とケモカイン

4) 和田隆志、岩田恭宜、坂井宣彦、古市賢吾

第 37 回 日本腎臓学会西部学術大会

平成 19 年 10 月 19 日 福井

ワークショップ 1-3

炎症・免疫担当細胞からみた腎臓病進展機序

(3) 図書

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) Sakai N, Wada T, Matsushima K, Kaneko S.

Role of fibrocytes in renal fibrosis

Fibrocytes, new insights into tissue repair and systemic fibroses

163-173

Ed. Bucala R, World Scientific, Singapore, 2007

3) Wada T, Matsushima K, Kaneko S.

Chemokines and the kidney

Progress in Chemokine Research, 179-186

Ed. Linkes WP, Nova Science Publishers, Hauppauge, 2007

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし

研究成果

本研究はケモカイン SLC とその受容体 CCR7 を介した骨髄由来細胞である fibrocyte の腎線維化への役割を理解し、治療標的としての可能性を明らかにするものである。これらの知見は腎臓病の予後規定因子である尿細管間質病変の治療を考える上で重要な意味をもつものと考えられる。現在、血液浄化療法を余儀なくされる腎不全例は増加の一途で 26 万人となり、腎不全への進行抑制は社会的、医学的にそして医療経済上に重要な意味を持つ。一方、腎線維化における fibrocyte の役割は十分に評価されておらず、炎症・免疫機序と線維化機序を橋渡しする新規機序である可能性がある。ケモカインを介した fibrocyte による腎線維化の解析ならびにその制御効果を検討することにより新規の治療戦略構築が期待できる。現在、治療に難渋している進行性腎臓病の共通進展経路である腎線維化治療の可能性が示されれば腎臓保護への多面的な臨床応用が可能である。このような背景と目的のもと、以下の 3 つの研究成果を得た。

1) fibrocyte の腎線維化機序への関与とその治療標的としての可能性

腎線維化ではマクロファージに代表される炎症・免疫担当細胞の腎局所への浸潤と活性化が発症・進展に重要と考えられている。これまで、我々は炎症・免疫担当細胞とケモカインに着目し、腎線維化進展機序への役割と治療への応用について検討してきた（本報告書 雑誌論文 7 および図書 3、報告書に

添付)。これらの成果より、ケモカインを介した炎症・免疫細胞の制御は腎線維化の重要な治療標的となりうることを推測してきた。これらを背景に腎線維化における fibrocyte の意義をマウス一側尿管結紮モデル(UUO)を用いて検討した。CD45/I型コラーゲン共陽性 fibrocyte は皮髄境界領域を中心に陽性所見を認め、その陽性細胞数は線維化進展に伴い増加した。この細胞の多くは CCR7 陽性であった。さらに皮髄境界領域を中心に CCR7 リガンド(CCL21)/MECA79 共陽性血管を認めた。一方、抗 CCL21 中和抗体を用いた CCL21/CCR7 シグナリング阻害にて、CD45/I型コラーゲン共陽性 fibrocyte 浸潤の減少とともに間質線維化の改善を認めた。ヒト末梢血より fibrocyte を分離採取し、CCL21, TGF- β 刺激によるコラーゲン産生能を検討したところ、時間依存性に I 型コラーゲン発現亢進を認めた (代表 雑誌論文 1 および 2、報告書に添付)。

2)各種ヒト腎臓病における fibrocyte の意義

腎生検を施行し、慢性腎臓病(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。

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。

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みとめた。

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。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。

結論

以上の結果より、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。

3) レニン・アンジオテンシン系の fibrocyte にはたす意義

レニン・アンジオテンシン系は腎はじめ臓器線維化に深く関与することが判明している。そこで、腎線維化におけるレニン・アンジオテンシン系と fibrocytes の意義を検討した。

対象と結果

8 週齢雄性 angiotensinII(AII)受容体 type2 欠損マウス(AT2k/o)および対照マウス(WT)に一側尿管結紮(UUO)モデルを作成した。なお、valsartan(VAL;20mg/kg/日)を UUO7 日前より経口投与した。UUO5 日目に屠殺し、腎組織、腎内 RNA および骨髄を採取した。ヒト末梢血より fibrocytes を採取し、AII 刺激による I 型コラーゲン(ColI)mRNA 発現を検討した。

その結果、UUO5 日目において、免疫組織学的に CD45/ColI 陽性 fibrocytes の腎浸潤を認めた。浸潤 fibrocyte 数、腎線維化面積、腎内 ColImRNA 発現は AT2k/o において WT に比し高値であり、VAL 投与でいずれも減少した。骨髄中の CD45/ColI 陽性 fibrocytes 数は、AT2k/o において WT に比し高値であり、VAL 投与でいずれも減少した。培養 fibrocytes は AII 刺激により時間依存性 ColImRNA 発現を認めた。一方、VAL 添加で発現は抑制され、PD123319(AT2 antagonist)添加では発現が亢進した。

結論

レニン・アンジオテンシン系は骨髄・腎における fibrocyte 増殖・活性化調節を介して腎線維化に関与することが示唆された。これらの結果より、レニン・アンジオテンシン系阻害薬の腎はじめ臓器線維化抑制効果の少なくとも一部は、fibrocyte の制御を介している可能性が示された（雑誌論文 4、報告書に添付）。

総括

新規の骨髄由来細胞、fibrocyte は CCL21/CCR7 シグナリングによる腎浸潤および活性化を介して腎線維化に関与する。さらにレニン・アンジオテンシン系は骨髄・腎における fibrocyte 増殖・活性化調節を介して腎線維化に関与することが示唆された。レニン・アンジオテンシン系阻害薬の腎はじめ臓器線維化抑制効果の少なくとも一部は、fibrocyte の制御を介している可能性が示された。