

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591192

研究課題名(和文)腎疾患の腎局所及び全身免疫応答における骨髄由来免疫抑制性細胞の意義

研究課題名(英文)Pathogenesis of immune cells in progressive kidney disease

研究代表者

岩田 恭宜 (Iwata, Yasunori)

金沢大学・大学病院・特任助教

研究者番号：90432137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性疾患では、白血球などの免疫担当細胞が活性化され、炎症促進/免疫抑制バランスに異常を来することが知られている。糖尿病性腎症では免疫担当細胞に加えて、腎固有細胞も活性化されるが、その免疫バランスに関しては明らかではない。そこで本検討では糖尿病性腎症における腎固有細胞の免疫バランスについて検証を行った。高糖刺激した腎固有細胞では、炎症促進系に働く分子のmRNA発現が亢進している一方、免疫抑制系分子のmRNA発現が低下していた。これらの結果は、糖尿病性腎症において、腎固有細胞でも免疫バランスが破たんし、このことが慢性炎症の遷延化から疾患の進展に寄与しているものと推測された。

研究成果の概要(英文)：High glucose (HG) stimulates various kinds of leukocytes, resulting in an aberrant the inflammatory/anti-inflammatory immune balance. However, it is unclear if renal resident cells showed an aberrant immune balance in diabetic nephropathy (DN). Therefore, we hypothesized that the aberrant immune balance of renal resident cells contributes to the pathogenesis of DN. To explore this possibility, we performed genome-wide transcriptome profiling in mesangial cells and tubular epithelial cells (TECs), which were stimulated by HG and detected the expression of inflammation associated genes. Pro-inflammatory/Th1 gene expression was upregulated, but Th2 related gene expression was downregulated in mesangial cells. In TECs, HG stimulation increased pro-inflammatory/Th1/Th2 gene expression. The data taken together indicate that HG shifts the immune balance toward pro-inflammatory/Th1 phenotype in renal resident cells, which might initiate and/or prolong inflammation.

研究分野：腎臓病学

キーワード：糖尿病性腎症 免疫担当細胞 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は糖尿病の高血糖により生じる最小血管障害であり、三大合併症の一つである。腎症の発症には高血糖による糸球体障害が関与するが、その進展には炎症細胞浸潤を含む慢性炎症が非常に重要な役割を果たしている。最近の報告では厳格な血糖や血圧のコントロール、レニン-アンジオテンシン系阻害薬を含めた腎保護作用をもつ薬物などの治療によって、糖尿病性腎症が改善する可能性も報告されている。しかしながら、糖尿病性腎症患者の減少は見られず、末期腎不全となり透析を受ける患者数は全透析症例数の37.6%(115,118例)に至り、新規透析導入患者も全透析導入患者の中で43.8%(15,837例)を占めており、その進展機序の解明は医学的・医療経済的にも重要な課題である。

糖尿病性腎症を含む進行性腎障害の進展には慢性炎症が深く関与することが報告されている。我々は、これまで糖尿病性腎症モデルマウスやループモデルマウスの腎障害において、マクロファージ(Mφ)の関与を検討してきた。その結果、炎症促進性に働くM1 Mφのみならず、免疫抑制性を示すM2 Mφも進行性腎障害の病態に寄与していることが明らかとなった。進行性腎障害の疾患発症・進展課程においては、炎症促進因子と免疫抑制因子のバランスが、疾患が増悪するかあるいは修復・治癒するか、という予後に重要な役割を果たしていることを示唆していると考えられた。一方、浸潤細胞のみならず、メサンギウム細胞や尿細管上皮細胞など、腎固有細胞も慢性炎症を介した腎障害の病態に関与することが明らかとなっている。

2. 研究の目的

そこで、我々は腎固有細胞においても、これ

ら免疫バランスの破たんが、糖尿病性腎症の発症・進展に関与していると仮説を立て、検証を行った

3. 研究の方法

培養メサンギウム細胞を高糖刺激し、mRNAを抽出・処理後に次世代シーケンサーにてトランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

高糖刺激にて CC-chemokine ligand (CCL) 2 や tumor necrosis factor (TNF)-α といったなどの、炎症性サイトカイン、ケモカインの遺伝子発現が亢進した。高糖からの刺激は、これまで protein kinase C を介した細胞内シグナル伝達に関与することが報告されており、本検討においても同分子の mRNA 発現亢進が認められた。一方、reactive oxygen species (ROS) 関連分子、mammalian target of rapamycin (mTOR)、インフラマゾーム関連分子など、高糖刺激との関連が明らかではない分子の遺伝子も発現亢進していた。これらのことは、高糖による刺激は、既知・未知含め、複数の細胞内シグナル伝達を介して細胞の動態を変化させていることを示唆していると考えられた。さらに、網羅的に検討したサイトカイン・ケモカイン関連分子、細胞内シグナル伝達関連分子の遺伝子発現を検討した。メサンギウム細胞では、高糖刺激により、炎症性サイトカイン/ケモカイン関連遺伝子の発現が亢進した(表1)。一方、interleukin(IL)-4 や IL-10 といった免疫抑制性サイトカイン関分子の遺

表1. 高糖刺激したメサンギウム細胞において inflammatory cytokine/chemokine 関連遺伝子の発現が亢進した

	Increased genes (High glucose/anti control)	Decreased genes (High glucose/anti control)
Pro-inflammatory	CCL2 (23.8) TNFα (2.2) IL-1R (2.0)	IL-6 (0.5) IL-10 (0.5) IL-13Rβ (0.8)
Th1	STAT1 (1.3)	IFN-γR (0.5)
Th2		IL-4R (0.5) IL-10Rβ (0.9) IL-13Rβ (0.8)
Th17	IL-6ST (1.3)	STAT3 (0.3)
TGF	SMAD1 (1.3) SMAD2 (1.7)	SMAD3 (0.4)

Abbreviations are CCL: CC chemokine ligand, TNF: tumor necrosis factor, MAPK: mitogen activated protein kinase, STAT: signal transducer and activator of transcription, IFN: Interferon, IL: interleukin, SMAD: Sma and Mad related family.

伝子発現は低下した。また尿細管上皮細胞においても同様の検討を行ったところ、炎症性サイトカイン/ケモカイン関連遺伝子の発現亢進が認められた(表2)。免疫抑制性サイトカイン関連遺伝子についても発現の亢進が認められた。これらの結果から、浸潤細胞のみ

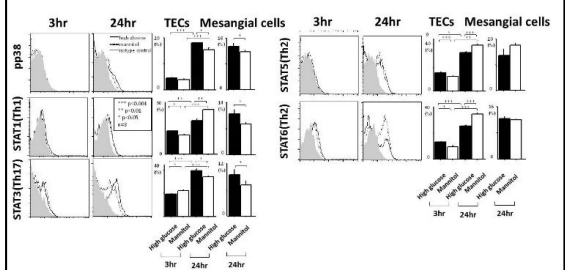
表2. 高糖刺激した尿細管上皮細胞において Inflammatory cytokine/chemokine 関連遺伝子の発現が亢進した

	Increased genes ↑ (High glucose/annitol control)		Decreased genes ↓ (High glucose/annitol control)	
	High glucose/annitol control	High glucose/annitol control	High glucose/annitol control	High glucose/annitol control
Pro-inflammatory	TN F α (1.5) IL-1R (0.0)	MAPK1 (1.3)		APK6 (0.6)
Th1	IL-18 (1.8) IL-12 (2.0)	STAT1 (2.8)		IFN- γ R (0.8)
Th2	IL-10R β (1.7) IL-13R α 1 (2.0)			
Th17	IL-6 (3.6)			
TGF				TGF- β 1 (0.8)

Abbreviations are: TNF: tumor necrosis factor, MAPK: mitogen activated protein kinase, STAT: signal transducer and activator of transcription, IFN: Interferon, IL: interleukin, TGF: transforming growth factor.

ならず、腎固有細胞においても、高糖刺激を受けることで、炎症促進性/免疫抑制性のバランスが破たんし、慢性炎症の遷延化から疾患の進展に寄与しているものと推測された。次いで、これら分子にかかわる細胞内シグナル伝達に関して検討を進めた。メサンギウム細胞、尿細管上皮細胞のいずれも、高糖刺激により、炎症性サイトカイン/ケモカイン関連の細胞内シグナル伝達分子のリン酸化が亢進した(図3)。また、尿細管上皮細胞では高糖刺激により免疫抑制系シグナル伝達分子のリン酸化が低下した。これらの結果は、高糖

図3. Inflammatory cytokine/chemokine 関連シグナルのリン酸化の亢進と、Th2関連シグナルのリン酸化の低下が認められた



刺激がサイトカイン/ケモカインの発現を変化させ、かつ、それらが細胞内シグナル伝達を介して、細胞障害に寄与していることを示唆していると考えられた。

以上の結果より、高糖刺激により腎固有細胞

の免疫バランスが破たんし、細胞内シグナル伝達を介した慢性炎症の遷延化から疾患の進展に寄与しているものと推測された。

今回の検討では、次世代シーケンサーを用いたことにより、免疫・炎症関連分子を網羅的に検討することで、細胞の免疫バランスを理解することが可能であった。単一細胞の単一の刺激であっても、多くのパスウェイにかかわる遺伝子発現に変化がみられた。このことは、高糖により、細胞内では複雑なカスケードを形成して、細胞の表現型が決定されることを示唆していると考えられた。今後はそれらカスケードを有機的に理解することで、高糖性細胞障害、ひいては糖尿病性臓器障害の新たなバイオマーカー、および治療標的の探索につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件)

1. Fujimi A, Kamihara Y, 他 15 名, Iwata Y (14 番目) Anti-erythropoietin receptor antibody-associated pure red cell aplasia accompanied by Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia in a patient with T cell/histiocyte-rich large B cell lymphoma. Int J Hematol. 2014 Aug 6. [Epub ahead of print] (査読有)
2. Kitajima S, Furuichi K, 他 9 名, Iwata Y (7 番目), Wada T (last author) Relapse and its remission in Japanese patients with idiopathic membranous nephropathy. Clin Exp Nephrol. 2014 Jun 24. [Epub ahead of print] (査読有)
3. Iwata Y, Furuichi K, 他 11 名, Wada T (last author) Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jan 17;443(3):969-74. (査読有)
4. 黒川 幸枝, 岩田恭宜, 他 4 名, 和田隆志 (6 番目) インスリン療法よりビルダグリプチン内服へ変更した糖尿病を合併する血液透析患者の検討 日本透析

- 医学会雑誌 47(9) 539-545 2014 (査読有)
5. 竹森優喜子, 千田靖子, 他 7 名, 岩田恭宜 (5 番目), 和田隆志 (last author) 当院における 5 年間の感染性心内膜炎の動向に関する研究 臨床病理 62(4): 332-336 2014 (査読有)
 6. 千田靖子, 竹森優喜子, 岩田恭宜, 他 2 名, 和田隆志 (last author) ITS-PCR 法および POT 法による MRSA の疫学解析に関する検討 臨床病理 62(5): 421-426 2014 (査読有)
 7. Nakade Y, Toyama T, 他 15 名, Iwata Y (11 番目), Wada T (last author) Impact of kidney function and urinary protein excretion on pulmonary function in Japanese patients with chronic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 2013 Dec 15. (査読有)
 8. Shimizu M, Furuichi K, 他 4 名, Iwata Y (7 番目), Wada T (last author) Long-term outcomes of Japanese type 2 diabetic patients with biopsy-proven diabetic nephropathy. Diabetes Care. 2013 Nov;36(11):3655-62. (査読有)
 9. Toyama T, Furuichi K, 他 2 名, Iwata Y (6 番目), Wada T (last author) The impacts of albuminuria and low eGFR on the risk of cardiovascular death, all-cause mortality, and renal events in diabetic patients: meta-analysis. PLoS One. 2013 Aug 30;8(8):e71810. (査読有)
 10. Hara A, Furuichi K, Higuchi M, Iwata Y, 他 2 名, Wada T Autoantibodies to erythropoietin receptor in patients with immune-mediated diseases: relationship to anaemia with erythroid hypoplasia. Br J Haematol. 2013 Jan;160(2):244-50. (査読有)
 11. Oshima M, Kitajima S, 他 11 名, Iwata Y (6 番目), Wada T (last author) Successful delivery in a patient with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. Clin Exp Nephrol. Intern Med. 2013;52(14):1605-9. (査読有)
 12. 岩田恭宜, 古市賢吾, 和田隆志 進行性腎疾患における骨髄由来免疫抑制性細胞の意義 日本臨床免疫学会誌 36(1), 2-10, 2013 (査読有)
 13. Iwata Y, Boström EA, 他 5 名, Wada T (6 番目) Aberrant macrophages mediate defective kidney repair that triggers nephritis in lupus-susceptible mice. J Immunol.

2012 May 1;188(9):4568-80. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Junya Yamahana, Yasunori Iwata, Kengo Furuichi, Takashi Wada Autoantibodies to EPOR are related to disease activity in SLE American Society of Nephrology Kidney Week 2014.11.11-16 (Philadelphia)
2. Yasunori Iwata Kengo Furuichi, Takashi Wada Genome-wide profiling of inflammation related genes in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells American Society of Nephrology Kidney Week 2013.11.5-10 (Atlanta)
3. 岩田恭宜, 橋本真一, 古市賢吾, 和田隆志 高踏刺激下での培養メサンギウム細胞における炎症関連遺伝子発現 第 5 6 回日本腎臓学会総会 2013 年 05 月 10 日 ~ 2013 年 05 月 12 日 (東京)
4. Yasunori Iwata, Elisabeth A. Bostom, Takashi Wada, and Vicki R. Kelley CSF-1 Dependent Defective Kidney Repair Triggers Nephritis in Lupus-Susceptible Mice American Society of Nephrology Kidney Week 2012 2012 年 10 月 30 日 ~ 2012 年 11 月 04 日 San Diego Convention Center (San Diego)
5. 岩田恭宜, 古市賢吾, 和田隆志 自己免疫性腎疾患における骨髄由来免疫抑制性細胞の意義 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012 年 07 月 05 日 ~ 2012 年 07 月 06 日 ホテル日航福岡 (福岡)
6. 岩田恭宜, 古市賢吾, 和田隆志 自己免疫性腎疾患における骨髄由来免疫抑制性細胞の意義 第 5 5 回日本腎臓学会学術総会 2012 年 06 月 01 日 ~ 2012 年 06 月 03 日 パシフィコ横浜 (神奈川)

〔図書〕(計 6 件)

1. 岩田恭宜, 和田隆志 妊娠が腎臓に及ぼす影響 腎臓内科の立場より 腎と透析 東京医学社 2013 p735-738
2. 岩田恭宜 腎臓病の病態 慢性炎症免疫担当細胞の関与 カレントセラピー ライフメディコム 2013 p18-23
3. 岩田恭宜, 和田隆志 腎不全 内科処方実践マニュアル 日本医学出版 2013 p265-274
4. 岩田恭宜, 和田隆志 検査・診断 腎不全治療レシピ 医学出版 2013 p52-61
5. 岩田恭宜, 和田隆志 慢性腎臓病の診断と治療 レジデント 医学出版 2012 Dec 5(12) P30-36
6. 岩田恭宜, 和田隆志 妊娠に伴う腎病変症例と病理からひもとく腎臓病 医薬ジャーナル社 2012 p244-253

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

岩田 恭宜 (Iwata Yasunori)

金沢大学 附属病院 特任助教

研究者番号： 9 0 4 3 2 1 3 7

(2)研究分担者

和田 隆志 (Wada Takashi)

金沢大学 医学系 教授

研究者番号： 4 0 3 3 4 7 8 4