

進行性腎炎における TNFR1, TNFR2 の役割

Department of Pathology Brigham and Women's Hospital

古橋 和拓

アステラス病態代謝研究会の海外留学補助により研究留学を 1 年間支援していただきました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。現在研究の足場づくりであり、まだまだ仮説を証明するには十分なデータがございませんが、これまでの研究経過をここにご報告いたします。

<背景と意義>

本邦の透析患者数は 30 万人（全国民の 400 名に一人）を超え、血液透析や、透析患者に高率に生じる脳梗塞、心筋梗塞などの合併症治療にかかるコストは医療経済を圧迫し続けている。そのため近年慢性腎機能障害(CKD)対策の重要性が叫ばれ、CKD に至る初期段階で患者に治療介入することにより、末期腎不全患者の減数に一定の効果が期待される。本邦での CKD 原因疾患として多くを占める腎炎や膠原病などの腎炎症性疾患に対する効果的治療開発には、その疾患の発症・進展機序のさらなる理解が不可欠である。腎炎発症主座である糸球体はいわば毛細血管の塊であり、炎症をプロモートする白血球の糸球体導入および炎症部位での活性化制御は腎炎治療戦略を構築する上で非常に魅力的である。

進行性腎障害の一つとして急速進行性糸球体腎炎(RPGN)が知られており、その中でも最も難治性の腎炎は抗基底膜抗体型腎炎（抗 GBM 抗体型 RPGN）である。抗基底膜抗体型腎炎は炎症の主座を糸球体とし、血管内から糸球体へ導入された白血球細胞により炎症が悪化・維持・収束する。抗 GBM 抗体の糸球体基底膜(GBM)への沈着をきっかけに、糸球体血管内皮細胞・白血球活性化が生じ、白血球から分泌されるサイトカイン・ケモカイン・タンパク分解酵素・過酸化水素などが血管内皮細胞をさらに傷害、それに引き続き単球・マクロファージ・リンパ球が浸潤することで糸球体障害が悪化する。この抗基底膜抗体型腎炎の進展には腫瘍壊死因子(TNF)が重要であるが、TNF レセプターには 2 種類 (TNFR1、TNFR2) のサブタイプが存在する。最近留学先の Tanya Mayadas 研究室は、TNFR1、TNFR2 のノックアウトマウスを用い、TNFR1、TNFR2 を介した腎炎進展に違いがあることを証明した。(Immunity 2013) TNFR1 はほとんどの細胞に発現しているが、TNFR2 は限られた細胞にしか発現していない。一方、日本で私は、抗基底膜抗体型腎炎の炎症を収束に導き、糸球体の再生に導くのは免疫調整性マクロファージなどの免疫細胞であることを示した。

そこで TNFR が単球系細胞（単球、マクロファージ、樹状細胞）を介した抗基底膜抗体型腎炎の炎症進展・収束にどのように関わっているのかを、Tanya Mayadas 研究室の TNFR1、TNFR2 ノックアウトマウスを用いて検討することを計画した。その単球系の評価において名古屋大学在籍中に開発した独自の生体内イメージング法を駆使して糸球体炎症を動態

学としてリアルタイムで観察する。

<研究方法>

①単球系細胞には表1に示すように

Inflammatory monocytes と patrolling Monocytes が存在する。

そこで各種単球系細胞（単球、樹状細胞、マクロファージ、）を CX3CR1-GFP,

CCR2-RFP のリポーターマウスを利用

して評価する。通常の組織固定法ではホルマリンの影響で F4/80 が検出できず、

生凍結切片では GFP, RFP が検出できず、

蛍光色素を保持した状態で単球系の評価に適した組織固定法を開発する必要があった。

②CCR2-RFP シグナルは CX3CR1-GFP よりも弱く、CX3CR1-GFP, CCR2-RFP のリポーターマウスを利用して各単球系の糸球体内での挙動を生体内で観察するためには two-photon 顕微鏡の最適なセッティングを行う必要があった。

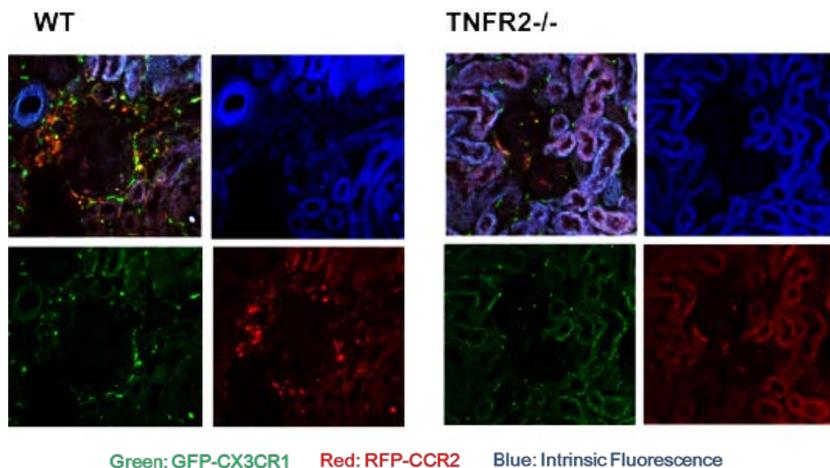
表 1

Human	Markers	Chemokine receptors	Function
Classical	CD14 ^{hi} CD16 ⁺ CD64 ⁺ (FcγR1) CD62L(L-selectin)	CCR2 ^{hi} CX3CR1 ^{low}	Phagocytic and microbial activity TNFR1 ^{int} TNFR2 ^{low}
Intermediate	CD14 ^{hi} CD16 ⁺ CD64 ⁺ (FcγR1) HLA-DR ^{hi}	CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{hi}	TNFR1 ^{hi} TNFR2 ^{int}
Non-classical	CD14 ^{low} CD16 ⁺ CD64 ⁻	CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{hi}	IL1-RA production TNFR1 ^{low} TNFR2 ^{hi}
Mouse	Markers	Chemokine receptors	Function
Classical	Ly6C ^{hi} CD43 ^{low} CD11b ⁺ CD115 ⁺ CD62L ⁺ CD11c ⁻	CCR2 ^{hi} CX3CR1 ^{low}	Inflammatory monocytes (produce TNF-alpha)
Intermediate	Ly6C ^{hi} CD43 ^{hi} CD11b ⁺ CD115 ⁻		
Non-classical	Ly6C ^{low} CD43 ^{hi} CD11b ⁺ CD115 ⁻ CD62L ⁻ CD11c ⁻	CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{hi}	Neovascularization. Patrolling, early response, tissue repair

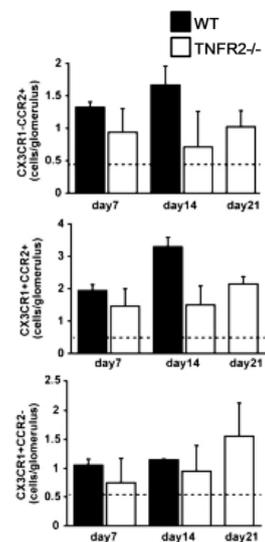
<研究成果>

①抗 GBM 抗体型 RPGN を誘導した WT と TNFR2^{-/-}の比較において各分画の単球系細胞を糸球体、間質で評価したところ、TNFR2^{-/-}において CCR2 陽性細胞の浸潤が少ないことがわかり、間質においてはどの単球系の浸潤も TNFR2^{-/-}マウスにて少ないことが判明した。また 10color FACS にて単球系の各分画を詳細に検討したが、抗 GBM 抗体型 RPGN が誘導されているにも関わらず、腎炎を誘導してないマウスと比較しても TNFR2^{-/-}にてマクロファージや樹状細胞の浸潤がほとんど認められなかった。しかし、それぞれの単球系分画をさらに各種細胞表面マーカーで分割し解析したところ、増加する分画と増加しない分画が存在しており、現在さらなる解析を続けている。

A. Glomerulus



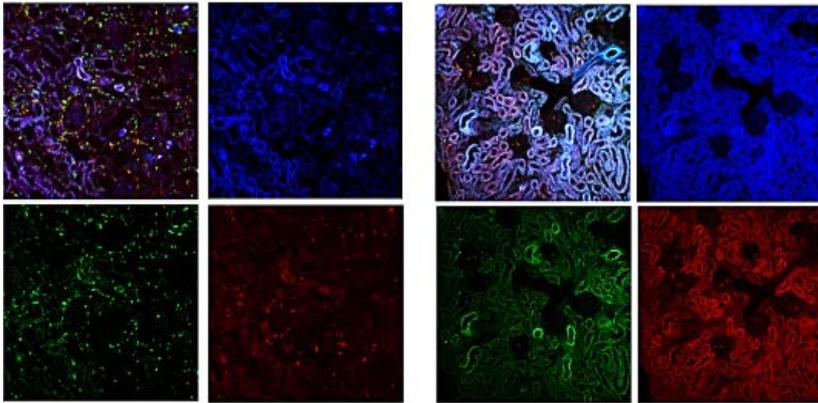
Green: GFP-CX3CR1 Red: RFP-CCR2 Blue: Intrinsic Fluorescence



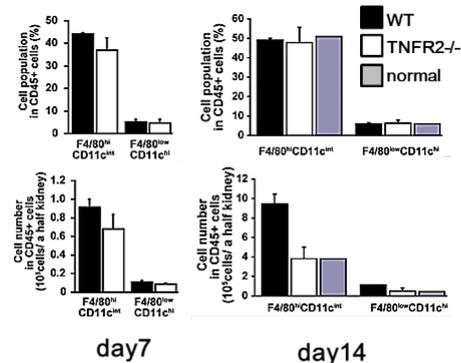
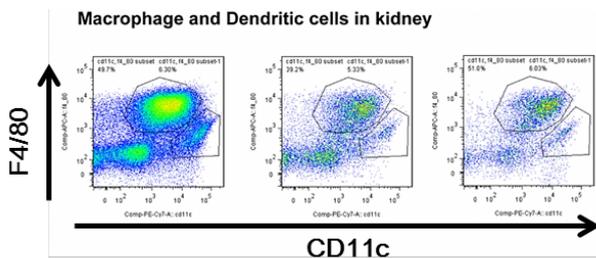
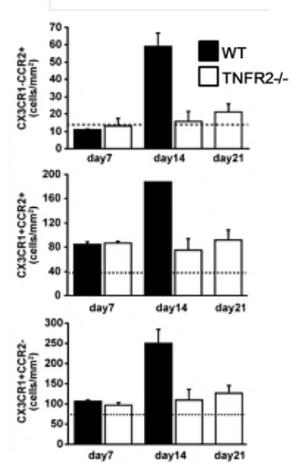
B. interstitiumn

WT

TNFR2^{-/-}



Green: GFP-CX3CR1 Red: RFP-CCR2 Blue: Intrinsic Fluorescence



②生体イメージング 糸球体



青：好中球 緑：CX3CR1陽性細胞
赤：CCR2陽性細胞 白：血管

<今後の研究>

この1年で単球系、好中球の動態を観察するための手技、マウスの作製、two-photon 生体顕微鏡のセッティング条件は完成した。この技術はあらゆる腎臓における炎症モデルで生体内の白血球の挙動を観察するのに有用な技術であり、現在他の共同研究者との研究において様々なノックアウトマウスの生体内での、単球系細胞、好中球、さらにはあらゆる白血球の観察を行っており、それを継続していく。

名古屋大学在籍中に開発した独自の生体内イメージング法をさらに改良することで、さらに深部まで観察可能となり、さらにtwo-photon 生体顕微鏡のセッティングをRFP観察に適した条件にすることで、生体内の腎臓特に糸球体での単球系、好中球の動態を同時に観察することも可能となった。この技術は今後も様々なノックアウトマウスでの、単球系細胞の観察に有用な技術であり、あらゆる腎臓における炎症モデルで生体内の単球系の動態を観察しうる礎であると考えている。

今後、自分のプロジェクトである TNFR1, TNFR2 を介した腎炎進展のメカニズムを、単球系細胞、好中球の動態学を通して証明していく予定である。

また、生体内の生きた情報を観察することで新たな発見が見えてくる可能性もあり、得られた4次元画像（XYZ+時間軸）を興味深く観察していく所存です。