

2002 年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

-調査・共同研究に対する助成-

2003 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会
理 事 長 殿

研究代表者名 名 取 泰 博 
所属機関名 国立国際医療センター研究所
部署・役職 臨床薬理研究部 部長
所在地 〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1
電話 03-3202-7181 内線 2800

1.研究テーマ

中国の腎炎患者における重症度と白血球浸潤に関する研究

2.研究期間 自 2002 年 5 月 1 日～ 至 2003 年 3 月 15 日

3.研究組織

日本側研究者氏名 名取泰博
所属機関 国立国際医療センター研究所 職名 部 長

中国側研究者氏名 欧 周羅
所属機関 復旦大学基礎医学院生物化学教研室 職名 副教授

4.研究報告書

別紙参照

中国の腎炎患者における重症度と白血球浸潤に関する研究

研究者氏名	名取泰博
日本所属機関	国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部
共同研究者	欧 周羅
中国所属機関	復旦大学基礎医学院生物化学教研室

要 旨

組織への白血球浸潤にはケモカインと呼ばれる一群のサイトカインが重要と考えられているが、ケモカインの中で唯一膜結合性であるフラクタルカインに関する研究は少ない。本研究では、復旦大学医学院附属中山医院に受診した腎疾患患者を対象として、フラクタルカイン及びフラクタルカイン受容体の発現を免疫組織化学的に解析した。

正常腎組織にはフラクタルカイン及びフラクタルカイン受容体の発現はほとんど見られなかったのに対し、腎疾患患者 52 例中 15 例の腎尿細管間質領域（多くは尿細管上皮細胞）にフラクタルカインが、35 例の間質にはフラクタルカイン受容体が検出された。フラクタルカイン陽性例の多くはフラクタルカイン受容体も陽性例であった（15 例中 13 例）。またフラクタルカイン陽性例では陰性例に比べて、血液尿素窒素、血清クレアチニン値、尿蛋白のいずれも高値を示した。間質への白血球浸潤の程度はフラクタルカイン及びフラクタルカイン受容体の発現が高い症例ほど顕著であり、フラクタルカインが陽性の尿細管の周囲には多数の白血球が観察されることが多かった。フラクタルカインの発現はいずれの浸潤白血球数とも相関し、特にフラクタルカインの発現と CD68 陽性細胞数との相関が最も強かった。以上の結果から、フラクタルカインは腎炎における間質白血球浸潤に重要な役割を担うことが示唆され、新しい診断あるいは治療の標的となり得ることが示唆された。

Key Words 糸球体腎炎、ケモカイン、線維化、白血球、腎間質

緒 言：

慢性腎不全の多くは数カ月から数年かけて不可逆的に進行し、腎死へと至る。血液透析療法が広く普及している我が国では腎死が患者の死に直結しないが、患者の QOL の問題や長期透析療法の保険財政への経済的圧迫などから慢性腎不全の防止は依然として重要な課題である。一方、中国においても慢性腎不全患者は年々増加し、少なく見積もっても現在約 70 万人の患者がいると推定されている。中国では腎移植の件数は年間約 3,000 人と言われ我が国より多いが、血液透析の普及は低く（普及率約 20%）、未だに慢性腎不全が原因で死亡する例が多い。従って中国では日本以上に慢性腎不全防止が重要な課題である。

慢性腎不全の原因疾患として、糖尿病性腎症の割合が著しく増加した我が国と比較し、中国においては依然として慢性糸球体腎炎の比率が遥かに高いと言われている。また、欧米諸国と比べて日中両国では慢性糸球体腎炎の中に占める IgA 腎症の割合が高く、両国で最も多い糸球体疾患となっている。従って中国においては IgA 腎症を主とした慢性糸球体腎炎の予防や治療が慢性腎不全対策として最も重要である。また IgA 腎症の患者数の多さから日中両国がその病態解明や診断・治療法の開発を強力に推進すべきと考えられる。

糸球体腎炎の進展の速度は、糸球体病変そのものよりも尿細管間質病変と良く相関することが古くから知られている。また尿細管間質病変は、糸球体腎炎の進展の結果であるばかりでなく増悪因子としても作用すると考えられており、尿細管間質病変の進展抑制は慢性糸球体疾患における腎不全阻止に有効な手段となることが示唆されている。従って尿細管間質病変進展の分子機構を明らかにすることは、慢性腎不全

への進展を阻止する新しい治療法を開発するのに有用と考えられる。

尿細管間質病変は、尿蛋白の増加に由来する尿細管上皮細胞の活性化から、間質の白血球浸潤、間質の線維化へと進展すると考えられている。これまで、腎間質への白血球の浸潤には多くの遊走因子が関与することが知られており、中でもケモカインと呼ばれる白血球遊走活性化能を有する一群のサイトカインについては数多くの報告がある。フラクタルカイン¹⁾は比較的新しく同定されたケモカインの一種であり、数あるケモカインの中で唯一の膜蛋白質である。フラクタルカインは活性化された血管内皮細胞に発現し、血管から間質組織への白血球浸潤に関与すると一般に考えられている。一方、フラクタルカイン受容体は単球、ナチュラルキラー (NK) 細胞、活性化 T 細胞に発現すると言われており、特にヒトの末梢血細胞を用いた研究からはパーフォリンやグランザイムなどを発現する細胞障害性 T 細胞及び NK 細胞に発現すると報告されている。しかし腎炎においてフラクタルカインの発現亢進に応じて集積する細胞についてや、フラクタルカイン及びフラクタルカイン受容体の両方の発現を分析した研究は報告されていない。

本研究では、ヒトフラクタルカイン及びフラクタルカイン受容体²⁾に対する特異抗体を用いて、種々の腎症患者におけるそれらの発現を解析し、その発現パターンを種々の白血球の浸潤や臨床データと比較することにより、腎症の白血球の浸潤におけるフラクタルカインの意義について検討した。

対象と方法：

上海・復旦大学医学院附属中山医院の腎臓内科に受診した IgA 腎症及び他の糸球体疾患患者 52 名を対象とし、その腎生検組織を免疫組織学的検索に用いた。疾患別の内訳は以下の通りである：IgA 腎症 22 名、微小変化型腎症 16 名、膜性腎症 3 名、巣状分節性増殖性腎炎 4 名、巣状糸球体硬化症 2 名、メサンギウム増殖性腎炎 2 名、膜性増殖性腎炎 1 名、半月体性糸球体腎炎 2 名（病理診断名は同病院の分類に従った）。その臨床データを表 1 に示す。正常コントロールとしては腎癌患者 4 名から摘出した腎組織の正常部分を用いた。また抗体反応のための陽性コントロールとして扁桃腺炎患者計 8 名から摘出した扁桃腺を用いた。これらの組織を本研究に用いることは同医院の倫理委員会にて承認されている。

用いた一次抗体は以下の通りである：マウス抗ヒト CD57 モノクローナル抗体（NK 細胞の検出、Becton Dickinson 社製）、マウス抗ヒト CD68 モノクローナル抗体（単球/マクロファージ、DAKO 社製）、マウス抗ヒト CD4 モノクローナル抗体（CD4 陽性 T 細胞、Antibody Diagnostics 社製）、マウス抗ヒト CD8 モノクローナル抗体（CD8 陽性 T 細胞、Nichirei 社製）、マウス抗ヒトトリプターゼモノクローナル抗体（マスト細胞、DAKO 社製）、マウス抗ヒトフラクタルカインモノクローナル抗体（カン研究所今井博士より供与）、ウ

表 1. 腎症患者の内訳及び臨床データ

疾患名	年齢	性比 (M:F)	血液	血清	尿蛋白 (g/24h)
			尿素窒素 (mM)	クレアチニン値 (μ M)	
IgA 腎症 (n=22)	44 $\pm$ 12	7:15	6.0 $\pm$ 3.1	92 $\pm$ 37	2.2 $\pm$ 1.9
微小変化型腎症 (n=16)	44 $\pm$ 14	3:12	5.0 $\pm$ 1.3	63 $\pm$ 10	1.6 $\pm$ 2.6
膜性腎症 (n=3)	48 $\pm$ 21	2:1	5.1 $\pm$ 2.6	68 $\pm$ 12	9.9 $\pm$ 2.3
巣状分節性増殖性腎炎 (n=4)	33 $\pm$ 18	2:2	7.1 $\pm$ 1.7	89 $\pm$ 39	1.5 $\pm$ 1.9
巣状糸球体硬化症 (n=2)	42, 69	0:2	7.7, 20.4	134, 152	3.0, 16.1
メサンギウム増殖性腎炎 (n=2)	35, 46	1:1	4.8, 6.2	75, 81	2.1, 2.3
半月体性糸球体腎炎 (n=2)	60, 61	1:1	19.2, 28.9	147, 979	0.11, 1.16
膜性増殖性腎炎 (n=1)	49	0:1	4.7	68	0.19

サギ抗ヒトフラクタルカイン受容体ポリクローナル抗体（カン研究所今井博士より供与）。薄切した凍結切片をこれらの抗体で反応させた後、対応するビオチン標識二次抗体及び ABC キット（Vector 社製）を用いて発色させた。メチルグリーンにより染色後、光学顕微鏡を用いて鏡検した。統計解析には Mann-Whitney U テストあるいは Spearman の順位相関テストを用いた。

結 果：

正常腎組織には、間質及び糸球体への白血球浸潤やフラクタルカイン及びフラクタルカイン受容体の発現はほとんど見られなかった。

腎疾患患者の腎生検組織にはフラクタルカインが検出される症例が 52 例中 15 例あり、陽性例の疾患別の内訳は、IgA 腎症 5 例、膜性腎症 3 例、巣状糸球体硬化症 2 例、半月体性糸球体腎炎 2 例、巣状分節性増殖性腎炎 1 例、メサングウム増殖性腎炎 1 例、膜性増殖性腎炎 1 例であった。これらの症例でフラクタルカインは尿細管間質領域にのみ検出され、その多くは尿細管上皮細胞に検出され、また一部は間質細胞に見られた。一方、糸球体内にはフラクタルカインの発現は見られなかった。

フラクタルカイン陽性例では陰性例に比べて、血液尿素窒素、血清クレアチニン値 ($P=0.01$)、尿蛋白 ($p=0.001$) のいずれも高値を示し、フラクタルカインの発現は臨床的に重症であるほど顕著であることが明らかとなった。

表 2．フラクタルカイン発現の有無と臨床パラメータの比較

	年齢	性比	血液 尿素窒素	血清 クレアチニン値	尿蛋白
		(M:F)	(mM)	(μ M)	(g/24h)
陽性例 (n=15)	47 $\pm$ 17	5:10	9.9 $\pm$ 7.7	168 $\pm$ 228	5.3 $\pm$ 4.6
陰性例 (n=37)	44 $\pm$ 14	11:26	5.9 $\pm$ 3.8	78 $\pm$ 39	1.6 $\pm$ 2.0

フラクタルカイン受容体の発現はフラクタルカインの発現より頻度が高く、また腎間質だけでなく、糸球体内にも見られた。腎間質での陽性例は 35 例、糸球体内陽性例は 21 例あり、そのうち両方が陽性だった例は 18 例あった。間質陽性例の疾患別の内訳は、IgA 腎症 12 例、微小変化型腎症 10 名、膜性腎症 3 例、巣状分節性増殖性腎炎 3 例、巣状糸球体硬化症 2 例、半月体性糸球体腎炎 2 例、メサングウム増殖性腎炎 2 例、膜性増殖性腎炎 1 例であった。またフラクタルカイン陽性例 15 例のうち腎間質でのフラクタルカイン受容体陽性例が 13 例あり、フラクタルカインが尿細管間質領域に発現すると、その受容体発現細胞が集積することが示唆された。間質のフラクタルカイン受容体陽性例と陰性例の間には臨床的パラメータについて有意な差は見られなかったが、全ての患者についての面積当たりのフラクタルカイン受容体陽性細胞数と尿蛋白値との相関解析では有意な相関を示した ($p=0.387$, $P<0.01$)。

表 3 に示すように、間質への白血球浸潤の程度はフラクタルカイン及びフラクタルカイン受容体の発現が高い症例ほど顕著であった。フラクタルカインが陽性の尿細管の周囲には多数の白血球が観察されることが多く、またフラクタルカイン受容体陽性細胞の分布は NK 細胞、マスト細胞、単球/マクロファージの分布と類似していた。フラクタルカインの発現はいずれの浸潤白血球数とも相関し、特にフラクタルカインの発現と CD68 陽性細胞数との相関が最も強かった ($P<0.01$)。

表 3. フラクタルカイン発現の有無による白血球浸潤の比較

	受容体	CD57	CD68	CD4	CD8	tryptase
	(cells/mm ²)	(cells/mm ²)	(cells/mm ²)	(cells/mm ²)	(cells/mm ²)	(cells/mm ²)
陽性例	13.3 ± 23.2	11.4 ± 11.2	13.2 ± 18.4	31.1 ± 37.2	33.2 ± 40.8	11.2 ± 9.5
陰性例	2.7 ± 4.7	4.7 ± 4.9	2.3 ± 4.9	8.5 ± 16.8	11.5 ± 16.9	7.0 ± 6.6

考 察：

本研究の結果から、腎炎の重症度が高いほどフラクタルカインの発現が亢進しており、また白血球浸潤の程度も高いことがわかった。さらにフラクタルカインを発現する尿細管上皮細胞の周囲にはフラクタルカイン受容体発現細胞や単球/マクロファージ、NK 細胞などが集積していることが示され、フラクタルカインがこれらの白血球浸潤に関与することが示唆された。

これまで、動物モデルを用いて腎炎におけるフラクタルカインの役割について調べた報告がいくつかあるが、尿細管間質での発現に関する報告はない。そこで申請者は共同研究者の欧周羅らとともに、ラットのピューロマイシンアミノヌクレオシド腎症モデルにおけるフラクタルカインの発現を調べた結果、同モデルの初期には糸球体内にのみ発現が認められたが、蛋白尿が出始める腎炎惹起 5 日目頃から尿細管上皮細胞にフラクタルカインの発現が起きるようになることを見出した（未発表）。また、臨床例の場合と同様、フラクタルカイン発現尿細管上皮細胞の周囲には白血球浸潤が観察され、フラクタルカインがこれらの白血球に対して遊走活性を示していることが示唆された。現在、この動物モデルを用いて、尿細管間質におけるフラクタルカイン発現の尿細管間質病変における役割を検討中である。

本研究の結果で興味深い点の一つは、微小変化型腎症の患者腎組織にはフラクタルカインの発現が 1 例も見られなかったことである。これらの症例のうち蛋白尿が 3.5 g/日以上を示したのは 2 例のみであるが、いずれもフラクタルカインの発現はなく、一方、同程度の蛋白尿を示した他の疾患患者 9 例中 8 例にはフラクタルカインの発現が見られた。症例数が少ないので結論を出すことはできないが、微小変化型腎症では尿細管上皮細胞におけるフラクタルカインの発現誘導がかからないことが示唆され、同疾患が予後が良いことと関連するかも知れない。また尿細管上皮細胞で発現する蛋白質は尿中にも現れる可能性が十分にあり、尿中のフラクタルカイン測定がこれらの疾患を識別するのに有用な診断法となる可能性も考えられた。

参考文献：

1. JF Bazan, KB Bacon, G Hardiman, W Wang, K Soo, D Rossi, DR Greaves, A Zlotnik, TJ Schall: A new class of chemokine with a CX3X motif. *Nature*, 385:640-644, 1997.
2. T Imai, K Hieshima, C Haskell, M Baba, M Nagira, M Nishimura, M Kakizaki, S Takagi, H Nomiyama, TJ Schall, O Yoshie: Identification and molecular characterization of Fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*, 91:1-20, 1997.

作成日：2003 年 3 月 14 日