

糖尿病性腎症の発症・進展における炎症機転の関与

岡田 震一*, 四方 賢一, 榎野 博史

岡山大学大学院医歯学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

キーワード：糖尿病性腎症，マクロファージ，ICAM-1，炎症

はじめに

戦後日本は、目覚ましい経済復興を遂げたが、国民の食生活には欧米化の波が押し寄せ、2型糖尿病の著しい増加をみている。厚生労働省がまとめた調査にては、糖尿病と推定される患者は平成9年に690万人だったが、平成14年には740万人とここ数年でも大きく増えた。糖尿病はその治療の進歩により生存期間の延長が得られるようになってきたが、その一方で全身の血管合併症を併発することが問題となってきた。特に糖尿病性腎症（以下腎症）は、そういった血管合併症のひとつであり、糖尿病患者の予後を左右する重要な疾患である。腎症による新規透析導入患者数は慢性糸球体腎炎によるそれを追い抜き、原因疾患別で第一位となり、増え続ける医療費の一因となっている。したがって、腎症の発症・進展の機序を解明することは医学的のみならず社会的にも重要な課題と言える。

腎症の自然歴は、蛋白尿の増加とともに進行性に腎機能の悪化をきたし、末期腎不全に至るというものである（図1）¹⁾。腎機能は糸球体濾過率という指標で表されるが、糖尿病の発症初期にはこれはむしろ亢進し

ていることが知られている。時間と共に、徐々に蛋白尿の増加が始まり、ごく早期には微量アルブミン尿として検出することができる。しだいに蛋白尿の増加をきたし、腎機能が悪化し始め、腎不全期となり、透析が必要な段階へと移行していく。ヒトにおける腎症の組織学的な所見を図2に示すが、まず正常の糸球体に比べて糸球体のサイズが大きくなる²⁾。そしてび慢性病変と呼ばれるメサンギウムの細胞外基質のび慢性の増加が起こり、糸球体硬化が進行するが、さらに進行すると、細胞外基質蛋白が結節状に蓄積して結節性病変と呼ばれる所見を呈する。また、凝固亢進による滲出性病変が見られることもある。

腎症におけるマクロファージの関与

腎症の発症進展のメカニズムとしては、高血糖を最上流として、蛋白・脂質・核酸などの糖化・酸化によるストレス、糸球体内の血行動態の変化による内皮細胞障害、PKC活性化など細胞内代謝異常、これらが相互に影響しあって、糸球体のメサンギウム細胞・間質の細胞からの細胞外基質の産生を増加させ、糸球体硬化・間質の線維化が進行するというストーリーが考えられている。

一方、糸球体腎炎では、マクロファージが腎臓に著明に浸潤し、これが腎炎の発症と進行の病態に大きく関与していることが分かっていた。糖尿病においても、

平成16年12月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7235 FAX：086-222-5214

E-mail：s_okada@md.okayama-u.ac.jp

◆ プロフィール ◆

岡田 震一

1996年岡山大学医学部卒業。2004年岡山大学大学院医歯学総合研究科博士課程修了。現在、同研究科客員研究員。

ここ半世紀で日本人の疾患構成は大きく様変わりしました。ライフスタイルの変化により糖尿病が著増していることは社会的にも問題となっています。糖尿病は全身の血管合併症を併発します。なかでも糖尿病性腎症は進行して末期腎不全に至ると透析療法が必要になり、生命予後だけでなくQOLの面からも著しく患者の利益を損なう疾患です。そこで糖尿病診療においては、いかに糖尿病性腎症を含めた合併症の発症を抑えるかが治療の目標のひとつとなります。岡山大学腎・免疫・内分泌代謝内科学（旧内科学第三）講座において榎野博史教授ならびに四方賢一講師のご指導のもとに糖尿病性腎症の発症進展の機序解明に関する研究に従事し、炎症機序がそれに深く関わっているのではないかという仮説のもとに主に動物実験による検証をおこなってきました。今回の研究はその成果ですが、これを端緒にさらに臨床にフィードバックできるようなテーマを追求して参りたいと考えております。

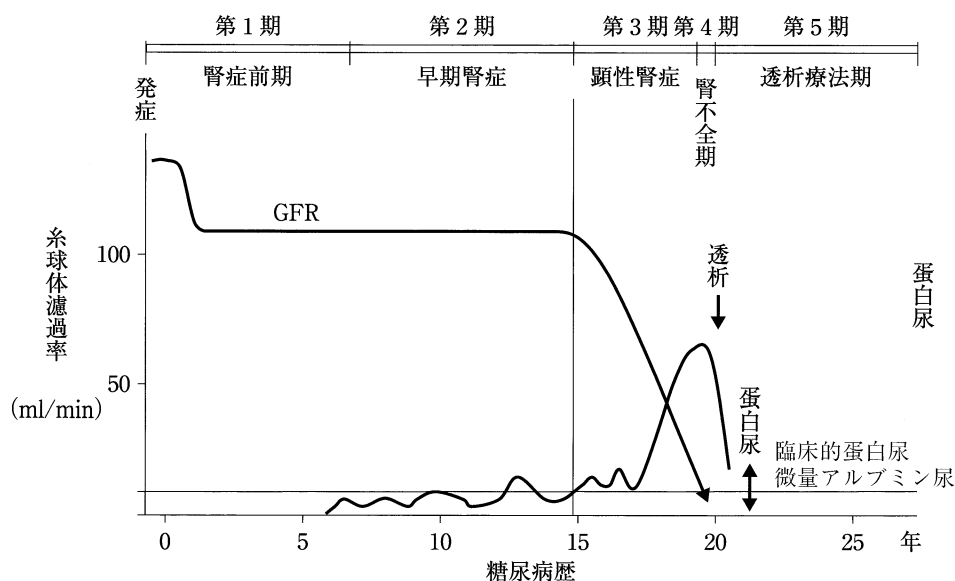


図1 糖尿病性腎症の臨床経過 (Diabetes Frontier 7 : 385, 1996より改変)

腎機能を反映する糸球体濾過率 (GFR) は糖尿病発症初期には増加するが、蛋白尿の増加とともに進行性に腎機能の悪化 (GFR の低下) をきたし、末期腎不全に至る。

Furuta ら³⁾が初めて腎症患者の腎臓におけるマクロファージの浸潤を報告したことから腎症におけるマクロファージの関与が注目されるようになった。同様に糖尿病モデル動物の腎組織でも、腎臓の糸球体と間質にマクロファージの著明な浸潤が認められる⁴⁾。こうした事実から腎症においてもマクロファージが病態に関わっている可能性が考えられたわけである。

こうした単球・マクロファージを含めた白血球の血管外遊走のメカニズム (図3) としては、活性化された血管内皮細胞上に発現する細胞接着分子の役割が重要である。まず血管内で内皮細胞と白血球の間にセレクチンによる緩やかな結合 (rolling) が起こる。続いて、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) を介する強固な結合が起こり組織への migration がそれに続く。ICAM-1 は immunoglobulin スーパーファミリーに属する接着分子であり、血管内皮細胞などに発現して、LFA-1 や Mac-1 といった白血球上のリガンドと結合することが知られている (図4)。その発現の誘導は炎症性サイトカイン、リポポリサッカライド、ずり応力などの刺激が報告されている。

我々は腎症患者の腎組織においても、糸球体内皮細胞において ICAM-1 の発現が亢進していることを明らかにし、このことからマクロファージの糸球体内への浸潤が ICAM-1 を介したものであると推定した⁵⁾。ラットの糖尿病モデルを用いた実験においても同様に、

ICAM-1 の発現亢進とマクロファージの腎浸潤が生じることを確認した (図5)⁴⁾。つまりラットにストレプトゾトシンという催糖尿病作用のある薬物を投与して1型糖尿病モデルを作成し、経時的に観察すると、糖尿病発症数日後から ICAM-1 の発現亢進が生じ、それに伴って、マクロファージの浸潤が起こり、それが持続していることが分かった。ICAM-1 の発現亢進には糸球体過剰濾過が重要であるが、ICAM-1 に対する特異的阻害抗体でマクロファージの浸潤が抑制されたことから、腎症におけるマクロファージの浸潤には ICAM-1 の発現亢進が重要であることが示された。さらに、インスリン投与で血糖を正常化するとマクロファージの浸潤が抑えられたことからストレプトゾトシンによる直接作用でマクロファージの浸潤が生じたのではないことも分かる。

さらに、マクロファージと腎症との関わりについてはいくつか他のグループからも報告があり、放射線照射により白血球を消失させたラットを糖尿病にした報告⁶⁾では、腎症での糸球体硬化に関わる transforming growth factor- β (TGF- β) やⅣ型コラーゲンなどの遺伝子発現が抑制され、また in vitro の検討⁷⁾でも、マクロファージの培養上清がメサンギウム細胞からの細胞外基質蛋白の産生を増加させることが示されている。

これらの過去の知見から、マクロファージが腎症の

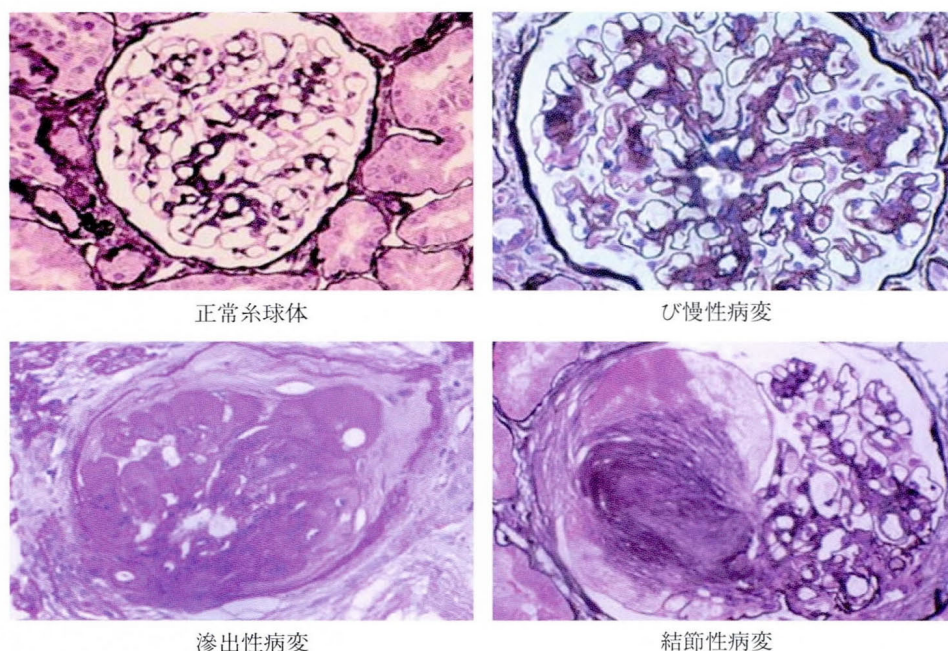


図2 糖尿病性腎症の組織学的所見の特徴

正常の糸球体に比べて糸球体のサイズが大きくなる（糸球体肥大），慢性病変：メサンギウムの細胞外基質の慢性の増加，結節性病変：細胞外基質蛋白が結節状に蓄積，滲出性病変：凝固亢進による病変。

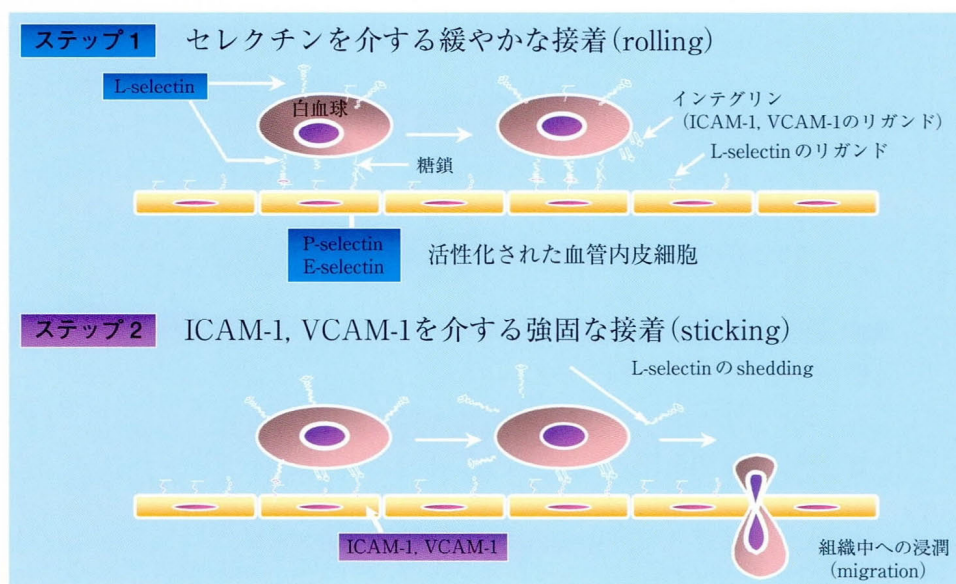


図3 白血球の血管外遊走のメカニズム

進展に重要な役割を果たしていることが示唆されるが，これを直接的に証明した報告はない．我々は，マクロファージを中心とする，いわゆる炎症メカニズムが腎症の加速因子として関与しているという仮説（図6）を提唱している．この仮説の一部を証明するために今回の検討を行った．

ICAM-1 ノックアウトマウスにおける検討

実際に ICAM-1 を介したマクロファージの腎浸潤が腎症の発症進展に影響を与えるのかどうかということを検証する目的で，今回の実験を行った．阻害抗体などを用いた検討では ICAM-1 の発現を長期間にわたっ

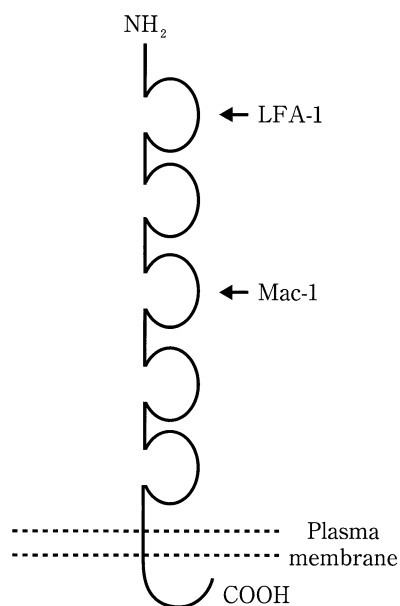


図4 Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の分子構造

Ig 様領域を 5 つ有する, Ig スーパーファミリーに属する接着分子. 分子量: 76-114 kDa. リガンド: LFA-1, Mac-1. 発現細胞: 血管内皮細胞, 白血球. 発現誘導: 炎症性サイトカイン, LPS, ずれ応力.

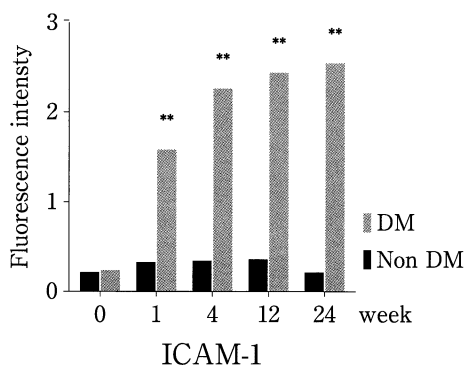


図5 糖尿病性腎症の糸球体における ICAM-1 発現とマクロファージ浸潤 (ラット) (Sugimoto H et al. Diabetes 46, 1997より改変) 糖尿病発症後早期から腎糸球体内の ICAM-1 の発現が亢進する. それに伴いマクロファージの腎浸潤の増加が生じた. さらにそれはインスリン投与や阻害抗体の投与により抑制された. (Mean±SEM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005)

て抑制することが困難であったため, ICAM-1 を介したマクロファージの浸潤が腎症に与える影響を直接に検証することは難しかったが, ICAM-1 ノックアウトマウスでは, 糖尿病発症後の糸球体へのマクロファージの浸潤が長期間にわたって抑制されると予想されるため, 糖尿病性腎症におけるマクロファージの役割を

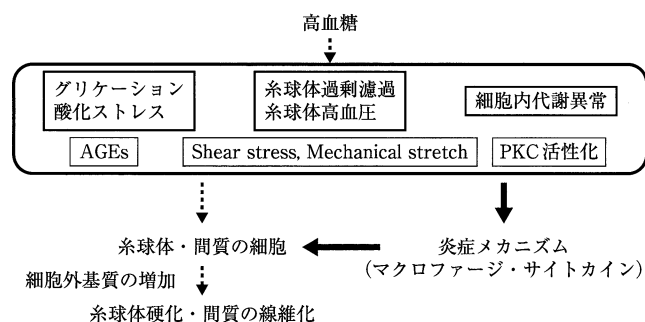
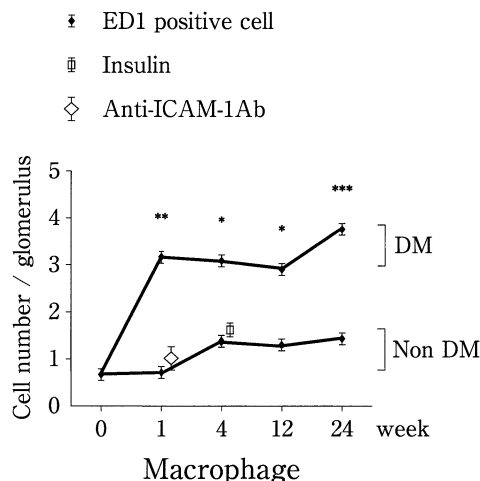


図6 糖尿病性腎症の成因と炎症メカニズム (仮説)

我々は, これまで報告されている腎症の発症・進展のメカニズムに, 炎症メカニズムが関与していることを提唱している.



解明するためのよいモデルと考えられる.

今回我々は ICAM-1 ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて, それぞれ糖尿病モデルを作製し, 非糖尿病群とともに全部で 4 群を 6 ヶ月観察した.

血圧は 4 群間に差は認めなかった. HbA1c とクレアチニンクリアランスは糖尿病群では増加していたが,

野生型マウスとノックアウトマウスの間には有意差を認めなかった。つまり同程度の糖尿病と同程度の糸球体内の血行動態であったと考えられる。糖尿病群では体重あたりの腎重量は有意に増加していたが、野生型マウスに比べてノックアウトマウスではその増加が有意に抑制されていた。腎肥大は糖尿病性腎症の特徴である。

糸球体内の ICAM-1 の発現 (図 7) であるが、糖尿病野生型マウスでは、ICAM-1 の発現が亢進していたが、ICAM-1 ノックアウトマウスでは発現はみられない。ICAM-1 の発現と平行して、糸球体内へのマクロファージの浸潤 (図 7) は糖尿病の野生型マウスでは著明に増加していたが、糖尿病 ICAM-1 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べてマクロファージの浸潤増加は抑制されていた。

糖尿病性腎症の指標である尿中アルブミン排泄 (図 8) は糖尿病群で増加し、野生型マウスでは 3 ヶ月目以降プラトーに達する。一方、ノックアウトマウスでも 1 ヶ月目までは同様に増加するが、それ以降の増加は野生型マウスと比べて有意に抑制されていた。ここで注目したいのはノックアウトマウスでも 1 ヶ月目までは野生型マウスとアルブミン尿の増加に差がないことで、初期のアルブミン尿には高血糖に伴う糸球体内の血行動態の変化が反映されているものと考えられた。

糖尿病の野生型マウスは糸球体サイズの増加とともに PAM 陽性で示されるメサンギウム基質も増加していた (図 9)。糸球体サイズの増加とメサンギウム基質の増加は、いずれも糖尿病性腎症の特徴である。一方 ICAM-1 ノックアウトマウスでは糸球体サイズ、基質

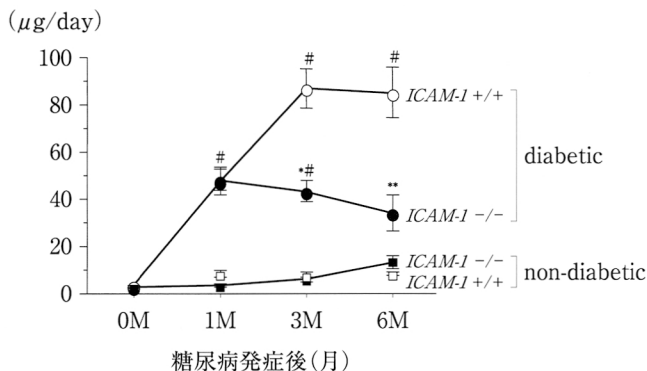


図 8 尿中アルブミン排泄量の推移
糖尿病群では尿中アルブミン排泄量は著明に増加するが、野生型マウスに比べて ICAM-1 ノックアウトマウスでは 3 ヶ月以降の増加が有意に抑制されていた。

の増加はともに有意に軽度だった。また、間質の線維化を Azan 染色で評価したが、ここに示されるように間質の線維化もノックアウトマウスでは軽度だった。糸球体内における TGF- β および IV 型コラーゲンの発現を免疫組織化学的に評価した (図 10)。TGF- β は糖尿病性腎症におけるメサンギウム基質の産生に中心的な役割を果たしていると考えられ、また IV 型コラーゲンは基質の主要成分とされている。野生型マウスでは糖尿病にすると TGF- β の発現は著明に増加するが、ICAM-1 ノックアウトマウスではその増加は抑制されていた。それに伴い、メサンギウム基質を構成する IV 型コラーゲンの発現も野生型マウスの糖尿病群において増加したが、ノックアウトマウスではその増加は抑制されていた。これは腎臓から抽出した蛋白を用いて行った western blot の結果からも確認された。

つまり ICAM-1 ノックアウトマウスでは、糖尿病発症後の腎症の進行が著明に抑制されていた。

考 察

このことから、糖尿病性腎症におけるマクロファージの役割について我々はこう考えている (図 11)。最上流の高血糖から、特に糸球体過剰濾過による内皮細胞障害により ICAM-1 の発現増加が起り、マクロファージが腎臓内に浸潤してくる。マクロファージは種々のサイトカインを介して、メサンギウム細胞や間質の細胞からの細胞外基質の産生を促し、糸球体硬化や間

糖尿病性腎症の成因における炎症メカニズムの関与とマクロファージの役割

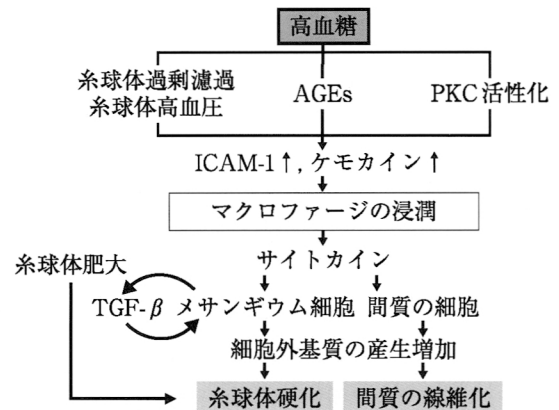


図 11 糖尿病性腎症におけるマクロファージの関与 (仮説)
糖尿病では腎での ICAM-1 やケモカインの発現増加に伴い、マクロファージが腎へ浸潤する。マクロファージはサイトカインなどを介して、糸球体・間質の細胞から細胞外基質の産生を増加させて、糸球体硬化・間質の線維化が進行すると考えられる。

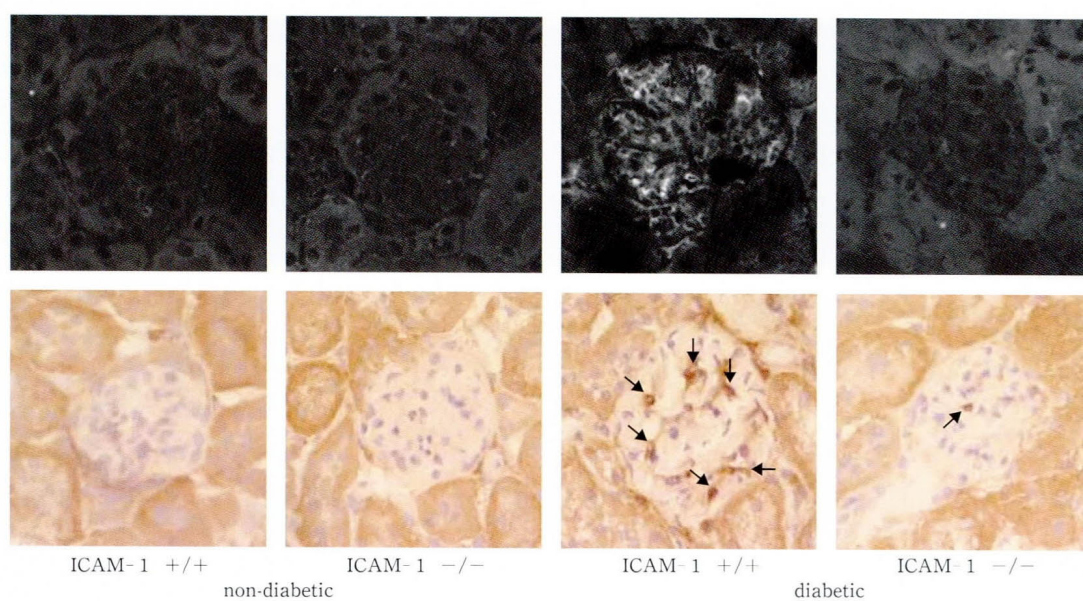


图 7

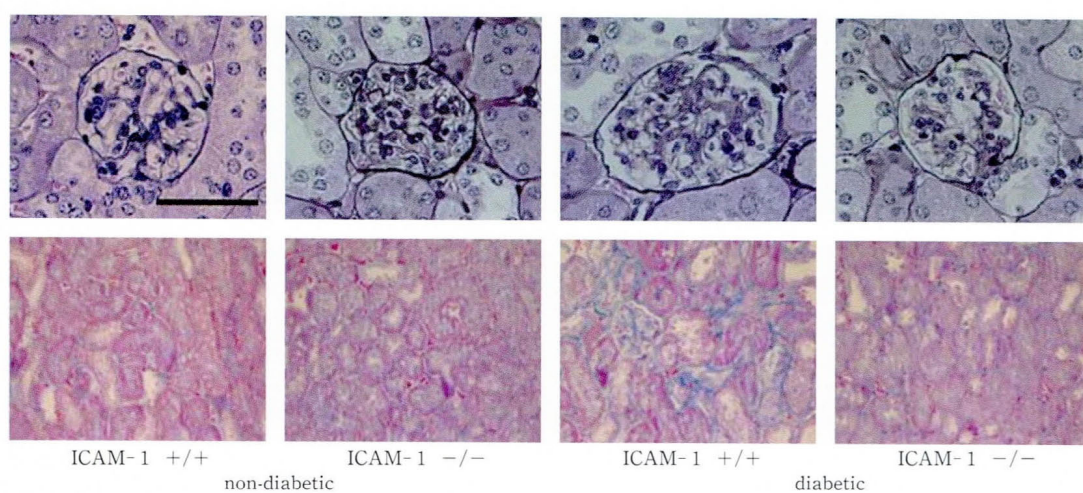


图 9

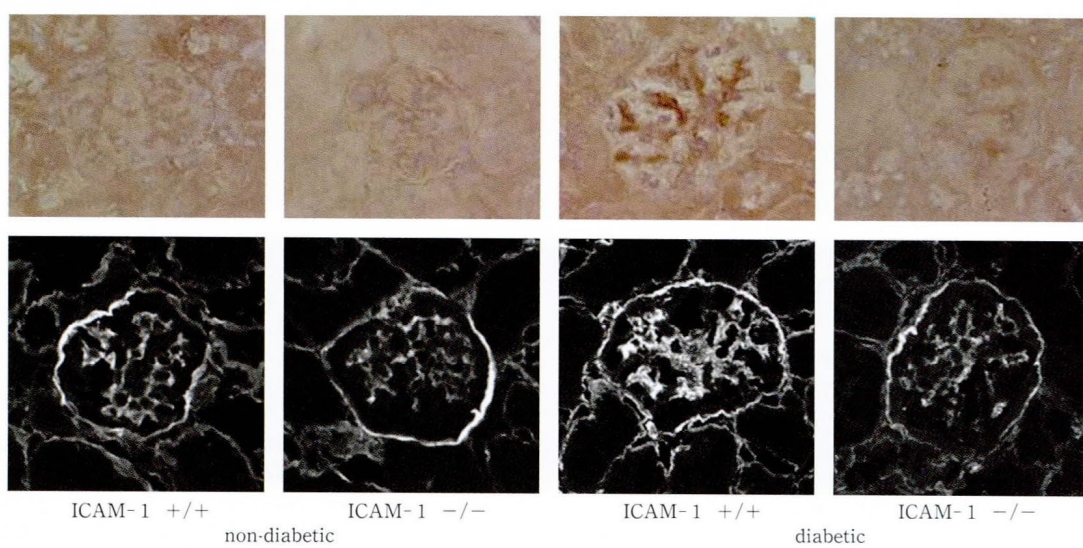


图10

図7 糸球体内の ICAM-1 の発現とマクロファージの浸潤
上段：ICAM-1. 糖尿病の野生型マウスでは糸球体内発現が著明に亢進したが，ICAM-1 ノックアウトマウスでは発現がみられない。下段：マクロファージの浸潤。糖尿病の野生型マウスでは糸球体内へのマクロファージの浸潤が著明であったが，ICAM-1 ノックアウトマウスでは浸潤は有意に抑制されていた。

図9 光顕像

上段：PAM 染色。糖尿病の野生型マウスでは糸球体サイズの増加とともにメサンギウム基質の増加を認めたが，ICAM-1 ノックアウトマウスではその増加が有意に抑制されていた。下段：Azan 染色。糖尿病の野生型マウスでは間質の線維化がみられたが，ICAM-1 ノックアウトマウスでは線維化が有意に抑制されていた。

図10 TGF- β とⅣ型コラーゲンの発現

上段：TGF- β ，下段：Type IV collagen. いずれも糖尿病群で著明に増加するが，ICAM-1 ノックアウトマウスではその増加は有意に抑制された。

質の線維化が進行すると考えられる。

マクロファージの培養上清がメサンギウム細胞からの細胞外基質産生を促進するという報告はこれを支持する。しかし，その詳細な機序は未だ不明であり，その解明は今後の課題である。

糖尿病性腎症の発症・進展のメカニズムについては，これまで advanced glycation end products の蓄積，protein kinase C の活性化，TGF- β の過剰発現などの諸説が提唱されてきた。我々はこれまでに，糖尿病性腎症患者の糸球体に ICAM-1 の発現の亢進とマクロファージの浸潤が認められることを示してきたが，今回の研究で，腎症の成因には，ICAM-1 を介して浸潤するマクロファージが重要な役割を果たすことが明らかとなった。

我々はこの仮説に則り，炎症機序を抑制する薬剤が腎症を改善することを明らかにしている。まず，高脂血症治療薬であるスタチンが腎症の進行を抑制し，これは NF κ B の活性化抑制を介した ICAM-1 の発現抑制によるものであることを報告している。また，糖尿病治療薬である PPAR γ アゴニストには血糖降下作用によらずに腎症を改善する作用があることや，免疫抑制薬であるメトトレキサートにも ICAM-1 の発現抑制を介して腎症を改善することを明らかにしている。また，同様に Mycophenolate mofetil が腎症の改善

効果があるという報告⁸⁾もある。

結 論

本研究は，糖尿病性腎症の成因にマクロファージを中心とする炎症メカニズムが関与することを直接的に証明したものであり，さらに炎症メカニズムの抑制が，糖尿病性腎症の新しい治療戦略となる可能性を示すものである。

謝 辞

今回の研究におきまして，ご指導とご支援を頂きました，榎野博史教授，四方賢一講師，そして糖尿病グループの方々に感謝いたします。

文 献

- 1) 榎野博史，宮武伸行，四方賢一：糖尿病性腎症診断マーカーの用い方，評価の仕方。Diabetes Frontier (1996) **7**，385.
- 2) 榎野博史編著：わかる糖尿病性腎症 (2002) p 16.
- 3) Furuta T, Saito T, Ootaka T, Soma J, Obara K, Abe K and Yoshinaga K : The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. Am J Kidney Dis (1993) **21**，480-485.
- 4) Sugimoto H, Shikata K, Hirata K, Akiyama K, Matsuda M, Kushiro M, Shikata Y, Miyatake N, Miyasaka M and Makino H : Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in diabetic rat glomeruli : glomerular hyperfiltration is a potential mechanism of ICAM-1 upregulation. Diabetes (1997) **46**，2075-2081.
- 5) Hirata K, Shikata K, Matsuda M, Akiyama K, Sugimoto H, Kushiro M and Makino H : Increased expression of selectins in kidneys of patients with diabetic nephropathy. Diabetologia (1998) **41**，185-192.
- 6) Sassy-Prigent C, Heudes D, Mandet C, Belair MF, Michel O, Perdureau B, Bariety J and Bruneval P : Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes (2000) **49**，466-475.
- 7) Pawluczyk IZ and Harris KP : Macrophages promote prosclerotic responses in cultured rat mesangial cells : a mechanism for the initiation of glomerulosclerosis. J Am Soc Nephrol (1997) **8**，1525-1536.
- 8) Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R and De Lourdes Noronha I : Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. Kidney Int (2003) **63**，209-216.