

マクロファージスカベンジャー受容体（SR-A）は炎症を制御することにより糖尿病性腎症を抑制する

片岡（白井）仁美^{a,b*}, 四方賢一^b, 佐々木基史^b, 槇野博史^b

^a岡山大学医療教育統合開発センター, ^b岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

キーワード：マクロファージスカベンジャー受容体, SR-A, 糖尿病性腎症, 炎症, マクロファージ

Macrophage scavenger receptor-A—deficient mice are resistant to diabetic nephropathy through amelioration of microinflammation

Hitomi Kataoka Usui^{a,b*}, Kenichi Shikata^b, Motofumi Sasaki^b, Hirofumi Makino^b

^aCenter for Developing Medical and Health care Education, Okayama University,

^bDepartment of Medicine and Clinical Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

糖尿病性腎症は本邦における透析導入原因の第一位であり、透析療法に至った糖尿病患者の生命予後は不良で、日本透析医学会の全国集計でも、10年生存率は30%未満と報告されている。しかしながら、糖尿病性腎症の発症進展機序は未だ解明されていない部分も多く、糖尿病性腎症の発症進展機序の解明と、現存の治療法に加えた新たな治療戦略を見出すことは医学的にも社会的にも重要な課題である。

糖尿病性腎症の発症進展機序として、PKC 経路の活性化¹⁾、TGF- β の発現亢進²⁾、AGE の蓄積^{3,4)}などの機序が現在提唱されている。近年、さらに炎症の果たす役割が注目され、microinflammation は糖尿病性血管

合併症の共通の病因ではないかと考えられている^{5,6)}。Furuta らは糖尿病性腎症患者の腎組織にマクロファージが浸潤していることを報告し⁷⁾、我々のグループは糖尿病性腎症患者の腎組織にマクロファージとともに接着分子の発現を見出した⁸⁾。また、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) が糖尿病状態の腎臓で過剰発現し、マクロファージの内皮細胞への接着に関与していることを報告し^{8,9)}、さらに ICAM-1 ノックアウトマウスでは糖尿病性腎症が改善することを確認した¹⁰⁾。

マクロファージの組織への浸潤の過程には rolling, sticking, migration などの段階があるが、内皮細胞側の分子である ICAM-1 の役割とともに、マクロファージ側の分子にも組織への浸潤の key molecule があるのではないかと考え、我々はマクロファージスカベンジャー受容体 (SR-A) に着目した。SR-A は1990年に Kodama らによってクローニングされ¹¹⁾、変性リポ蛋白、糖化変性リポ蛋白の除去、アポトーシス細胞の除去、細菌などからの生体防御、細胞接着、細胞内シグ

平成20年6月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-6597 FAX：086-235-6597

E-mail：hitomik@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



片岡（白井）仁美

平成9年岡山大学医学部医学科卒業。同年岡山大学第三内科（現 腎・免疫・内分泌代謝内科学）に入局及び岡山大学大学院医学研究科（内科学第三講座）に入学。中国中央病院での臨床研修修了後、槇野博史教授、四方賢一准教授の下、糖尿病性腎症の発症進展メカニズムについての研究に従事する。平成15年にHMGCoA還元酵素阻害薬（スタチン）の抗炎症作用による糖尿病性腎症抑制効果を証明した研究をNephrology Dialysis Transplantationに投稿、同年岡山大学大学院を卒業、学位を取得した。平成18年にはThomas Jefferson大学腎臓内科に留学した。

本研究は大学院在籍中に開始し、マクロファージ上に発現するマクロファージスカベンジャー受容体がマクロファージの組織への浸潤と、糖尿病性腎症の発症進展に重要な役割を果たすことを証明し、研究成果をDiabetesに発表した。

ナル伝達など幅広い生理機能を持つことが知られている¹²⁾。さらに、SR-A は動脈硬化巣へのマクロファージの浸潤を起こすこと¹³⁾、マクロファージとIV型コラーゲンや変性I型コラーゲンとの接着に関与すること¹⁴⁾、高糖濃度で培養したヒト培養マクロファージと糖尿病マウスの腹腔マクロファージはSR-Aを強発現していること¹⁵⁾、などの報告がなされている。しかし、SR-Aの糖尿病性腎症に果たす役割についてはこれまで詳細な知見はなく、我々はSR-Aノックアウトマウスを用いてSR-Aの糖尿病性腎症に果たす役割について研究を行った。

糖尿病 SR-A ノックアウトマウスではアルブミン尿の抑制が認められた

我々は、SR-Aノックアウトマウス(SR-A^{-/-})と遺伝的バックグラウンドの等しい野生型マウス(SR-A^{+/+})を用い、ストレプトゾトシンで糖尿病を誘発し、4群(糖尿病SR-A^{+/+}マウス:DM-WT, 糖尿病SR-A^{-/-}マウス:DM-KO, 非糖尿病SR-A^{+/+}マウス:ND-WT, 非糖尿病SR-A^{-/-}マウス:ND-KO)に分け、6ヶ月間の観察を行った。代謝データではHbA_{1c}は糖尿病群間に有意差はなく、コレステロールがDM-KOでやや低い傾向と、過酸化脂質のDM-KOにおける明らかな低下を認めた(表1)。また、尿中アルブミン排泄量は1か月目ではDM-WT, DM-KO共に上昇するが、DM-KOにおいて3か月以降のアルブミン尿の抑制が認められた(図1)。

表1 代謝データ(6ヶ月目)

	Non-DM		DM	
	ND-WT	ND-KO	DM-WT	DM-KO
血圧 (mmHg)	96.8±3.9	99.7±7.6	106.0±2.7	110.1±1.5
体重 (g)	32.8±1.5	33.3±0.7	18.7±0.8*	25.2±1.2 [‡]
腎重量 (mg/g BW)	11.2±0.5	12.1±0.4	25.3±1.1*	19.1±1.6 [‡]
HbA _{1c} (%)	3.7±0.1	3.7±0.2	9.9±0.5*	9.6±0.2*
Ccr (ml/min/g BW)	6.5±1.3	5.5±0.8	25.2±3.9*	21.0±3.8*
T cho (mg/dl)	84.0±1.4	80.0±3.8	125.2±8.3*	94.0±3.9 [‡]
過酸化脂質 (nmol/ml)	2.8±0.3	4.5±0.9	22.6±6.5*	9.6±1.8 [‡]

ND-WT; 非糖尿病 SR-A^{+/+}, ND-KO; 非糖尿病 SR-A^{-/-}, DM-WT; 糖尿病 SR-A^{+/+}, DM-KO; 糖尿病 SR-A^{-/-}, Data; mean±SEM.

*p<0.0001 vs. ND-WT, [‡]p<0.05 vs. ND-WT, [†]p<0.05 vs. DM-WT

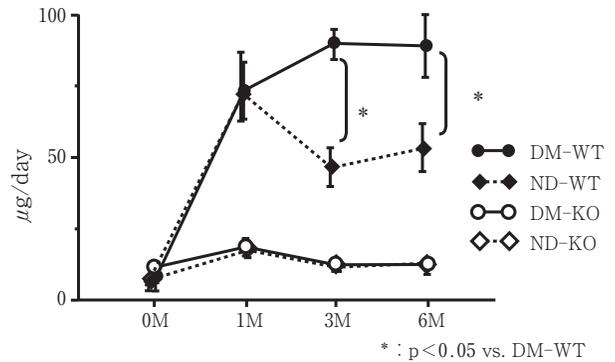


図1 尿中アルブミン排泄量の経時的変化

DM-WT: 糖尿病 SR-A^{+/+}マウス, DM-KO: 糖尿病 SR-A^{-/-}マウス, ND-WT: 非糖尿病 SR-A^{+/+}マウス, ND-KO: 非糖尿病 SR-A^{-/-}マウス

DM-WTではアルブミン尿は経時的に増加するが、DM-KOではアルブミン尿の増加が緩やかで、3、6か月目には有意にDM-WTよりアルブミン尿が抑制されている。

糖尿病 SR-A ノックアウトマウスでは腎組織へのマクロファージの浸潤抑制と腎保護効果が認められた

組織学的検討では、DM-WTで観察される糸球体肥大と細胞外マトリックスの増加はDM-KOでは抑制されていた。さらに興味深いことに、DM-WTで顕著なマクロファージの糸球体及び間質への浸潤はDM-KOでは著明に抑制されていた。また、TGF- β 、細胞外マトリックスの主成分であるIV型コラーゲンの糸球体での発現もDM-KOでは著明に抑制されていた(図2-4)。さらに、DNAマイクロアレイを用いた検討では、ND-WTと比較しDM-WTで増加する遺伝子群のうち、DN-KOで抑制された遺伝子群の機能分析を行うと、多くの炎症関連遺伝子があり、SR-Aをノックアウトすることにより炎症関連遺伝子の糖尿病状態における発現亢進が抑制されていることが明らかとなった。

細胞外マトリックスへのマクロファージの浸潤におけるSR-Aの役割

DM-KOにおいて腎組織へのマクロファージの浸潤抑制が起こったメカニズムを明らかにするため、抗SR-A抗体を用いてマクロファージの接着実験を行った。まず、あらかじめPMA刺激し、抗SR-A抗体、非阻害抗体などとプレインキュベーションしたヒト単核細胞(THP-1)をIV型コラーゲンと反応させ、洗浄後にIV型コラーゲン上に接着したTHP-1細胞の数を比較した。非阻害抗体と比較し、抗SR-A抗体の添加によってIV型コラーゲンに対するマクロファージの接

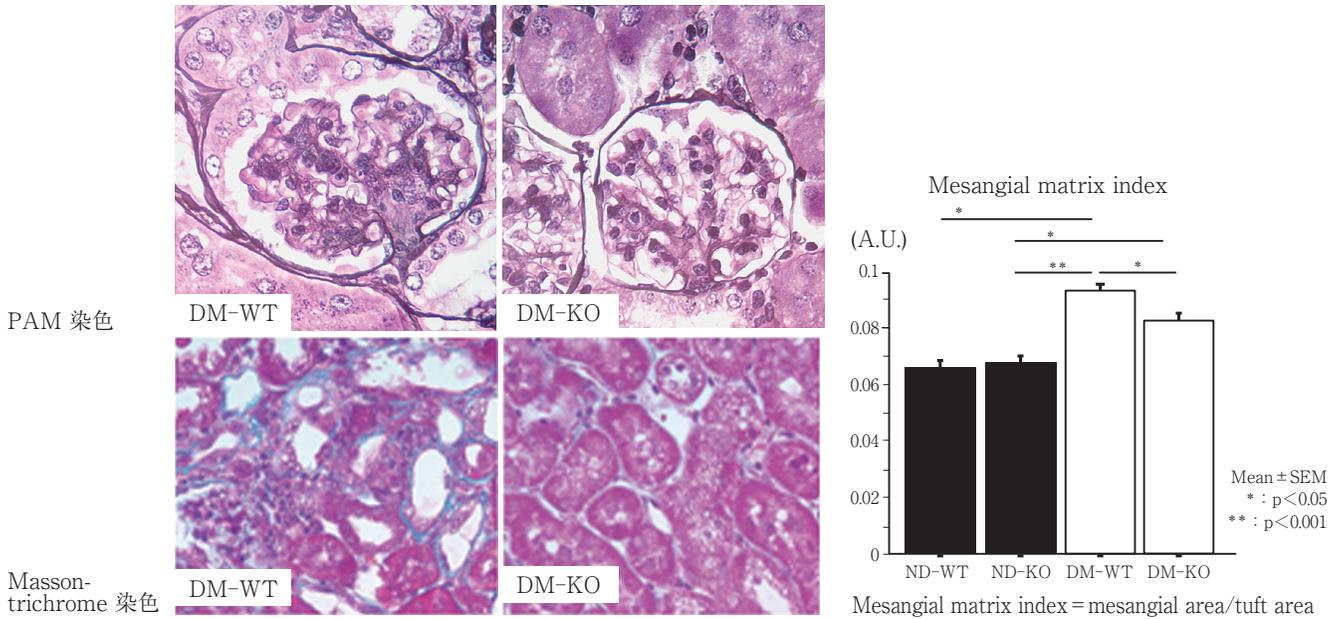


図2 糸球体肥大と間質の線維化

DM-WT：糖尿病 SR-A^{+/+}マウス，DM-KO：糖尿病 SR-A^{-/-}マウス，ND-WT：非糖尿病 SR-A^{+/+}マウス，ND-KO：非糖尿病 SR-A^{-/-}マウス

DM-WT で認められる糸球体肥大と間質の線維化は DM-KO で明らかに改善している。

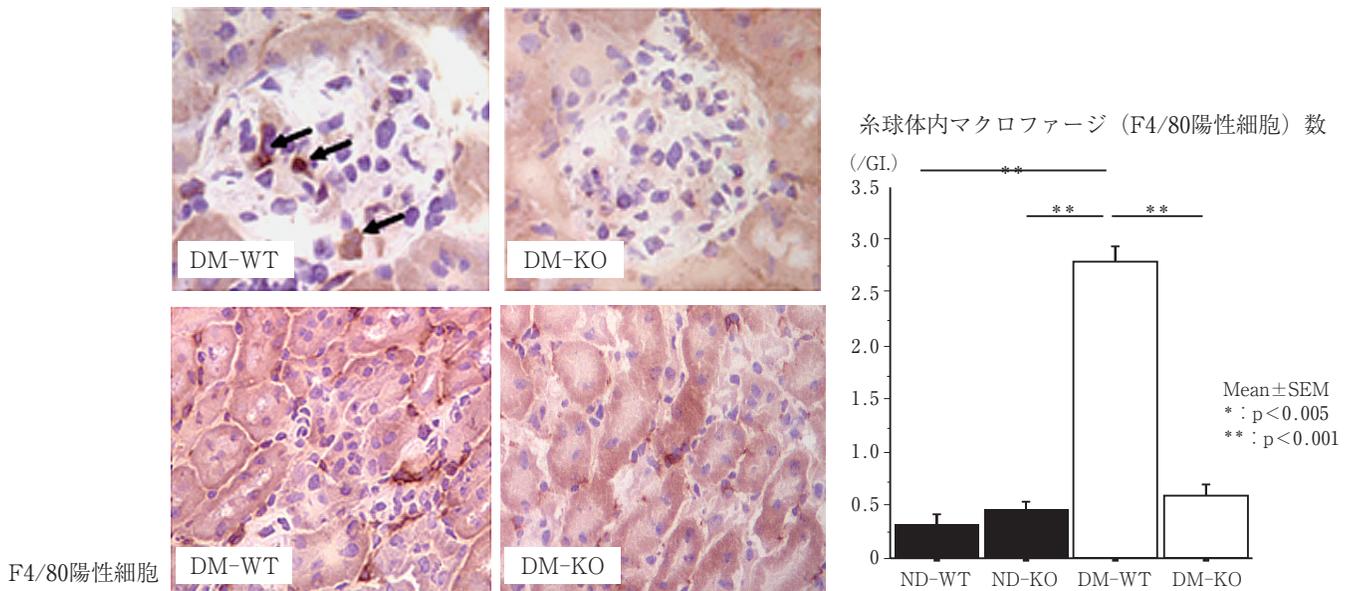


図3 マクロファージの腎組織への浸潤

DM-WT：糖尿病 SR-A^{+/+}マウス，DM-KO：糖尿病 SR-A^{-/-}マウス，ND-WT：非糖尿病 SR-A^{+/+}マウス，ND-KO：非糖尿病 SR-A^{-/-}マウス

DM-WT で認められる糸球体及び間質へのマクロファージの浸潤は DM-KO で抑制されている。

着は EDTA の有無にかかわらず明らかに抑制された (図 5 A). 次に，正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を単層培養し，前述の方法で観察したところ，抗体を添加していない対照と比較し，抗 SR-A 抗体を添加した系と非阻害抗体を添加した系では接着したマクロフ

ァージの数は変化なく，抗 SR-A 抗体はマクロファージと内皮細胞の接着には関与していないことが示唆された。以上より，SR-A は内皮細胞とマクロファージの接着ではなく，IV型コラーゲンなどの細胞外マトリックスとの接着に関与していることが示唆された (図 5 B).

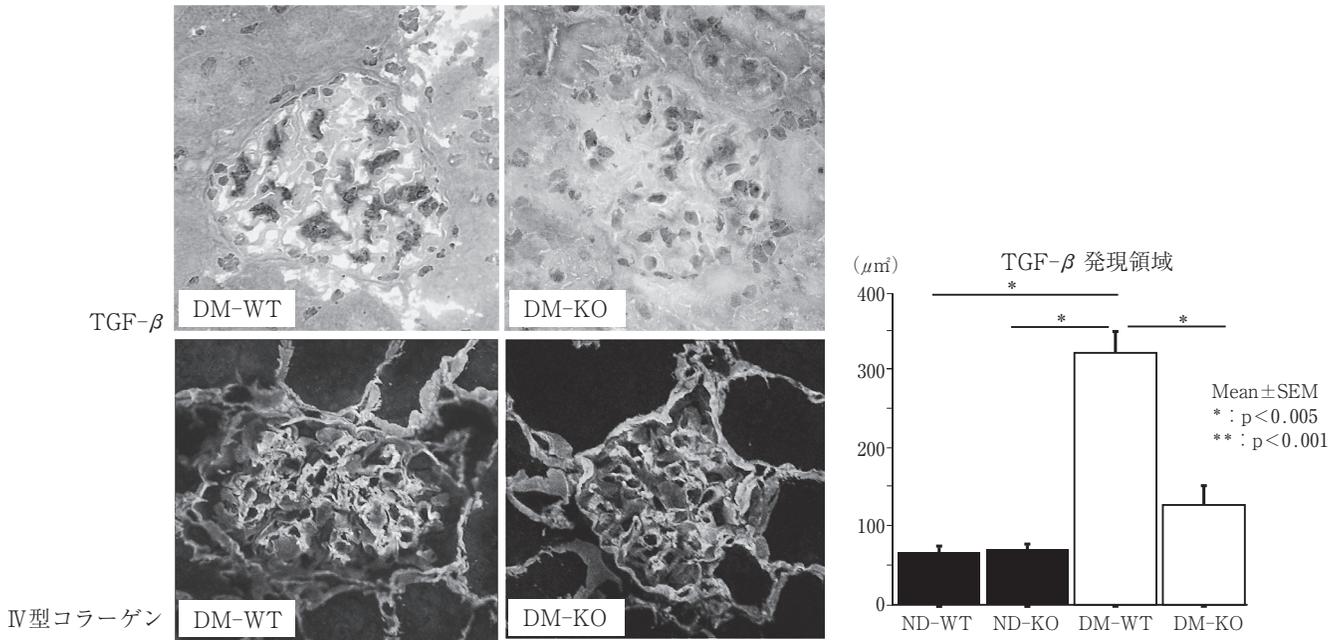
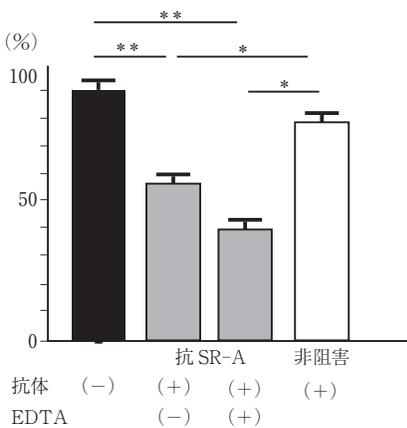


図4 TGF-βと4型コラーゲンの腎組織における発現
 DM-WT:糖尿病 SR-A^{+/+}マウス, DM-KO:糖尿病 SR-A^{-/-}マウス, ND-WT:非糖尿病 SR-A^{+/+}マウス, ND-KO:非糖尿病 SR-A^{-/-}マウス
 DM-WTの腎組織で認められるTGF-βとIV型コラーゲンの発現亢進はDM-KOで抑制されている。

A IV型コラーゲンとマクロファージの接着



B マクロファージの組織浸潤におけるSR-Aの役割

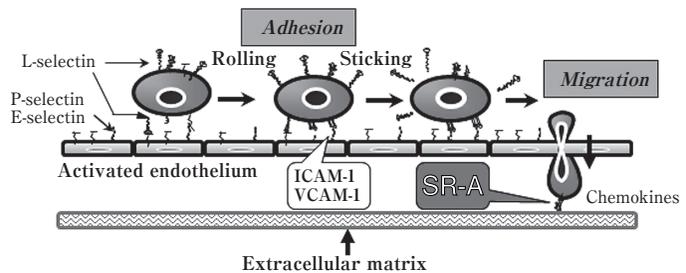


図5 IV型コラーゲンに対するマクロファージの接着と抗SR-A抗体の接着阻害効果
 A. マクロファージのIV型コラーゲンに対する接着は抗SR-A抗体によってカルシウムイオンの存在下, 非存在下のいずれの条件においても抑制された。B. マクロファージの細胞外マトリックスへの浸潤にはAdhesionとMigrationの過程が必要である。IV型コラーゲン及び内皮細胞とマクロファージとの接着実験によって, SR-Aは細胞外マトリックスとの接着とMigrationに関与することが示唆された。

おわりに

本研究の結果よりSR-Aは内皮細胞に接着したマクロファージが細胞外マトリックスと接着し, migrationする過程に関与することが明らかとなった。SR-Aはマクロファージの腎組織への浸潤というmicro-

inflammationのステップのkey moleculeであり, 糖尿病性腎症の発症進展に大きな役割を果たしていることが示唆された。今後, SR-Aの機能を制御することによってmicroinflammationの抑制という糖尿病血管合併症の発症メカニズムに基づく治療応用の可能性も考えられ, 今後のさらなる知見の集積が必要である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり，東京大学先端化学技術センター 児玉龍彦教授，中外製薬富士御殿場研究所の御協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL : Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* (1997) 100, 115-126.
- 2) Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G : Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* (1994) 93, 536-542.
- 3) Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M : Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) 91, 11704-11708.
- 4) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H : Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* (1988) 318, 1315-1321.
- 5) Saraheimo M, Teppo AM, Forsblom C, Fagerudd J, Groop PH : Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in Type 1 diabetic patients. *Diabetologia* (2003) 46, 1402-1407.
- 6) Nelson CL, Karschimkus CS, Dragicevic G, Packham DK, Wilson AM, O'Neal D, Becker GJ, Best JD, Jenkins AJ : Systemic and vascular inflammation is elevated in early IgA and type 1 diabetic nephropathies and relates to vascular disease risk factors and renal function. *Nephrol Dial Transplant* (2005) 20, 2420-2426.
- 7) Furuta T, Saito T, Ootaka T, Soma J, Obara K, Abe K, Yoshinaga K : The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* (1993) 21, 480-485.
- 8) Hirata K, Shikata K, Matsuda M, Akiyama K, Sugimoto H, Kushiro M, Makino H : Increased expression of selectins in kidneys of patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* (1998) 41, 185-192.
- 9) Sugimoto H, Shikata K, Hirata K, Akiyama K, Matsuda M, Kushiro M, Shikata Y, Miyatake N, Miyasaka M, 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.
- 10) Okada S, Shikata K, Matsuda M, Ogawa D, Usui H, Kido Y, Nagase R, Wada J, Shikata Y, Makino H : Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes. *Diabetes* (2003) 52, 2586-2593.
- 11) Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M : Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* (1990) 343, 531-535.
- 12) Platt N, Gordon S : Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. *J Clin Invest* (2001) 108, 649-654.
- 13) Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, et al. : A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* (1997) 386, 292-296.
- 14) Santiago-Garcia J, Kodama T, Pitas RE : The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. *J Biol Chem* (2003) 278, 6942-6946.
- 15) Fukuhara-Takaki K, Sakai M, Sakamoto Y, Takeya M, Horiuchi S : Expression of class A scavenger receptor is enhanced by high glucose in vitro and under diabetic conditions in vivo : one mechanism for an increased rate of atherosclerosis in diabetes. *J Biol Chem* (2005) 280, 3355-3364.
- 16) Usui HK, Shikata K, Sasaki M, Okada Shinichi, Matsuda M, Shikata Y, Ogawa D, Kido Y, Nagase R, Yozai R, Ohga S, Tone A, et al. : Macrophage scavenger receptor-a-deficient mice are resistant against diabetic nephropathy through amelioration of micronflammation. *Diabetes* (2007) 56, 363-372.

