

## 糖尿病腎症の発症進展における免疫学的背景の検討

### 学位論文内容の要旨

#### 【背景と目的】

糖尿病腎症は透析導入となる最多の原因疾患である。インスリン療法を中心とした厳密な血糖管理やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系阻害薬を中心とした血圧管理が腎症の発症や進展の抑制を目的として行われている。しかし進行した腎症への効果は少なく、有効な治療法がないのが現状である。糖尿病腎症の成因として糖代謝産物、protein kinase C, レニン・アンジオテンシン系, 活性酸素などの関与が指摘されている。最近、糖尿病腎症の成因に血管を主座とする軽微な炎症を意味する microinflammation という病態の関与が報告されている。Microinflammation にはマクロファージの浸潤とマクロファージおよび T helper 1 (Th1) 細胞から分泌された IFN $\gamma$  や tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) などの Th1 サイトカインが病態に関わっているとされる。また IFN $\gamma$  を誘導するサイトカインである IL18 が糖尿病腎症患者では高いという報告もなされている。これらの報告から Th1 サイトカインが糖尿病腎症の進展に影響を与えるという仮説を立て、Th1/Th2 バランス, T 細胞ならびにマクロファージが腎症の発症や進展に与える影響につき検討した。

#### 【材料と方法】

8 週齢の C57BL/6 マウス (B6 マウス), BALB/c マウスを用いた。それぞれを streptozotocin (STZ) の投与により作成した糖尿病群と溶媒のみを投与した対照群に群別した (B6, BALB/c, B6+DM, BALB/c+DM)。8 週間飼育した後に屠殺し腎組織を採取した。腎組織病理標本を作製しメサンギウム細胞数/メサンギウム領域, およびメサンギウム領域/糸球体面積比につき検討した。

次に糖尿病腎症に対する IFN $\gamma$  の影響を確認するために BALB/c マウスおよび糖尿病 BALB/c マウスに対してそれぞれ human IFN  $\gamma$  (huIFN  $\gamma$ ) を連日投与した (BALB/c+IFN, BALB/c+DM+IFN)。8 週間飼育した後に屠殺し腎組織を採取した。腎組織病理標本を作製しメサンギウム細胞数/メサンギウム領域, およびメサンギウム領域/糸球体面積比につき検討した。

糖尿病腎症に対する T 細胞の影響を確認するために T 細胞の存在しないヌードマウスを用いて実験を行った。8 週齢の BALB/c マウスとヌードマウスに対して STZ を投与し糖尿病群と対照群に群別した (BALB/c, Nude, BALB/c+DM, Nude+DM)。飼育中は 4 週ごとに尿蛋白量, 血糖および体重を測定した。8 週間飼育した後に屠殺し腎組織を採取した。腎組織病理標本を作製しメサンギウム細胞数/メサンギウム領域, およびメサンギウム領域/糸球体面積比につき検討した。また, 得られた病理組織標本を抗マウス F4/80 抗体を用いて免疫染色し, 糸球体に浸潤したマクロファージを測定した。

対照ヌードマウスおよび糖尿病ヌードマウスに対して BALB/c マウスの脾臓より採取し, Magnetic cell sorting (MACS) を用いて純化した T 細胞を移植した (Nude+Tc, Nude+DM+Tc)。飼育中は 4 週ごとに尿蛋白量, 血糖および体重を測定した。8 週間飼

育した後に屠殺し腎組織を採取した。腎組織病理標本を作製しメサングウム細胞数/メサングウム領域、およびメサングウム領域/糸球体面積比につき検討した。また、得られた病理組織標本を抗 F4/80 抗体を用いて免疫染色し、糸球体に浸潤したマクロファージ浸潤数を測定した。

#### 【結果】

B6+DM 群は対照 B6 群および BALB/c+DM 群と比較して有意にメサングウム細胞数/メサングウム領域およびメサングウム領域/糸球体面積比が増加していた。BALB/c+DM 群では BALB/c 群と比して軽度増悪傾向を認めたが有意差は認めなかった。BALB/c 群および BALB/c+DM 群に対して huIFN $\gamma$  を投与したところ、BALB/c+DM+IFN 群においてメサングウム細胞数/メサングウム領域およびメサングウム領域/糸球体面積比の増悪が見られた。

次にヌードマウスでは Nude+DM 群は Nude 群および BALB/c+DM 群と比較して飼育 8 週目で尿中アルブミン/クレアチニン比の増加を認めた。また腎病理組織でも有意にメサングウム細胞数/メサングウム領域およびメサングウム領域/糸球体面積比が増加していた。免疫染色では Nude+DM 群では Nude 群および BALB/c+DM 群と比較して有意にマクロファージの浸潤増加が認められた。また、Nude 群でも BALB/c 群に比してマクロファージの浸潤増加が認められた。

Nude 群および Nude+DM 群に対して BALB/c マウスより採取した T 細胞を移植したところ Nude+DM+Tc 群は Nude+DM 群に比して有意に尿中アルブミン/クレアチニン比の低下を認めた。また、腎病理組織でも有意にメサングウム細胞数/メサングウム領域およびメサングウム領域/糸球体面積比が減少していた。また、免疫染色で Nude+DM+Tc 群は Nude+DM 群に比して有意にマクロファージ浸潤の減少を認めた。

#### 【考察】

今回の結果では B6 マウスでは BALB/c マウスに比して糖尿病腎症は進展していた。これは、既報でも同様の結果が示されているが、我々は Th1 優位であることが糖尿病腎症の進展に関与すると考え、Th2 優位である BALB/c マウスに対して Th1 サイトカインである IFN $\gamma$  を投与することとした。その結果 IFN $\gamma$  を投与した糖尿病 BALB/c マウスでは糖尿病腎症の進展を認めた。そこで、Th1 細胞の存在しないヌードマウスでは糖尿病腎症の進展が抑えられるのではないかと考え、ヌードマウスを用いて同様の実験を行った。しかしヌードマウスでは糖尿病腎症の進展を認め、Microinflammation を示唆するマクロファージの浸潤も増加していた。そこで、ヌードマウスに対して BALB/c マウスより採取した T 細胞を移植したところ糖尿病腎症の進展が抑制された。このことから、BALB/c マウスの T 細胞は糖尿病腎症に対して防御的に働いていると考えられた。BALB/c マウスは Th2 優位であるため、今回移植した T 細胞が Th2 優位であり、それが腎症の抑制に作用した可能性も考えられた。

#### 【結論】

マウスの糖尿病腎症において Th1/Th2 バランスが腎症の進展に影響を与えている可能性が示唆された。また、BALB/c マウスでは T 細胞が糖尿病腎症に対して防御的に働いている可能性が示唆された。

今後さらなる検討を進めることで、この機構が明らかにすることが、糖尿病腎症の加療に役立つと考えている。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 瀬 谷 司  
副 査 教 授 野々村 克也

## 学位論文題名

### 糖尿病腎症の発症進展における免疫学的背景の検討

糖尿病腎症は透析導入となる最多の原因疾患である。その成因にはさまざまな機序が考えられているが、最近 IFN $\gamma$  や tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) などの Th1 サイトカインが病態に関わっているとの報告がある。Th1 サイトカインは Th2 サイトカインにより抑制されることが知られている。まず臨床研究として実際の糖尿病患者における IgE を測定し、糖尿病腎症の重症度につき検討を行った。糖尿病患者 192 名を対象とし、血清 IgE 値 200IU/1 未満の Low-IgE 群と 200IU/1 以上を呈した High-IgE 群とに群別し、検討を行った。結果、尿蛋白量は両群間で差を認めないが High-IgE 群では腎機能障害の速度が緩やかであった。次に対象のうち尿蛋白 0.5g/g・Cre 以上を呈した顕性蛋白尿群 45 名で同様の検討を行った。結果はタンパク尿・腎機能障害の進行速度ともに、High-IgE 群で有意に軽症であった。

このことから IgE を刺激する Th2 細胞が糖尿病腎症に対して防御的に働くことが示唆され、マウスにおいてさらなる検討を行った。

Th2 細胞が有意である BALB/c マウスおよび糖尿病 BALB/c マウスに対して human IFN $\gamma$  を連日投与した (BALB/c+IFN, BALB/c+DM+IFN)。その結果 BALB/c+DM 群では糖尿病腎症は軽度増悪を認めるのみであったが、BALB/c+DM+IFN 群において糖尿病腎症の増悪が見られた。このことから IFN $\gamma$  は糖尿病腎症を増悪させる事が示唆された。

次に T 細胞の存在しないヌードマウスを用いて実験を行った。8 週齢の BALB/c マウスとヌードマウスに対して STZ を投与し糖尿病群と対照群に群別した (BALB/c, Nude, BALB/c+DM, Nude+DM)。飼育中は尿蛋白量、血糖および体重を測定した。8 週間飼育した後に屠殺し腎組織病理標本を作製しメサンギウム細胞数/メサンギウム領域、およびメサンギウム領域/糸球体面積比および抗マウス F4/80 抗体を用いた免疫染色により糸球体に浸潤したマクロファージを測定した。

その結果ヌードマウスでは Nude+DM 群は Nude 群および BALB/c+DM 群と比較して飼育 8 週目で尿中アルブミン/クレアチニン比の増加を認めた。また腎病理組織でも有意にメサンギウム細胞数/メサンギウム領域およびメサンギウム領域/糸球体面積比が増加していた。免疫染色では Nude+DM 群では Nude 群および BALB/c+DM 群と比較して有意にマクロファージの浸潤増加が認められた。また、Nude 群でも BALB/c 群に比してマクロファージの浸潤増加が認められた。このことから BALB/c マウスでは T 細胞は糖尿病腎症に対して防御的に働いている可能性が示唆された。

そこで Nude 群および Nude+DM 群に対して BALB/c マウスの脾臓より採取した T 細胞

を移植し (Nude+Tc, Nude+DM+Tc) 同様の検討を行った。その結果、Nude+DM+Tc 群は Nude+DM 群に比して有意に尿中アルブミン/クレアチニン比の低下を認めた。また、腎病理組織でも有意に糖尿病腎症が軽症であった。また、免疫染色で Nude+DM+Tc 群は Nude+DM 群に比してマクロファージ浸潤の減少を認めた。

以上より BALB/c マウスにおいては T 細胞が糖尿病腎症の進展を抑制し、臨床検討の結果をあわせると Th2 細胞が有意であることが糖尿病腎症に対して防御的に働いていると思われた。

以上を発表し以下の質疑応答を行った。

瀬谷教授より糖尿病腎症に対して制御性 T 細胞について移植してはどうか、との質問があった。

今後 T 細胞の subtype については CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞・制御性 T 細胞などに純化し、移植することで糖尿病腎症の重症度にどのような影響を与えるか、更に検討する予定であると回答した。

野々村教授より糖尿病腎症に対するレニン・アンギオテンシン系 (RAA 系) の関与につき質問を受けた。

炎症性サイトカインが RAA 系に対して影響を与えるかは不明だが、逆に RAA 系阻害薬の投与で炎症性サイトカインが低下するという報告はあり、今後の検討課題と考えられると回答した。

小池教授より今後の展望について質問を受けた。

ヌードマウスに T 細胞を subtype に純化し移植することでさらなる検討を行う予定であると回答した。また、臨床面では Th2 へ誘導する貼付剤などによる糖尿病腎症の加療を考えていると回答した。

この論文は、北海道医学雑誌で高く評価され、今後のさらなる検討が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。