

Mini Review

進行性腎線維化にはたすMCP-1-CCR2の役割と治療戦略への応用

和田隆志^{1,2)}, 横山 仁^{1,2)}, 向田直史³⁾, 松島綱治⁴⁾¹⁾金沢大学大学院医学系研究科腎臓内科²⁾同医学部附属病院血液浄化療法部³⁾同がん研究所組織分子構築研究分野⁴⁾東京大学大学院医学系研究科分子予防医学*MCP-1-CCR2 in renal fibrosis*

Studies of chemokines and their cognate receptors have shed light on the detailed molecular mechanisms of leukocyte trafficking and activation in various inflammatory diseases including renal ones. Chemokine receptors expressed on renal resident cells might be involved in proliferation, proteinuria and fibrogenesis. Novel biological functions of chemokines would expand their universe beyond chemotaxis and activation of inflammatory cells in renal diseases. Importantly, MCP-1 and its cognate receptor CCR2 are now considered to contribute to progressive renal fibrosis, which is a hallmark of progressive renal diseases despite their etiologies, including diabetic nephropathy. The selective intervention of MCP-1-CCR2 via the administration of anti-MCP-1 neutralizing antibodies, CCR2 antagonists and the MCP-1 mutant ameliorated progressive renal fibrosis by resulting in decrease in the deposit of type I collagen and in reduced expression of TGF- β . This MCP-1-CCR2-dependent loop for progressive renal fibrosis was confirmed in CCR2 gene targeted mice. These findings suggest that the therapeutic strategy of blocking MCP-1-CCR2 may prove beneficial for progressive renal fibrosis.

Rec.4/6/2004, Acc.5/19/2004, pp567-572

Takashi Wada^{1,2)}, Hitoshi Yokoyama^{1,2)}, Naofumi Mukaida³⁾, Kouji Matsushima⁴⁾¹⁾Department of Gastroenterology and Nephrology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science²⁾Division of Blood Purification, Kanazawa University Hospital³⁾Division of Molecular Bioregulation, Cancer Research Institute, Kanazawa University⁴⁾Department of Molecular Prevent Medicine, Graduate School of medicine, University of Tokyo**Key words** chemokine, kidney, fibrosis, MCP-1, CCR2

腎疾患の発症・進展には、腎局所への炎症細胞の浸潤・活性化、腎固有細胞の壊死、脱落あるいは過剰増殖、肥大および細胞外マトリックスの増加といった一連の過程がある。この過程を経て末期腎不全により血液浄化療法を余儀なくされる方々は、日本だけでも約23万人と増加の一途を辿っている。これは人口比に直すと世界で最大であり、透析症例の約10人に1人は日本人である。この透析医療に費やされる医療費も全体の約3%を占める。これらの

観点から、腎不全への進展阻止を視野に入れた進行性腎疾患の治療戦略の構築は、医学的、社会的、そして医療経済上の重要な課題の一つである。

一方、ケモカイン研究は、1987年に吉村と松島が好中球に対して走化活性を有するポリペプチド性因子を精製、クローニングし、interleukin(IL)-8と命名したことから幕開けした。その機能は当初考えられていた白血球走化活性に留まらず、受容体を介して線維化や細胞増殖など、実に多

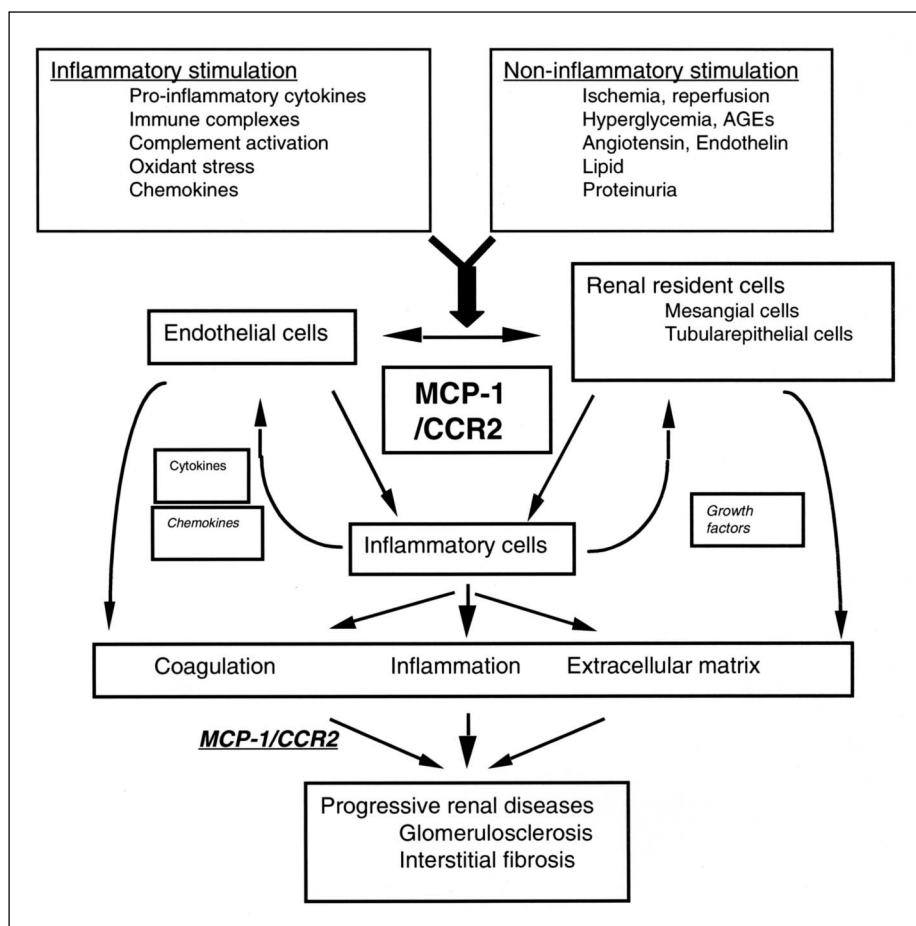


図1 腎線維化 / 硬化に至る進展機序とMCP-1-CCR2(文献1,3)より改変引用)

彩な機能を示すことが判明してきた。

進行性腎線維化は、線維化の進展過程で細胞浸潤を伴うことが病理学的な特徴であり、臨床的には腎疾患の予後を規定する重要な病態である。したがって、進行性腎線維化の病態の解明と、その治療の確立が腎不全への進展阻止を考える上で重要である。そこで、本稿では腎線維化の進展過程におけるケモカイン、ことに monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF)/CCL2、およびその受容体である CCR2 に着目し、病態への関与ならびに治療標的分子としての可能性につき概説する。

腎固有細胞とケモカイン / ケモカイン受容体

腎固有細胞である尿細管上皮細胞、糸球体メサンギウム細胞、糸球体上皮細胞あるいは内皮細胞が *in vitro* において、サイトカインをはじめ種々の刺激により IL-8/CXCL8, MCP-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α /CCL3 および regulated upon activation, normal T cells ex-

pressed and secreted (RANTES)/CCL5 といった炎症性ケモカインを産生する¹⁾。例えば、MCP-1 は炎症性刺激に留まらず、虚血、高血糖、脂質異常、種々の血管作動物質および蛋白尿自体により培養メサンギウム細胞や尿細管上皮細胞からの産生が亢進することが判明している。一方、腎固有細胞上にもケモカイン受容体が発現し、従来の炎症細胞浸潤・活性化に加え、新たな機序により腎疾患の病態を制御している可能性が示され始めている。

例をあげると、培養メサンギウム細胞上に CXCR3 が *de novo* に発現し、そのリガンドである interferon inducible protein (IP)-10/CXCL10 により培養メサンギウム細胞増殖効果が得られるとともに、ヒト増殖性腎炎例での関与が報告された。この IP-10 発現は tumor necrosis factor (TNF)- α ならびに interferon (IFN)- γ 刺激で亢進することから、炎症に伴いメサンギウム増殖が促進されることを示唆する。さらに secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC)/CCL21 の受容体である CCR7 がメサンギウム細胞上に発現し、メサンギウム細胞の遊走・増殖ならびにアポトーシス回避効果に関与する。これら新たに判明しつつある事実から、ケ

モカインは炎症刺激に伴い腎固有細胞から産生されるだけでなく、オートクリンもしくはパラクリン分泌機構を介して腎固有細胞を生理的ならびに種々の病態に応じて制御し、腎疾患の発症・進展に関与していることが考えられる(図1)。

しかしながら、腎疾患で最も精力的に検討され、かつその重要性が示唆されているMCP-1の受容体、CCR2の腎固有細胞における発現は、今だに十分に検討されていない。他方、CCR2以外のMCP-1シグナル伝達を担うputative receptorを示唆する研究もある。たとえば、Orthらは培養尿細管上皮細胞を用いてMCP-1刺激に伴う転写因子(nuclear factor- κ B, activator protein-1)を介したIL-6ならびにintercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)発現を確認している。このMCP-1刺激はCCR2以外の未知の受容体を介する可能性を示している²⁾。

腎線維化に至る腎疾患進展因子ならびに臨床活動性指標としてのMCP-1の意義

培養メサンギウム細胞において、C-X-Cケモカインの刺激によりMCP-1に代表されるC-Cケモカインが産生されるというカスケードが存在することが報告された⁴⁾。この事実は腎固有細胞を場として急性期から慢性期に至る炎症の進展過程において、C-X-CからC-Cケモカインへの移行の重要性を示すものと考えられる。臨床的にもケモカイン発現の経時的変化はカスケードを形成していることが観察される¹⁾。すなわち、好中球浸潤を主体とする急性炎症を示す急性腎炎、IgA腎症の急性増悪時あるいは活動性ループス腎炎ならびに腎移植後の急性拒絶反応時には尿中IL-8濃度の上昇がみられる。病理学的にはIL-8は糸球体糸球体における管内性増殖ならびに白血球(好中球)浸潤と相関を示す。加えて細胞性半月体形成あるいは間質内T(Th1)リンパ球浸潤例では、CCR5陽性細胞浸潤に対応して一過性に尿中MIP-1 α が検出される。MCP-1もこの急性炎症期に腎固有細胞での発現が亢進し、尿中MCP-1値は増加する。さらに興味深いことに、MCP-1はむしろ糸球体病変、とくにメサンギウムの硬化性病変や腎線維化が進行し、臨床的にも高度の尿蛋白ならびに腎機能低下を示す症例において経過とともにさらに増加する。

このように、腎固有細胞および浸潤細胞から産生されるサイトカイン・ケモカインは、オートクリンもしくはパラクリン分泌機構を介してさらに炎症を増幅し、最終的に腎線維化に至るカスケードを形成するものと考えられる(ケモカインカスケード)^{1,3)}(図1)。

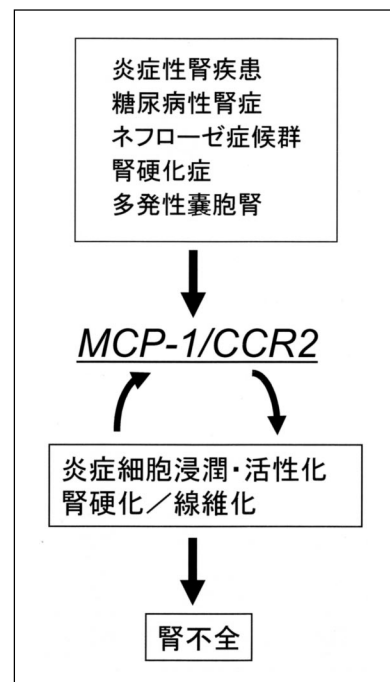


図2 MCP-1-CCR2の腎線維化に至る共通の進展因子の可能性

MCP-1-CCR2: 腎線維化に至る病因を問わない共通進展因子

MCP-1はループス腎炎、半月体形成性腎炎、IgA腎症ならびに移植拒絶反応といった、その発症・進展に炎症が関与する腎疾患において尿中濃度が上昇し、尿細管上皮を中心にmRNAならびに蛋白発現が確認される¹⁾。これまで非免疫機序で進展すると考えられていた糖尿病性腎症において、少なくとも進行期の尿細管・間質障害に関与することが示された⁵⁾。さらに成人発症の一次性ネフローゼ症候群の代表的疾患である膜性腎症において臨床的に進行性であり、予後不良な一群がある。かかる例においては、進展した間質線維化/尿細管萎縮と単球/マクロファージ浸潤が特徴であり、その病態形成にMCP-1-CCR2が関与する⁶⁾。加えて、遺伝性腎疾患のうち最も頻度が高く、徐々に腎不全に進展する多発性嚢胞腎の進展過程にMCP-1が関与し、尿中MCP-1値の測定が臨床的に病態を反映することが示された⁷⁾。

これらの報告からMCP-1は腎疾患の急性炎症期に関与するだけでなく、炎症の遷延化や腎線維化に至る尿細管・間質障害に病態特異的に関与し、MCP-1が病因を問わない共通の進展因子である可能性が考えられる(図2)^{1,8)}。このことは治療戦略上の標的分子として、さらに臨床検査医学上の重要性を示唆するものである。

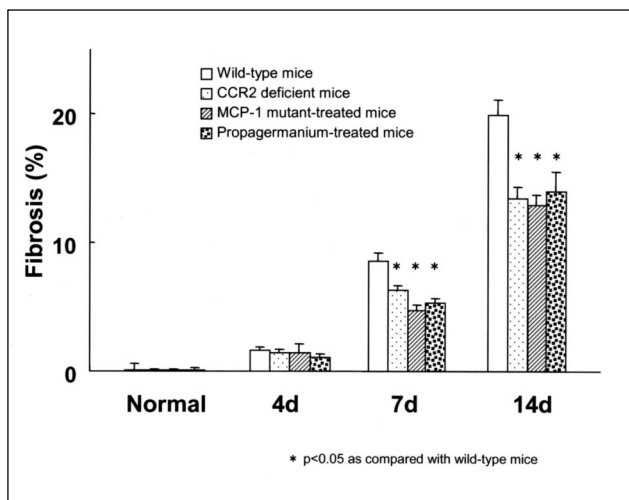


図3 MCP-1-CCR2阻害によるマウス側尿管結紮モデルの腎線維化に対する効果(文献13,15)より改変引用)

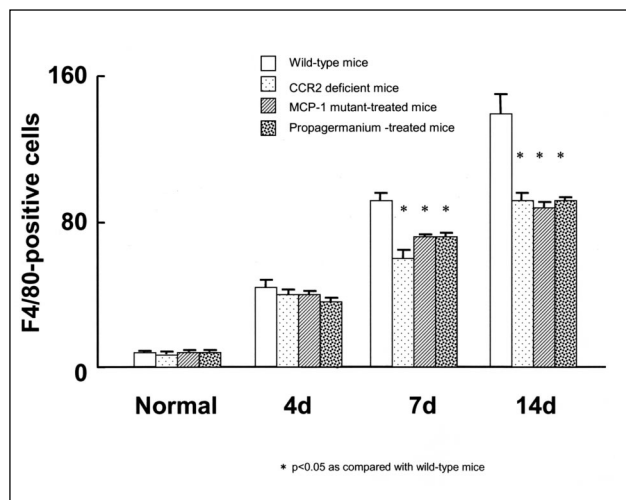


図4 MCP-1-CCR2阻害によるマウス側尿管結紮モデルのマクロファージ浸潤に対する効果(文献13,15)より改変引用)

MCP-1-CCR2と腎障害機序

最近, 蛋白尿は糸球体障害をはじめとする腎障害の結果によって生じるだけではなく, 蛋白尿そのものが腎線維化に至る腎障害増悪因子であることが明らかとなってきた。これまで MCP-1 や IL-8 は, 実験腎炎モデルや臨床的に微小変化型ネフローゼ症候群例の増悪期に発現することから蛋白尿との関連が示されていた。この機序に関連して, 培養糸球体上皮細胞ならびに膜性腎症例の糸球体上皮細胞に IL-8 の受容体である CXCR1 はじめ, 種々のケモカイン受容体が発現していることが報告された⁹⁾。これらのケモカイン受容体にリガンドを作用すると NADPH-oxidase 活性亢進から糸球体上皮細胞の superoxide anion の増加を来した。この上皮細胞障害はケモカインを介した蛋白尿の機序として注目される。一方, 蛋白尿に含まれるアルブミン, トランスフェリン等で NF- κ B 等転写因子を介して尿細管上皮細胞からの MCP-1 が亢進する。一旦産生された MCP-1 は先述したように尿細管上皮細胞に作用し, 転写因子(NF- κ B, AP-1)を活性化する³⁾。したがって, 尿細管・間質において MCP-1 を介した炎症増幅機構が存在することが示唆される。この遷延する炎症が腎線維化に至る進展機序に密接に関連していることが推測される。

これまで腎線維化機序と TGF- β との密接な関連が指摘されてきた。実験腎炎モデルの検討では, MCP-1 刺激により糸球体細胞由来の TGF- β 産生が亢進することが報告された¹⁰⁾。この事実から MCP-1 と TGF- β の相互連関の存在と, この連関を介した線維化機序が示唆される。一方, CCR2 を発現する肺線維芽細胞を用いた検討により MCP-1 刺激に伴う TGF- β ならびにプロコラーゲン産生が示され

た¹¹⁾。この実験結果は MCP-1 の線維化にはたす直接的な効果を示したものとして注目される。しかしながら, 目下のところ腎線維芽細胞はじめ, 腎固有細胞を場とした MCP-1-CCR2 による直接的な線維化機序を示唆するデータに乏しく, 今後の展開が期待される。

MCP-1-CCR2 を分子標的とした腎線維化治療戦略とその有用性

現在ケモカイン・ケモカイン受容体を分子標的とした創薬は魅力的な分野である。例えば, MCP-1-CCR2 を分子標的とした薬剤はヒト型化抗 MCP-1 抗体はじめ, 多岐に渡って開発が進められている。抗体に関しては MCP-1 だけではなく, CCR2 に対する抗体も開発され, CCR2N 末端に対する抗体 MCP-1 R02 はアゴニストとして, 第3細胞外ドメインに対する抗体 MCP-1 R04, MCP-1 R05 はアンタゴニストとして作用する。アンタゴニストとして MCP-1 の N 末端の7塩基を欠損させた MCP-1 変異体(7ND)は, ドミナントネガティブ効果により MCP-1-CCR2 シグナル伝達を阻害する。さらに, MCP-1(9-76)も関節炎抑制効果が示されている。一方, ペプチド性アンタゴニストは抗原性が強いいため, 非ペプチド性アンタゴニストの開発が結晶構造解析や合成化合物を用いて進められている。加えて, すでに臨床の場において使用されている薬剤の機序に, このケモカイン拮抗効果が判明した例もある。肝炎治療に用いられているプロパゲルマニウムは GPI-anchored protein に作用して近接した CCR2 の機能を制御し, MCP-1-CCR2 の結合を阻害することなく MCP-1 誘導性遊走活性を抑制する。

実際, MCP-1-CCR2の制御による抗ケモカイン療法の効果は急性から線維化モデルまで種々の腎疾患モデルでその有用性が示されている。腎硬化, 線維化が生じるWistar-Kyoto ラットを用いた半月体形成性腎炎モデルでは, 抗MCP-1 中和抗体の硬化 / 線維化抑制効果から腎機能保持が示されている¹²⁾。さらにMCP-1変異体(7ND)を用いた遺伝子治療により, 尿細管・間質病変の最終組織像である線維化モデルの一側尿管結紮モデルにおける腎線維化抑制効果が示された¹³⁾(図3)。これまでに7NDによる腎線維化に至るアルブミン負荷モデルならびに線維化への進展機序の一つである虚血再環流モデルによる尿細管壊死軽減効果も同様に確認されている¹⁴⁾。さらに, 最近 MCP-1-CCR2を標的分子とした低分子化合物の開発ならびにその効果の検討が精力的に進められている。実際, CCR2 アンタゴニストにより, マウス一側尿管結紮モデルにおける腎線維化ならびにマクロファージ浸潤抑制効果も確認されている¹⁵⁾(図3,4)。この線維化抑制効果はCCR2欠損マウスとほぼ同等であることも明らかとなった。この際, MCP-1-CCR2を阻害することにより, 腎線維化機序に深く関与する腎固有細胞からのTGF- β 産生ならびに線維化を構成する細胞外基質であるI型コラーゲン産生を軽減することが判明した^{13,15)}。一方, MCP-1 アンタゴニストによる自然発症ループ腎炎モデル(MRL-*Fas*^{lpr} マウス)における有用性も示され¹⁶⁾, MCP-1欠損MRL-*Fas*^{lpr} マウスにおける腎障害軽減効果を支持するものであった¹⁷⁾。加えて, 副腎皮質ステロイド, 抗血小板薬, アスピリン, HMG-CoA還元酵素阻害薬およびアンジオテンシン変換酵素阻害薬(アンジオテンシン受容体拮抗薬)など, 臨床で使用されている薬剤によってNF- κ Bは不活性化される。最近, スタチンとアンジオテンシン変換酵素阻害薬の併用投与によりHeymann nephritisの改善効果が得られ, MCP-1mRNA発現もほぼ完全に抑制されることが報告された¹⁸⁾。このように特異性は低いものの, 臨床で用いられる薬剤の中には, その機序の少なくとも一部にMCP-1を含めた抗ケモカイン・ケモカイン受容体効果を示すものが存在する。

まとめ

MCP-1-CCR2は急性期腎疾患に関与するばかりではなく, 腎疾患の病因を問わず, 腎線維化に至る病態に深く関与する共通進展因子であることが推測される。さらに腎における抗線維化療法の新しい標的分子としてMCP-1-CCR2の臨床応用が期待される。

文 献

1) Wada T, Matsushima K, Yokoyama H: Chemokines as

the therapeutic targets for renal diseases. *Curr Med Chem Anti-Inflammatory & Anti-Allergy*, 2: 175-190, 2003.

- 2) Viedt C, Dechend R, Fei J, Hansch GM, Kreuzer J, Orth SR: MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *J Am Soc Nephrol*, 13: 1534-1547, 2002.
- 3) Yokoyama H, Wada T: Chemokines in renal fibrosis and glomerulosclerosis. *Nephrology and Hypertension*, 9: 89-96, 2003.
- 4) Luo Y, Lloyd C, Gutierrez-Ramos JC, Dorf ME: Chemokine amplification in mesangial cells. *J Immunol*, 163: 3985-3992, 1999.
- 5) Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, Takeda S, Takasawa K, Yoshimura M, Kida H, Kobayashi K, Mukaida N, Naito T, Matsushima K, Yokoyama H: Up-regulation of MCP-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 58: 1492-1498, 2000.
- 6) Yoshimoto K, Yokoyama H, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Goshima S, Kida H: Pathological findings of initial biopsies reflect the outcomes of membranous nephropathy. *Kidney Int*, 65: 148-153, 2004.
- 7) Zheng D, Wolfe M, Cowley BD Jr, Wallace DP, Yamaguchi T, Grantham JJ: Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 14: 2588-2595, 2003.
- 8) Wada T, Yokoyama H, Matsushima K, Kobayashi K: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): does it play a role in diabetic nephropathy? Editorial comment *Nephrol Dial Transplant*, 18: 457-459, 2003.
- 9) Huber TB, Reinhardt HC, Exner M, Burger JA, Kerjaschki D, Saleem MA, Pavenstadt H: Expression of functional CCR and CXCR chemokine receptors in podocytes. *J Immunol*, 168: 6244-6252, 2002.
- 10) Wolf G, Jocks T, Zahner G, Panzer U, Stahl RA: Existence of regulatory loop between MCP-1 and TGF-beta in glomerular immune injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: 1075-1084, 2002.
- 11) Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Lipinski S, Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Kunke SL: Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1- and Th2-type pulmonary granuloma models. *J Immunol*,

- 163: 2193-2201, 1999.
- 12) Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi K, Harada K, Naruto M, Su SB, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K: Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J*, 10: 1418-1425, 1996.
- 13) Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Kitagawa K, Ishida Y, Kondo T, Hashimoto H, Ishiwata Y, Mukaida N, Tomosugi N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H: Gene therapy via blockade of MCP-1 for renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 15: 940-948, 2004.
- 14) Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Tomosugi N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H: Gene therapy expressing amino-terminal truncated monocyte chemoattractant protein-1 prevents renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 14: 1066-1071, 2003.
- 15) Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Kuziel WA, Matsushima K, Mukaida N, Yokoyama H: Blockade of CCR2 ameliorates renal fibrosis. *Am J Pathol*, 165: 237-246, 2004.
- 16) Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, Inoue A, Ito MR, Terada M, Hieshima K, Maruyama H, Miyazaki J, Yoshie O, Nose M, Fujita S: Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/*lpr* mice. *Arthritis Rheum*, 48: 2555-2566, 2003.
- 17) Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR: Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-*Fas^{lpr}* mice. *J Exp Med*, 190: 1813-1824, 1999.
- 18) Zoja C, Corna D, Rottoli D, Cattaneo D, Zanchi C, Tomasoni S, Abbate M, Remuzzi G: Effect of combining ACE inhibitor and statin in severe experimental nephropathy. *Kidney Int*, 61: 1635-1645, 2002.