 原 著

順天堂医学, 2006, 52
P. 84~93

腎における肺サーファクタント蛋白Dの局在

眞 野 訓*1)

SATOSHI MANO

大 井 洋 之*1)

HIROYUKI OHI

玉 野 まり子*1)

MARIKO TAMANO

池 上 真知子*2)

MACHIKO IKEGAMI

Jeffrey A. Whitsett*2)

JEFFREY A. WHITSETT

富 野 康日己*1)

YASUHIKO TOMINO

目的：肺サーファクタント蛋白D (pulmonary surfactant protein D (SP-D)) はコレクチンに属し、様々な微生物の表面の炭水化物に結合することにより、肺の宿主防御に重要な役割を果たしている。ヒトにおいてSP-DのmRNAや蛋白の、肺以外の臓器の粘膜表面にも発現すると報告されているが、腎でのSP-D蛋白の局在部位は報告により異なっている。本研究の目的は、ヒトの腎におけるSP-Dの局在部位を特定し、ヒトとマウスの腎での局在を比較することで、その意義を明らかにすることである。

対象および方法：正常腎組織と原発性糸球体腎炎患者の腎生検組織を用い、SP-Dの免疫組織染色を酵素抗体法で行った。正常マウスとSP-D遺伝子を強発現させたマウスおよび血清SP-D濃度を増加させたマウスの腎組織の免疫組織染色も行った。ヒトの正常腎組織を用い、SP-Dとデコリンの局在部位を免疫組織染色により比較した。

結果：ヒトの腎でSP-Dは、遠位尿細管上皮に染色されたが、糸球体にはほとんど染色されなかった。正常腎組織と腎炎患者の腎組織では、SP-Dの局在部位や染色強度に有意な差は認められなかった。SP-Dは、正常マウスとSP-D遺伝子を強発現させたマウスの腎には染色されなかった。血清SP-D濃度を増加させたマウスではSP-Dは糸球体に認められたが、尿細管にはわずかな染色を認めるのみであった。SP-Dとデコリンの染色部位は、一致していなかった。

結論：SP-Dはヒト糸球体に認められることがあるが、血清SP-D濃度を増加させたマウスの検討より血清SP-Dが上皮細胞に捕捉されたために染色される可能性が考えられた。SP-Dは、マウスの腎では染色されず、ヒトの腎では遠位尿細管に染色され、各種原発性糸球体腎炎患者の腎でも変化は認められなかった。SP-Dは、ヒトの遠位尿細管に恒常的に局在していると考えられた。

キーワード：SP-D, コレクチン, 自然免疫, 遠位尿細管

はじめに

ヒトなど脊椎動物の生体防御機構は、自然免疫と獲得免疫の二つの反応系で成立している。これ

らの免疫システムにより自己と非自己を認識し、異物を排除している。無脊椎動物では、自然免疫が主に生体防御機構を担っているが、その中でレクチン群による異物の監視システムは極めて重要

*1) 順天堂大学医学部内科学教室腎臓内科学講座

*2) シンシナチルドレンホスピタルメディカルセンター肺生物学講座

*1) Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

*2) Division of Pulmonary Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio.

[Oct. 12, 2005 原稿受領][Dec. 1, 2005 掲載決定]

である。哺乳動物の血液中にも幾つかのレクチン群が存在していることが、知られている。マンナン結合蛋白やコングルチニン、肺サーファクタント蛋白A・Dなどのコレクチンは、カルシウム依存性レクチンファミリーに属する蛋白である¹⁾。

肺サーファクタント蛋白D (SP-D) は、ヒト肺胞上皮に存在し、肺の宿主防御に重要な役割を果たしているコレクチンの一つである¹⁾。SP-Dは、インフルエンザAウィルスやRSウィルスなどのウィルスに付着し、それらを凝集させマクロファージによるクリアランスを促し、それらの感染の成立を抑制している²⁾³⁾。また、グラム陰性菌において細胞膜の透過性を亢進させ、直接細菌の増殖を抑える機能のあることが明らかにされている⁴⁾⁵⁾。

肺以外にも上皮由来のような臓器に、SP-Dタンパクの発現や^{6)~8)} mRNAの発現も報告されているが、蛋白としての発現は肺に比較して弱い⁷⁾。腎においても、SP-DのmRNAやSP-D蛋白の発現が報告されている⁶⁾⁷⁾が、論文によりSP-D蛋白の局在部位は異なっており明確ではない。これまでの報告では、特に糸球体における存在は異なっている。Stahlmanらは、酵素抗体法によるSP-Dの免疫組織染色を行い糸球体で局在を認めているが⁶⁾、Madsenらは同じ免疫組織染色で糸球体での局在は認めていない⁷⁾。腎は肺と同様に排泄臓器であり、SP-Dが腎の生体防御機構として機能しているかもしれないが、これまで腎でのSP-Dの検討はヒトでもマウスでも詳細には行われていない。

われわれは、1) ヒトの腎におけるSP-Dの局在を確認し、腎疾患での発現の変化を観察すること、2) すでに肺でのSP-Dの機能を明らかにする目的で確立されているSP-DノックアウトマウスやSP-Dトランスジェニックマウスを用いてマウスの腎における発現を観察し、ヒトの腎と対比することによりその機能を解明すること、3) SP-Dはヒトの血清中には認めるがマウスの血清中には検出されないため、血中濃度を増加させたマウスで腎に及ぼす血清SP-Dの影響を確認すること

を目的に検討を行った。また、SP-Dと結合性の高いプロテオグリカンとしてデコリンの存在が報告されている⁹⁾。デコリンはTGF- β と結合し、その働きを抑制することが知られている¹⁰⁾。腎でもデコリンは、メサンギウム細胞・尿細管間質に発現を認め、間質の炎症や線維化を抑制していると考えられている¹¹⁾。そこで、SP-Dとデコリンの腎での発現が一致しているか否かについても検討を行った。

材料と方法

1. ヒトの腎組織

原発性糸球体腎炎患者の腎組織は、順天堂大学医学部附属順天堂医院で施行された腎生検により採取された。IgA腎症・膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)・膜性腎症(MN)・微小変化群ネフローゼ症候群(MCNS)・巣状分節状糸球体硬化症(FSGS)の患者各3症例、急速進行性糸球体腎炎(RPGN)患者2症例のパラフィン固定組織を用いた。なお、今回使用した組織は、腎生検を施行した患者に研究目的での使用の同意を得て検体を使用した。

健常者の腎組織として、National Disease Research Interchange (NDRI) 社(フィラデルフィア、アメリカ合衆国)から得た腎炎・腎症を認めない腎癌患者の摘出腎3症例を使用した。各正常腎組織切片は、PAS染色とHE染色により、糸球体構造が保たれていること、尿細管・間質に病的な細胞浸潤や線維化がないことを確認した。

2. マウスの組織

マウスの野生種として、129/Olaマウス3匹から、肺・腎組織を摘出し、パラフィン固定した。SP-D遺伝子をもたないSP-Dノックアウトマウス¹²⁾3匹から、肺・腎組織を摘出し、パラフィン固定した。SP-D遺伝子を強発現させたSP-Dトランスジェニックマウス¹³⁾3匹から、肺・腎組織を摘出し、パラフィン固定した。

ヒトFGF-7を遺伝子導入したマウスにドキシサイクリンを投与すると肺にSP-Dが過剰発現

し、SP-Dが血管内に漏出し血清SP-D濃度は上昇する¹⁴⁾。野生種マウスでは、血清SP-D濃度は測定感度以下(10ng/ml未満)であるが、SP-Dを増加させたConditional FGF-7マウスの血清SP-D濃度は、ドキシサイクリン処置後7週目で $298 \pm 42 \text{ ng/ml}$ 、14週目が $579 \pm 31 \text{ ng/ml}$ であった(平均値±標準偏差)。それぞれドキシサイクリン投与後7週・14週各3匹の肺・腎組織を摘出し、パラフィン固定した。

3. 抗体

SP-Dの免疫組織染色は、シンシナチチルドレンホスピタルメディカルセンター肺生物学講座で作成したポリクローナルウサギ抗マウスSP-D抗体を使用した⁶⁾。この抗体はヒトのSP-Dも認識し、ヒトの肺でも反応性が確認されている⁶⁾。

デコリンの免疫組織染色は、サンタクルズ社(カリフォルニア, アメリカ合衆国)のポリクローナルウサギ抗ヒトデコリン抗体を使用した。

4. 免疫組織染色

ヒトの腎組織および各マウスの肺・腎組織のパラフィン切片を酵素抗体法の一つであるEnvision法を用いて免疫組織染色を行った。各切片をキシレンで10分間ずつ2回脱パラフィンした後、エタノール溶液(100%・100%・90%・80%・70%・50%)に各5分間浸して脱エタノールし、PBS溶液(pH7.2)で洗浄した。次に、マイクロ波で15分間抗原の賦活化を行い、PBS溶液で洗浄した。次に、0.3%過酸化水素加メタノール溶液で10分間処理することによりペルオキシダーゼを失活させ、PBS溶液で洗浄後、10%正常ヤギ血清加フィッシュゼラチン(ブロッキング溶液)で非特異的結合を阻害した。各切片に一次抗体(ウサギ抗マウスSP-D抗体は2000倍希釈, ウサギ抗ヒトデコリン抗体は1000倍希釈)を乗せて4℃で一晩反応させ、PBS溶液で十分に洗浄した。二次抗体(Envisionキットのヤギ抗ウサギIgG抗体)を室温で30分間反応させ、PBS溶液で十分に洗浄し、DAB溶液(Envisionキット)を30秒~30分反応させた。次いで、10分間水洗した切片をヘマトキシリンで核染色した後、封入した。

5. 免疫組織染色の評価

SP-Dの免疫組織染色の染色強度は、4段階に分けて評価した。++を強発現した状態、+を発現した状態、±を一部に発現を認めた状態、-を全く発現しない状態と判定した。

結 果

1. ヒト腎組織におけるSP-Dの発現

摘出腎を用いた正常腎組織でのSP-Dの免疫組織染色では、鏡検で観察された糸球体356個のうち338個の糸球体では、上皮細胞にもメサンギウム細胞にもSP-Dの有意な染色はみられなかった(図-1a)。18個の糸球体にのみ主として上皮細胞(図-1b矢印)と内皮細胞・メサンギウム細胞のごく一部で染色が認められた。尿細管では、ほぼ全ての遠位尿細管内腔に沿ってSP-Dの染色を認めたが(図-1d矢印)、近位尿細管では染色を認めなかった(図-1c)。

次に、各種原発性糸球体腎炎患者の生検腎組織

図-1 ヒト正常腎組織でのSP-D発現

観察された糸球体(356個)のうち、338個の糸球体では糸球体にSP-Dの染色は認めなかった(a)が、18個の糸球体にのみ、主として上皮細胞(b矢印)その他内皮細胞・メサンギウム細胞・メサンギウム基質の一部に染色を認めた。尿細管では、全ての遠位尿細管にのみ染色を認めた(c, d矢印)。

(a, b, d: 倍率400倍, c: 倍率200倍)

表-1 各種原発性糸球体腎炎患者の臨床検査所見

	症例数	年齢 (歳)	血清Cr濃度 (<i>mg/dl</i>)	CCr (<i>ml/min</i>)	TP (<i>g/dl</i>)	アルブミン (<i>g/dl</i>)	尿蛋白 (<i>g/day</i>)	血尿 (個/毎視野)	尿中NAG (U/l)	尿中 β 2MG (μ g/l)
IgA腎症	n=3	31.7±3.4	1.1±0.49	77.1±28.0	7.4±0.59	4.1±0.12	1.37±0.69	多数	2.33±0.74	46.3±14.7
MPGN	n=3	33±12.7	0.70±0.08	76.1±21.4	6.9±0.62	4.3±0.33	1.97±0.37	11～多数	11.6±11.8	80.0±9.9
MN	n=3	50±8.3	0.73±0.03	110.7±16.6	5.8±1.28	2.7±0.53	3.50±2.20	1～5	17.3±6.85	167.3±76.8
MCNS	n=3	25.3±9.0	0.77±0.13	91.1±31.4	4.5±0.28	2.2±0.29	5.90±4.82	1～5	41.1±27.3	369.7±272.0
FSGS	n=3	30.3±11.7	0.67±0.11	78.4±24.4	6.0±1.28	3.5±1.05	2.54±2.00	1～5, 多数	16.5±13.1	230.1±240.2
RPGN	n=2	53.5±3.5	6.8±2.4	11.7±8.4	5.2±0.85	3.2±1.00	4.15±1.15	多数	40.8±35.6	404±376

MPGN, 膜性増殖性糸球体腎炎; MN, 膜性腎症; MCNS, 微小変化群ネフローゼ症候群; FSGS, 巣状分節状糸球体硬化症; RPGN, 急速進行性糸球体腎炎 (平均値 $\pm$ SD)

を用いて検討を行った。腎生検時の臨床検査所見は、腎機能・蛋白尿・血尿・尿細管障害の程度は様々であった(表-1)。各生検組織の免疫組織染色では、正常腎の染色とは異なり糸球体に全く染色はみられず、遠位尿細管にのみ染色を認めた(図-2)。尿細管における染色は、疾患の違いや腎機能・蛋白尿・血尿・尿細管障害の程度による明らかな差は認められなかった(表-2)。

2. マウスの腎組織におけるSP-Dの発現

129/olaマウス(野生種)では、SP-Dノックアウトマウスと比較して、肺のⅡ型肺胞上皮細胞とマクロファージに染色が認められた(図-3a)が、腎では糸球体、尿細管ともに認められなかった(図-3b)。

SP-Dトランスジェニックマウスの肺では、Ⅱ型肺胞上皮細胞とマクロファージにSP-Dの強い染色が認められたが(図-3c)、腎では染色はみられなかった(図-3d)。

血清SP-D濃度を増加させたconditional FGF-7マウスの肺では、Ⅱ型肺胞上皮細胞・マクロファージ・血管内皮細胞にSP-Dの強い染色を認めた(図-4a-1)。また、腎では主に糸球体上皮細胞と一部のメサンギウム細胞にSP-Dの染色を認めた(図-4a-2矢印)。ドキシサイクリン投与14週目の血清SP-D濃度がより高いマウスの肺では、Ⅱ型肺胞上皮細胞・マクロファージ・血管内皮細胞にSP-Dのより強い染色がみられた(図-4b-1)。腎では糸球体に染色を認め、尿細管間

図-2 各種原発性糸球体腎炎患者の腎生検腎組織でのSP-D発現

各種原発性糸球体腎炎のいずれの腎組織においても遠位尿細管にのみ染色を認め、糸球体では染色を認めなかった。

- a, IgA腎症 b, 膜性腎症
c, 巣状分節状糸球体硬化症 d, 膜性増殖性糸球体腎炎
(a, b, c: 倍率200倍 d: 倍率400倍)

質・尿細管細胞の一部にも染色が認められた(図-4b-2矢印)。SP-Dトランスジェニックマウスとconditional FGF-7マウスを比較すると、染色される部位に明らかな違いは認められないが、conditional FGF-7マウスでは肺胞上皮の増殖の程度に従いSP-Dは強く染色されていた。

3. ヒトの腎におけるSP-Dとデコリンの発現

デコリンは、糸球体内皮細胞と尿細管間質・血

表-2 ヒト腎におけるSP-D発現

	糸球体				尿細管		血管壁
	上皮細胞	内皮細胞	mesangium	mesangial matrix	近位	遠位	
健常者 (n=3)	±	±	±	±	—	++	—
IgA腎症 (n=3)	—	—	—	—	—	++	—
MPGN (n=3)	—	—	—	—	—	++	—
MN (n=3)	—	—	—	—	—	++	—
MCNS (n=3)	—	—	—	—	—	++	—
FSGS (n=3)	—	—	—	—	—	++	—
RPGN (n=2)	—	—	—	—	—	++	—

MPGN, 膜性増殖性糸球体腎炎; MN, 膜性腎症; MCNS, 微小変化群ネフローゼ症候群; FSGS, 巣状分節状糸球体硬化症; RPGN, 急速進行性糸球体腎炎

SP-Dは、摘出腎で18/338の糸球体にのみ染色を認めたが、腎生検の腎で糸球体は染色を認めなかった。遠位尿細管は腎疾患の種類・有無に関わらず強い染色を認めた。

図-3 マウスの肺・腎組織でのSP-D発現

野生種 (129/ola) マウスの肺ではⅡ型肺胞上皮細胞・肺胞マクロファージに染色を認める (a) が、腎では染色を認めなかった (b)。SP-Dトランスジェニックマウスの肺ではⅡ型肺胞上皮細胞・肺胞マクロファージに強い染色を認める (c) が、腎では染色を認めなかった (d)。(a, b, c, d: 倍率400倍)

図-4 血清SP-D濃度の高いマウスでの肺・腎組織のSP-D発現

ヒトFGF-7トランスジェニックマウスのドキシサイクリン投与後7週目のマウス (血清SP-D濃度 $298 \pm 42 \text{ ng/ml}$) では、肺ではⅡ型肺胞上皮・肺胞マクロファージ・血管内皮に染色を認め (a-1)、腎では糸球体の上皮細胞に軽度の染色を認めた (a-2矢印)。ドキシサイクリン投与後14週目のマウス (血清SP-D濃度 $579 \pm 31 \text{ ng/ml}$) では、肺ではⅡ型肺胞上皮・肺胞マクロファージ・血管内皮に強い染色を認めた (b-1)、腎では糸球体の上皮細胞に7週目のマウスより強く染色を認め、尿細管間質の一部に染色を認めた (b-2矢印)。(a, b, c, d: 倍率400倍)

表-3 マウス腎におけるSP-D発現

	糸球体				尿細管		血管壁
	上皮細胞	内皮細胞	mesangium	mesangial matrix	近位	遠位	
WT (n=3)	—	—	—	—	—	—	—
SP-D KO (n=3)	—	—	—	—	—	—	—
SP-D TG (n=3)	—	—	—	—	—	—	—
FGF-7 TG 7weeks (n=3)	±	±	—	—	—	—	±
FGF-7 TG 14weeks (n=3)	+	+	±	±	±	±	+

SP-D KO : SP-D KO マウス

WT : 野生種 (129/ola マウス)

SP-D TG : SP-D TG マウス

FGF-7 TG : conditional FGF-7 マウス

(7weeks : 血清SP-D濃度 $298 \pm 42 \text{ ng/ml}$ 14weeks : 血清SP-D濃度 $579 \pm 31 \text{ ng/ml}$)

マウスではSP-Dをトランスジェニックさせても腎に染色を認めないが、血液中にSP-Dを漏出させると腎の糸球体に染色を認め、尿細管のごく一部にのみ染色を認めた。

図-5 ヒトの腎におけるSP-Dとデコリンの発現部位の違い

同一検体の切片を用いたSP-Dとデコリンの免疫組織染色では、SP-Dは遠位尿細管内腔に染色を認め (a-1)、糸球体では発現を認めなかった (a-2) のに対し、デコリンは尿細管間質の線維成分 (b-1)・糸球体の内皮細胞 (b-2) に染色がみられた。

(a-1, a-2, b-2 : 倍率400倍 b-1 : 倍率200倍)

管周囲線維成分 (図-5b-1, b-2) に染色が認められたが、尿細管内腔には染色は認められなかった。腎でのSP-Dとデコリンの染色部位について

は、連続切片の染色で比較を行ったが、一致してはいなかった (図-5)。

考 察

肺は呼吸により体内に空気を取り込んでガス交換を行うことから、他の臓器以上に空気中の微生物にさらされる機会が多い。それゆえ肺では、強力な生体防御機構の必要性が考えられる。Ⅱ型肺胞上皮細胞から分泌されるSP-DやSP-Aはコレクチンに属し、様々な微生物の表面の炭水化物に結合し微生物を死滅させたり、マクロファージの貪食を促したりすることで、肺での宿主防御を行ない生体の自然免疫の一環として重要な役割を担っている^{1)~3)}。

SP-D (43kD) はSP-A (34kD) よりも分子量が大きく5倍の空間的広がりを持ち、細菌などの細胞膜の脂肪酸やリポ多糖体のより大きな範囲に付着し、免疫細胞の貪食能亢進・化学走性の亢進・炎症性サイトカインの調節・フリーラジカルの産生を行い、微生物を死滅させる^{1)~3), 5) 15)}。また、SP-Dには凝集を起こしてマクロファージに

よる食食を容易にする働きがある^{2)~4), 16)}。肺以外の臓器での感染防御に関しては、女性の生殖器に存在するSP-Dがクラミジア感染を抑制する¹⁷⁾との報告や、*in vitro*の実験系でE. coliの成長を細胞膜の透過性を亢進させることで抑制するとの報告もある⁵⁾。また、SP-Dには肺胞マクロファージのアポトーシスを抑制する働きをもつことも、マウスを用いた実験から明らかにされている^{18) 19)}。

このSP-Dが腎臓にも存在することが報告されたが、報告により相違点があり腎組織中のSP-Dの局在部位は異なっている^{6) 7)}。その局在は、果たしてヒトに特有で種特異性があるのか、また存在するならば健常者と腎疾患とでは変化が認められるのか、腎に認めるSP-Dは生体防御の面から考えるとどのような働きを担っているのかなど不明な点が多く、またそれらについての検討はなされていない。ヒト以外での腎におけるSP-Dの検討も、これまでなされていない。

われわれは、肺サーファクタントの分野ですでに確立されているSP-D ノックアウトマウス・トランスジェニックマウス・肺にヒトFGF-7を遺伝子導入させ、その後ドキシサイクリン投与することによりSP-Dの血中濃度を高めたマウスを用いてそれぞれを対比し、ヒトの腎で認められるSP-Dについて考察を試みた。

ヒトの腎でSP-Dは、遠位尿細管に特徴的に発現を認めた。SP-Dは正常腎組織の遠位尿細管に認められ、また臨床像の異なる原発性腎炎にも同様に認められた。尿細管障害の程度やネフローゼ症候群の有無・腎機能障害の程度による差も認められず、SP-Dは遠位尿細管に恒常的に存在する成分と思われた。

一方、野生種のマウスでSP-Dは、肺には認められたが腎では認められなかった。マウスの腎にはSP-DのmRNA発現はみられるが、蛋白としては認められない可能性が考えられたため、SP-D遺伝子を強発現させ、肺でのSP-D蛋白が強発現するマウスの腎を観察したが、SP-D蛋白の発現は認められなかった。ヒトと異なりマウスの腎にはSP-Dは存在せず、種特異性があると考えられ

た。正常マウスでは、尿路感染症の原因となりうる膀胱尿管逆流現象が、ヒトとは異なり日常的に起こっているが、尿路感染症を起こすことはまれである。マウスの腎にはSP-Dに変わる機能が存在している可能性も考えられ、興味深い。一般論として、病原因子はそれぞれの因子の受容体をもつなど、臓器特異性との関連が強い。ヒトとマウスの腎の間には、それに類似する種別間での差があり、マウスの腎ではSP-Dを必要としないのかもしれない。

マウスではヒトと異なり血清中にSP-Dは存在しないが、ヒトと同じように肺でのSP-Dを放出させ血清中のSP-D濃度を高めたマウスでは、糸球体にSP-Dの染色が認められた。Stahlmanらの報告⁶⁾やわれわれの健常者の検討では、ヒトの糸球体に染色は弱いSP-Dが認められた。この所見は、時間的な変化が考えられる剖検腎組織と腎生検組織という組織標本による違いや、小児例⁶⁾と成人例という組織の成熟度の違いによる可能性も考えられる。マウスの系でみられた染色性からは、細胞での発現というよりも、単に血中から糸球体に捕捉された結果であると推測される。これらのことが、報告により染色部位、特に糸球体での蛋白発現に差が認められた理由であると思われる。

遠位尿細管ではSP-Dの局在が確認されたが、腎の機能より大きく二つの機序が考えられた。血清中のSP-Dが糸球体で原尿と共に漏出し、遠位尿細管に再吸収される過程で内腔に沈着したとする考え方と、遠位尿細管細胞自身が産生しているとする考え方である。デコリンとSP-Dは*in vitro*で強く結合することが知られており⁹⁾、デコリンはTGF- β と結合しその働きを抑制することが報告されている¹⁰⁾。デコリンは腎でもメサンギウム細胞や尿細管に発現を認め、間質の炎症・線維化を抑制していると考えられている¹¹⁾。遠位尿細管で再吸収される過程で尿細管内腔に沈着していると仮定すると、デコリンと結合して染色部位が一致すると思われたが、免疫組織染色では全く一致していなかった。また、高度蛋白尿を呈し

ていた患者と健常者としてSP-Dが尿細管に同程度に染色されたことに矛盾すると考えられた。これまでの報告では、腎でのSP-DのmRNAの存在が確認されている⁷⁾。これらのことから、尿細管に認められるSP-Dが再吸収の結果である可能性は極めて低く、遠位尿細管細胞がSP-Dを産生している可能性が考えられる。その可能性を確かめるために、われわれは尿中へのSP-D排泄について測定感度10ng/ml以上のEIA法(ヤマサSP-Dキット, 東京都)で、健常者・ネフローゼ症候群患者・間質性肺炎患者の尿中のSP-D濃度測定も行ったが、尿中にSP-Dは検出できなかった(未発表データ)。

ヒトの肺以外の臓器では、涙腺・唾液腺・腎・食道の腺・胃壁細胞・皮脂汗腺・エクリン汗腺・女性器の腺細胞全般・精巣嚢などでSP-Dの蛋白発現を認め^{6)~8)}、腎・気管・精巣・唾液腺・前立腺・小腸・胎盤などでSP-DのmRNA発現を認めたと報告されている⁶⁾⁷⁾。蛋白として認められている部位の大部分は、外界からの微生物が侵入可能な臓器であった。今回の種々の腎生検組織を用いた検討では、SP-Dの染色は正常腎組織と比べいじりしい変化は認められず、遠位尿細管に染色が認められた。腎は解剖学的に考えても尿路を介して外界と接しており、肺と同様に外界の影響を直接受ける可能性が高いと思われる。しかし、尿道炎・膀胱炎・腎盂炎は日常に認める疾患であるが、腎実質での感染は稀である。腎実質への外界からの微生物の直接的な進入経路は尿路系を介することが考えられ、腎実質にもし細菌が進入した場合、最初の進入経路である遠位尿細管の免疫機構は腎実質の感染防御にとって重要である。このことにSP-Dは何らかの役割を担っている可能性が考えられる。尿路系の宿主側の防御因子として、①尿の流れによるウォッシュアウト、②尿が高浸透圧であること、③pH、④尿中酸性物質の存在、⑤Tamm-Horsfall ムコ蛋白の存在などがある。尿中にはTamm-Horsfall ムコ蛋白に代表されるさまざまなプロテオグリカンが存在する。これらは細菌をはじめさまざまな蛋白と容易に結

合し、尿路粘膜細胞への付着を阻害している。これらの存在を考えるとSP-Dは、腎泌尿器経路において細菌・ウィルスなど微生物の侵入に対する防御系であり、解剖学的に尿道口から最深部で腎実質から最も外界に近い位置にあり、恒常的に存在して腎実質を防御する最後の砦的な役割を果たしているのではないと思われる。しかし、ほとんどの場合種々の宿主防御系により阻止され、遠位尿細管にまで微生物が侵入することは稀であると考えられる。そのために、遠位尿細管はSP-Dが容易に機能する場とはならず、染色性に変化を認めなかったと考えられた。

尿細管細胞は何らかの腎障害因子が働くと活性化され、IL-6・TNF α ・IL-15などの様々なサイトカインを分泌する。SP-Dには、TNF α の作用を増強する機能があると報告されている²⁰⁾。サイトカインは、尿細管細胞自身をさらに活性化させマクロファージなどと関連し、ケモカインの産生を促進させる。これらの複雑に反応するネットワークの存在を考えると、恒常的に存在するSP-Dの意義はきわめて基本的な自然免疫としての役割をもつ因子とも考えられる。

結 論

SP-Dは、腎遠位尿細管に恒常的に存在する。その機能を考えると、生体防御において重要な役割を担っていると思われる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご協力を賜りました順天堂大学腎臓内科学講座の柴田 照美実験助手ほか皆様に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC: Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol*, 2003;

- 21: 547~578.
- 2) Crouch EC: Collectins and pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998; **19**: 177~201.
- 3) McCormack FX, Whitsett JA, The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest*, 2002; **109**: 707~712.
- 4) Erpenbeck VJ, Malherbe DC, Sommer S, *et al*: Surfactant protein D increases phagocytosis and aggregation of pollen-allergen starch granules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005; **288**: L692~698.
- 5) Wu H, Kuzmenko A, Wan S, *et al*: Surfactant protein A and D inhibit the growth of gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest*, 2003; **111**: 1589~1602.
- 6) Stahlman MT, Gray ME, Hull WM, *et al*: Immunolocalization of surfactant protein-D (SP-D) in human fetal, newborn, and adult tissues. *J Histochem Cytochem*, 2002; **50**: 651~660.
- 7) Madsen J, Kliem A, Tornøe I, *et al*: Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissue. *J Immunol*, 2000; **164**: 5866~5870.
- 8) Leth-Larsen R, Floridon C, Nielsen O, *et al*: Surfactant protein D in the female genital tract. *Mol Hum Reprod*, 2004; **10**: 149~154.
- 9) Nadesalingam J, Bernal AL, Dodds AW, *et al*: Identification and characterization of a novel interaction between pulmonary surfactant protein D and decorin. *J Biol Chem*, 2003; **278**: 25678~25687.
- 10) Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, *et al*: Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest*, 1990; **86**: 453~462.
- 11) Kuroda M, Sasamura H, Kobayashi E: Glomerular expression of biglycan and decorin and urinary levels of decorin in primary glomerular disease. *Clin Nephrol*, 2004; **61**: 7~16.
- 12) Korfhagen TR, Sheftelyevich V, Burhans MS, *et al*: Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis *in vivo*. *J Biol Chem*, 1998; **273**: 28438~28443.
- 13) Fisher JH, Sheftelyevich V, Ho YS, *et al*: Pulmonary-specific expression of SP-D corrects pulmonary lipid accumulation in SP-D gene-targeted mice. *J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000; **278**: L365~373.
- 14) Jay TW, Wei Lu, Whitsett JA : Conditional expression of fibroblast growth factor-7 in the developing and mature lung. *J Biol Chem*, 2000; **275**: 11858~11864.
- 15) Wright JR: Host defense functions of pulmonary surfactant. *Biol Neonate*, 2004; **85**: 326~332.
- 16) Ferguson JS, Voelker DR, McCormack FX: Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis Bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions Resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol*, 1999; **163**: 312~321.
- 17) Oberley RE, Goss KL, Ault KA, *et al*: Surfactant protein D is present in the human female reproductive tract and inhibits Chlamydia trachomatis infection. *Mol Hum Reprod*, 2004; **10**: 861~870.
- 18) Clark H, Palaniyar N, Strong P, *et al*: Surfactant protein D reduces alveolar macrophage apoptosis *in vivo*. *J Immunol*, 2002; **169**: 2892~2899.
- 19) Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, *et al*: Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells *in vivo* and *in vitro*: Calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol*, 2002; **169**: 3978~3986.

- 20) Bufler P, Schmidt B, Schikor D, *et al*: Surfactant protein A and D differently regulate the immune response to nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003 ; **28**: 249~252.

Summary

Localization of pulmonary surfactant protein D in kidney.

Objective : Pulmonary surfactant protein D (SP-D) is one of the collectins that plays an important role in host defense in the lung by binding to a variety of microbial carbohydrates. It has been previously reported that the presence of SP-D and SP-D mRNA is not restricted to a subset of cells in the lung, but is also expressed on mucosal surfaces of other organs. The objectives of the present study were to determine the localization pattern of SP-D in the kidney and clarify the difference in SP-D expression between human and mouse kidneys.

Methods : Renal biopsy tissues from patients with glomerulonephritides and normal human kidneys were stained immunohistochemically. The pulmonary and renal tissues of wild type, transgenic mice with over-expressed SP-D and transgenic mice with increased SP-D in the plasma were also stained. The transgenic mice which over-expressed fibroblast growth factor-7 (FGF-7) in the lung by doxycycline treatment showed an increase of SP-D in the plasma.

Results : Consistent SP-D was observed in renal distal tubular epithelial cells (TEC), but seldom in glomeruli. The pattern and intensity of SP-D staining in normal human kidneys were similar to those in patients with glomerulonephritides. In contrast, SP-D was not detected in kidneys from normal and SP-D transgenic mice. In these conditional FGF-7 mice, SP-D staining was observed in glomeruli but was rarely observed in tubules.

Conclusions : The present study demonstrated that occasionally observed SP-D in human glomeruli might be a result of increased plasma SP-D. SP-D was synthesized in renal distal urinary TEC in humans although it was not observed in the mouse kidney. This SP-D synthesis in TEC was not altered in patients with glomerulonephritides. It appears that SP-D constantly present in the urinary tubules may play an important role in host defense in the kidney.

Key words : pulmonary surfactant protein D (SP-D), collectin, innate immunity, renal distal tubule