

- neutrophil Cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in MPO-ANCA-associated glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 53 : 242-252, 2000
- 8) Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, et al : Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25 : 381-387, 2001
 - 9) 鈴木和男 : 血管炎発症機構の解析研究-活性化好中球の関与. *医学のあゆみ* 206 : 133-139, 2003
 - 10) 鈴木和男 : ANCA関連血管炎の発症機序-活性化好中球の関与. *リウマチ科* 29 : 228-236, 2003
 - 11) Murata H, Iijima H, Naoe S, et al : The pathogenesis of experimental arteritis induced by *Candida* alkali-extract in mice. *Jpn J Exp Med* 57 : 305-313, 1987
 - 12) Kinjoh K, Kyogoku M, Good RA : Genetic selection for crescent formation yields mouse strain with rapidly progressive glomerulonephritis and small vessel vasculitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 3413-3417, 1993
 - 13) Cherry Engelman RW, Wang BY, Kinjoh K, et al : Calorie restriction delays the crescentic glomerulonephritis of SCG/Kj mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 218 : 218-222, 1998
 - 14) Ishida-Okawara A, Ito Ihara T, Muso E, et al : Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/kj mice. *Nephrol Dial Transplant* (in press)
 - 15) Jayne DR, Chapel H, Adu D, et al : Intravenous immunoglobulin for ANCA-associated systemic vasculitis with persistent disease activity. *QJM* 93 : 433-439, 2000
 - 16) Jayne DR : Update on the European Vasculitis Study Group trials. *Curr Opin Rheumatol* 13 : 48-55 (Review), 2001
 - 17) Ito-Ihara T, Nogaki F, Ono T, et al : Intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment of MPO-ANCA-related microscopic polyangiitis. *Cleveland Clin J Med Suppl* 69 : S11-188, 2002



話題

血管炎症候群と 免疫グロブリン大量療法*

武曾恵理** 猪原登志子***

Key Words: vasculitis syndrome, ANCA, TNF- α , IVIg, rapidly progressive glomerulonephritis

はじめに

血管炎症候群とは血管壁の炎症を起こすいろいろな病態を総称している。これらは1994年、Chapel Hill Consensus Conference on the Nomenclature of Systemic Vasculitis(表1)¹⁾で侵される血管の大きさにより分類された。このうち、小動脈に起こる血管炎でWegener肉芽腫症(Wegener's granulomatosis; WG), 顕微鏡的多発血管炎(microscopic polyangiitis; MPA), アレルギー性肉芽腫性血管炎(Churg-Strauss 症候群; CSS)には1982年にDaviesらによって見出された抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil-cytoplasmic antibody; ANCA)の関連が確かめられており²⁾, とくにWGには好中球細胞質内酵素のなかでもproteinase 3 (PR3)に対する抗体, MPA, CSSにはmyeloperoxidase (MPO)に対する抗体が認められることが広く知られている。近年, これらのANCA関連血管炎は急速に進行する腎炎, 肺出血など重篤な症状を呈して, 老年者に多く発症してきており, その予後の不良性とあわせて治療の指針が議論されている。従来行われてきているステロイドをはじめとする免疫抑制療法の限界や副作用も問題となり, その欠点を補う治療法として, 従来中血管を侵す代表的な血管炎である川崎病に特異的にその効果が確かめられている, 経静脈性免疫グロブリン大量(IVIg)療法の有効性

が注目されるようになった。本稿では, 血管炎症候群に対する本治療の使用状況とその効果発現機序, さらにその問題点と限界についても, 最近の報告を含め述べる。

血管炎症候群に対するIVIg治療の臨床

最初にIVIg療法の有効性が確立された疾患は突発性血小板減少性紫斑病である。それ以来現在までいくつかの自己免疫疾患や炎症性疾患に対して本法の比較試験が試みられ, 優位性が確認されて実際に保険治療で認められているものが増えてきている(表2)³⁾。

1. 川崎病に対するIVIg療法

川崎病は4歳以下の乳幼児に発症する全身血管炎で, 表1に分類するごとく中・小動脈を巻き込むがとくに, 急性期の冠動脈の拡張や動脈瘤形成が後に狭窄や閉塞病変へと進行し, 心筋梗塞や突然死をきたす。発症率は年間8,000人にのぼる。その治療には, 抗生物質や, 副腎皮質ステロイドが用いられたが, 1983年に古庄らがIVIgの大量療法により冠動脈病変の発生を抑制することを報告した⁴⁾。日本では400mg/kg/day, 5日間の治療がより効果的であることがMorikawaらによって報告された⁵⁾。米国では1991年にNewburger JWらによって2g単回投与の効果が確認され⁶⁾, さらにDurongpisitkulらによってメタアナリシスが行われて, この治療法と少量のアスピリン(80mg/kg

* Vasculitis syndrome and intravenous immunoglobulin therapy.

** Eri MUSO, M.D.: 財団法人田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科(〒530-8480 大阪市北区扇町2-4-20); Division of Nephrology and Dialysis, Department of Medicine, Kitano Hospital The Tazuke Kofukai Medical Research Institute, Osaka 530-8480, JAPAN

*** Toshiko IHARA, M.D.: 京都大学大学院医学研究科循環病態学腎臓部門

表1 血管炎の分類

大血管の血管炎	巨細胞動脈炎(側頭動脈炎)	大動脈とその主要な分枝の肉芽腫性血管炎で、頸動脈の頭蓋外分枝に高頻度である。しばしば側頭動脈に病変を認める。通常、発症年齢は50歳以上でリウマチ性多発筋痛症と関連がある。
中血管の血管炎	高安動脈炎	大動脈とその主要な分枝の肉芽腫性炎症。通常50歳以下に発症。
	結節性多発動脈炎(古典的PN)	小動脈の壊死性炎症で、糸球体腎炎や細動脈、毛細血管、細静脈に炎症を認めない。
小血管の血管炎	川崎病	粘膜皮膚リンパ節の病変を伴う大、中、小動脈の炎症。冠動脈がしばしば侵される。大動脈や静脈にも病変を伴うことがある。通常、小児の疾患である。
	Wegener肉芽腫症	気道の肉芽腫性炎症と小～中血管の壊死性炎症を認めるもの(細動脈、毛細血管、細静脈を含む)。通常、壊死性糸球体腎炎を伴う。
	アレルギー性肉芽腫性血管炎(Churg-Strauss症候群)	気道の肉芽腫性炎症で好酸球を多く含む。また、中小血管に壊死性炎症を認める。気管支喘息や好酸球増多症を伴う。
	顕微鏡的多発血管炎	壊死性血管炎で免疫複合体の沈着を認めない。細動脈、毛細血管、細静脈などの小血管に変化を認める。中動脈の炎症を伴っても、伴わなくてもよい。壊死性糸球体腎炎の頻度が高く、肺毛細血管炎もしばしば伴う。
	Henoch-Schönlein紫斑病	IgAを主体とする免疫複合体の沈着を認める小血管の血管炎。通常は皮膚、腸管、腎糸球体が障害され、関節炎を伴う。
	特発性クリオグロブリン血症	血清中にクリオグロブリンを認め、血管壁に免疫複合体の沈着を認める血管炎。小血管が主に障害を受け、皮膚と腎糸球体がしばしば侵される。
	皮膚白血球破砕性血管炎	全身性血管炎や糸球体腎炎を伴わない、皮膚に限局した白血球破砕性血管炎。

表2 効果が比較試験で証明されているIVIgの自己免疫疾患および炎症性疾患の一覧

特発性血小板減少性紫斑病
ギランバレー症候群
慢性炎症性脱髄性多発神経根症(CIDP)
重症筋無力症
多発性運動神経疾患
ステロイド抵抗性皮膚筋炎
川崎病
GVHD予防
ANCA関連血管炎*
自己免疫性ぶどう膜炎*
多発性硬化症

*: 予備的試験で効果が報告されており比較試験が現在進行中

以下)との併用がもっとも冠動脈瘤の発生率が低いことが確認された(図1)⁷⁾。

2. ANCA関連血管炎に対するIVIgの効果

(1)ANCA関連血管炎の分類と最近の発生の現状
わが国で1996年から2000年の間に登録された1,500人の急速進行性糸球体腎炎症例のうちANCAの測定が可能であった593人を検討したところ、71%の症例でANCAが陽性であったが、欧米のPR3-ANCA陽性者優位と異なり、そのうち62%で

はMPO-ANCA単独陽性で、PR3単独陽性者は4%にすぎなかった(図2)⁸⁾

わが国に多いMPAはWGに比較しその発症年齢が高いことも知られており、最近では阪神・淡路大震災の直後から1年後にかけて、神戸地区で、高齢者に気道、呼吸器障害を合併した症例の多発が報告された⁹⁾。前述のごとく、従来の免疫抑制療法では、とくに高齢者では、副作用である感染症や、各種血管合併症により施行が阻まれたり、生命予後を悪くしたりしているのが現状である。一方、本症は発症初期の6か月間にその生命および腎の機能を落とす例が多く、その後安定を得たものは比較的緩徐な経過をたどることもわかっており(図3)⁹⁾¹⁰⁾、とくに発症初期に、安全で効率がよく患者の免疫能を落とさない新たな治療が期待されてきた。

(2)急速進行性腎炎を伴うMPO-ANCA関連血管炎(MPA)へのIVIg療法の臨床的効果¹¹⁾

われわれは15人のMPA症例に対し、IVIg療法を従来の免疫抑制療法を行う前に施行した。図4のプロトコールで血管炎活動性はANCA関連血管炎の臓器多発性を考慮したBirmingham Vascu-

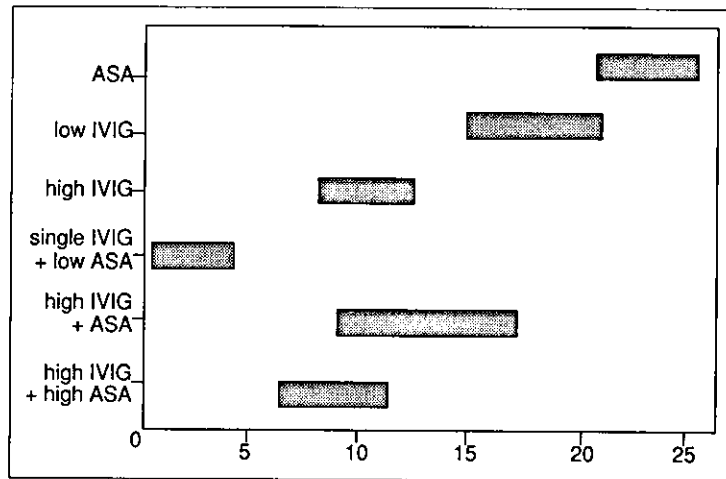


図1 川崎病の治療法別冠動脈瘤発生頻度(30病日)
 ASA：アスピリン単独治療, low IVIG：総量1g/kg以下の量, high IVIG：総量1g/kgを超える量, single IVIG：1g/kgを超える量の単回投与, low ASA：アスピリン80mg/kg以下の量, high ASA：アスピリン80mg/kgを超える量

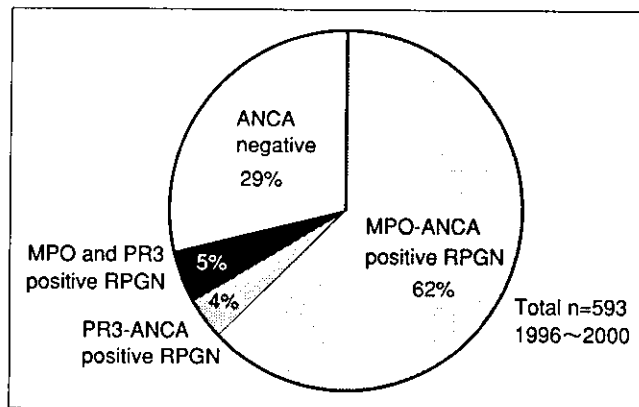


図2 わが国の急速進行性糸球体腎炎におけるANCA陽性率
 (文献⁸⁾より引用改変)

ritis Activity Score (BVAS) (表3)¹²⁾を用いて評価した。さらにIVIg投与前後の腎機能の変化には1/クレアチニン(Cre)の単位時間当たりの変化率で評価した。15例の患者の年齢は72±3歳と高齢で、治療前の平均Cre値は4.1mg/dlと腎不全状態のものが多く、腎生検でも10名に50%以上の糸球体に活動性半月体形成を認めた。MPO-ANCA値も389±115EUと高値でCRP, WBCも高値を示し、炎症所見が強いことを示していた。

5日間のIVIg治療後約1週間の時点で、BVAS, CRP, WBCの有意な低下を認めた。腎機能低下を評価するための1/Creの変化率も増加し、有意な

改善が認められた(P<0.05)。また全身状態も12人の患者で著明な改善を示した。一方、IVIgによる各種炎症性サイトカインの血中における変動も検討したが、TNF-αは有意に低下した(表4)。

後療法として、比較的低容量の経口ステロイド療法を行い、経口CsAの投与は6例にのみ使用した。3か月の時点で再発は1例、腎死が1例あったが死亡例はなく、また重篤な感染症の発症もみっていない。典型的な1例の経過を図に示す(図5)。

以上の所見はMPAに対するIVIg療法の急性期治療としての有効性と安全性および予後改善性を示唆するもので、その機序の一部は炎症性サイトカ

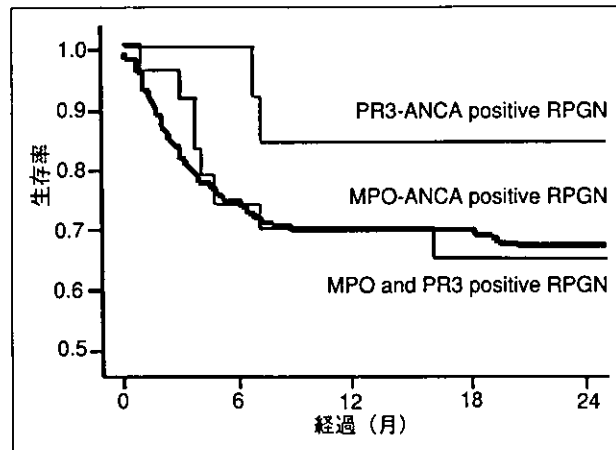


図3 ANCA関連血管炎に伴う急速進行性糸球体腎炎の予後
(文献⁸⁾より引用改変)

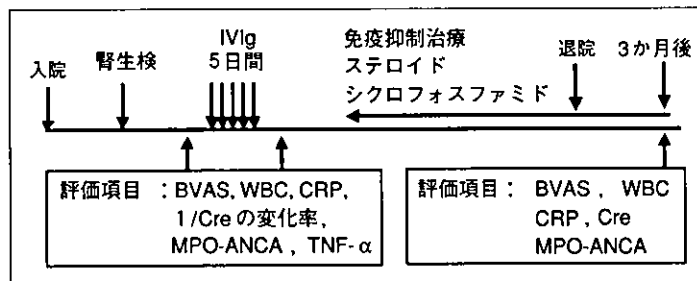


図4 IVIg治療プロトコール
IVIg : intravenous immunoglobulin (400mg/kg/day)

インの発現抑制を介していることが考えられた。

血管炎症候群に対するIVIg療法の効果発現機序の考察

一般にIVIg療法の免疫修飾作用の発現には表5のような機序が考えられている³⁾。これらは血管炎症候群にもあてはまる機序であり、ANCA関連血管炎においてもさまざまな検証がなされている。

1. Fcレセプター (FcR) を介する機序

血管炎における効果についてFcレセプターが関与していることは、川崎病でFcを取り去ったF(ab')₂部分のみの製剤では、効果が低いことから推測される。一方、*in vitro*でANCAによって誘導された好中球の活性をFcをブロックするモノクロナル抗体で抑制したという報告がなされており、これはIVIg療法を模した系であると考えられる¹³⁾。また、最近のモデルマウスを用いた

報告でITPではIVIgによって抑制性FcレセプターであるFc γ RIIBの発現を促進することで、その効果を発揮していることも示された¹⁴⁾。この系の血管炎での証拠はまだない。

2. 抗炎症作用

IVIgの急速な抗炎症作用の一部には補体膜攻撃成分 (membrane attack complex) であるC5-C9の減少がかかわることが推測されるが、これはIgが直接活性化補体成分であるC3やC4b成分に結合してその作用を止めることによる¹⁵⁾。免疫複合体を介する病変への効果では、その補体成分へのIgの結合が、ICの沈着を防ぐ機序が考えられる。しかし、MPAでは、ICを介さないpauci-immune型の免疫反応が中心であるため、この機序の関与には議論がある。

一方、われわれのMPAに対する効果においても認められたように、炎症性サイトカインのIVIg

表3 Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS)

1. 全身症状	3 (最高)	5. 肺炎所見	6 (最高)
所見なし	[]0	所見なし	[]0
全身倦怠	[]1	呼吸困難または喘鳴	[]2
筋痛	[]1	結節または線維化	[]2
関節痛・関節炎	[]1	胸水/胸膜炎	[]4
発熱(<38.5℃)	[]1	肺浸潤像	[]4
発熱(>38.5℃)	[]2	咯血/肺出血	[]4
1か月以内の体重減少(1~2kg)	[]2	大量肺出血	[]6
1か月以内の体重減少(>2kg)	[]3	6. 心血管所見	6 (最高)
2. 皮膚症状	6 (最高)	所見なし	[]0
所見なし	[]0	心雑音	[]2
梗塞	[]2	新規の脈欠損	[]4
紫斑	[]2	大動脈閉鎖不全	[]4
ほかの皮膚血管炎	[]2	心膜炎	[]2
潰瘍	[]4	新規の心筋梗塞	[]6
壊疽	[]6	心不全/心筋症	[]6
多発性指壊疽	[]6	7. 消化器, 腹部症状	9 (最高)
3. 粘膜/眼症状	6 (最高)	所見なし	[]0
所見なし	[]0	腹痛	[]3
口腔潰瘍	[]1	血性下痢	[]6
陰部潰瘍	[]1	胆嚢穿孔	[]9
結膜炎	[]1	腸硬塞	[]9
強膜炎	[]2	脾炎	[]9
ブドウ膜炎	[]6	8. 腎所見	12 (最高)
網膜浸出性病変	[]6	所見なし	[]0
網膜出血	[]6	高血圧(拡張期圧>90mmHg)	[]4
4. 耳鼻咽喉所見	6 (最高)	蛋白尿(>1+または>0.2g/24h)	[]4
所見なし	[]0	血尿(>1+または>10RBC/ml)	[]8
鼻汁/鼻閉	[]2	クレアチニン(1.41~2.82mg/dl)	[]8
副鼻腔炎	[]2	クレアチニン(2.83~5.44mg/dl)	[]10
鼻出血	[]4	クレアチニン(>5.46mg/dl)	[]12
痂皮形成	[]4	クレアチニンの上昇>10%	[]12
耳漏	[]4	9. 神経症状	9 (最高)
中耳炎	[]4	所見なし	[]0
新規の聾	[]6	混迷/痴呆	[]3
嗄声/喉頭炎	[]2	痙攣	[]9
顎下腺炎	[]6	卒中	[]9
		脊髄症状	[]9
		末梢神経症状	[]6
		多発単運動神経炎	[]9
		合計最高値	63

療法後の減少は、いろいろな血管炎で報告されている。各種の*in vitro*の系では活性化された抹消血単核球、マクロファージからのTNF- α やIL-1の分泌の抑制作用が知られており、またIL-1阻害作用のあるIL-1raやsIL-1rIIおよびIL-8の翻訳や分泌を刺激することも報告されている¹⁶⁾。TNF- α はANCA関連血管炎候群において、好中球のブライミングに重要であり、これらの好中球はapoptosis

表4 IVIg療法前後での血管炎の活動性パラメーターと血漿サイトカインの変動

	前	後	P
BVAS	21 \pm 1	17.1 \pm 1.1	<0.0001
CRP(mg/dl)	9.4 \pm 1.4mg	5.8 \pm 1.3	<0.001
WBC(/ μ l)	9,900 \pm 608	7,787 \pm 764	<0.001
TNF- α (pg/ml)	3.97 \pm 2.73	2.16 \pm 1.68	0.0156

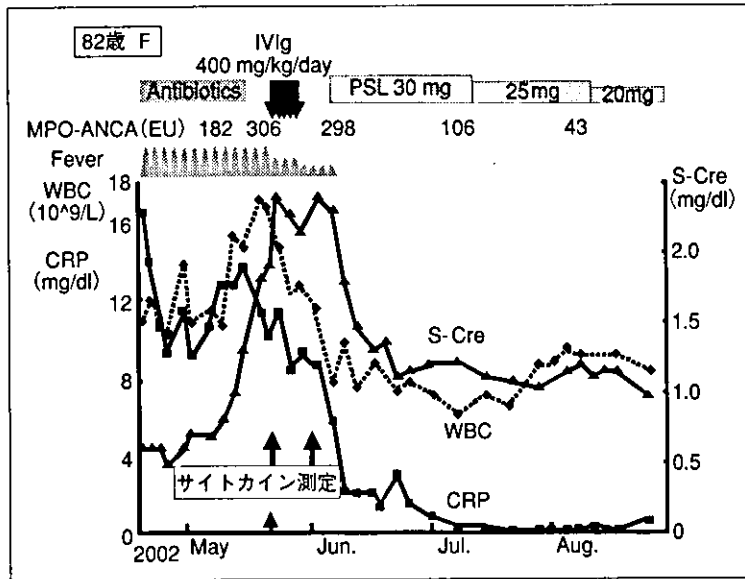


図5 82歳女性症例の経過

表5 IVIgの免疫制御作用

- Fcレセプターへの作用
 - マクロファージとエフェクター細胞におけるFcレセプターの阻害
 - 抗体依存性cytotoxicityの誘導
 - 抑制性FcγレセプターIIbの誘導
- 抗炎症作用
 - 補体を介する組織障害の軽減
 - 免疫複合体を介する炎症の軽減
 - 抗炎症性サイトカインの誘導
 - 内皮細胞活性化の抑制
 - 微生物毒素の中和
 - ステロイド使用量の減少作用
- B cellおよび抗体への作用
 - 急性骨髄 B cell repertoiresの制御
 - Fcγレセプターを介する抑制シグナル伝達
 - 抗体産生の選択的抑制および亢進
 - 抗イディオタイプ抗体による血中自己抗体の中和
- T cellに対する作用
 - ヘルパー T cellからのサイトカイン産生の制御
 - T cell スーパー抗原の中和
- 細胞増殖への作用
 - リンパ球増殖抑制作用
 - アポトーシスの制御

に陥りやすく、マクロファージにより貪食されるが、これらからさらに向炎症性サイトカインの放出が起こり、慢性炎症がひき起こされることが報告されている¹⁷⁾。したがって、その低下は疾患活動性抑制において重要と考えられた。

3. T cellへの作用

T cellのサブタイプの平衡の偏りは各種の自己免疫疾患や血管炎で認められており、たとえばCSSではTh2優位、WGについてはTh1の優位性がそれぞれ報告されている¹⁸⁾。IVIgがこれらの偏ったTh1/2平衡を正常化する可能性が報告されているが、血管炎に関しては、動物モデルにおける効果が確

かめられている程度であり今後の課題である。

また細菌性のsuperantigenによるT cellへの刺激が川崎病や、WGで確認されている。これらの機序にはIVIgに含まれる細菌性superantigenの中和抗体によるものや、T cellレセプターへの結合阻止作用によることが考えられている。

4. B cellおよび自己抗体idiotypeネットワークへの作用

ANCA関連血管炎においては、特殊抗体であるANCAのB cellによる産生が病態発現、活動性にかかわっており、これをIVIgが制御することで、疾患活動性が抑制されている可能性がある。B cellの活性化や自己抗体産生に及ぼすIVIgの影響については、*in vitro*の系ではB cell FcγRIIへのIVIgの結合により抗体産生を抑制した報告がある¹⁹⁾。

一方、この分野でより重要視されているのはそのvariable regionであるF(ab')₂に依存している系で、IVIg F(ab')₂成分が、固着化された抗原へのANCAの結合を抑制した報告などから、ANCAには多くの正常人のIgが認識する共通のidiotypeが存在することが示唆される。実際、PR3-ANCA、MPO-ANCAにはそれぞれ、多くのヒトのIgが認識する共通のidiotypeが知られており、それらのモノクロナル抗体はANCAの抗原への結合を阻止することも報告されている。また活動期や、寛解期の患者血清において、血清中のANCAと抗idiotype抗体レベルとの間に逆相関があったことも報告されており²⁰⁾、実際にIVIg療法の効果発現にどれだけこれらのidiotypeを介する系が効いているのかは不明であるが、将来のより特異的なIVIg療法にはこれらのモノクロナル抗体の含有も視野に入れるべきであろう。

IVIgの腎毒性

従来、高用量のIVIg療法を行った後に、急性腎不全が発症した例が報告されている。これらの報告では腎障害は大量の蛋白を、腎機能が障害されている患者に投与することで起こっており、その過敏反応によるものとは考えられにくい。

一方、IgGの製剤内での凝固を防ぐため、一部の製剤には二糖類のsucroseが含まれているが、これが高浸透圧血症をひき起こすことが報告されている。プラセボとの比較試験で、sucrose含

有例では17人中4人に投与2~3週後にCreの上昇をきたしているが、これらはももとのGFRが40ml/minであった²¹⁾。これらのことを考えると、腎機能障害のつよいANCA血管炎にはsucroseを含まない製剤を用いるか、量を減らして、時間をかけて投与することがすすめられる。

おわりに

高齢化に伴い、急増しているANCA関連血管炎の治療に、IVIgをとくにその発症初期に導入療法として施行することで、従来の免疫抑制療法の弊害である、感染症や治療抵抗性を改善し得ると考えられるが、その作用機序が完全に明らかではないこと、医療経済上高価であること、厳重なプラセボとの比較試験のないことなど、問題も多い。早急な比較試験の開始と、その機序の解明に向けた取組みが必要である。

文 献

- 1) Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 187.
- 2) Davies DJ, Moran JE, Niall JF, et al. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 285: 606.
- 3) Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2001; 345: 747.
- 4) 古庄巻史, 佐藤克子, 添田 健. 川崎病におけるγグロブリンの大量点滴療法. 基礎と臨床 1983; 17: 659.
- 5) Morikawa Y, Ohashi Y, Harada K, et al. A multicenter, randomized, controlled trial of intravenous gamma globulin therapy in children with acute Kawasaki disease. *Acta Paediatr Jpn* 1994; 36: 347.
- 6) Newburger JW, Takahashi M, Beiser AS, et al. A single intravenous infusion of gamma globulin as compared with four infusions in the treatment of acute Kawasaki syndrome. *N Engl J Med* 1991; 324: 1633.
- 7) Durongpisitkul K, Gururaj VJ, Park JM, et al. The

- prevention of coronary artery aneurysm in Kawasaki disease : a meta-analysis on the efficacy of aspirin and immunoglobulin treatment. *Pediatrics* 1995 ; 96 : 1057.
- 8) 小山哲夫, 堺 秀人, 黒川 清, ほか. 急速進行性糸球体腎炎の治療指針. *日本腎臓学会誌* 2002 ; 44 : 55.
- 9) Yashiro M, Muso E, Itoh-Ihara T, et al. Significantly high regional morbidity of MPO-ANCA-related angitis and/or nephritis with respiratory tract involvement after the 1995 great earthquake in Kobe (Japan). *Am J Kidney Dis* 2000 ; 35 : 889.
- 10) Westman KW, Bygren PG, Olsson H, et al. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 1998 ; 9 : 842.
- 11) Ito-Ihara T, Nogaki F, Muso E, et al. Intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment of MPO-ANCA-related microscopic polyangiitis. *Cleve Clin J Med* 2002 ; 69 Suppl 2 : S II 13.
- 12) Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, et al. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 1994 ; 87 : 671.
- 13) Brooks CJ, King WJ, Radford DJ, et al. IL-1 beta production by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies : relevance to systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996 ; 106 : 273.
- 14) Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV, et al. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 2001 ; 291 : 484.
- 15) Basta M, Dalakas MC. High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest* 1994 ; 94 : 1729.
- 16) Ruiz de Souza V, Carreno MP, Kaveri SV, et al. Selective induction of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 in human monocytes by normal polyspecific IgG (intravenous immunoglobulin). *Eur J Immunol* 1995 ; 25 : 1267.
- 17) Harper L, Cockwell P, Adu D, et al. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int* 2001 ; 59 : 1729.
- 18) Csernok E, Trabandt A, Muller A, et al. Cytokine profiles in Wegener's granulomatosis : predominance of type 1 (Th1) in the granulomatous inflammation. *Arthritis Rheum* 1999 ; 42 : 742.
- 19) Kondo N, Kasahara K, Kameyama T, et al. Intravenous immunoglobulins suppress immunoglobulin productions by suppressing Ca(2+)-dependent signal transduction through Fc gamma receptors in B lymphocytes. *Scand J Immunol* 1994 ; 40 : 37.
- 20) Jayne DR, Esnault VL, Lockwood CM. ANCA anti-idiotypic antibodies and the treatment of systemic vasculitis with intravenous immunoglobulin. *J Autoimmun* 1993 ; 6 : 207.
- 21) Jayne DR, Chapel H, Adu D, et al. Intravenous immunoglobulin for ANCA-associated systemic vasculitis with persistent disease activity. *QJM* 2000 ; 93 : 433.

* * *

●一般演題3

透析患者における酸化ストレスマーカー,
チオレドキシン (TRX) と脂質について

糟野健司¹⁾・武曾恵理²⁾・小野孝彦³⁾・中村 肇¹⁾
 淀井芳子⁴⁾・淀井省三⁴⁾・糟野裕子⁵⁾・児玉直也⁶⁾
 東 義人⁵⁾・大伴裕美子⁵⁾・淀井淳司¹⁾

はじめに

動脈硬化に関連した種々の血管障害は、透析患者の主な死因の一つとされている。酸化ストレスと脂質異常は動脈硬化の主要な危険因子といわれている¹⁾。これまで透析患者は過酸化脂質が多いことが報告されているが、現在、酸化ストレスを定量するための有用なマーカーがないため酸化ストレスと脂質異常の間にはいまだ不明な点が多い。血中チオレドキシン (TRX) は酸化ストレスを定量するマーカーの一つとして知られており^{2,3)}、血中TRX濃度はリウマチ、C型肝炎、HIV、悪性疾患、火傷、糖尿病、心不全、心筋梗塞などで上昇し、疾患の重症度に比例する^{3~11)}。今回われわれは、血液透析患者は血中TRX濃度が著明に高く、血中TRX濃度はHDLコレステロール値と負の相関を示すことを報告する。

1 方 法

対象は京都大学医学部付属病院、日本赤十字社赤和歌山医療センター、淀井病院(大阪)および、児玉病院(和歌山)の患者で、血中TRX異常値をきたす疾患を除いた22例の慢性血液透析(HD)および20例の腹膜透析(PD)患者、218例の保存期腎不全患者および、18例の健康ボラン

ティア(正常人)を対象として、各群の血中TRX濃度を測定し比較検討した。HD患者は男性18例、女性4例、29~78歳(平均 54.0 ± 10.3 歳)、透析歴0~31.2年(平均 11.2 ± 9.4 年)であり、PD患者は男性11例、女性9例、29~79歳(平均 53.8 ± 11.0 歳)、透析歴0.83~17.0年(平均 3.8 ± 5.2 年)であった。

2 結 果

1) 透析患者の血中TRX上昇とHDL

血中TRX濃度はHD患者群(211.1 ± 48.4 ng/mL)、PD患者群(90 ± 6.6 ng/mL)で保存期腎不全(22.6 ± 22.2 ng/mL)、正常人(11.8 ± 6.6 ng/mL)に比べ著明に上昇していた(図1)。この血中TRX濃度上昇の程度はPD患者よりもHD患者のほうが大きかった。透析患者の血中TRX濃度と年齢、性別、透析歴の期間、原疾患、透析膜の種類の間には有意差がなかった。

酸化ストレスが動脈硬化発症と関係しているとの報告から、われわれは血中TRX濃度と総コレステロール、中性脂肪、HDL、LDLを含む臨床データの関係を調査した。HD患者の血中TRX濃度は、血清HDL値(図2, $p = 0.022$)と負の相関を示した。

¹⁾京都大学ウイルス研究所感染防御研究室 ²⁾田附興風会北野病院腎臓内科 ³⁾静岡県立大学薬学部病態薬学
⁴⁾淀井病院内科 ⁵⁾日本赤十字社和歌山医療センター第2泌尿器科 ⁶⁾博文会児玉病院内科

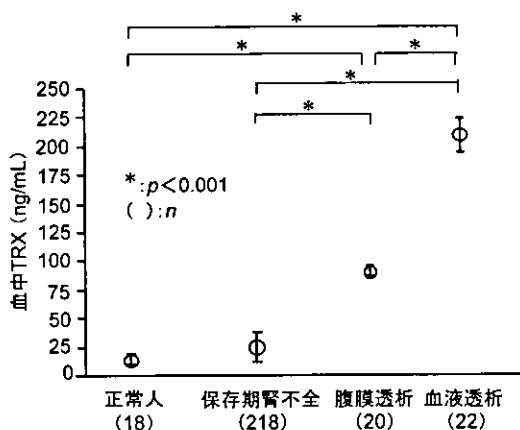


図1 透析患者の血中チオレドキシニン濃度
HIV, C型肝炎, リウマチなどのTRX高値を示す疾患は除外した。

2) 透析患者のTRX上昇のメカニズム

一般に分子量20kDa以下のタンパクは腎糸球体基底膜によって濾過される。TRXは分子量12kDaの球状小タンパク質であることから濾過される可能性が高いと考えられる。このことから、われわれは透析患者の血中TRXの増加のメカニズムが、腎不全によるTRXクリアランスの減少に起因するのか、もしくは酸化ストレスなどの刺激による産生過剰に起因するのかを調べた。PDおよびHDにおいて透析廃液中のTRX濃度からTRXクリアランスを算出し、正常人尿のTRXクリアランスと比較検討した。TRXクリアランスは正常人尿が 0.5 ± 0.09 mL/min, PDが 0.12 mL/min およびHDが 2.37 ± 1.0 mL/minであった。HDのTRXクリアランスは正常人尿より高く、1週間の透析治療で排泄されるTRXタンパク量の合計は、同一期間に正常人が尿中に排泄するTRXタンパク量よりも多いことがわかった。これらのことからHD患者における血中TRXの上昇はTRXクリアランスの低下によるものではなく、酸化ストレスなどの刺激による産生過剰に起因する可能性が示唆された。

3 考 察

今回、TRXの血中濃度が透析患者において著しく上昇しており、さらにPD患者よりHD患者

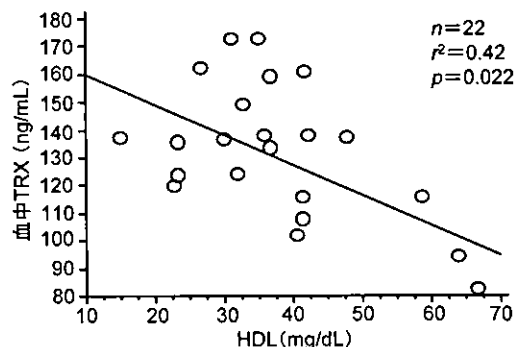


図2 血中HDLコレステロールと血中TRX濃度の相関

のほうが高値であったことを示した。この結果は、透析患者は抗酸化能力が低下しているという従来の報告と合致しており²⁾、HD療法はPD療法より強くレドックス調節の破綻を引き起こす可能性が高いことを示唆している。またHDとPD患者でさまざまなパラメーターを分析した結果、血清クレアチニン、血中尿素窒素値、血中カルシウム、リン、PTH、ヘモグロビン、血中タンパク質、CRPおよび β_2 ミクログロブリン値は、血中TRXと相関は認められず、HD患者の血中TRX高値の主な原因ではないことが示唆された。また、保存期腎不全患者と透析患者(PDおよびHD)の間でのTRX値の比較(図1)からは、腎疾患よりも透析療法自体が血中TRXの上昇に大きく寄与していることが示唆される。透析に至った原疾患別にみて、HD患者の血中TRXに有意差がなかったことはこれを裏付けている。

今回示したHD患者の血中TRXは平均値211.1 ng/mLと、これまで報告されている血中TRX高値を示す疾患(50~100 ng/mL)に比較し、非常に高い値であった^{3~11)}。HD患者におけるこのように高度な血中TRXの上昇には、複数のメカニズムが関与している可能性がある。透析廃液と尿中のTRX濃度からTRXクリアランスを算出した結果、HD患者の血中TRX上昇はTRX排泄量の低下による蓄積に起因するのではなく、酸化ストレスなどの刺激による産生過剰に起因す

る可能性が示唆された。

透析患者ではLDLコレステロール値は正常であるが、HDLが低値であることが報告されている¹⁾。また、HDL値の上昇に伴い透析患者の致死率が減少することから、透析患者の低HDL値は動脈硬化発症の重要な危険因子であるといわれている¹⁾。本研究でHD患者における血中TRX濃度は、HDL値と負の相関を示した。このことから、過剰の酸化ストレスを伴いレドックス調節が大きく破綻したHD患者では、動脈硬化発症の危険性が高い可能性が示唆された。

結 語

血液透析患者では酸化ストレスマーカーである血中TRXレベルが著明に高く、HDLコレステロールレベルと負の相関を示すことを報告した。酸化ストレスの多い患者はHDLが低く、動脈硬化発症の危険性が高い可能性が示唆された。

文 献

- 1) Prichard SS. Impact of dyslipidemia in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(9 Suppl 4):S315-20.
- 2) Kasuno K, Nakamura H, Ono T, Muso E, Yodoi J. Protective roles of thioredoxin, a redox-regulating protein, in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2003;64(4):1273-82.
- 3) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Mitsuyoshi H, Sakamoto Y, Okanoue T, Kashima K, Nakamura H, Yodoi J. Serum thioredoxin levels as an indicator of oxidative stress in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2000;33(4):616-22.
- 4) Yoshida S, Katoh T, Tetsuka T, Uno K, Matsui N, Okamoto T. Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF-alpha-induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts. *J Immunol* 1999;163(1):351-8.
- 5) Kato A, Odamaki M, Nakamura H, Yodoi J, Hishida A. Elevation of blood thioredoxin in hemodialysis patients with hepatitis C virus infection. *Kidney Int* 2003;63(6):2262-8.
- 6) Nakamura H, De Rosa S, Roederer M, Anderson MT, Dubs JG, Yodoi J, Holmgren A, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Elevation of plasma thioredoxin levels in HIV-infected individuals. *Int Immunol* 1996;8(4):603-11.
- 7) Miyazaki K, Noda N, Okada S, Hagiwara Y, Miyata M, Sakurabayashi I, Yamaguchi N, Sugimura T, Terada M, Wakasugi H. Elevated serum level of thioredoxin in patients with hepatocellular carcinoma. *Biotherapy* 1998;11(4):277-88.
- 8) Abdiu A, Nakamura H, Sahaf B, Yodoi J, Holmgren A, Rosen A. Thioredoxin blood level increases after severe burn injury. *Antioxid Redox Signal* 2000;2(4):707-16.
- 9) Kakisaka Y, Nakashima T, Sumida Y, Yoh T, Nakamura H, Yodoi J, Senmaru H. Elevation of serum thioredoxin levels in patients with type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 2002;34(3):160-4.
- 10) Kishimoto C, Shioji K, Nakamura H, Nakayama Y, Yodoi J, Sasayama S. Serum thioredoxin (TRX) levels in patients with heart failure. *Jpn Circ J* 2001;65(6):491-4.
- 11) Soejima H, Suefuji H, Miyamoto S, Kajiwarani I, Kojima S, Hokamaki J, Sakamoto T, Yoshimura M, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H. Increased plasma thioredoxin in patients with acute myocardial infarction. *Clin Cardiol* 2003;26(12):583-7.

Original Paper

Role of mesangial Factor V expression in crescent formation in rat experimental mesangioproliferative glomerulonephritis

Takahiko Ono,^{1*} Ning Liu,¹ Toshiaki Makino,² Fumiaki Nogaki,¹ Keiko Nomura,¹ Eri Muso,³ Fujio Shimizu,⁴ Gisho Honda² and Toru Kita¹

¹Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

²Department of Pharmacognosy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

³Division of Nephrology, Kitano Hospital, Tazuke-Kofukai Foundation Medical Research Institute, Osaka, Japan

⁴Department of Cell Biology, Institute of Nephrology, Niigata University Graduate School of Medicine, Niigata, Japan

*Correspondence to:

Takahiko Ono, MD, Clinical Pharmacology and Therapeutics, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka City 422-8526, Japan.

E-mail:

ono@u-shizuoka-ken.ac.jp

†TO moved from Kyoto University to the University of Shizuoka after this study.

Abstract

It has been suggested that fibrin deposition participates in the development of crescents in active glomerulonephritis (GN). In human IgA nephropathy, which is a common form of mesangioproliferative GN (MsPGN), crescent formation is occasionally observed in active disease, leading to end-stage renal failure. Factor V is a membrane-bound potent cofactor for the conversion of prothrombin to thrombin by Factor Xa. An *in vivo* study was conducted to clarify the contribution of local fibrin production to crescent formation in MsPGN through mesangial Factor V expression. Wistar rats were injected intravenously with rabbit anti-rat thymocyte serum. Three days after injection, mesangiolysis with intense mesangial Factor V expression was observed and immunoelectron microscopy revealed fibrin localization in mesangiolytic lesions, which had spread into the glomerular basement membrane adjacent to the destroyed mesangium, accompanied by clots in Bowman's space. Marked glomerular fibrin deposition, together with its deposition in Bowman's space and cellular crescent formation, was noted with mesangial proliferation on day 8. Specific bands for Factor V mRNA were also detected from isolated glomeruli. Fibrin deposition and cellular crescent formation were significantly suppressed by treatment with anti-Factor V antibody. These results suggest that local fibrin production, following mesangial Factor V expression, together with mesangiolysis that spreads to the adjacent glomerular basement membrane, plays a role in crescent formation in MsPGN.

Copyright © 2004 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: crescent formation; Factor V; fibrin production; mesangioproliferative glomerulonephritis; mesangiolysis; Wistar rat

Received: 13 February 2004

Revised: 27 April 2004

Accepted: 20 May 2004

Introduction

Anti-thymocyte serum (ATS)-induced rat nephritis is known as an experimental model for mesangioproliferative glomerulonephritis (MsPGN), referred to as Thy-1 nephritis [1]. Thy-1 nephritis is characterized by initial mesangiolysis, platelet and monocyte/macrophage infiltration, and subsequent mesangial cell proliferation and mesangial matrix expansion, similar to human MsPGN [2]. A major difference between Thy-1 nephritis and human MsPGN is the lack of immunoglobulin A deposition in the former, whereas such deposition is frequent in the latter in the context of IgA nephropathy. Recently, it was reported that the acute injury of mesangiolysis in Thy-1 nephritis was predominantly due to necrosis [3]. Although Thy-1 nephritis is basically an MsPGN, it is often accompanied by crescent formation. Parietal glomerular epithelial cells, phenotypically altered podocytes,

T cells, and macrophages have been reported to participate in the development of these crescents [4].

In addition, several studies have reported the observation of fibrin deposition in crescents, especially in human microscopic polyangiitis [5,6] and in experimental anti-glomerular basement membrane (GBM) nephritis [7]. We previously identified cross-linked fibrin in crescents in human MsPGN: IgA nephropathy and Henoch–Schönlein purpura nephritis [8]. Of the various coagulation factors, tissue factor is known to be the initiator in the extrinsic coagulation cascade, the major cascade in inflammatory diseases, and, thereafter, to convert Factor X to its active form Xa. On the other hand, Factor V in its active form (Va) serves as a membrane-bound cofactor for Factor Xa, which converts prothrombin to thrombin, causing immediate conversion of fibrinogen to fibrin. It has been reported that the rate of prothrombin activation by the prothrombinase complex, Xa/Va, is about 300 000-fold

higher than the rate of activation by Factor Xa alone [9,10]. Thus, Factor Va plays a key role at the end of the coagulation pathway. Factor V is expressed in various circulating and non-circulating cells, such as platelets [11,12], endothelial cells [13], monocytes [14], and hepatocytes [15]. In a previous *in vitro* study, we observed pro-coagulant activity in cultured mesangial cells via expression of Factor V [16]. Therefore, in the present study, to clarify the contribution of Factor V in crescent formation in MsPGN, the effects of anti-Factor V antibody were compared with those of prednisolone (PSL) in a rat experimental model.

Materials and methods

Experimental design

MsPGN was induced in 6-week-old male Wistar rats (Shimizu Laboratory Materials, Kyoto, Japan) by the intravenous injection of rabbit ATS, which was prepared as reported previously [1] and provided by Nippon Shinyaku Co (Kyoto, Japan). In this animal model, mesangial proliferation is known to peak on day 8 [1]. Therefore, 28 rats were injected intravenously with ATS (0.8 ml/kg BW) for a time-course study on crescent formation and were sacrificed on days 0, 1, 3, 5, and 8 ($N = 6$, respectively, except day 5: $N = 4$). According to the results of this study, another 30 rats were used for a comparative study and were divided into five experimental groups ($N = 6$, respectively): (i) the normal group, injected with normal rabbit serum; (ii) the disease control group, injected with ATS; (iii) and (iv) the anti-Factor V antibody low and high groups, injected with ATS and with rabbit antibody against human Factor V, RAHu/FV (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands), at 0.1 mg/kg (low dose) or 0.5 mg/kg (high dose) of IgG; and (v) the PSL group, injected with ATS and treated with PSL (2 mg/kg per day; Wako, Osaka, Japan). The doses of anti-Factor V antibody were determined by a preliminary experiment, using various concentrations from 0.1 to 1.0 mg/kg of IgG, which revealed that the dose of 0.5 mg/kg achieved a plateau in the suppressive effect. Urinary protein from 24-h urine samples was measured using the Biuret reaction. Rats were sacrificed on day 8, when serum and kidneys were collected. These experiments were conducted in accordance with the protocol approved by the Animal Care Committee of Kyoto University.

Histological analysis of renal tissue

Kidney tissues were fixed in Dubosque-Brazil solution and embedded in paraffin wax. Sections (4 μ m) were stained with haematoxylin and eosin (H&E) and periodic acid-Schiff (PAS). The crescent formation score was evaluated by a modified method of Floege *et al* [2] as follows: 20 glomerular cross-sections were graded according to the relative area of Bowman's

capsule occupied by the cellular crescents as 0, negative; 1, 1–25%; 2, 26–50%; 3, 51–75%; and 4, 76–100%, and then the averaged grade was calculated.

Immunohistological evaluation

Formalin-fixed and dewaxed sections were stained with an antibody against proliferating cell nuclear antigen (PCNA) using a DAKO EPOS anti-rat PCNA/HRP kit (DAKO, Carpinteria, CA, USA), and with an antibody against rat monocyte/macrophage antigen (ED-1; Chemicon, Temecula, CA, USA) using an ABC Elite-peroxidase staining kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Colour was then developed by incubation with an ImmunoPure Metal Enhanced DAB Substrate kit (Pierce, Rockford, IL, USA). The average of positively stained cell numbers in a glomerular cross-section was evaluated by counting the cells in 20 randomly selected glomeruli in each section.

Factor V deposition and OS-3-positive cells were detected on fresh frozen sections, fixed in acetone for 5 min. Fibrin was detected on formalin-fixed and dewaxed sections. These sections were stained by an indirect method as described previously [7], using each primary antibody as follows: Factor V, a sheep antibody against human Factor V (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada); OS-3-positive cells, a murine monoclonal antibody, OS-3, which was produced as reported previously [17] and is known to be reactive against parietal glomerular epithelial cells and transdifferentiated podocytes [4]; and fibrin, a goat antibody against rat fibrinogen (ICN, Aurora, OH, USA). Next, sections were incubated with appropriate biotinylated secondary IgG antibodies (Vector Laboratories). The sections were reacted with avidin-DH-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vector Laboratories) and then colour was developed. To evaluate Factor V expression, staining density was analysed by NIH Image version 1.61 [18]. The intensity of fibrin staining in the glomerular segments was scored on a scale from 0 to 3+ according to a previous method [19].

Double labelling of α -smooth muscle actin (α -SMA) and Factor V

Fresh frozen tissue sections from six rats in the disease control group were stained indirectly according to a previously reported modified method [20]. The sites of the antigen-antibody reaction were revealed by incubating sections with a sheep antibody against human Factor V, followed by biotinylated IgG as the secondary antibody. The preparations were washed twice in Tris-buffered saline (pH 7.4) and incubated with a monoclonal anti-human α -SMA (DAKO), rabbit anti-mouse immunoglobulins (DAKO), and mouse APAAP complex (DAKO). Colour was then developed by incubation with a DAB Substrate kit (Pierce) and a fast red dye (DAKO). Twenty glomeruli in each tissue section were evaluated.

RT-PCR for Factor V mRNA

For first-strand cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was incubated in a reaction mixture of 1 µl with 50 µmol of Oligo(dT)20 as primer (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). The reaction contained 15 units of THERMOSCRIPT RT (Life Technologies), 2 µl of 0.1 M dithiothreitol–10 mM dNTP mixture, and 40 units of RNase inhibitor (Life Technologies). The reaction was performed at 50 °C for 1 h. Subsequently, the reverse transcriptase was inactivated by heating the sample at 85 °C for 5 min. PCR was performed in 2 µl of 10× PCR buffer with 0.5 unit of Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan), containing 2 µl of each primer 5'-CTC TTC CTC ATC CAG ATC TC-3' (antisense) and 5'-TGA GCA TGA AGA GAA TAC GG-3' (sense) designed from published mouse Factor V sequences [21] or 5'-GAT TGT CAG CAA TGC ATC CTG-3' (antisense) and 5'-GAA GAG TGG GAG TTG CTG TTG-3' (sense) designed from mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [22], respectively. Amplification of the appropriate cDNA results in a 580 bp fragment for Factor V. The PCR product was separated in 2% agarose gels. Signals for Factor V were normalized in comparison with the signal for GAPDH.

Immunoelectron microscopy

Part of the biopsy specimen was treated according to the method of McLean and Nakane [23] and sectioned (6 µm) on a cryostat [24]. The sections were incubated with a goat antibody against rat fibrinogen (ICN) at 4 °C overnight. After washing, further incubation followed with biotinylated anti-goat IgG for 3 h. The sections were then reacted with avidin-DH-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vector Laboratories) for 3 h and colour was developed as described above. Sections were post-fixed in 2% osmic acid, embedded in Epon 812 (Oken Shoji), and ultrathin sections were cut. Observation was performed with a HITACHI 7100 electron microscope (Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Values are represented as means ± SE. The statistical significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) or Student's *t*-test, as appropriate. A difference of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Urinary findings

In this animal model, proteinuria peaked on the fourth day after the injection of ATS [25]. In disease control rats, the amount of urinary albumin on that day was significantly increased to 59 ± 15 mg/day compared with the low level of normal rats, and that in the

Table 1. Change of proteinuria after RAHu/FV injection

Group	Urinary protein, mg/day (mean ± SE)
Normal	14 ± 2
Disease control	59 ± 15
RAHu/FV (0.5 mg/kg of IgG)	23 ± 4*

* $p < 0.05$ versus disease control.

RAHu/FV-injected group at a high dose of 0.5 mg/kg of IgG was significantly decreased to 40% of that in the disease control group ($p < 0.05$) (Table 1).

Histological evaluation

Nuclear chromatin condensation was observed on day 1. Next, on day 3, we observed chromatin fragmentation, together with prominent mesangiolytic, segmentally proliferating mesangial cells, glomerular basement membrane breaks, and fibrin precipitation in Bowman's space. On day 5, marked mesangial cell proliferation, crescent formation, and mesangial matrix widening were observed until day 8. Figure 1 shows the significant increase in crescent formation after ATS injection, compared with the normal group. The ATS injection significantly aggravated cellular crescent formation, which was suppressed in both the anti-Factor V antibody and PSL groups (Figure 2). The crescent scores, in both the high dose of anti-Factor V antibody and PSL groups, were significantly improved on day 8 (crescent score: normal, 0.00 ± 0.00 ; control, 1.03 ± 0.21 ; low dose, 0.59 ± 0.21 ; and high dose of RAHu/FV, 0.49 ± 0.05 , $p < 0.05$ versus control; PSL, 0.49 ± 0.05 , $p < 0.05$ versus control).

PCNA- and ED-1-positive cells were often observed in glomeruli, and in crescents, respectively, in the disease control group (Figures 3B and 3D). The monoclonal antibody, OS-3, was used to detect podocytes with phenotypic changes. OS-3-positive cells were

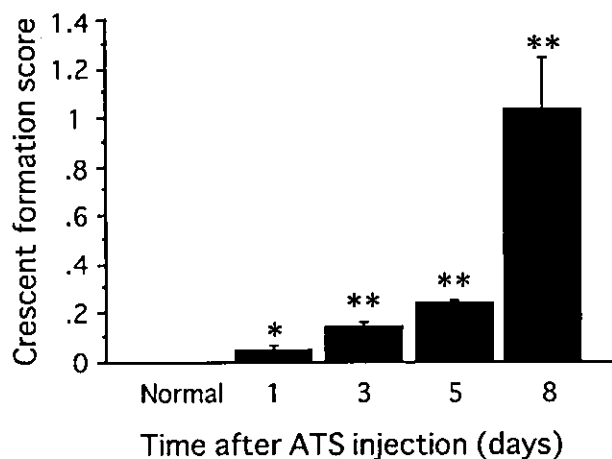


Figure 1. Time course of cellular crescent formation in ATS-induced nephritis. Crescents were evaluated using PAS staining. Values are from three rats at each time point. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus normal. $N = 6$ rats per group, except day 5: $N = 4$

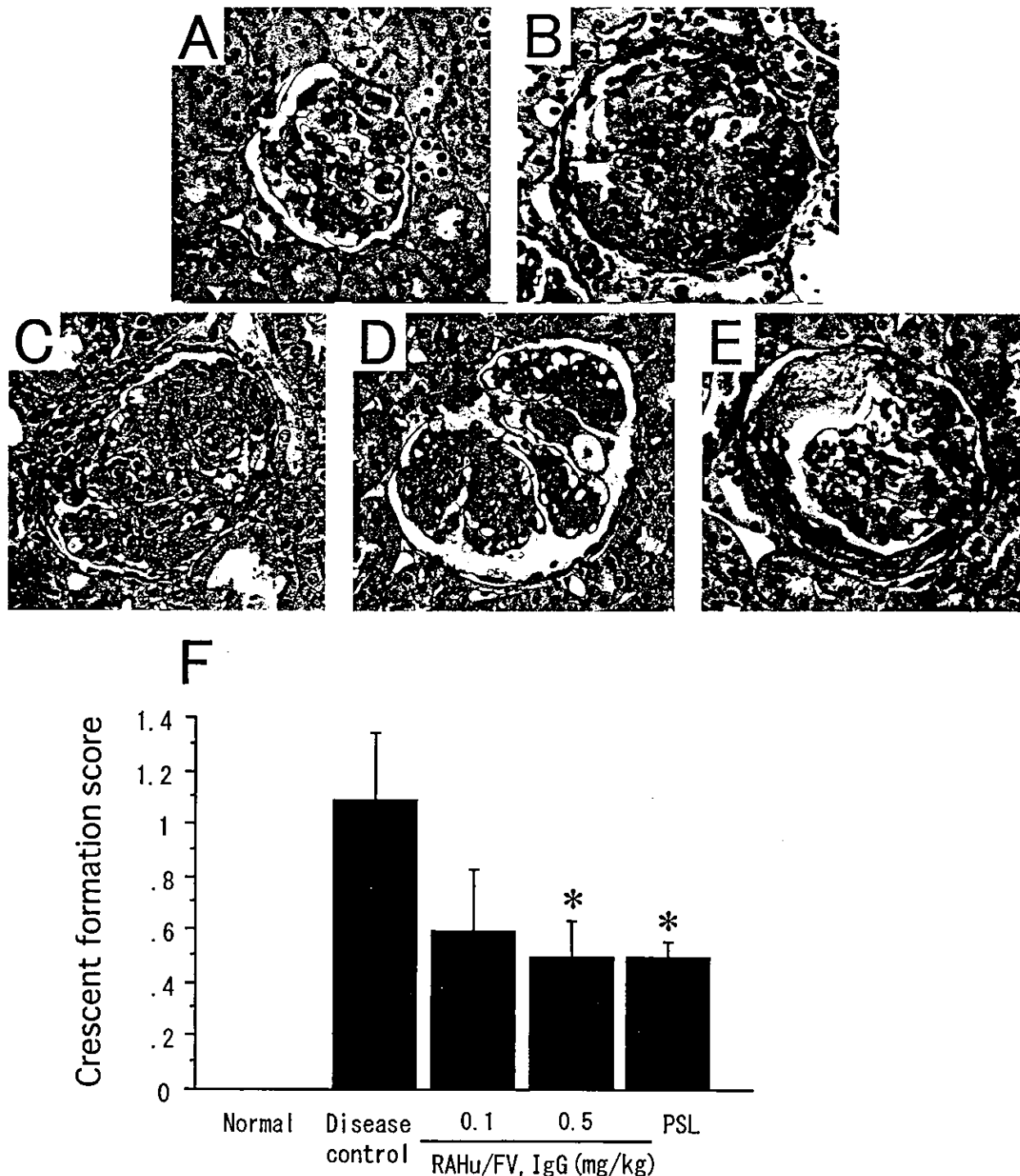


Figure 2. Inhibitory effects of RAHu/FV on crescent formation. Cellular crescents are frequent in the disease control group (B), the RAHu/FV group (low dose, C; high dose, D), and the prednisolone group (E) on day 8, compared with normal (A) (final magnification, $\times 270$). Significant dose-dependent suppression of crescent formation is seen after treatment by RAHu/FV injection (F). * $p < 0.05$ versus disease control group; PSL = prednisolone. $N = 6$ rats per group

abundantly observed in the crescents from the disease control group (Figure 3F). As shown in Figure 4, neither dose of anti-Factor V antibody treatment decreased the total glomerular cell number, although PSL did (normal, 80.4 ± 3.3 ; control, 115.8 ± 2.4 ; low dose, 112.1 ± 2.9 ; and high dose of RAHu/FV, 115.6 ± 1.9 ; PSL, 94.8 ± 1.3 , $p < 0.01$ versus control; cells/glomerular cross-section). Such a change was also observed in the number of PCNA-positive

cells (normal, 0.08 ± 0.02 ; control, 0.22 ± 0.03 ; low dose, 0.19 ± 0.01 ; and high dose of RAHu/FV, 0.17 ± 0.04 ; PSL, 0.09 ± 0.02 , $p < 0.01$ versus control; cells/glomerular cross-section).

Endogenous Factor V expression

Although glomerular Factor V expression was slight on day 0 (normal), staining density was increased and

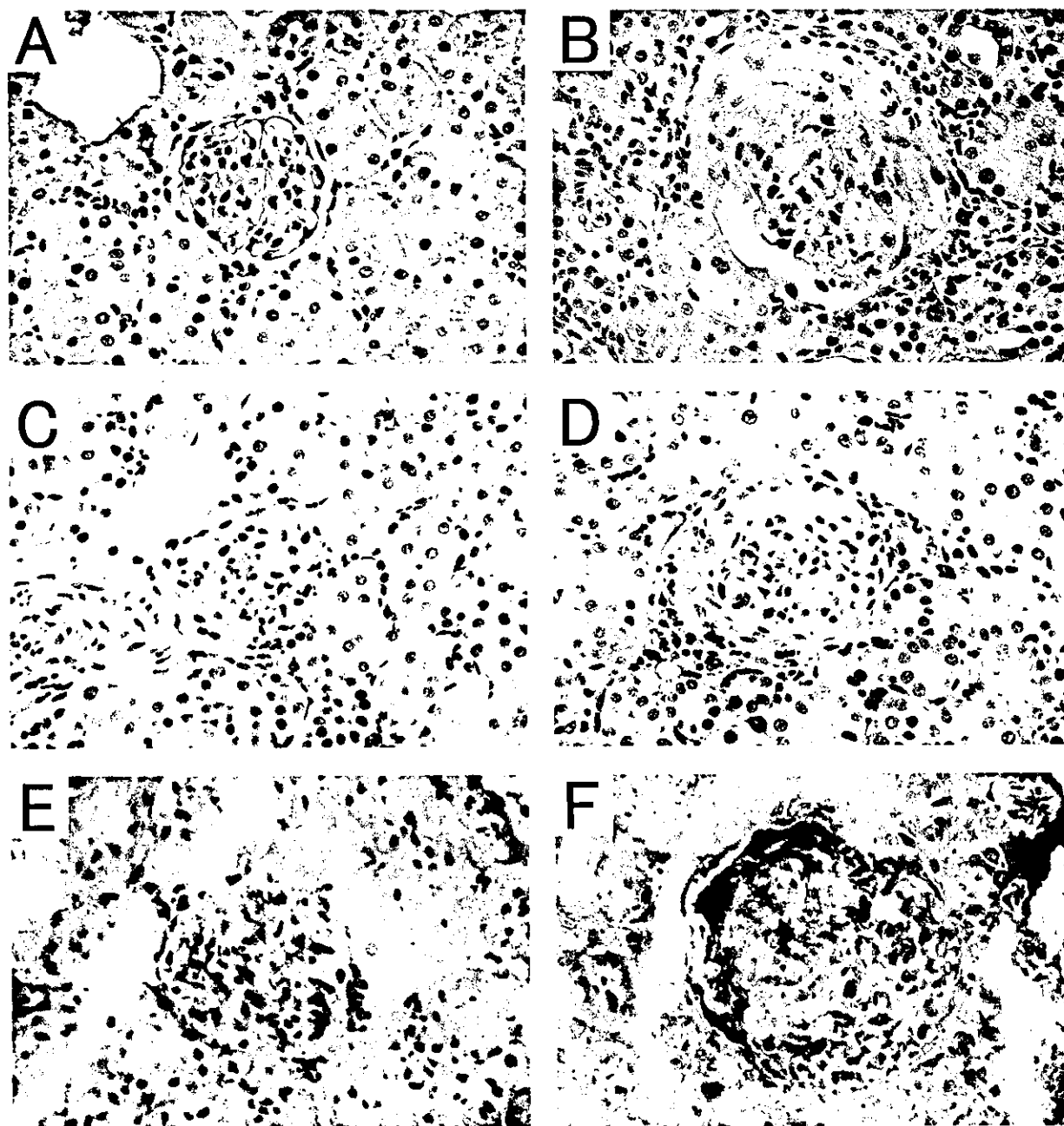


Figure 3. Immunostaining for PCNA-, ED-1-, and OS-3-positive cells. PCNA- (B) and ED-1-positive (D) cells are often observed both in glomeruli and in crescents in the control, and OS-3-positive cells (F) are abundantly observed in the crescents, while such cells are scarce in the normal group (A, C, and E, respectively) (final magnification $\times 250$)

prominent on day 3: normal, 3.0%; day 1, 39.7%; day 3, 100%; and day 8, 49.4% of the day 3 level; each $p < 0.001$ versus normal; staining intensity was intense and detected mainly in the mesangium (Figures 5A and 5B). To identify the cell type expressing Factor V, α -SMA was used as a mesangial cell marker [26]. Double-labelling experiments using α -SMA and Factor V revealed their frequent co-localization in the same mesangial areas of glomeruli (Figures 5C and 5D).

Effect of RAHu/FV on fibrin deposition

There was no fibrin deposition in the normal group, but deposition was marked in the ATS group on day

8 and decreased in the group injected with a high dose of anti-Factor V antibody. No such decrease was seen in the PSL group (Figure 6). The degree of fibrin deposition decreased in a dose-dependent manner (normal, 0.0 ± 0.0 ; control, 2.7 ± 0.2 ; low dose, 2.6 ± 0.2 ; and high dose of RAHu/FV, 1.3 ± 0.2 , $p < 0.01$ versus control; PSL, 2.7 ± 0.2).

RT-PCR for Factor V mRNA in glomeruli

Specific bands for amplified Factor V cDNA were clearly detected using RT-PCR on total glomerular RNA isolated from both the disease control group and the RAHu/FV-injected high-dose group after 8 days of intravenous injection with ATS (Figure 7). In contrast,

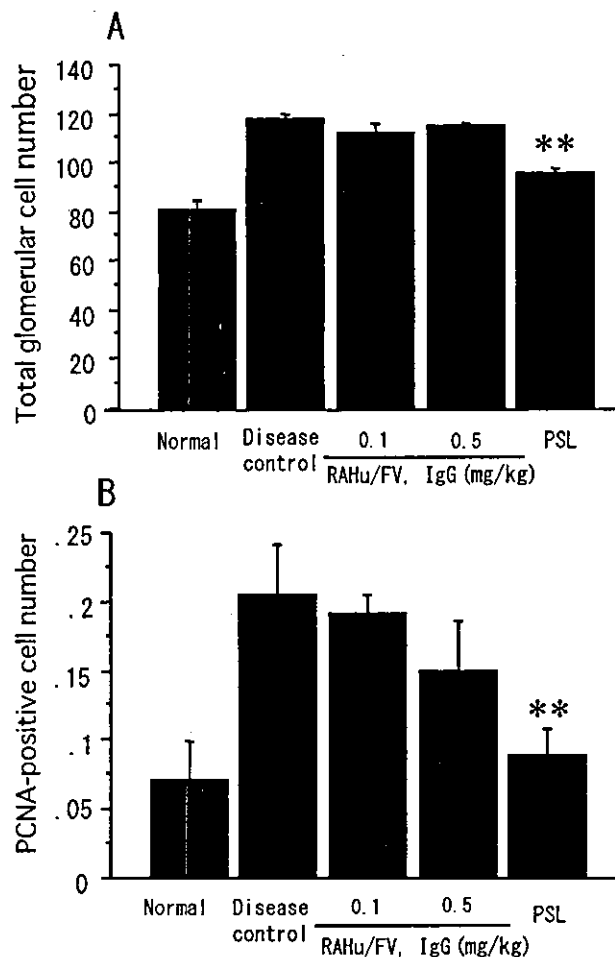


Figure 4. Total glomerular cell number (A) and PCNA-positive cell number (B). Total glomerular cell number and PCNA-positive cell number are decreased in the prednisolone group, whereas they are not decreased in the group injected with anti-Factor V serum. ** $p < 0.01$ versus disease control group; PSL = prednisolone. $N = 6$ rats per group

very low levels of Factor V-specific mRNA could be detected in the normal group.

Immunoelectron microscopy for fibrin

By immunoelectron microscopy, intense mesangial and capillary luminal fibrin deposition was present in the early phase of the model on day 3 in a glomerulus from the disease control rat (Figure 8). The glomerular basement membrane was ruptured at the portion adjacent to the damaged mesangial area, where a surviving mesangial cell was seen nearby. Fibrin clot was also precipitated in Bowman's space.

Discussion

It has been suggested that intraglomerular coagulation is involved in the development of glomerular injury [27]. According to the developmental mechanisms of crescent formation, it is suggested that breaks in the glomerular capillary basement membrane may

contribute to the leakage of fibrinogen into Bowman's space and thus extracapillary cellular proliferation appears to be related to precipitation of fibrin [28]. In the present study, we observed disrupted glomerular capillary basement membranes and precipitated fibrin clots in Bowman's space by immunoelectron microscopy in the early stage of MsPGN. In crescentic GN, fibrin deposition together with necrosis and tissue factor expression precedes crescent formation [5,29,30].

In a previous *in vitro* study, we reported that mesangial cells produce Factor V and participate in the coagulation cascade on the mesangial cell surface [31]. Factor V is converted to its active form, Va, by thrombin or Factor Xa [32]. The Xa/Va complex serves to convert prothrombin to thrombin and, subsequently, thrombin converts fibrinogen to fibrin [33]. In the present study, we observed mesangial Factor V protein expression using double labelling of α -SMA and Factor V, and mRNA expression in glomeruli by northern blot analysis in the disease control group. Factor V mRNA expression was up-regulated, not only in the disease control, but also in the group injected with a high dose of RAHu/FV. These results show that Factor V was expressed after ATS injection and then was neutralized in the antibody-treated group, which ameliorated fibrin and crescent formation.

Factor V is abundantly available in the circulation and could permeate the mesangium through fenestration of glomerular endothelial cells. The role of Factor V in mesangial cells is comparable to that of tissue factor (TF), which also acts on their membrane surface and initiates the coagulation cascade. Erlich *et al* reported that infusion of recombinant human TFPI significantly reduced the development of glomerular fibrin deposition [34], even when administered intravenously. It was reported that kidney transplantation in patients with inherited thrombophilia, Factor V G1691A, was clinically associated with acute rejection, including fibrinoid necrosis and transmural arteritis [35]. On the contrary, in two familial cases of IgA nephropathy associated with mild type-Factor V deficiency, the disease activity of glomerulonephritis was also mild [36].

In Thy-1 nephritis, following mesangiolysis, mesangial cell proliferation starts in the next phase [3], which corresponds to day 3 in the present study, when mesangial Factor V expression was prominently observed. These findings were consistent with previous observations showing up-regulated Factor V expression, using mesangial cells cultured with pro-inflammatory cytokines and tumour necrosis factor (TNF)- α [37], and a clinical study, in which a close relationship was observed between mesangial Factor V expression and mesangial proliferation in human IgA nephropathy [20]. Macrophages are also known to produce Factor V [14] and are found in Bowman's space; mesangial cells are not present. Although we could not determine whether Factor V production predominated in mesangial cells or macrophages, our results suggest

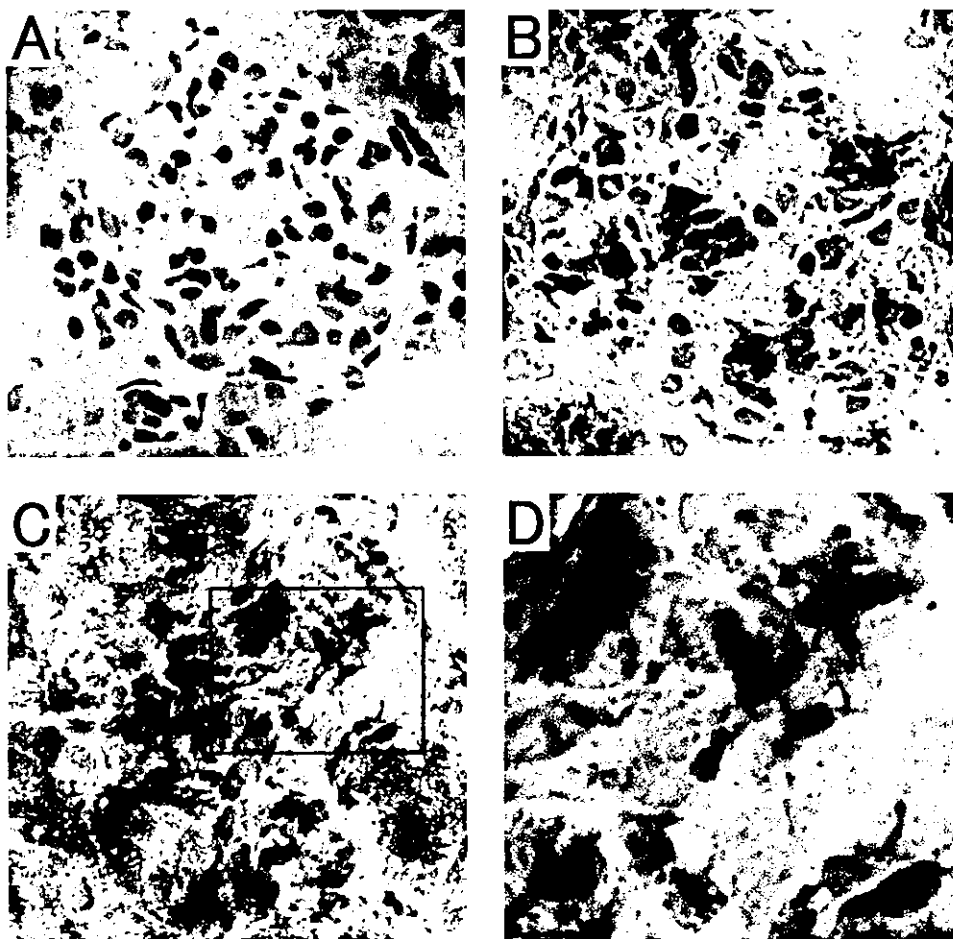


Figure 5. Endogenous Factor V staining. Mesangial Factor V staining is intense in the ATS group (B) early on day 3, in contrast to its absence in the normal group (A) (final magnification, $\times 380$). By double immunostaining of the glomerulus for α -SMA and Factor V, α -SMA (red) co-localizes with Factor V (dark brown) in the same mesangial areas (C, final magnification $\times 450$). The boxed area is shown at a higher power in panel D (final magnification $\times 1100$)

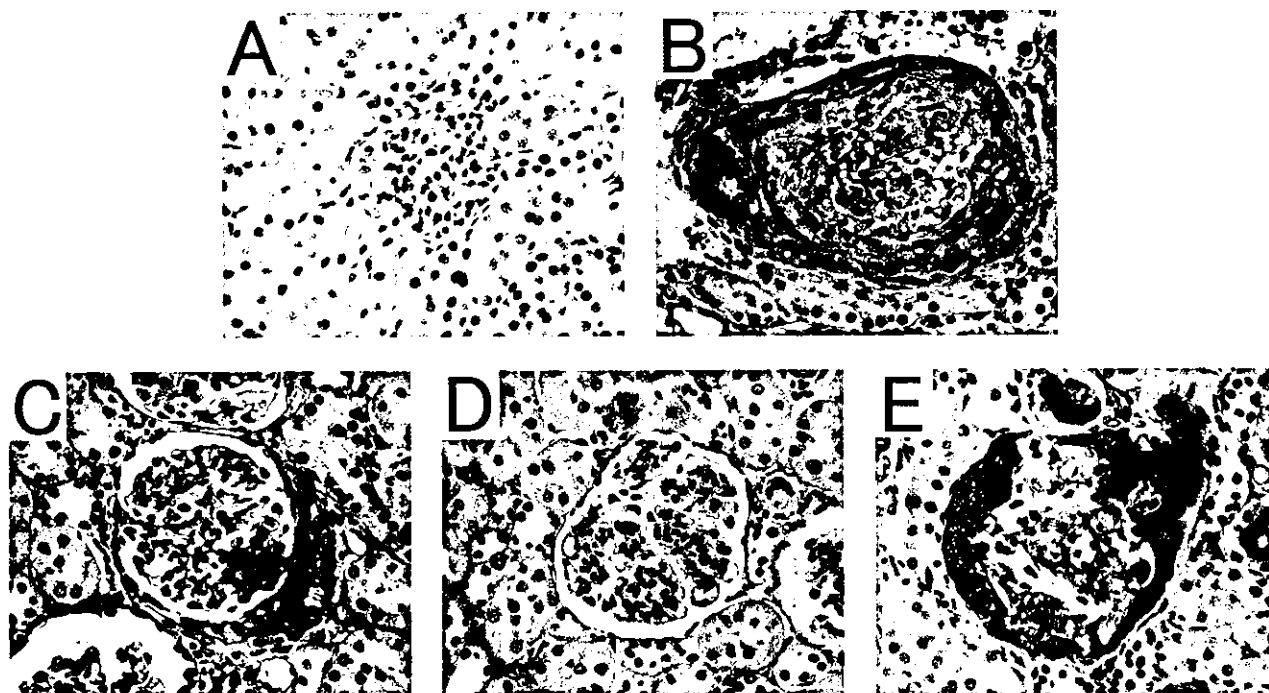


Figure 6. Inhibitory effects of RAHu/FV on fibrin deposition. Fibrin deposition is intense in the disease control group (B), the RAHu/FV group (low dose, C; high dose, D), and the prednisolone group (E) at day 8, compared with the normal group (A) (final magnification $\times 230$)

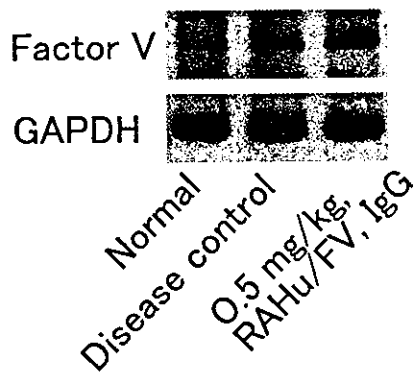


Figure 7. Factor V expression in glomeruli by RT-PCR. The levels of mRNA Factor V were evaluated by RT-PCR using total glomerular RNA isolated from the normal group, from the disease control group, and from the group injected with 0.5 mg IgG/kg RAHu/FV. The levels of GAPDH mRNA served as the positive control



Figure 8. Ultrastructural distribution of fibrin viewed by immunoelectron microscopy in a glomerulus from ATS-induced nephritis. Fibrin is observed in the mesangium (thin arrows), capillary lumen (large arrow-heads), and in Bowman's space (small arrow-heads). Glomerular basement membrane is broken (thick arrow) adjacent to the mesangiolytic lesion (*), where a surviving mesangial cell (M) is seen on day 3 (final magnification $\times 3200$)

that mesangial cells in the necrotic lesions at least in part play a role in prothrombin activation through the formation of prothrombinase complex. As shown in this study, Factor V expression in the mesangium in MsPGN may be linked to mesangial cell proliferation and inflammatory activity, although the regulatory mechanism of Factor V needs to be clarified.

Fibrin is chemotactic for leukocytes [7]. It is of interest that crescent formation has features of delayed-type hypersensitivity (DTH), with the consistent observation of T cells, macrophages, tissue factor, and fibrin in the glomerular lesion [19,38,39]. The relevance of a number of adhering molecules, and chemokines, such as ICAM-1, VCAM-1, and IL-18, was demonstrated in crescentic GN and dermal DTH [40,41]. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was also recognized as an important factor in the inflammatory phase of crescentic GN [42]. The effect of PSL treatment on glomerular cell proliferation in

Thy-1 nephritis has been previously reported [43]. In the present study, PSL treatment inhibited both cellular crescent formation and mesangial cell proliferation, together with PCNA- and ED-1-positive cells, although PSL did not suppress fibrin precipitation in Bowman's space. In a previous study, methylprednisolone therapy suppressed the expression of MCP-1 and glomerular monocytes/macrophage infiltration in a rat model of crescentic GN [44]. Therefore, corticosteroids may inhibit crescent formation through suppression of monocyte recruitment, despite the fibrin deposition. In this context, the clinical efficacy of regimens that include heparin-warfarin in combination with PSL, azathioprine, and dipyridamole in severe childhood IgA nephropathy was reported [45].

In the present study, the majority of cells within crescents were positive for OS-3 staining in the disease control rats. In addition, ED-1-positive cells were observed as a subpopulation. These results are consistent with the previous suggestions that crescent-constituting cells are derived mainly from parietal glomerular epithelial cells and transdifferentiated podocytes [4], and that macrophages stimulate crescent-constituting cells to proliferate [46].

It is known that both thrombin and Factor Xa have mitogenic effects on mesangial cells [47,48] and stimulate the effect of MCP-1 expression on mesangial or other cells [49,50]. The Xa/Va complex activates prothrombin to thrombin. Blocking thrombin generation using anti-Factor V antibody could therefore inhibit the coagulation cascade, but may not be efficient in suppressing mesangial cell proliferation and macrophage infiltration, because Factor Xa alone could initiate the mitogenic and infiltrating processes. In our preliminary study, direct inhibition of Factor Xa, using a specific Xa inhibitor in experimental MsPGN, may be effective against mesangial proliferation, fibrin deposition, and crescent formation [51]. In conclusion, local fibrin production, following mesangial Factor V expression, together with mesangiolytic, which spreads to the adjacent glomerular basement membrane, plays a role in crescent formation in MsPGN.

Acknowledgements

We are grateful to Ms Fumie Uemura for secretarial support and to Mr Daniel Mrozek for help in preparing the manuscript.

References

- Ishizaki M, Masuda Y, Fukuda Y, Sugisaki Y, Yamanaka N, Masugi Y. Experimental mesangioproliferative glomerulonephritis in rats induced by intravenous administration of anti-thymocyte serum. *Acta Pathol Jpn* 1986; **36**: 1191–1203.
- Floege J, Johnson RJ, Gordon K, et al. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. *Kidney Int* 1991; **40**: 477–488.
- Mosley K, Collar J, Cattell V. Mesangial cell necrosis in Thy 1 glomerulonephritis — an ultrastructural study. *Virchows Arch* 2000; **436**: 567–573.