

2006.12.11-13 (大阪)

15. Kazuko Uno, Yoshiki Omatsu,  
Toshiko Ihara, Yoko Mitsuishi, Kayo  
Inaba, Eri Muso, Kazuko Suzuki,  
Tsunataro Kishida Correlation  
between the number of plasmacytoid  
dendritic cells and IFN- $\gamma$  production  
upon stimulation with Sendai virus in  
human peripheral blood. 第36回日  
本免疫学会総会 2006.12.11-13 (大  
阪)
16. Eri Muso: Impaired biodefense in the  
active phase of MPO-ANCA positive  
polyangiitis with RPGN—highly  
suppressed IFN production with  
abnormal localization of  
plasmacytoid dendritic cells. The  
5th International Meeting on Human  
Peroxidases Feb. 20-23, 2007  
(Akaroa, New Zealand)

図1 種々の疾患患者の IFN 産生能

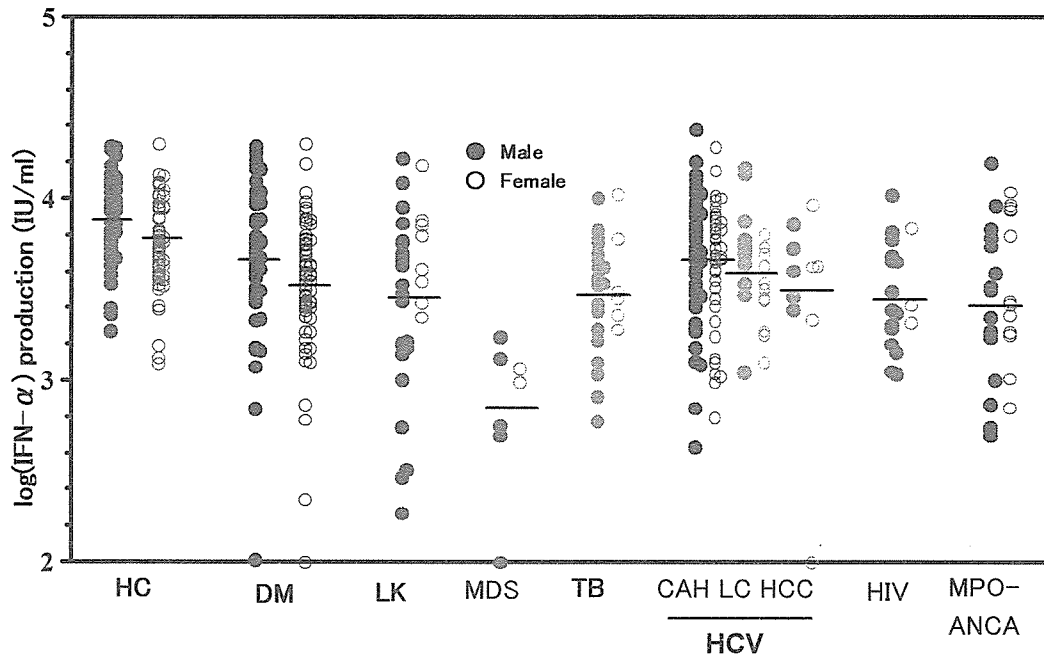


図2 MPA に伴う RPGN 患者の血中 IFN $\alpha$  濃度

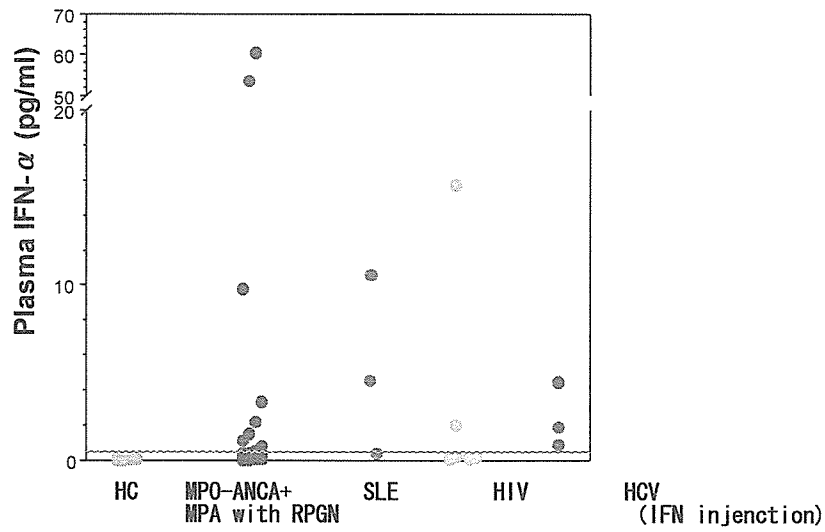


図3 IVIg 前後での IFN $\alpha$  産生能と血中 IFN $\alpha$  濃度の変化

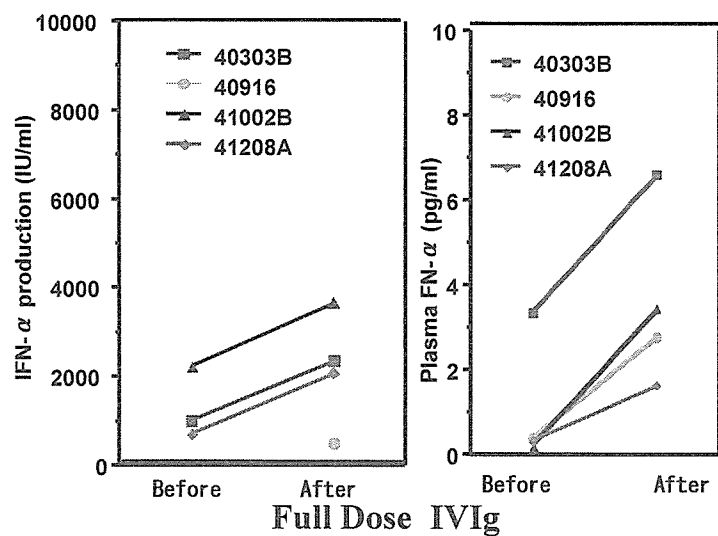


図4 IFN- $\alpha$  産生細胞の同定

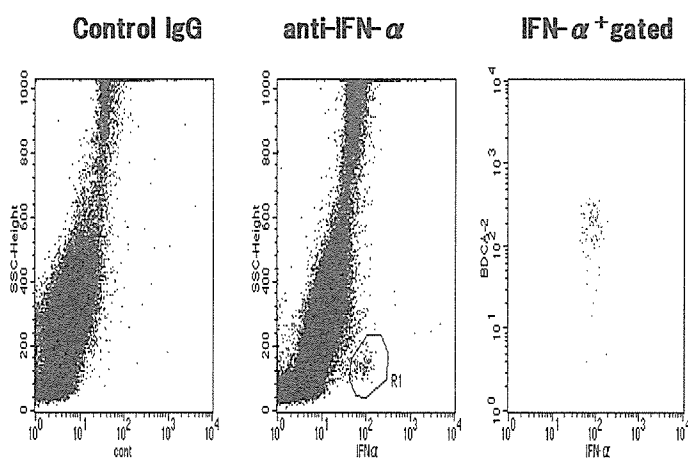


図5 単球と pDC からの IFN- $\alpha$  産生

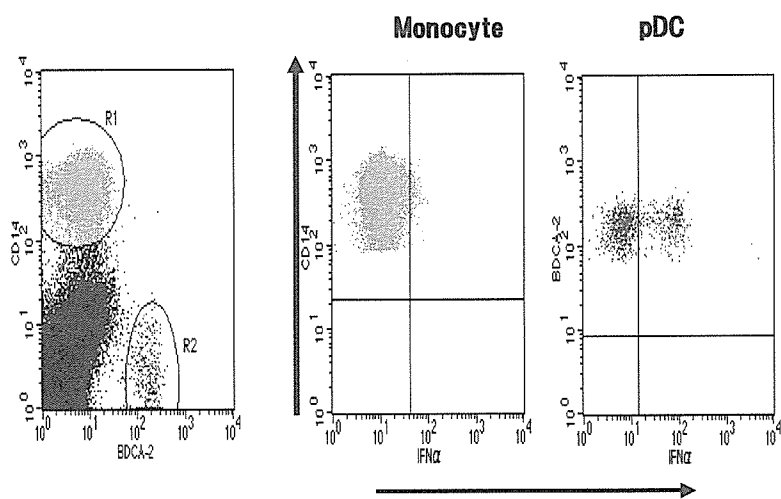
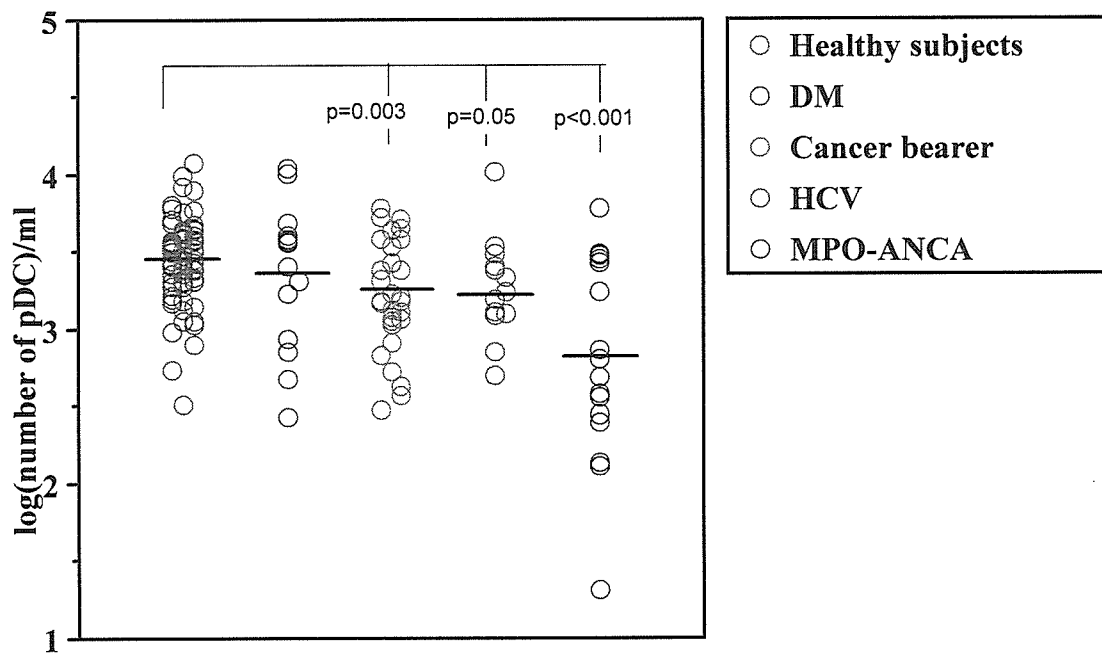


図6 種々の疾患患者の pDC 数



「MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎に対する  
白血球除去（LCAP）療法の有用性」

研究協力者 木村朋由，堀田修，田熊淑男  
仙台社会保険病院 腎センター

研究要旨

LCAP療法は標的物質を選択的に除去する機序により過度の免疫抑制を避け感染死を軽減する効果が期待されている。当院ではMPO-ANCA関連RPGNに対し23例のLCAP療法を経験しており，その治療経験をまとめ報告する。6ヶ月腎生存率は82.6%，個体生存率は87.0%。12ヶ月腎生存率は74.0%，個体生存率は78.3%。平成14年厚労省進行性腎障害に関する研究RPGN分科会の全国調査と比べ良好な結果が得られており，また感染死も2例と極めて少ない結果だった。既存治療に対するLCAP療法の有用性および免疫抑制療法減量による感染死抑制の可能性が示され，有効かつ安全な治療法と考えられた。

A. 研究背景・目的

急速進行性糸球体腎炎（以下RPGN）は放置すれば数週から数ヶ月で末期腎不全まで進行する，極めて予後不良な腎炎の一群である。我が国のRPGNの特徴として，諸外国に比べMPO-ANCA例が多く全体の50.4%を占める。治療は長期比較的大量の副腎皮質ステロイドと免疫抑制剤の併用療法が標準的となっているが，死亡患者の約50%が感染症を死因としていることから，過度の免疫抑制による副作用が大きな課題となっている。

LCAP療法は活性化好中球・単球を効率的に除去するアフレスシス療法である。ポリエチレンテレフタレート

極細繊維の不織布（セルソーバ）を用い，末梢血から連続的な体外循環で白血球分画を吸着除去する。標的物質を選択的に除去するその機序により過度の免疫抑制を避け感染死を軽減する効果が期待されている。

当院ではMPO-ANCA関連RPGNに対し既に20例以上のLCAP療法を経験してきた。今回その治療経験をまとめ，その有用性を検討したので報告する。

B. 対象および研究方法

1997年1月から2004年10月までの7年10ヶ月間に，当院でLCAP療法を施行したMPO-ANCA関連RPGN23例

を対象とした。男性 11 例／女性 12 例，平均年齢 67.5 歳，治療前平均 Cr3.87mg/dl，肺合併症 10 例。臨床学的重症度分類（厚労省進行性腎障害に関する研究 RPGN 分科会）；Grade I 8 例・II 10 例・III 5 例・IV 0 例。

LCAP 療法は隔日で 2 週間に計 6 回施行し，病状に合わせて増減，最大 10 回まで施行した。

（研究の倫理面への配慮）

LCAP 療法は難治性潰瘍性大腸炎や悪性関節リウマチに対して既に臨床応用されている治療法である。当院においても多数の施行実績があり，これまで安全性に全く問題が無かった。

LCAP 療法の施行にあたり，予め当院倫理委員会にて承認を得た後，それに基づいた同意説明文書にて患者および家族に説明し同意を得た。

### C. 結果

23 例の経過を表に示す。

初期治療として，23 例全例に LCAP 療法を行い，維持療法として経口プレドニゾロン 0.5～0.6mg/kg を投与した。尚，追加治療として，23 例中 16 例でメチルプレドニゾロンパルス療法，2 例でエンドキサパルス療法，5 例でγグロブリン大量療法を行った。4 例は追加治療を行わず，LCAP 療法と経口プレドニゾロンで加療した。

6 ヶ月腎生存率は 82.6%，個体生存率は 87.0%。1 例が開始 9 日で透析導入し，死亡した 3 例の死因は脳出血（7 週），急性膵炎（3 週），肺炎（4 ヶ月）。

12 ヶ月腎生存率は 74.0%，個体生存

率は 78.3%。6 ヶ月以降の透析導入は無く，死亡 2 例の死因は肺炎（6 ヶ月），脳梗塞（10 ヶ月）。

尚，LCAP 療法に加え経口プレドニゾロンのみ併用の 4 例は，1 例が 17 ヶ月で消化管出血死亡した以外は 3 例とも 2 年以上再燃無く経過している。

### D. 考察

MPO-ANCA 陽性 RPGN 患者は，近年更に増加傾向にあり，厚労省進行性腎障害に関する研究 RPGN 分科会の平成 14 年の全国調査では 6 ヶ月腎生存率 69.9%，個体生存率 74.2%と予後不良であり，死亡原因の約半数が感染症によることが示されている。

LCAP 療法は当院既報（論文発表 1.2.）にて，従来のメチルプレドニゾロンパルス療法に比べ腎機能改善，死亡数低下がみられた。また，末梢血中リンパ球数・CD4 陽性細胞数を低下させないことから免疫抑制をかけない治療であることが示されている。

今回の検討では腎生存率，個体生存率共に全国調査と比べ良好な結果が得られており，また感染死も 2 例と極めて少ない。既存治療に対する LCAP 療法の有用性および免疫抑制療法減量による感染死抑制の可能性が示され，有効かつ安全な治療法と考えられた。

### E. 結論

LCAP 療法は有効性・安全性で既存治療より優れており，MPO-ANCA 陽性 RPGN 患者の治療に際して早期に

治療選択肢となることが重要と考えられた。

## H. 研究発表

### 論文発表

1)T.Furuta et al: Lymphocytapheresis to treat rapidly progressive glomerulonephritis: a randomized comparison with steroidpulse treatment. Lancet. 352:203-204, 1998

2)T.Furuta et al: Decreased CD4 Lymphocyte count as a Marker Predicting High Mortality Rate in Managing ANCA Related Rapidly Progressive Glomerulonephritis. Nephron. 91:601-605, 2001

3)O.Hotta et al: Improvements in Treatment Strategies for Patients With

Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. Ther Apher Dial. 10:390-395, 2006

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「MPO-ANCA 陽性急速進行性腎炎の臨床病理学的検討」

研究協力者 新田孝作、板橋美津世、湯村和子  
東京女子医科大学第四内科

研究要旨

MPO-ANCA陽性急速進行性腎炎を呈し腎生検を施行した18例について、臨床所見と腎病理所見、腎予後との関連を検討した。その結果、腎生検時の血清クレアチニンが高値であり、腎生検において硬化糸球体率が高いほど、透析に至っていることが分かった。また、病変が腎に限局している腎限局型では全身型や多臓器型に比べ有意にCRPが低値であった。予後については、生存率94%、透析移行例33%、再発は5年後に1例であった。

A. 研究目的

腎生検を施行した MPO-ANCA 関連腎炎患者において、腎組織所見と腎予後、腎外症状、CRP、MPO-ANCA との関連を調べた。また、初期治療、維持療法についても検討した。

（研究の倫理面への配慮）

腎生検を施行する時点で、本研究の意義を説明し、匿名化による個人情報保護に関して配慮することを文書で確認した。

B. 研究方法

対象は MPO-ANCA 関連急速進行性腎炎を呈し 1995-2005 年までに腎生検を施行した 18 例である（男性 7 例、女性 8 例）。  
腎生検時の病理所見、血清クレアチニン、MPO-ANCA、重症度を調べ、腎予後との関連を調べた。また、初期治療、維持療法の内容及び予後、再発率についても検討した。

C. 結果

【腎生検時臨床所見】平均年齢は 58.6 ±13.9 歳で 60 代にピークを認め、血清クレアチニン 4.5mg/dl、CRP7.5mg/dl、MPO-ANCA379±291EU であった。臨床重症度は 1.8±0.89、BVAS14.8±3.2 であった。腎単独例は 7 例、その他は全身症状合併 7 例、肺病変合併 5 例であった。臨床病型と CRP、MPO-ANCA との関連を調べると、CRP は腎単独型では全身・多臓器型に比し有意に低値であったが、MPO-ANCA と病型には



関連はなかった。

【腎生検所見】病理組織では、球状硬化糸球体率が  $39 \pm 28\%$ 、細胞性半月体  $24 \pm 22\%$ 、線維細胞性半月体率  $13 \pm 15\%$ 、間質細胞浸潤は中等度～高度、壊死性血管炎は4例に認めた。

【腎予後との関連】病理所見と腎予後を比べると、1年以内に透析に移行した透析群では、腎生存群に比較し、球状硬化糸球体率が有意に高かったが、半月体や間質細胞浸潤の程度とは無関係であった。また、透析群では腎生検時の血清クレアチニンが有意に高値であった。

【初期治療と予後】初期治療内容は全例ステロイドを使用しており、パルス（セミパルス含む）施行は11例、プレドニン(PSL)は平均  $0.76\text{mg/kgBW}$  投与されていた。免疫抑制薬は IVCY1 例、CYC 内服3例、PEは DFPP を含め4例であった。1ヶ月以内の短期予後は腎機能については、6例が透析に移行し2例がその後離脱した。1ヶ月以内の死亡例はなかった。

【維持療法】維持療法については、平均  $53 \pm 36$  ヶ月の経過観察期間において、14例がステロイドを内服し、うち12例が2年間継続した。2年後の平均 PSL 内服量は  $8.1\text{mg}$  であった。免疫抑制薬の併用はシクロスポリン3例、ミゾリピン3例であった。

【診断後2年間の臨床所見の推移】診断後2年間の尿所見、CRP、MPO-ANCA、血清クレアチニンの推移をみた。透析群、腎生存群で診断時の血尿蛋白尿の程度に有意差はなく、

2年後には尿異常はほぼ消失した。CRPは診断後1ヶ月にはほぼ陰性化し、MPO-ANCAは漸減傾向となったが、2例は陰性化しなかった。この観察期間中に再発はなかった。

【予後】2年間に透析移行例は6例（33%）であり、1ヶ月以内4例、1ヶ月～1年以内2例、6年後1例であった。2年生存率は94%で、発症後1年においてCMV感染による死亡が1例あった。再発は1例認め、PSLのみで維持療法を行っていた症例で5年後に再発を認めた。

#### D. 考察およびE. 結論

1、MPO-ANCA陽性急速進行性腎炎において、1年以内に透析に至った例は全体の約33%であり、腎組織にて硬化糸球体率が有意に多かったが、半月体や間質細胞浸潤の程度とは有意差はなかった。

2、透析移行例は、発症時の血清クレアチニンが有意に高かったが、MPO-ANCAやCRPとの間に有意差はなかった。

3、腎単独例に比べ、全身型・多臓器型ではCRPが有意に高値であった。

4、再発例は1例であり、ステロイド単独で維持療法を施行していた。免疫抑制薬併用群に再発はなく、寛解維持に有効である可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

今回の研究に関し健康被害は認めなかった。

## G. 知的所有権の出現登録状況

なし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

1. W.Yumura, M.Itabashi,A. Ishida-Okawara, K.Tomizawa, J.Yamashita, Y.Kaneshiro, H.Nihei, K.Suzuki: A novel mouse model for MPO-ANCA-associated glomerulonephritis. *Microbiol Immunol* 50: 149-157, 2006

### 2. 学会発表

1、板橋美津世、湯村和子 ANCA 関連腎炎の病理学的検討、日本腎臓学会総会、2006

2、M. Itabashi, W. Yumura, K. Nitta, The cytokine network in model mouse of MPO-ANCA-associated glomerulonephritis,ASN,2006

## 「MPO-ANCA 関連血管炎患者における動脈硬化の検討」

分担研究者

榎野博史(岡山大学大学院医歯学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学 教授)

研究協力者 杉山 斉 (同上講師)

佐田憲映 (同上助手)

### 研究要旨

MPO-ANCA関連血管炎患者においてPWVを用いた動脈硬化の評価を行い、年齢をマッチさせたSLE患者、RA患者、慢性腎機能障害患者との比較検討を行った。MPO-ANCA関連血管炎患者では罹病期間が短いにもかかわらずPWVが高値であった。関連因子として、年齢・中性脂肪・血管炎の活動性が抽出された。MPO-ANCA関連血管炎患者においては動脈硬化が進行していることが示唆された。

### A. 研究目的

MPO-ANCA 関連血管炎 (MPA) における寛解導入療法の進歩により、MPA 患者の急性期の予後は改善しつつある。本邦における同患者の平均年齢は高く、維持療法期において今後、動脈硬化などに伴う心血管系の合併症が問題になることが予測される。

今回我々は寛解導入療法開始後1年以上経過した MPA 患者における動脈硬化について PWV を用いてパイロット研究を行い、年齢をマッチさせた RA・SLE・慢性腎臓病患者と比較検討したので報告する。

### B. 研究方法

50 歳以上で 1 年以上の治療歴のある MPO-ANCA 関連血管炎患者を対象とし、年齢をマッチさせた RA 患者、

SLE 患者、慢性腎臓病患者 (CKD) を対照とした。

各患者群での PWV、足関節上腕動脈血圧比 (ABI) の測定及び罹病期間、高血圧、高脂血症、糖尿病、BMI、罹病期間など背景因子の比較検討を行い、MPA 患者ではさらに腎機能や活動性などの疾患関連因子について動脈硬化との関連を検討した。

### C. 研究結果

MPA 患者 14 例、RA 患者 13 例、SLE 患者 10 例、CKD 患者 7 例で検討を行った。

平均年齢は MPA $68.0 \pm 2.1$  歳 RA $68.9 \pm 1.4$  歳 SLE $67.8 \pm 2.0$  歳 CKD $66.6 \pm 1.8$  歳と統計学的有意差を認めなかった。また罹病期間は MPA $5.6 \pm 0.6$  年、RA $13.1 \pm 3.2$  年、SLE $13.6 \pm 2.8$  年、

CKD14.4±4.6年とMPAで他疾患に比べて短かった。BMIはMPA23.0±1.0、RA21.9±0.8、SLE22.9±0.9、CKD22.9±1.5と有意差を認めなかった。高血圧・高脂血症・糖尿病の罹患については統計学的有意差を認めなかった。

PWV値はそれぞれMPA 2191.0±171.9cm/s, RA 1751.2±78.7cm/s, SLE 1664.1±127.7cm/s, CRF 1815.1±163.4cm/sと全体に高値であったがMPA患者ではさらに有意に高値であった。

すべての症例において検討した多変量解析では、PWV>2000cm/sに対する危険因子として、「年齢」・「MPAであること」が抽出された。

MPA患者における相関分析では、「年齢」・「中性脂肪」・「血管炎活動性(全身項目)」がPWVと関連を認めた。

#### D. 考察

今回の検討では、年齢が同等の患者群で特にMPA患者においてPWVが高値であり動脈硬化が進行している可能性が示唆された。その危険因子として疾患活動性などの関連の可能性も示唆された。また多変量解析からは罹病期間が短いにもかかわらずMPAであることが強い危険因子として抽出されており、今後発症時における動脈硬化の評価を行いMPA患者における動脈硬化の成因について明らかにしたい。

#### E. 結論

MPA患者では動脈硬化が進行して

おり今後心血管合併症の増加が危惧される。MPA患者における動脈硬化進展因子を明らかにし予防に向けた治療への可能性を検討していく必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

現在準備中

##### 2. 学会発表

平成18年6月日本腎臓学会発表

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「マウス半月体形成性腎炎モデルの半月体形成期腎糸球体における内因性  
**retrotransposon** の発現」

研究協力者

山縣 邦弘（筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻腎臓病態医学分野 教授）  
共同研究者 清水 芳男、萩原 正大、臼井丈一、平山 暁、富田 知栄、  
楊 景堯（筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻腎臓病態医学分野）

研究要旨：ウシアルブミンを用いたマウス半月体形成性腎炎モデルは経過中の時相と組織所見が一致する。この特徴を生かし、半月体形成期のマウス腎糸球体と形成前糸球体間において発現する遺伝子のサブトラクションを行った。2つの未知配列と内因性retrotransposon中の逆転写酵素の配列が得られた。In situ hybridizationによる内因性retrotransposonの発現解析では、半月体構成細胞・半月体が認められる糸球体および周囲の尿細管・間質細胞に強い発現を認めた。以上より、内因性retrotransposonはマウス半月体形成性腎炎モデルにおける半月体形成に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

糸球体における半月体形成は糸球体腎炎の活動性のみならず、予後不良を示唆する腎組織所見である。半月体に関する多くの研究がなされてきたが、分子レベルでの形成機序はいまだ明らかになっていない。

ウシアルブミン（bovine serum albumin, BSA）を用いたマウス半月体形成性腎炎モデル（日腎誌 1987; 29）は BSA 投与開始 3 週間までは半月体形成が全くみられず、4 週間には高度な半月体形成を認めるため、時相と組織所見が一致するよい動物モデルである。

本研究はマウス半月体形成性腎炎モデルを用い、半月体形成期に腎糸球体内で特異的に発現が上昇する遺伝子をを同定し、組織内での発現部位を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

① マウス半月体形成性腎炎モデルの作製

Pre-immunization:8 週齢メス B10-BR マウスに BSA(200mg)を Freund の完全アジュバンドと共に 2 週毎に 4 回皮下注射した。

Antigen administration:2 週間マウスを休ませた後、生理食塩水に溶解した

BSAを28日間連日腹腔内に投与した。BSAの投与量は15ngより漸増し、開始5日目に1.5 $\mu$ gとなったところで固定した。リン酸緩衝液を投与した対照群と尿蛋白量および生存曲線の比較を行った。

#### ② 糸球体の単離・ messenger RNA(mRNA)の抽出

BSA腹腔内投与後3週および4週のマウス腎より sieving 法にて糸球体を単離した。核酸抽出機 Mag-Extractor RNA (東洋紡) を用い mRNA を抽出した。抽出した mRNA は complementary DNA(cDNA)に逆転写した。

#### ③ cDNA-representational difference analysis (cDNA-RDA)

Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences Clontech)を用い添付されたマニュアルに従い BSA 投与後4週マウス腎糸球体から BSA 投与後3週マウス腎糸球体へのサブトラクション (RDA) を行った。サブトラクションされた cDNA 断片は T ベクターの pCR II(Invitrogen)へサブクローニングし、配列を決定した後、データベース検索にて遺伝子を同定した。

#### ④半月体形成期特異的発現遺伝子の発現部位同定

cDNA-RDA にて得られた配列を pBluescript SK (Stratagene) にサブクローニングし、制限酵素で直鎖化した後、Sp6 プロモーターを用いてジゴキシングニン標識 RNA プローブを作製した。本プローブを用いてマウス腎糸球

体中の発現部位を in situ hybridization にて解析した。

(研究の倫理面への配慮)

本研究は筑波大学組み換え遺伝子実験安全管理規程に則り実験計画を申請し承認後に施行した。

動物実験に関しては筑波大学生命科学動物資源センターから実験計画の承認をうけてから可能な限り愛護的に施行した。

### C. 結果

#### ① マウス半月体形成性腎炎モデルの性状

a. 尿蛋白：尿蛋白排泄量は BSA 腹腔内投与期より徐々に増加したが、第4週では排泄量が低下した。対照群では尿蛋白排泄量の低下は見られなかった(図1)。

b. 生存曲線：BSA を投与されたマウスは対照群に比し antigen administration 期に入ってから死亡例が増加し、有意な生存率の低下を認めた。(図2)

c. 腎組織像：BSA 腹腔内投与3週のマウス腎には半月体が形成されておらず、4週のマウス腎には高度な半月体形成が認められた。蛍光抗体法では IgG, C3 の沈着が腎糸球体内に認められた(図3)

#### ② 糸球体の単離

実体顕微鏡による観察で sieving 法にてマウス腎糸球体は良好に単利

されていることが確認された。

### ③ cDNA-RDA

BSA 投与後 4 週-3 週のサブトラクションにより 3 つの配列がクローニングされた。2 つは未知配列であったが、1 つはマウスの Line-1 retrotransposon 中の逆転写酵素の配列 (GenBank Accession Number: NP001005856) であった (図 4)。

### ④ retrotransposon の発現部位

半月体形成期の腎組織 (BSA 腹腔内投与後 4 週) では半月体形成前 (BSA 腹腔内投与後 3 週) 腎および対照マウス腎に比し、糸球体・尿細管に強い発現を認めた。強拡大下の観察では半月体構成細胞、半月体が認められる糸球体およびその周囲の尿細管・間質細胞に発現が偏在していた (図 5)。

## D. 考察

内因性 retrotransposon は自身のゲノムから転写した RNA を逆転写酵素によって DNA 断片に変換しこの DNA を transposase によりゲノム DNA のランダムな位置に転位させる性質を持つ。単純挿入により遺伝子の不活性化や活性化を起こすため表現型を変化させる他、欠失や逆位などの DNA 組み換え反応も起こすためゲノムの再編成にも関わっているとされる。

Retrotransposon は紫外線照射下、化学療法中などのストレス状況下の細胞で発現が上昇することが知られている他、関節リウマチなどの自己免疫疾患の発症にも関与するとの報告が

ある。いずれの状況にせよ、細胞・個体レベルでの死に瀕した状態であり、表現型の変化やゲノムの再編成などを引き起こしかねない retrotransposon の発現上昇は生体の統御という点に関して合目的的な活動では無いように思われる。

一方、自己免疫性疾患の研究において retrotransposon の発現上昇下のサイトカインプロファイルは細胞増殖の増強や免疫反応を誘導する状況であることが確認されており、障害細胞の存在を免疫担当細胞へ伝達し、強い免疫反応を惹起させる役割があるのではないかと推測されている。我々の研究成果においても、半月体形成という強い細胞増殖と炎症反応が腎に生じている時相と場に強く retrotransposon の発現が生じており、この仮説を指示する結果となった。

## E. 結論

マウス半月体形成性腎炎モデルにおいて、内因性 retrotransposon は半月体形成期の腎糸球体およびその周囲の尿細管間質細胞に強く発現し、半月体の形成に関与することが示唆された。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 知的所有権の出現登録状況

なし。

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Shimizu Y, Nagata M, Usui J, Hirayama K, Yoh K, Yamagata K, Kobayashi M, Koyama A.

Tissue-specific distribution of an alternatively spliced COL4A5 isoform and non-random X chromosome inactivation reflect phenotypic variation in heterozygous X-linked Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 21(6): 1582-7, 2006

2. Kai H, Shimizu Y, Hagiwara M, Yoh K, Hirayama K, Yamagata K, Ohba S, Nagata M, Koyama A

Post-MRSA infection glomerulonephritis with marked *Staphylococcus aureus* cell envelope antigen deposition in glomeruli. *J Nephrol* 19(2): 215-9, 2006

3. Arakawa Y, Shimizu Y, Sakurai H, Kawamura S, Hashimoto Y, Kai H, Hagiwara M, Usui J, Yoh K, Hirayama K, Yamagata K, Koyama A.

Polyclonal activation of IgA subclass against *Staphylococcus aureus* cell membrane antigen in post-methicillin-resistant *S. aureus* infection glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 21(5): 1448-9, 2006

4. 清水 芳男、山縣 邦弘、小山 哲夫。急速進行性糸球体腎炎(RPGN)。日本臨床 64 増刊号 2 : 403 - 407, 2006

### 2. 学会発表

1. Shimizu Y, Seki M, Sakurai H, Arakawa Y, Watanabe F, Yoh K, Yamagata K, Koyama A

Staphylococcal cell membrane antigen, a possible antigen in post-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection glomerulonephritis (GN) and IgA nephropathy interacts directly with cultured mesangial cells. 11<sup>th</sup> International symposium on IgA nephropathy, 2006

2. Shimizu Y, Hirayama K, Kobayashi M, Kaneko S, Hagiwara M, Yoh K, Yamagata K, Koyama A

Patients with IgA nephropathy respond strongly through production of IgA with low avidity against *Staphylococcus aureus*, 11<sup>th</sup> International symposium on IgA nephropathy, 2006

3. 清水 芳男、平山 浩一、楊 景堯、松永 恒明、関 正則、荒川 洋、山縣 邦弘、小山 哲夫。マウス半月体形成糸球体腎炎モデルにおける Line-1 レトロトランスポゾン発現部位の解析。日本腎臓学会総会、2006



図1

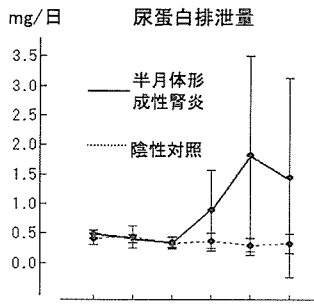


図2

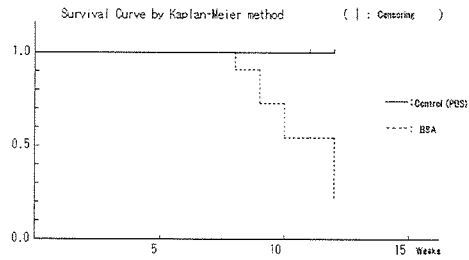


図3

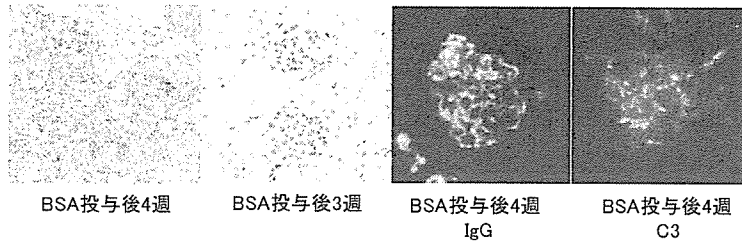


図4

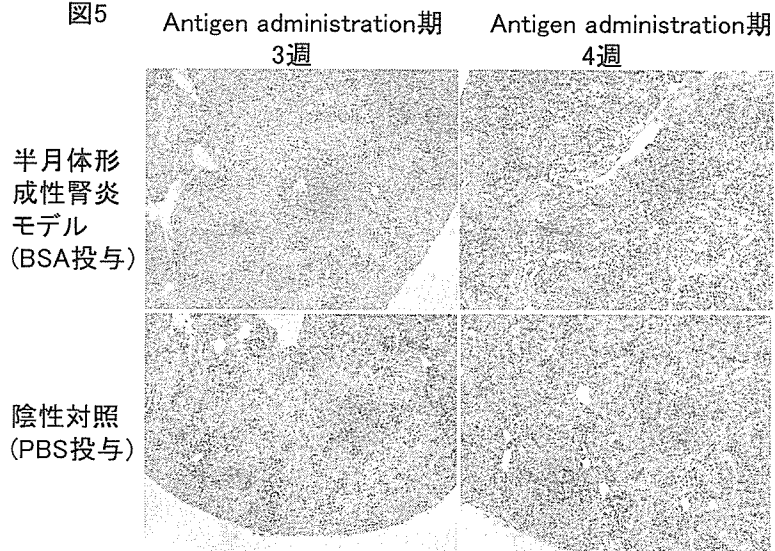
Cloned sequence 1      atctacacaatggggtactactcagctatttaacaagaatgaatttatgaattcctaggc 60  
retrotransposon 59858      atctacacaatggggtactactcagctatttaacaagaatgaatttatgaattcctaggc 59927

Cloned sequence 61      aatgggtggaccctggggcctcatcctgagtgaggttaaccaatcacaaaggactca 120  
retrotransposon 59928      aatgggtggaccctggggcctcatcctgagtgaggttaaccaatcacaaaggactca 59987

Cloned sequence 121      cacactgtactactgataagtgatattagccagaatcttagnataccagatgat 180  
retrotransposon 59988      cacactgtactactgataagtgatattagccagaatcttagnataccagatgat 60047

Cloned sequence 181      aagatacaattttcaaacacatttaactgaagaacgaagactcaagtggtgacacttt 240  
retrotransposon 60048      aagatacaattttcaaacacatttaactgaagaacgaagac-caagtggtgacacttt 60106

図5



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「半月体形成性腎炎における VEGF の役割」

研究協力者 和田 隆志 金沢大学医学部附属病院血液浄化療法部助教授  
共同研究者 原 章規 坂井 宣彦 古市 賢吾  
金沢大学医学部附属病院腎臓内科

研究要旨

Wistar-Kyoto ラット半月体形成性腎炎における Vascular endothelial growth factor (VEGF)の役割を検討した。VEGF 活性阻害効果を有する VEGF1 型受容体アイソフォームである可溶性 FLT-1(sFLT-1)プラスミドを作成 3 日前および 14 日後に筋肉内投与した。その結果、sFLT-1 による VEGF 機能阻害により蛋白尿が増加した。ネフリンの発現低下を認め、足突起癒合が観察された。腎炎惹起後 56 日目には sFLT-1 群において内皮細胞数の減少を伴う糸球体硬化の増悪ならびに間質線維化の進行がみられた。臨床的に sFLT-1 群において、腎炎惹起後 56 日目に腹水、血清総蛋白濃度の低下ならびに腎機能障害が認められた。

【結論】 VEGFは半月体形成性腎炎において、糸球体上皮細胞の機能維持ならびに蛋白尿出現機序に重要な役割を果たし、糸球体基底膜透過性の制御に関与していることが示された。さらに VEGFは進行性腎障害における糸球体および間質病変に対して防護的に作用していると考えられる。

A. 研究目的

Vascular endothelial growth factor (VEGF)は血管内皮細胞の遊走、増殖、分化ならびに再生を誘導する強力な血管新生因子である。マウス腎においては VEGF はその発生に不可欠の分子である。また障害糸球体ならびに間質毛細血管網の修復に必要であることが判明している。

これらの VEGF の作用は主に血管

内皮細胞上に発現している VEGF1 型受容体である Flt-1 および VEGF2 型受容体である Flk-1 を介して発現する。一方、Flt-1 のアイソフォームである可溶性 Flt-1(sFLT-1)は VEGF と結合しその活性を抑制することが知られている。

近年、VEGF が蛋白尿に関連することが示唆されている。蛋白尿は糸球体障害の結果であると同時に間質障害

を惹起し最終的に末期腎不全に至る危険因子である。この蛋白尿が VEGF 中和抗体、あるいは可溶性 Flt-1 による循環血液中の VEGF 機能阻害により正常腎で誘発されることが報告されている。加えて癌に対する臨床試験において抗 VEGF 抗体療法の副作用として蛋白尿が知られるようになった。しかしながら蛋白尿出現機序ならびに糸球体上皮細胞に対する VEGF の役割については目下のところ不明である。

病理学的に半月体形成性腎炎 (CrGN) に代表される急速進行性糸球体腎炎症候群 (RPGN) は糸球体硬化・間質線維化という共通の病理所見を示し腎不全に至る。この過程において、糸球体病変や蛋白尿の発症・進展機序を明らかにすることは病態のさらなる理解とともに治療法の確立にむけ意義深いものと考えられる。しかしながら、この点に関して分子機序・背景については十分な検討がなされていない。

そこで本研究ではラット糸球体腎炎において VEGF は蛋白尿に関与する糸球体濾過障壁の維持に関わっているという仮説を立てた。この仮説を検証するため VEGF 活性を阻害する可溶性 Flt-1 プラスミドを遺伝子導入したラットを用い、半月体形成性腎炎における VEGF の蛋白尿、上皮細胞関連分子ならびに微小血管系へおよぼす役割を検討した。

## B. 研究方法

Wistar-Kyoto ラットの抗糸球体基底膜抗体型半月体形成性腎炎を用い、VEGF 活性阻害のため腎炎の発症 3 日前および 14 日後に可溶性 Flt-1 プラスミドを筋肉内投与しエレクトロポレーションによって遺伝子導入をした。

腎炎ラットを 6 日目あるいは 56 日目にと殺し腎組織、血液を採取した。腎病理については光顕にて糸球体硬化および間質線維化を評価した。電顕で上皮細胞足突起の癒合を評価した。また血清総蛋白濃度および尿素窒素を測定した。加えて尿蛋白および尿中 sFlt-1 を測定した。プラスミド導入部位での sFlt-1 の発現、糸球体における浸潤細胞、PCNA 陽性細胞、VEGF とその受容体、内皮細胞マーカーとしてのトロンボモジュリン、糸球体上皮細胞マーカーとしてのデスミンならびに上皮細胞関連分子の発現を免疫組織染色、Real-time RT-PCR および Western blot 法により解析した。

## C. 結果

### (1) 遺伝子導入した sFlt-1 の発現

sFlt-1 を導入した筋組織における sFlt-1 染色陽性領域を認めた。加えて導入部位における sFlt-1 mRNA の発現を認めた。さらに 6 日目において尿中 sFlt-1 は高値を示した。この結果より筋肉内投与した sFlt-1 が局所で発現し循環血液中から尿腔に移行したことが確認された。

### (2) sFlt-1 投与に伴う病理学的所見

腎炎発症後 6 日目には両群の糸球体において管内性増殖、壊死性病変なら

びに半月体形成が認められた。しかしながら、両群間には半月体形成率、総細胞数ならびに浸潤細胞数に差はなかった。

VEGF 阻害の長期的効果を検討する目的で、腎炎惹起後 56 日目の組織学的所見を検討した。コンピュータ画像処理により糸球体硬化はマトリックスの沈着部分を、間質線維化はアザン染色で青に染まる部分を抽出し解析した。コントロール群に比較し sFlt-1 群で糸球体硬化ならびに間質線維化が進行していた。

次に電子顕微鏡所見にて検討した。腎炎惹起 6 日目には糸球体上皮細胞足突起の癒合が見られた。一方、sFlt-1 群においてはコントロール群に比して著明な足突起の癒合を認めた。

#### (3) 蛋白尿ならびに血清総蛋白濃度の推移

正常ラットにおいて、sFlt-1 プラスミド導入後軽度の蛋白尿が惹起された。以後 28 日目まで蛋白尿は持続したが、56 日目にはほぼ正常レベルまで減少した。一方、腎炎ラットにおいては、6 日目以降蛋白尿は経時的に増加した。sFlt-1 群において高度の尿蛋白を認めた(図 1)。加えて sFlt-1 群では低蛋白血症が増悪し、と殺時に大量の腹水が認められネフローゼ状態を呈したものと推測した(図 2a)。

#### (4) 腎機能の推移

各群における腎機能を評価する目的で BUN の推移を検討した。腎炎惹起 56 日目には BUN の上昇を認めたが sFlt-1 群でさらに上昇した。以上より

VEGF の阻害により糸球体硬化・間質線維化の増悪を反映して腎機能障害が進行したことが判明した(図 2b)。

#### (5) 上皮細胞関連分子の発現の検討

糸球体上皮細胞障害のマーカーであるデスミンの免疫組織染色を施行した。腎炎惹起により上皮細胞におけるデスミンの発現が見られたが、sFlt-1 群でその発現の亢進を認めた。以上より VEGF 阻害による糸球体上皮細胞障害ならびに蛋白尿の増悪が示された。

糸球体上皮細胞の障害機序をさらに検討する目的で糸球体上皮細胞関連分子について解析した。はじめに抗蛋白尿効果に重要な役割を果たしているネフリンの発現を示す。腎炎惹起によりネフリンの腎内 mRNA 発現は減少したが、VEGF 阻害によりさらに減少した。ウェスタンブロット法によるネフリン蛋白の発現も腎炎により低下したが sFlt-1 群においてさらに低下した(図 3)。代表的な糸球体における免疫組織染色においても同様の所見が得られた。

さらにポドシン、ポドカリキシンおよびポドプラニンといった上皮細胞関連分子の発現を示す。腎炎惹起によりこれらの分子の mRNA 発現はいずれも低下した。ネフリンの発現とは対照的にポドシン、ポドプラニンおよびポドカリキシンといった分子の発現は sFlt-1 による変化がなかった。Western blot 法および免疫組織染色でのポドカリキシン蛋白を検討した結果についても同様に sFlt-1 による変化