

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
遺伝子操作動物による進行性腎障害疾病モデル開発に関する研究分科会
分担研究報告書

「遺伝子操作動物による進行性腎障害疾病モデル開発に関する研究」

分担研究者 林松彦 慶應義塾大学医学部内科学・助教授
研究協力者 佐々木成 東京医科歯科大学医学部腎臓内科・教授
下田耕二 慶應義塾大学医学部実験動物センター・専任講師

研究要旨

Cre-loxPシステムを用いて腎疾患に重要と考えられる遺伝子を腎臓の特定の細胞に過剰発現したマウスを作製し、腎疾患の研究のためのモデルマウスを開発することを目的とする。近位尿細管S3セグメント特異的なCreマウスとして、AQP7-Creマウスを作製したが、十分な組織特異性が得られず、他のプロモーターを用いたCreマウスを再作製している。Creリコンビナーゼ存在下で特定の遺伝子を過剰に発現する、LoxP-hMR、LoxP-LIF、LoxP-IkBDNの3系統のトランスジェニックマウス（LoxP-マウス）を作製し、いずれも数系統の目的とするトランスジェニックマウスを得られた。分与を受けたTie2-CreマウスやNphs1-CreマウスとこれらLoxPマウスを様々な組み合わせることにより、腎臓の特定の細胞に特定の遺伝子を過剰発現するモデルマウスの作製が可能となる。

A. 研究目的

モデル動物作製において、遺伝子操作動物であるトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスは有効な手法であるが、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスでは遺伝子改変がすべての体細胞でおこるため、目的臓器や細胞以外の遺伝子改変の影響を受けたり、遺伝子の過剰発現または欠損によって胎生致死となり目的の動物を得られないという欠点があった。このような欠点を克服する目的で、組織特異的に遺伝子発現をコン

トロールする仕組みとして、Cre-loxPシステムが近年脚光を浴びている。Cre-LoxPシステムについて簡単に説明する。まず、特定の細胞集団に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用することで、特定の細胞にCreリコンビナーゼを発現するCreマウスを作製する。Creリコンビナーゼは2つの並んだLoxP配列を認識して切り出す。次に、相同組み換えによって特定の遺伝子の両端にLoxP配列を2つ挿入したマウス、または、特定の遺伝子の上流に2つのLoxP配列に挟まれ

た Stop コドンを入れたトランスジェンを導入されたトランスジェニックマウス (LoxP マウス) を作製する。Cre マウスと LoxP マウスを交配すると、Cre リコンビナーゼを発現している細胞でのみ遺伝子の欠失または過剰発現を起こすことが可能である。

Cre-LoxP システムを用いて、腎臓の特定の細胞に特定の遺伝子を過剰発現させたマウスを作製することにより、腎疾患の発症、進行を検討し、創薬対象としての可能性を検証するとともに、各因子の役割を確定する。さらに、疾患の進行を促進させることにより、新規治療薬の有用性を短期間で明らかとすることを可能とするようなモデル動物作製を目的とする。

具体的には近位尿細管 S3 セグメント特異的な Cre マウスを作製するとともに、これまで我々が腎疾患で重要であることを見いだしてきた LIF、MR、IkB タンパク (またはそのドミナントネガティブ体) の LoxP マウスを作製し、両者を様々な組み合わせで交配することでモデルマウスを作製する。

B. 研究方法

1. AQP7-Cre マウスの作製

近位尿細管 S3 セグメント特異的な Cre マウスを作製するために、近位尿細管 S3 セグメント特異的な遺伝子発現を認める Aquaporin-7(AQP7)に注目し、AQP7-Cre マウスの作製を行った。AQP7 は近位尿細管の中でも、虚血の影響を受けやすく、尿細管の再生現象がもっとも観察される S3 セグメント

に特異的に発現している。マウスゲノム DNA 鋳型として、AQP7 遺伝子のプロモーター5.7kbp を PCR で増幅し、塩基配列を確認した。AQP7 プロモーターの下流に rabbit beta-globin のイントロン、核移行シグナルのついた Cre リコンビナーゼ cDNA、SV40 由来の polyA シグナルをつなげたものをトランスジェンのコンストラクトとした。KpnI で切断してベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェンの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

AQP7-Cre マウスにおいて、Cre が S3 セグメント特異的な発現パターンを示しているかを検討するために、LoxP-EGFP マウスと交配し、Cre の発現を EGFP で可視化した。

2. LoxP-IkBBDN マウスの作製

LoxP-IkBBDN マウスは Cre 存在下に IkB のドミナントネガティブ体を過剰発現するトランスジェニックマウスである。NFkB は、一般には p65、p50、IkB の三種のタンパク質が形成する三量体をさすが、この三量体はサイトカインあるいは free radical などの刺激が加わると、まず IkB がリン酸化され、遊離する。この IkB が引き続きユビキチン化を受け、代謝酵素により分解される。一方、p65、p50 は遊離して核内に移行し、転写領域にある NFkB コンセンサス配列に結合して転写促進を行う。IkBDN は IkB の N 末端 54 アミ

ノ酸を欠いた変異体であり、リン酸化を受けないために、p65、p50は遊離できない。したがって、IkBDNを過剰発現すると、NFkB活性化を完全に抑制できるところを我々は示している (Takase ら、Kidney Int. 2003;63:501-13)。また、アデノウイルスによるIkBDNの遺伝子導入が尿細管間質病変を抑制することを示している。

東京大学医科学研究所齊藤泉教授より分与されたpCALNL5ベクターを用いることで、CAGプロモーター-LoxP-neo-LoxP-IkBDN cDNAというコンストラクトを作製した。本コンストラクトでは、Creリコンビナーゼ非存在下では、CAGプロモーターによりneoが発現するがIkBDNは発現しない。Creリコンビナーゼ存在下では、LoxPには含まれたneoが切り出され、CAGプロモーターによりIkBDNが発現する。本コンストラクトをSalI-HindIIIで切断し、ベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/Heの受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックの確認はtail DNAをPCRすることで確認した。

Cre存在下でIkBDNが過剰発現することを検討するために、心筋特異的なCreマウス(α -MHC-Creマウス)と交配し、double transgenicマウスの心筋細胞を用いてRT-PCR、Western Blotをおこなった。

3. LoxP-LIF マウスの作製

LoxP-LIFマウスはCre存在下にLIF (Leukemia Inhibitory Factor)を過剰発現するトランスジェニックマウスである。我々は、虚血再灌流モデルにおいて、近位尿細管S3セグメントにLIFが発現し、尿細管の再生を促進していることを報告した (Yoshino ら、J Am Soc Nephrol. 2003;14:3090-101)。

マウス胎児腎臓のRNAよりPCRによって得たLIF cDNAをpCALNL5ベクターに挿入することで、CAGプロモーター-LoxP-neo-LoxP-LIF cDNAというコンストラクトを作製した。本コンストラクトでは、Creリコンビナーゼ非存在下では、CAGプロモーターによりneoが発現するが、LIFは発現しない。Creリコンビナーゼ存在下では、LoxPには含まれたneoが切り出され、CAGプロモーターによりLIFが発現する。本コンストラクトをSalI-HindIIIで切断し、ベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/Heの受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックの確認はtail DNAをPCRすることで確認した。

Cre存在下でLIFが過剰発現することを検討するために、 α -MHC-Creマウスと交配し、double transgenicマウスの心筋細胞を用いてRT-PCR、Western Blotをおこなった。

4. LoxP-hMR マウスの作製

LoxP-hMRマウスはCre存在下にヒトMineralocorticoid Receptor (MR)を過

剰発現するトランスジェニックマウスである。ヒト MR cDNA (Salk 研究所 Evans 博士より分与) を pCALNL5 ベクターに挿入することで、CAG プロモーター-LoxP-neo-LoxP-hMR cDNA というコンストラクトを作製した。本コンストラクトでは、Cre リコンビナーゼ非存在下では、CAG プロモーターにより neo が発現するが、MR は発現しない。Cre リコンビナーゼ存在下では、LoxP にはさまれた neo が切り出され、CAG プロモーターにより human MR が発現する。本コンストラクトを Sall-HindIII で切断し、ベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジーンの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

Cre 存在下で MR が過剰発現することを検討するために、 α -MHC-Cre マウスと交配し、double transgenic マウスの心筋細胞を用いて RT-PCR、Western Blot をおこなった。

(研究の倫理面への配慮)

細胞・動物実験に関しては、倫理面の問題は生じないが、動物愛護上の問題はあり、Helsinki 宣言を遵守し、慶應義塾大学動物実験指針に則って研究を行った。

C. 結果

AQP7-Cre マウスは現在、15 ラインのファウンダーが生まれた、そのうち

7 ラインに RT-PCR で Cre リコンビナーゼの発現が確認できたが、蛋白レベルでは発現が確認できなかった。そこで、Cre レポーターマウスである LoxP-EGFP と交配することによって、EGFP の発現で Cre 発現部位を可視化した。現時点で解析が終了した 5 系統ともほぼ同じような発現パターンであり、目的としていた S3 セグメントにおける発現は認められず、近位尿細管 S1,S2 セグメントに patchy な発現を認めた。また、腎臓以外の臓器での発現は、脂肪、精巣に多かったが、かなり広範な臓器に発現を認めた。以上の結果から本トランスジェニックに用いた AQP7 プロモーターは組織特異性を十分に発揮していないと考えられた。

糸球体内皮細胞および尿細管周囲間質血管内皮細胞に Cre リコンビナーゼを発現する Tie2-Cre マウスをテキサス大学の柳沢教授、ジョージア医科大学の Koni 準教授より分与を受け、系統維持をおこなっている。また、糸球体上皮細胞特異的な Cre 発現マウスとして、東海大学松阪泰二助教授より Nphs1-Cre マウス (ネフリンプロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現するマウス) の分与を受け系統維持を行っている。

一方、これらの Cre マウスと交配すべく、LoxP-IkBDN、LoxP-LIF、LoxP-hMR の 3 系統のトランスジェニックマウスを作製した。LoxP-IkBDN マウスは Cre 存在下に IkB のドミナントネガティブ体を過剰発現するマウ

ス、LoxP-hMR マウスは Cre 存在下にヒトミネラルコルチコイド受容体を過剰発現するマウス、LoxP-LIF マウスは Cre 存在下に Leukemia Inhibitory Factor を過剰発現するマウスである。

LoxP-IkBDN マウスについては、 α MHC-Cre マウスとの交配でスクリーニングをおこない、蛋白レベルでの発現を認めた 2 系統が確保でき、現在、解析を進めている。

LoxP-LIF マウスについては、 α MHC-Cre マウスとの交配でスクリーニングをおこない、mRNA および蛋白レベルで高発現を認めた 3 系統が確保できた。その中で、LIF が正常の数千倍発現する Line10 を中心に解析を進めている。また、 α MHC-Cre マウスとの交配で、心筋特異的に LIF を発現させると心臓においてある Phenotype が出現しており、現在、この点を解析中である。

LoxP-hMR マウスについては、 α MHC-Cre マウスとの交配でスクリーニングをおこない、mRNA レベルで発現を認めた 2 系統が確保できた。

D. 考察

今回作製した AQP7-Cre マウスは少なくとも、当初の目的の S3 セグメント特異的な Cre マウスとして使えないので、プロモーターを他のものに変えて、再度トランスジェニックマウスを作成中である。

3 系統の LoxP マウスについては、Nphs1-Cre マウス、Tie2-Cre マウスとの交配によって、それぞれ、足細胞、

血管内皮細胞に特異的な過剰発現マウスを作成中である。

E. 結論

Cre-LoxP システムを用いたトランスジェニックマウスとして、AQP7-Cre、LoxP-IkBDN、LoxP-LIF、LoxP-hMR というトランスジェニックマウスを作製した。AQP7-Cre マウスは目的の発現パターンを示さなかったが、LoxP の 3 系統は目的のマウスが作製できたと考えており、分与を受けた Cre マウスとの交配で腎臓のモデルマウスを作成中である。

F. 健康危険情報

本研究はヒトを対象とした検討を行っていないので、該当する情報はない。

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

Tsuji M, Monkawa T, Yoshino J, Asai M, Fukuda S, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T. Microarray analysis of a reversible model and an irreversible model of anti-Thy-1 nephritis. *Kidney International* 69(6): 996-1004, 2006.

Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Nishiyama A, Inagami T, Hayashi M. Nonproteolytic Activation of Prorenin Contributes to Development of Cardiac

Fibrosis in Genetic Hypertension. *Hypertension* 47 (5): 894-900, 2006.

Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Hayashi M. Ambulatory blood pressure variability and brachial-ankle pulse wave velocity in untreated hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension* 20(7): 529-536, 2006.

Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Nabi AH, Nishiyama A, Sugaya T, Hayashi M, Inagami T. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 17(7): 1950-1961, 2006.

Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Hayashi M, Inagami T. Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney International* 70(4): 641-646, 2006.

Marumo T, Uchimura H, Hayashi M, Hishikawa K, Fujita T. Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation. *Hypertension* 48(3): 490-496, 2006.

2. 学会発表

林 松彦、「臓器再生治療・最近の知見」第49回日本腎臓学会総会、2006年6月、東京

武光 智子、市原淳弘、金城 雪、迫

田万里代、河内 裕、清水不二雄、林松彦、「高血圧において増加した非蛋白融解的活性化プロレニンの腎糸球体内局在」第49回日本腎臓学会総会、東京、2006年6月

「迫田万里代、市原淳弘、金城 雪、武光智子、林 松彦、中里 優一、中川 寅、鈴木 文昭、培養ヒト血管平滑筋細胞においてプロレニンはアンジオテンシン II 非依存性に ERK をリン酸化する」第49回日本腎臓学会総会、東京、2006年6月

辻 美保子、門川俊明、吉野 純、林松彦、「進行性腎障害におけるサイモシン β 4 および β 10 の役割」第49回日本腎臓学会総会、東京、2006年6月

吉野 純、門川俊明、辻 美保子、林松彦、「腎線維化における転写制御因子 snail の役割と発現調節機構」第49回日本腎臓学会総会、東京、2006年6月

金城 雪、市原 淳弘、武光 智子、迫田 万里代、西山 成、鈴木 文昭、中川 寅、稲上 正、林 松彦、「ヒトプロレニン受容体トランスジェニックラットにおける腎糸球体硬化」第49回日本腎臓学会総会、東京、2006年6月

福田誠一、門川俊明、浅井昌樹、林 松彦、「アルドステロン持続注入ラットにおけるスピロノラクトンとトリアムテレンの腎障害に対する効果の比較」第49回日本腎臓学会総会、東京、2006年6月

Takemitsu T, Ichihara A, Kaneshiro Y,

Sakoda M, Hayashi M, “Glomerular Localization of Prorenin Receptor and Activated Prorenin” , the 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, October 2006, Fukuoka
Fukuda S, Monkawa T, Hayashi M,

“Aldosterone induced proteinuria and renal fibrosis independent of hypertension or its tubular action.” the 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, October

Marumo T, Uchimura H, Hayashi M, Hishikawa K, Fujita T, “Aldosterone reduces vascular endothelial growth factor receptor-2 expression and impairs bone marrow-derived progenitor cell formation.” the 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, October 2006, Fukuoka

Inomata K, Kaneshiro Y, Takahashi H, Takemitsu T, Sakoda M, Hayashi M, Nakagawa T, Suzuki F, Inagami T, Ichihara A “Stimulation of human prorenin receptor directly increases plasma aldosterone levels.”

Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T, Sakoda M, Nishiyama A, Hayashi M, Suzuki F, Inagami T, “Development of renin angiotensin system independent nephropathy in diabetic human prorenin receptor transgenic rats.” the 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, October 2006, Fukuoka

Takahashi H, Takemitsu T, Inomata K,

Kaneshiro Y, Sakoda M, Nakagawa T, Suzuki F, Inagami T, Hayashi M, Ichihara A, “Involvement of nonproteolytic activation of prorenin in progression of diabetic nephropathy.” the 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, October 2006, Fukuoka

疫学に関する調査研究班
分担・各個研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
疫学に関する調査研究班分担研究報告書

「IgA 腎症予後調査 10 年目」

分担研究者 遠藤正之（東海大学医学部・腎内分泌代謝内科）
共同研究者 若井建志（名古屋大学大学院・予防医学）
川村 孝（京都大学・保健管理センター）

研究要旨

IgA腎症の腎機能予後を予測することを目的に、1995年の全国疫学調査で把握された患者について予後調査を実施した。調査は主治医への郵送法で10年後の生命および腎機能予後を調査した。わが国のIgA腎症の10年腎生存率は約85%である。維持透析導入への危険因子は、腎生検時の高血圧、高度蛋白尿、血清クレアチニン値高値、障害度の高い腎生検組織所見であった。

A. 研究目的

わが国におけるIgA腎症患者の予後と進行因子を明らかにするために、1995年のIgA腎症全国疫学調査で把握された患者の10年後の予後調査を行った。

B. 研究方法

1995年に全国の病院から抽出した内科・腎臓内科・小児科で、腎生検によりIgA腎症と診断された5,324人のうち所定のルールで3,409人を選択した。今回は、これまで計3回の追跡ですでに死亡や慢性透析療法への導入が判明した患者を除外した2,214人の生命及び腎機能予後について、主治医宛てに患者個人票を郵送し調査した。

C. 結果

1830例の回答（回答率=82.7%）を

得て、透析導入の有無、または最終予後確認時点が不明の165人を除く2285人を分析対象とした。

新たな維持透析導入患者は45人と判明し、維持透析患者は合計252人となった。また5人の新たな死亡者（腎疾患以外）が判明し、死亡者は合計21人となった。

追跡期間の中間値87ヶ月（interquartile 42-122ヶ月）で、10年後腎生存率は0.849（95%CI, 0.830-0.867）であった。

透析導入への独立した危険因子は腎生検時の高血圧、高度蛋白尿、血清クレアチニン値高値、障害度の高い腎生検組織所見であった。

D. 考察

今回の予後調査における、わが国のIgA腎症の10年腎生存率は約85%で、

10 年前の本研究班からの報告と同じであった。

維持透析導入への危険因子はこれまでの本研究班の調査結果（4 年、7 年後の調査）および諸外国からの報告とほぼ同じで、腎生検時の高血圧、高度蛋白尿、血清クレアチニン値高値、障害度の高い腎生検組織所見であった。

E. 結論

わが国の IgA 腎症の 10 年腎生存率は約 85%で、透析導入危険因子は腎生検時の高血圧、高度蛋白尿、血清クレアチニン値高値、障害度の高い腎生検組織所見であった。

F. 健康危険情報

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

Wakai K, Kawamura T, Endoh M et al.: A scoring system to predict renal outcome in IgA nephropathy: from a nationwide prospective study. *Nephrol Dial Transplant*. 21:2800-2808, 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

「扁桃摘出＋副腎皮質ステロイドパルス療法(扁桃摘パルス療法)の実施状況についての全国アンケート調査結果」

研究協力者 今井裕一 愛知医科大学医学部 腎臓・膠原病内科
共同研究者 三浦直人 北川 渡 山田晴生 佐久間正人 西川和裕
愛知医科大学医学部 腎臓・膠原病内科

研究要旨

IgA腎症に対する扁桃摘出＋副腎皮質ステロイドパルス（扁桃摘パルス）療法の全国実態調査を行なった。848施設にアンケートを配布し317施設から回答が得られた（回収率37.4%）。2004年、2005年、2006年では、年間600名以上実施され、6ヵ月後の尿完全寛解率は32%、12ヶ月後では45.6%であった。扁桃摘パルス療法の尿完全寛解率を50%、ステロイドパルス療法の尿完全寛解率をPozziの成績から最大20%としてRandomized controlled trialのサンプルサイズを計算すると36名となる。ドロップアウトも考慮しても1群50名で十分であることがわかった。ただし、患者背景を厳密に調整する必要がある。

A. 研究目的

IgA腎症の治療法として、わが国の堀田らによって扁桃摘出＋副腎皮質ステロイドパルス（扁桃摘パルス）療法が開発された。尿完全寛解が期待できることが報告されて以来、全国各地で実施されてきている。今回、無作為比較試験(RCT)を実施する際の基礎データを得るために、全国アンケート調査を行なった。

B. 研究方法

全国アンケート調査

2006年10月27日から12月28日の2ヶ月間に、全国の病院に勤務している腎臓専門医にアンケートを郵送し、さらに腎臓学会評議員についてはメーリングリストにて調査を依頼した。診療所およびクリニックを除いた

病院848施設を対象とした。

アンケート内容

①実施状況、②開始時期、③実施症例数、④テストテープ法による、6ヵ月後および12ヶ月後の寛解症例数、⑤臨床比較試験への協力の意思、⑥扁桃摘パルス検討委員会への参加の意思

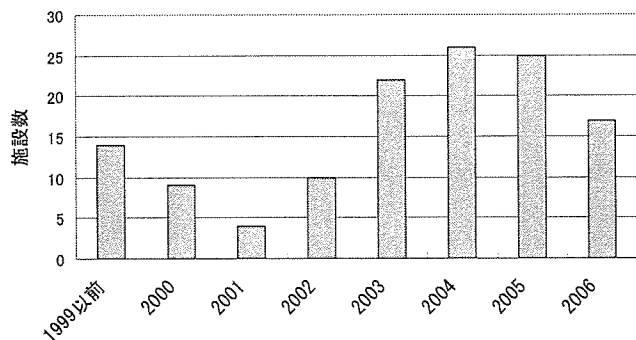
（倫理面への配慮）

患者を特定できる項目は調査していない。

C. 研究結果

1. 回収率と実施施設数：848施設中317施設から回答が得られ、37.4%の回収率であった。地区別では、北海道の61.3%を最高にし、最低は中部地区23.8%の回収率であった。

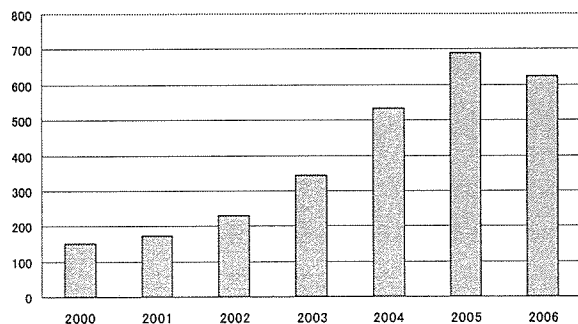
2. 開始時期と開始施設数 施設数：



1999年以前から実施していた施設数は14であったが、2001年に堀田らの論文が掲載されて以降、増加に転じ2004年まで急速に拡大している。年間15～20施設が新たに実施してきている。

3. 実施患者数

2001年までの実施患者数は年間150名程度である。このうちの仙台社会保険病院が約100名であった。しかし、2002年から増加し、2005年、2006年には年間600名以上で実施されている。2000年以降、2746名で実施されている。

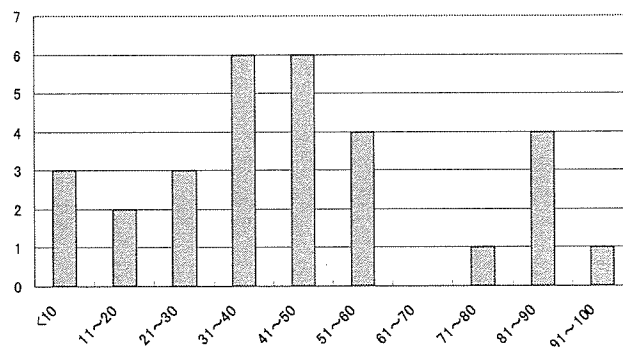


4. 尿完全寛解率

6ヶ月、12ヶ月の治療成績について記載のあった約1000例のデータ（仙台社会保険病院の年間100例のデータを除外）から、6ヵ月後の完全寛解率は、 $347/1085=32\%$ 、12ヶ月後では、 $452/991=45.6\%$ であった。

5. 10例以上実施30施設での尿完全寛解率の比較

これまでの10例以上実施している施設に限って尿完全寛解率を比較してみると、寛解率30%未満の施設が8施設、30-70%が15施設、70%以上が6施設と施設間で大きな差があることがわかった。



D. 考察

今回の検討で以下のことがわかった。

- ① わが国で、年間500～600例のIgA腎症患者で扁桃パルス療法が実施されていること
- ② 2000年以降、2746名で実施されたこと
- ③ 6ヵ月後の尿完全寛解率は、32%、12ヶ月後では、45.6%であったこと
- ④ 尿完全寛解率30%未満の施設が8施設、30-70%が15施設、70%以上が6施設と施設間で大きな差があること

尿完全寛解率に関しては、当施設の21例の成績とほぼ一致していた（尿完全寛解率 6ヶ月 33.3%、12ヶ月 47.1%）。同様に当施設の寛解群と非寛解群の要因を解析すると、①血清クレアチニン値 0.8mg/dl未満（陽性尤度比；8.8，陰性尤度比 0.22）、②正常血圧（陽性尤度比；4.4，陰性尤度比 0.24）、③女性（陽性尤度比；3.3，陰性尤度比 0.14）、④蛋白尿1.1g/日（陽性尤度比；3.0，陰性尤度比 0.27）であった。もし、50%の確率で完全寛解になると予測する

と、そのOddsは1.0となる。その数字と4項目の陽性尤度比あるいは陰性尤度比を順番に掛け合わせると最終のOddが計算できる。Oddsを%確率に変換する。上記3項目以上がある場合は、90%以上の確率となる。一方、1項目以下の場合は、90%以上の確率で抵抗性である。すなわち、RCTにおいては両群間で項目数を厳密に調整する必要がある。

扁摘パルス療法の尿完全寛解率を50%、ステロイドパルス療法の尿完全寛解率をPozziの成績から最大20%と考えてRCTのサンプルサイズを計算すると36名でなる。ドロップアウトも考慮しても1群50名で十分であることがわかった。

E. 結論

年間500-600例が実施されていること、RCTでも1群50例で十分な解析が可能であることからわが国でRCTは早期に実施可能である。ただし、患者背景を厳密に調整しないと信頼性に欠く成績となる危険がある。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miura N, et al: Acute renal failure due to IgM- \square glomerular thrombi and MPGN-like lesions in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Amer J Kidney D 48:E3-E9, 2006

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3 その他 なし

難病特別研究班
分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
難病特別研究班分担研究報告書

「全身性自己免疫疾患の遺伝的背景：*Fcgr2b* 遺伝子の関与」

分担研究者 西村裕之

桐蔭横浜大学・医用工学部 人間科学工学センター

研究要旨

免疫複合体沈着を伴う糸球体腎炎の基盤は免疫系における自己寛容の破綻である。正常な免疫系では獲得免疫系を構成するT細胞とB細胞のそれぞれの発生・成熟過程に監視機構が多重に備えられて自己寛容が維持されるが、自己免疫疾患においては複数の遺伝子多型を背景としてこれらの機序が重複して破綻すると想像される。疾患モデルを用いて自己寛容破綻を基礎づける量的な表現型に着目して連鎖解析を行えば、多段階の自己寛容破綻の遺伝的基礎を明らかにできると期待される。本研究では全身性自己免疫疾患モデルである New Zealand 系マウスにおいて自己寛容破綻を規定する多数の遺伝子座を明らかにし、特に抑制性 Fc 受容体を規定する *Fcgr2b* 遺伝子多型の自己免疫疾患発症における役割を明らかにした。

A. 研究目的

獲得免疫系を構成するT細胞とB細胞の発生・分化・成熟過程にはそれぞれ自己反応性クローンの出現を監視し、抑制する多重のチェックポイントがあって、免疫系の自己寛容が維持されていると考えられる。糸球体腎炎発症を示す自己免疫疾患モデルマウスでは、本来は外来抗原特異的なB細胞クローンにおいて起こるべき、抗体遺伝子の class switch と affinity maturation、さらには抗体産生細胞への分化が、自己反応性B細胞クローンにおいて起きることが示されている。このような疾患モデルについては、糸球体腎炎など、自己免疫病態表現に着目した遺伝連鎖解析が多く試みられ

ているが、自己寛容破綻の遺伝的基盤については未だ不明の点が多い。

このような疾患モデルにおいて自己寛容破綻を基礎づける量的表現型に注目した遺伝連鎖解析を行えば、多段階の自己寛容破綻の分子機序を明らかにできると期待される。我々は多遺伝子が関与する全身性自己免疫疾患モデル、NZB系マウスにおいて、自己寛容破綻に密接に関連すると考えられる、免疫寛容原に対する異常な応答性に着目して責任遺伝子の連鎖解析を行い、自己寛容破綻の遺伝支配を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ウシ IgG (BGG)水溶液を超遠心分離

(100,000g)によって精製して凝集物を除去し、特異的免疫寛容原(Deaggregated BGG: DBGG)とした。正常 C57BL/6 系と NZB 系の F2 intercross マウス(n=221)において、免疫寛容破綻を規定する遺伝子座を検索した。動物実験については、桐蔭横浜大学動物実験委員会の倫理審査を経て承認を得た。

C. 結果

正常 C57BL/6 系マウスは免疫寛容原、DBGG の腹腔内投与(10gm)によって BGG 特異的な免疫寛容を誘導したが、NZB 系マウスではこの免疫寛容誘導がみられなかった。(C57BL/6 x NZB)F₂ intercross マウス(n = 221)においては、DBGG による免疫寛容誘導能は量的形質であり、正常な免疫寛容を示す個体から、NZB 系同様、免疫寛容を誘導しない個体まで多様であった*。個々の F2 マウスについて、ゲノムに散在するマイクロサテライト DNA 多型を調べ、NZB マウスの免疫寛容誘導能の欠如を規定する遺伝子座を *MapManager QTX* プログラムを用いて検索した結果、第 1 染色体テロメア近傍の *D1Mit15* に "highly significant linkage" 第 3 染色体上 *D3Mit109* に "significant linkage" 基準を満たす連鎖を見出した*。*D1Mit15* 近傍に存在する *Fcgr2b* 遺伝子を欠損した C57BL/6 マウスは DBGG によって BGG 特異的な免疫寛容誘導を示さず、第 1 染色体上の責任遺伝子は *Fcgr2b* であることが示唆された。しかし、用

いた *Fcgr2b* 欠損マウスの作成プロセスにおいて、129 系由来の胚性肝細胞 (ES cell) が用いられていたため、*Fcgr2b* 欠損マウスが示した免疫寛容不全の原因が *Fcgr2b* 遺伝子欠損によるものではなく、近傍の *SLAM/CD2* 遺伝子群の 129 系由来ハプロタイプが担う自己免疫疾患感受性に基づくものではないかとの疑問が提唱された (図 1)。そこで、今年度 *Fcgr2b* が関与することを支持するデータを更に得るため、129 系と 129 系・NZB 系と相同な *Fcgr2b* 遺伝子多型を持つ C57BL/6.Ly17.1 congenic 系を含め、Ig サブクラスに着目して DBGG 誘導による免疫寛容を比較した。その結果、129 系は全ての Ig サブクラスによる免疫応答について、C57BL/6 系と同様に正常な免疫寛容誘導を示したのに対し、C57BL/6.*Fcgr2b*^{-/-}系では全ての Ig サブクラスについて免疫寛容の不全がみられた (図 2)。以上の結果より、DBGG による免疫寛容誘導は *Fcgr2b* 遺伝子発現に依存した現象であることが示された。

C57BL/6.Ly17.1 congenic 系マウスにおいては、ほぼ正常に近い免疫寛容誘導が観察された。

D. 考察

Fcgr2b 遺伝子のコードする FcγRIIB は抑制性の ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) を持つ Fc 受容体であり、B 細胞受容体からのシグナルのフィードバック制御に関与し、B 細胞の自己寛容誘導に重要な

役割を果たしていると考えられている。 *Fcgr2B* 遺伝子はプロモーター領域に多型を有し、特に NZB 系ではこの系統にユニークな配列の欠損に基づいて、germinal center B 細胞における FcγRIIB 表現のレベルが異常に低い。このことが、NZB 系マウスの自己免疫疾患感受性に重要な役割を果たしていると考えられる。

NZB 系マウスの *Fcgr2b* 遺伝子多型を持つ C27BL/6.*Ly17.1* 系マウスにおいてはほぼ正常な免疫寛容誘導が観察された。このことは免疫寛容不全に複数の遺伝子多型の組み合わせが必要であることを示すものと考えられ、さらに詳しく検討を行っている。

E. 結論

糸球体腎炎を示す全身性自己免疫疾患モデル NZB 系マウスにおいて、*Fcgr2b* 遺伝子の発現制御異常はこのマウスの自己寛容の破綻に重要な役割を果たしている。同様の機序がヒトの SLE 感受性に寄与していることが最近報告されている。FcγRIIB を介した B 細胞のシグナル伝達の分子機構は自己抗体産生に基づく難治性疾患治療のための創薬ターゲットとして重要である。

* 平成 17 年度研究報告書にて報告

F. 健康危険情報

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. Fujii T, Iida Y, Yomogida M, Ikeda K, Haga T, Jikumaru Y, Ninami M, Nishimura N, Kodera Y, Inada Y, Shirai T, Hirose S and Nishimura H. Genetic control of the spontaneous activation of CD4⁺ Th cells in systemic lupus erythematosus-prone (NZB x NZW) F1 mice. *Genes Immun.* **7**: 647-654 (2006)
2. Nakamura K, Sugawara Y, Sawabe K, Ohashi A, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuji M, Lin Q-S, Nishimura H and Hirose S. Late developmental stage specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *J. Neurosci.* **26**:530-534 (2006)
3. Lin Q-S, Xiu Y, Jiang Y, Tsurui H, Nakamura K, Kodera S, Ohtsuji M, Shiroyiwa W, Tsukamoto K, Amano H, Kinoshita K, Sudo K, Nishimura H, Izui S, Shirai T and Hirose S. Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. *J. Immunol.* **177**: 1646-1654 (2006)
4. Hirose S, Jiang Y, Nishimura H and Shirai T. Significance of MHC class II haplotypes and IgG Fc receptors in SLE. *Springer Semin. Immunopathol.* **28**: 163-174 (2006)

2. 学会発表

1. Fujii T, Jikumaru Y, Haga T, Ikeda K, Nishimura N, Toei J, Mitsui K, Kodera

- Y, Inada Y, Xiu Y, Nakamura K, Shirai T, Hirose S and Nishimura H. Genetic predisposition to systemic autoimmune disease: Studies using mouse models. *Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2006*, Toin University of Yokohama, Japan (2006)
2. Nishimura H, Toei J, Mitsui K, Kodera Y, Hagiwara H and Inada Y, Center for inherited disease research. *Toin University of Yokohama. Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2006*, Toin University of Yokohama, Japan (2006)
3. Haga T, Fujii T, Jikumaru Y, Ikeda K, Isoyama N, Toei J, Mitsui K, Kodera Y, Inada Y, Xiu Y, Nakamura K, Shirai T, Hirose S and Nishimura H. Role of inhibitory Fc γ RIIB in defective immune tolerance in New Zealand Black mice. *Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2006*, Toin University of Yokohama, Japan (2006)
4. 芳賀俊明、藤井琢磨、軸丸由梨、稻田祐二、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之、「NZB系マウスの自己免疫寛容破綻における抑制性Fc受容体Fc γ RIIBの役割」、第36回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)
5. 藤井琢磨、飯田行恭、蓬田雅人、池田賢一、芳賀俊明、軸丸由梨、西村尚樹、稻田祐二、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之、「自己免疫疾患モデルマウスにおける自発的T細胞の活性化を規定している遺伝子」、第36回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)
6. Lin Q, Tsurui H, Nakamura K, Ohtsuji M, Tsukamoto K, Shiroyiwa W, Nishimura H, Shirai T and Hirose S, Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. 第36回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)
7. Ohtsuji M, Shiroyiwa W, Tsukamoto K, Lin Q, Tsurui H, Nakamura K, Kadowaki N, Nishimura H, Shirai T and Hirose S. Possible contribution of neutrophil activation to lupus nephritis”, 第36回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)
8. Hirose S, Ohtsuji M, Shiroyiwa W, Tsukamoto K, Lin Q, Tsurui H, Nakamura K, Nishimura H and Shirai T. IL-4R α polymorphism and its association with lupus nephritis. 第36回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)

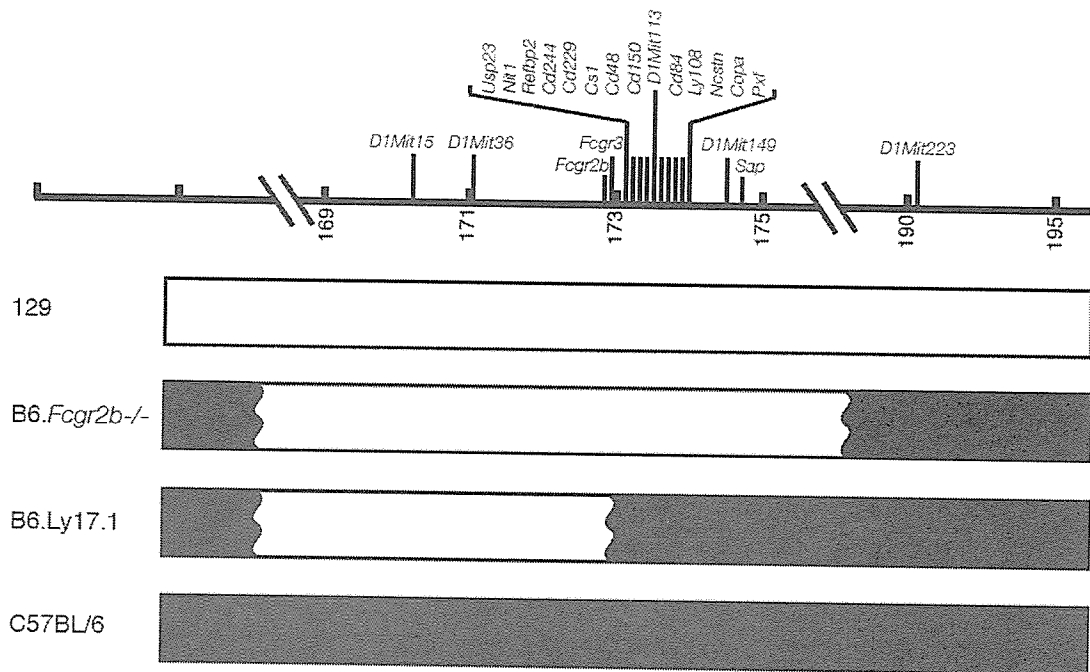


図1 マウス第一染色体テロメア近傍の物理地図。Fc受容体遺伝子族とSLAM/CD2遺伝子複合体を含む領域を示す。地図の下の横棒は、129、C57BL/6. *Fcgr2b*^{-/-}、C57BL/6. *Ly17.1* および C57BL/6 系マウスにおけるこの染色体領域のハプロタイプを示す。129 系統由来は白、C57BL/6 系由来は黒で示す。

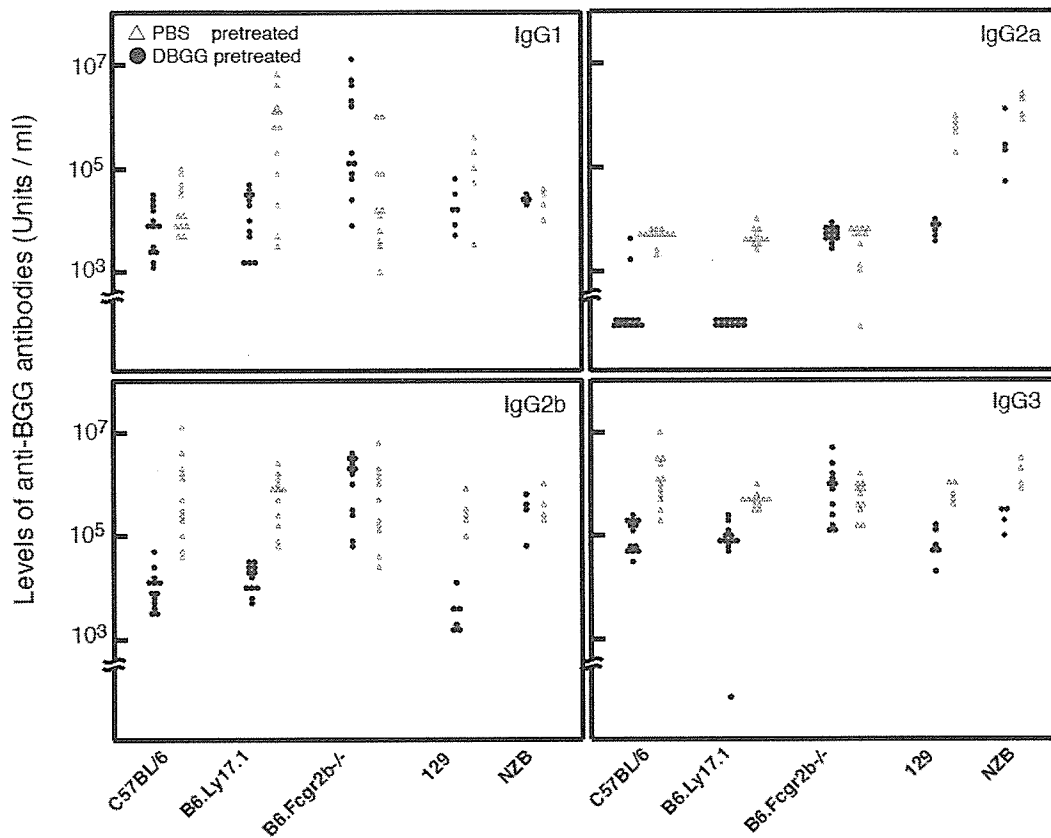


図2 C57BL/6, C57BL/6. *Ly17.1*, C57BL/6. *Fcgr2b*^{-/-}, 129 及び NZB 系マウスにおける免疫寛容誘導。Ig サブクラスごとに免疫応答の程度を示す。3 か月齢マウスを第 0 週および第 1 週において、10mg の超遠心精製ウシ免疫グロブリン(DBGG)を腹腔投与し、第 2 週にフロイントアジュバントとともに 250 μ g の免疫原性を有するウシ免疫グロブリン(BGG)を後肢掌に投与し、第 3 週に眼窩静脈叢より採血し、血清を採取した。ペルオキシダーゼ標識マウス IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} 及び IgG₃ 特異的モノクローナルを用いた ELISA によって BGG 特異的な抗体応答を Ig サブクラスごとに定量した。