●原 著●

実験的半月体形成性腎炎の治療の試み
—モノクローナル抗体を用いた検討—藤中 秀彦^{*1}・原 正則^{*2}・内山 聖^{*1}・矢尾板永信^{*3}
川崎 克俊^{*3}・山本 格^{*3}・木原 達^{*3}

要 旨

半月体形成性腎炎は予後不良の糸球体疾患である。我々は実験モデルでその解析を行なっている。WKY ラットにごく少量の抗糸球体基底膜抗体を投与して得られる半月体形成性腎炎モデルは、CD8陽性リンパ球 (CD8) とそれに続く多数のマクロファージ (Mφ) の糸球体内浸潤を特徴とする。我々はモノクローナル抗体を用いてこれらの細胞浸潤を抑制することにより、この腎炎の発症を抑制することを試みた。1) CD8の抑制により蛋白尿や半月体形成をほぼ完全に抑制できるが、この時糸球体内 Mφ 浸潤も抑制されており、糸球体内 ICAM-1mRNA 発現も低下していた。2) MCP-1のモノクローナル抗体投与により、腎炎4日目ではCD8を抑制せずに Mφ のみを抑制でき、この時蛋白尿が抑制された。以上より、半月体形成性腎炎の発症には浸潤細胞、直接的には特に Mφ の関与が重要であると考えら

れた。

序 言

半月体形成性腎炎は急速な腎機能低下を伴い、早期に腎死に陥る糸球体疾患の代表である。他の糸球体腎炎でも半月体の存在は予後不良の指標とされている。半月体の形成は糸球体毛細血管係蹄壁の破綻に基づくと考えられ、その過程にT細胞やマクロファージなどの糸球体浸潤細胞の関与を想定しうが、詳細についてはまだ不明な点が多い。実験的には、WKY ラットにごく少量の抗糸球体基底膜 (GBM) 抗体を静注することによりほぼ100%に半月体の形成される激しい腎炎を惹起できる。この腎炎の糸球体に浸潤する細胞は、CD8陽性リンパ球 (CD8) とそれに続くマクロファージ (Mφ) である。糸球体への細胞浸潤を抑制することにより、半月体形成性腎炎を抑制できないだろうか？この CD8に対するモノクローナル抗体を予め投与し、CD8を涸渇しておくことにより、この半月体形成性腎炎をほぼ完全に抑制できることを我々は既に示している¹⁾。CD8がどのようにしてこの腎炎に関係しているのだろうか。CD8を涸渇した時、糸球体浸潤Mφ数も有意に減少しており、腎炎発症が CD8の直接的作用なのか、Mφ を介した間接的作用なのかはこれのみでは決定できない。今回我々は この半月体形成性腎炎に直接関与するのは Mφ であり、CD8の関与は Mφ を集積させることによる間接的なものであろうと仮定した。例えばCD8がサイトカインを産生して接着分子 ICAM-1の発現を促進し、これによ

^{*1}新潟大学医学部小児科学教室
(〒951 新潟市旭町通1番町757番地)

^{*2}新潟県立吉田病院小児科

^{*3}新潟大学医学部腎研究施設構造病理学分野
Therapeutic Trials of Experimental Crescentic Glomerulonephritis.

Hidehiko Fujinaka^{*1}, Masanori Hara^{*2}, Makoto Uchiyama^{*1}, Eishin Yaoita^{*3}, Katsutoshi Kawasaki^{*3}, Tadashi Yamamoto^{*3}, Itaru Kihara^{*3}

^{*1}Department of Pediatrics, Niigata University School of Medicine.

^{*2}Department of Pediatrics, Niigata Prefectural Yoshida Hospital.

^{*3}Department of Pathology, Institute of Nephrology, Niigata University.

Key Words : 半月体形成性腎炎
モノクローナル抗体
CD8陽性リンパ球
ICAM-1
マクロファージ

て糸球体へ Mφ を集積させている可能性を考えることができる。今回我々は以下1) 2) について実験的検討を行なった。

1) モノクローナル抗体投与で CD8を予め涸渇させた時、実際にサイトカインや ICAM-1の糸球体内発現が低下するだろうか？

2) CD8を抑制せずに Mφ のみを抑制した時、やはりこの腎炎の発症が抑制されるか。MCP-1 (Macrophage Chemoattractant Protein-1)は、単球/マクロファージ系細胞に特異性の高い走化性因子(ケモカイン)であると言われている。MCP-1に対するモノクローナル抗体を投与して Mφ の糸球体内浸潤のみを抑制した際、この腎炎の発症が抑制されるだろうか？

対象・方法

腎炎は WKY ラットにウサギ抗ラット GBM 血清を体重100gあたり25μl 静注して作製した(対照群)。

1. CD8に対するモノクローナル抗体(MRC-OX8)投与。

MRC-OX8を2日前に投与したラット(実験群)に腎炎を作製し、病変を比較した。投与は静注、および腹腔内投与で、投与量はそれぞれ0.6mg/100g (iv), 2.8mg/100g (ip)とした。両群各4匹ずつを腎炎惹起1時間目、1日目、3日目にそれぞれ屠殺した。細胞浸潤の程度を光顕的に確認し、間接蛍光抗体法で糸球体浸潤 Mφ, CD8, および ICAM-1を染色した。単離糸球体から RNA を抽出し、ICAM-1および文献的に ICAM-1の発現を亢進すると言われるサイトカイン(IL-1, TNFα, IFNγ)²⁾³⁾の mRNA を Ribonuclease protection assay 法⁴⁾で検出した。

2. MCP-1に対するモノクローナル抗体(C4)投与。

C4を前日から連日投与したラット(実験群)に腎炎を作製し、病変を比較した。投与は静注、および腹腔内投与1日1回ずつとし、投与量はいずれも2mg/100gとした。両群各5匹ずつを腎炎4日目、8日目にそれぞれ屠殺した。投与前日、および屠殺前日の1日蛋白尿を測定した。細胞浸潤の程度や半月体を光顕的に確認し、間接蛍光抗体法で糸球体浸潤 Mφ, CD8を染色した。単離糸球体から RNA を抽出し、MCP-1の mRNA を Ribonuclease protection assay 法で検出した。

成績

1. CD8に対するモノクローナル抗体(MRC-OX8)投与。

図1 糸球体における ICAM-1の mRNA 発現。
CD8に対するモノクローナル抗体投与により、糸球体の ICAM-1 mRNA の発現は1時間、1日、3日のいずれの時点でも低下した。

MRC-OX8投与により、この腎炎10日目までの蛋白尿、11日目までの半月体形成および糸球体への Mφ, CD8の浸潤をほぼ完全に抑制できる。糸球体の ICAM-1 mRNA の発現は1時間、1日、3日の各時点でいずれも低下していた(図1)。また間接蛍光抗体法における糸球体の ICAM-1の染色性も同様に低下していた(図2a,b)。またCD8の涸渇によって、糸球体におけるサイトカインの mRNA 発現にも種々の程度の低下がみられ、特に TNFα の mRNA 発現は ICAM-1と同様に各時点で低下していた。

2. MCP-1に対するモノクローナル抗体(C4)投与。

C4の投与によって、4日の時点では光顕所見の軽快を認め(図3a,b)、また糸球体浸潤 Mφ 数(図4)、および蛋白尿(図5)ともに有意の減少が認められたが、CD8には差がなかった。4日目では、C4の投与によって、糸球体浸潤 Mφ 数の減少は34.7%であった。8日目では蛋白尿、糸球体浸潤 Mφ およびCD8数、半月体形成に差がみられなかった。MCP-1の mRNA は、4日目では65.5%低下していたが、8日目では差がなかった(図6)。

考 察

半月体構成細胞として従来より Bowman 嚢上皮細胞の他、Mφ⁵⁾⁶⁾の、最近ではT細胞の存在⁷⁾⁸⁾がそれぞれ報告されているが、これらの細胞が実際どのように半月体形成に関与しているのかは不明な点が多い。我々は以前よりこの半月体形成性腎炎モデルにおいて、各種モノク

a.

b.

図2 糸球体の ICAM-1発現 (間接蛍光抗体法)。

CD8に対するモノクローナル抗体投与により、糸球体の ICAM-1の染色性は低下した。a は対照群、b は実験群。共に3日目の糸球体を示した。

ローナル抗体を用いて糸球体への細胞浸潤を抑制する試みを行なっている。具体的には CD8に対するモノクローナル抗体を投与して CD8の糸球体への浸潤をブロックすると、蛋白尿や半月体がほぼ完全に抑制された¹⁾。また接着分子 ICAM-1, LFA-1に対するモノクローナル抗体投与によって、糸球体への細胞浸潤、蛋白尿や半月体形成を用量依存性に抑制できた⁹⁾。今回の検討で、CD8を潤濁させると ICAM-1発現が低下することが示された。これは CD8が糸球体への細胞浸潤を起こさることによって、半月体形成に関与している可能性を支持するものである。そこで次に Mφ を特異的に炎症局所に集積させる可能性のあるケモカイン MCP-1を、モノクローナル抗体を用いてブロックすることにより、CD8の糸球体浸潤を変えずに Mφ の浸潤だけを抑制できないかと考えて実験を行なった。

実験群では対照群と比較し、腎炎4日目で糸球体浸潤 Mφ が34.7%減少し、この時蛋白尿が66.2%抑制され

a.

b.

図3 糸球体光顕所見。

MCP-1に対するモノクローナル抗体投与によって、糸球体細胞浸潤は明らかに軽減した。a は対照群、b は実験群。共に4日目の糸球体を示した。

ていた。糸球体浸潤 CD8には差がなかったことから、この腎炎モデルにおける糸球体障害は、直接的には Mφ によるものと考えられた。なお MCP-1に対するモノクローナル抗体投与で糸球体浸潤 Mφ を完全には抑制できなかったのは、抗体投与量が不十分であったためか、あるいは Mφ の浸潤に MCP-1以外の因子も関与するためかと考えられる。腎炎8日目で糸球体浸潤 Mφ を有意に抑制できなかった理由も同様に考えられる。腎炎4日目で差が出たのに8日目で差がなくなったのは、あるいはラットが MCP-1のモノクローナル抗体に対する抗体を産生するようになるためかもしれない。MCP-1に対するモノクローナル抗体投与で、少なくとも今回の投与方法では腎炎8日目における半月体の形成を抑制できなかった。この時点で糸球体浸潤 Mφ 数を有意に抑制できるように投与方法をさらに検討する必要があると思われる。

MCP-1の産生細胞については糸球体固有の細胞^{10)~13)}

図4 糸球体浸潤 Mφ 数。

4日目では実験群で糸球体浸潤 Mφ 数の有意な低下が見られた ($p < 0.01$) が、8日目では差がなかった。

図5 蛋白尿。

4日目では実験群で蛋白尿の有意な低下が見られた ($p < 0.01$) が8日目では差がなかった。

および浸潤細胞¹⁴⁾のいずれにもその可能性があるが、MCP-1の mRNA 発現が、腎炎4日目で Mφ の浸潤減少に伴って低下したことから、Mφ 自身が autocrine and/or paracrine 的に産生している分が大きいと思われる。

以上からこの腎炎モデルにおける半月体形成機序を考えてみる。まず糸球体に CD8が浸潤しこれが TNF α などのサイトカイン産生に関係して糸球体内 ICAM-1の発現を促進する。これによって糸球体に Mφ が集積し、これがさらに MCP-1を産生して Mφ の集積を増強させ

図6 糸球体における MCP-1の mRNA 発現。

MCP-1の mRNA は、4日目でのみ明らかな低下が見られた。レーン1：正常，レーン2：対照群4日，レーン3：実験群4日，レーン4：対照群8日，レーン5：実験群8日。

糸球体障害が進行する，というものである。はじめに CD8が浸潤するメカニズム，Mφ が実際どのように糸球体を障害して半月体形成に至るのか，また CD8自体があるいは Mφ を介さずに直接糸球体障害に働くメカニズムがあるのかどうか，などが今後の解析を要する問題と思われる。

結 論

糸球体細胞浸潤をモノクローナル抗体を用いてブロックすることにより，半月体形成性腎炎を治療する可能性が示され，半月体形成機序に浸潤細胞，特に Mφ の関与が重要であると思われる。

文 献

- 1) Kawasaki, K., Yaoita, E., Yamamoto, T., Kihara, I.: Depletion of CD8-positive cell in nephrotic serum nephritis of WKY rats. *Kidney Int.* 41: 1517-1526, 1992.
- 2) Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A., Springer, T. A.: Induction by IL-1 and interferon gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 137: 245-254, 1986.
- 3) Pober, J. S., Gimbrone, M. A., Lapierre, L. A., Mendrick, D. L., Fiers, W., Rothlein, R., Springer, T. A.: Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol.* 137: 1893-1896, 1986.
- 4) Gilman, M.: Ribonuclease protection assay. In: Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., Ed. *Current Protocols in Molecular Biology*: Green Publishing and Wiley-Inters-

- ciences, New York : 4.7.1-4.7.8, 1991.
- 5) Sarno, E. N., Alvarenga, F. B. F., Ruzany, F., Gattas, C. R. : Distribution of mononuclear phagocytes in glomerulonephritis with crescents. *Nephron* 32 : 265, 1982.
 - 6) Hancock, W. W., Atkins, R. C. : Cellular composition of crescents in human rapidly progressive glomerulonephritis identified using monoclonal antibodies. *Am J Nephrol.* 4 : 177-181, 1984.
 - 7) Nolasco FEB, Cameron JS, Hartley B, Coelho, A., Hildreth, G., Reuben, R. : Intraglomerular T cells and monocytes in nephritis: Study with monoclonal antibodies. *Kidney Int.* 31 : 1160-1166, 1987.
 - 8) Li H-L, Hancock W.W, Dowling JP Atkins, R.C. : Activated (IL-2R+) intraglomerular mononuclear cells in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 39 : 793-798, 1991.
 - 9) Kawasaki, K., Yaoita, E., Yamamoto, T., Tamatani, T., Miyasaka, M., Kihara, I : Antibodies against intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 prevent glomerular injury in rat experimental crescentic glomerulonephritis. *J Immunol.* 150 : 1074-1082, 1992.
 - 10) Natori, Y., Sekiguchi, M., Natori, Y., Nakao, N., Yamabe, H. : Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by cytokine-treated glomerular epithelial cells (GECs). *J Am Soc Nephrol.* 4 : 623, 1993 (abstract).
 - 11) Rovin, B. H., Yoshimura, T., Tan, L. : Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by human mesangial cells. *J Immunol.* 148 : 2148-2153, 1992.
 - 12) Satoriano, J. A., Hora, K., Shan, Z., Stanley, E. R., Mori, T., Schlondorff, D. : Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN- γ , tumor necrosis factor- α , IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol* 150 : 1971-1978, 1993.
 - 13) Kakizaki, Y., Waga, S., Sugimoto, K., Tanaka, H., Nukii, K., Takeya, M., Yoshimura, T., Yokoyama, M. : Production of monocyte chemoattractant protein-1 by bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* 48 : 1866-1874, 1995.
 - 14) Leonard, E. J., Yoshimura, T. : Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunology Today* 11 : 97-101, 1990.