総 説

レチノイン酸によるループス腎炎の治療

木下 浩二, 船内正憲

Therapeutic effect of retinoic acid in lupus nephritis

Koji KINOSHITA and Masanori FUNAUCHI

Department of Nephrology and Rheumatology, Kinki University Faculty of Medicine, Osaka-Sayama, Osaka Japan

(Received October 17, 2011)

summary

Lupus nephritis is a major cause of morbidity and mortality among patients with systemic lupus erythematosus (SLE). In these patients, treatment with immunosuppressive agents can significantly improve the outcome of lupus nephritis. However, these agents have severe adverse reactions and some patients are refractory to those therapies. Retinoids, a group of natural and synthetic derivatives of vitamin A, play important regulatory roles of cellular proliferation, differentiation and apoptosis. They have been used for the treatment of acute promyelocytic leukemia and inflammatory disorders such as psoriasis and acne. It has also been shown that retinoids have therapeutic effects in various animal models of kidney disease, including lupus nephritis. Based on these findings, retinoids are a promising agent for the treatment of lupus nephritis. We studied the clinical effects of retinoid therapy in patients with lupus nephritis. In open clinical trial, 7 patients with active lupus nephritis that was refractory to steroid therapy were studied. In all these patients, retinoid was added to the immunosuppressive therapy and its therapeutic effects were evaluated. As a result, 4 out of 7 patients showed improvement of the clinical symptoms and laboratory findings, including urinary protein and anti-dsDNA antibody levels. No important adverse effects of ATRA therapy were observed in all patients. Thus, retinoids might be indicated in cases of lupus nephritis that are refractory to conventional immunosuppressive therapy.

Key words—lupus; retinoid; nephritis

抄 録

ループス腎炎は、全身性エリテマトーデス (SLE) の主要な臓器障害であり生命予後に大きな影響を与えている。その治療には副腎皮質ステロイド薬やシクロフォスファミドなどの免疫抑制薬を使用し一定の効果をあげているが、しばしばそれらの副作用等により治療に難渋することがある。レチノイン酸は、ビタミン A の誘導体の総称であるが、細胞の分化増殖やアポトーシスに重要な役割を演じていることが知られている。以前から抗腫瘍効果に注目され急性前骨髄性白血病の治療に用いられているが、近年、レチノイン酸の持つ免疫調節作用を利用して、種々の動物モデルを用いた研究において自己免疫疾患や腎疾患にも治療効果を示すことが明らかになってきた。SLE においても、その自然発症モデルである NZB/WF1 マウスにレチノイン酸を投与することにより、生存期間を著明に延長させるとともに、蛋白尿の抑制、腎組織障害の改善効果が報告されている。さらに活動期ループス腎炎症例に対する臨床試験では 7 例中 4 例にネフローゼ症状および血清免疫学的異常の改善を認め、また重篤な副作用を認めなかったことから、レチノイン酸がループス腎炎の新しい治療薬となり得ることが示唆された。

はじめに

全身性エリテマトーデス (SLE) は、腎臓を含めた全身の諸臓器を侵す代表的な自己免疫疾患であり、その発症には、抗 DNA 抗体をはじめとする自己抗体や自己反応性リンパ球、サイトカインバランスの不均衡などの免疫調節異常が密接に関与してい

る。SLE の治療としてはこれらの自己免疫異常を是正するための副腎皮質ステロイド薬、シクロフォスファミドなどを用いた免疫抑制療法が行われ、一定の効果をあげているが、ときに易感染性や悪性腫瘍の誘発といった重篤な副作用により治療に難渋することがあり、より効率的に免疫異常を是正し副作用の少ない治療薬が待ち望まれている。近年、ビタミン A の誘導体であるレチノイン酸が免疫調節作用を持ち、自己免疫疾患の治療薬としての可能性が

示唆されている¹⁾。本稿では、SLEの代表的臓器障害であるループス腎炎に対するレチノイン酸の治療効果について、今までの報告に加えわれわれの最近の知見についても紹介する。

レチノイン酸

レチノイン酸 (retinoic acid : RA) はビタミン A の誘導体の総称であり、all-*trans*-RA (ATRA), 9-*cis*-RA (alitretinoin) や 13-*cis*-RA (isotretinoin) があり、核内に存在するレチノイン酸受容体 retinoic acid receptor (RAR) や retinoic X receptor (RXR) と特異的に結合し、核内転写因子を調節することにより生体内において細胞の分化増殖、アポトーシス、組織発生、恒常性の維持に重要な役割を果たしている²⁾。臨床においてレチノイン酸は、以前よりその抗腫瘍効果に注目され、急性前骨髄球性白血病の治療薬³⁾や乾癬やざ瘡などの皮膚疾患に使われている^{4,5)}。また、ビタミン A 欠損マウスを用いた研究で、ビタミン A が Th1 免疫応答を抑制し、Th2 応答が促進することや¹⁾、さらにレチノイン酸が Th1 への分化を抑制するといった⁶⁾、レチノイン酸の持つ免疫調節作用により自己免疫疾患に対する新たな治療薬となることが期待されるようになってきた。

レチノイン酸と自己免疫疾患

レチノイン酸は未だ臨床現場では自己免疫疾患の治療薬としては確立されていないが、いくつかの実験モデル動物の研究において有効性が示されている。例えば、多発性硬化症のモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) は、疾患惹起性 T 細胞は Th1 タイプであり、レチノイン酸の投与により、Th1/Th2 バランスを Th2 優位の状態に変化させ EAE の発症を抑制することが報告されている⁷⁾。またコラーゲン誘発関節炎 (CIA) においても、レチノイン酸は TNF- α , IL-6 などのサイトカイン産生を抑制し関節炎の発症増悪を抑制した⁸⁾。

レチノイン酸と腎疾患

レチノイン酸はさまざまな実験的腎疾患モデルに対しても予防的、および治療の効果を有することが報告されている。メサングウム増殖性腎炎のモデルである Thy1.1 糸球体腎炎では、レチノイン酸はメサングウム細胞のオステオポンチン、フィブロネクチン、MCP-1, iNOS などの発現を抑え、その増殖を

抑制することにより腎炎の発症を抑制する^{9,10)}。また微小変化型腎症のモデルである Puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症はポドサイトの障害によるネフローゼ症候群が特徴であるが、レチノイン酸の投与により PAN で誘導される足突起のアポトーシスを抑制するとともに MCP-1 やフィブロネクチンの発現を抑え、間質への細胞浸潤も抑制することによりネフローゼが改善される¹¹⁾。さらに、一側尿管結紮 (UUO) モデルでは、MCP-1, TGF- β 1, I 型コラーゲンなどの発現を抑えることにより腎間質の線維化を抑制した¹²⁾。

ループスモデルマウスに対するレチノイン酸の治療効果

NZB/WF1 マウスは、SLE の代表的モデルマウスであり、生後 5 か月齢から自然産生される抗 DNA 抗体を含む多彩な自己抗体や自己反応性リンパ球を介して、ヒトループス腎炎に酷似した免疫複合体型糸球体腎炎を発症し、腎不全のために死亡する (50%生存率約 8 か月)。その病態には、IL-4, IL-6, IL-10 等の Th2 サイトカインのみならず、IFN- γ や IL-2 などの Th1 サイトカインも重要な役割を演じているとされる^{13~16)}。

われわれはループスモデルマウスに対するレチノイン酸の治療効果を検討する目的で以下の実験を行った¹⁷⁾。3 か月齢の NZB/WF1 マウスを 2 群に分け、一方には ATRA 0.5 mg を、もう一方には生理食塩水 (コントロール) を週 3 回、7 か月間腹腔内投与した (n=8)。その結果、ATRA 投与群は、コントロール群に比べ有意に生存率が延長し、投与 7 か月後 (10 か月齢時) コントロール群では 8 匹中 3 匹 (37.5%) が生存しているのみであったのに対し ATRA 投与群では 8 匹中 6 匹 (75%) が生存して

図1 ATRA投与群とコントロール群の生存率、蛋白尿出現率の比較
文献¹⁷⁾より引用改変。

コントロール群 ATRA投与群

図2 マウス腎組織の比較。A, コントロール群; 免疫複合体型腎炎像を示す。硬化した糸球体 (太い矢印), 変性した尿細管 (星印), 炎症細胞浸潤 (細い矢印)。B, ATRA 投与群; ほぼ正常の腎組織像を示す。文献¹⁷⁾より引用改変

いた (図 1A)。さらに腎障害の指標である蛋白尿の出現率をみると、コントロール群では 4 か月齢で蛋白尿が出現し始め、10 か月齢では 75% のマウスで陽性になるのに対し、ATRA 投与群では有意に蛋白尿の出現率が抑制され、10 か月齢で 12.5% のマウスが陽性になるのみであった (図 1B)。また病理組織学的検索の結果、いずれのマウスも死因は腎不全と考えられた。この結果から、ATRA がループス腎炎の発症を抑制することにより、NZB/WF1 マウスの生存率を改善させることが示唆された。

さらに両群 (8 か月齢) の腎組織を免疫病理学的に検討した。NZB/WF1 マウスにみられるループス腎炎の組織学的特徴は、いわゆる免疫複合体型腎炎であり、糸球体メサンギウム基質の肥厚、細胞増生や係蹄毛細血管壁の肥厚 (wire-loop 病変)、間質の細胞浸潤、尿細管の萎縮、変性が認められ、また蛍光抗体法で糸球体に IgG および補体の顆粒状沈着が認められることが知られている。コントロール群の腎組織像も、典型的な免疫複合体型腎炎像を示し、炎症細胞浸潤が多数認められるのに対し (図 2A)、ATRA 投与群では、腎糸球体、尿細管、間質は正常に近いものであり、細胞浸潤も認めなかった (図 2B)。同様に、蛍光抗体法でも ATRA 投与群ではコントロール群に比べて、糸球体の IgG 沈着が有意に抑制されていた。

NZB/WF1 マウスでは、抗 DNA 抗体がループス腎炎の発症、増悪に密接に関連していることから、ATRA が NZB/WF1 マウスの抗 DNA 抗体産生におよぼす影響を比較検討した。両群 (8 か月齢) のマウスから血清を採取し ELISA 法により抗 DNA 抗体価を測定した結果、ATRA 投与群では、コン

図3 ATRA 投与群とコントロール群の抗 DNA 抗体価の比較
p<0.05.
文献¹⁷⁾より引用改変。

図4 ATRA 投与群とコントロール群のサイトカイン発現量の比較
p<0.05.
文献¹⁷⁾より引用改変。

コントロール群に比べ、全 IgG 抗 DNA 抗体および IgG2a 抗 DNA 抗体産生を有意に抑えた (図 3)。

さらに、ATRA が NZB/WF1 マウス脾臓 CD4 T 細胞のサイトカイン発現に与える影響の有無を検討した。両群のマウスから脾臓 CD4 T 細胞を採取し、RT-PCR 法により Th1 サイトカイン (IL-2, IFN-γ)、Th2 サイトカイン (IL-4, IL-10) の発現量を比較

した (図 4)．従来の報告では、レチノイン酸は T 細胞による Th1 サイトカインの産生を抑制するとされている¹⁸⁻²⁰⁾．今回の我々の結果からも、ATRA は T 細胞による Th1 サイトカインの産生、特に IFN- γ を強く抑制し、IgG2a アイソタイプの抗 DNA 抗体の産生を抑制した．IFN- γ は NZB/WF1 マウスの自己免疫病態に重要な役割を果たしていることが知られている^{21,22)}．また IFN- γ は IgM を IgG2a にクラススイッチさせる働きも持つが、IgG2a 抗 DNA 抗体は NZB/WF1 マウスにおいて腎炎発症に密接に関係しているといわれている²³⁾．このことから、ATRA は IFN- γ の発現を抑制することにより、IgG2a 抗 DNA 抗体の産生、さらに腎糸球体の IgG2a の沈着を抑え、その結果、重篤な免疫複合体型腎炎の発症を防いだものと考えられた．

以上より ATRA 投与により NZB/WF1 マウスの生存率および腎炎の改善を認めたが、ATRA による Th1 細胞の機能の抑制がその一因であることが示唆され、SLE の病態ならびに治療法を開発する上で非常に有意義な知見であると考えられた．

さらにわれわれは臨床応用に先立ち、ループス腎炎の治療においてレチノイン酸が実際に副腎皮質ステロイド薬との相乗効果およびステロイド薬の減量効果があるのかをループスモデルマウスにレチノイン酸とステロイド薬を併用投与して検討した²⁴⁾．その結果単独ではそれほどの治療効果を表わさない程度の少量のレチノイン酸であってもステロイド薬と併用することにより著明に抗 DNA 抗体産生、炎症性サイトカイン産生、腎組織障害を是正し、生存率および蛋白尿を改善しうることが示されレチノイン酸がヒトループス腎炎の治療薬として有用である可能性が示唆された．

レチノイン酸のループス腎炎治療への臨床応用

ステロイド抵抗性のループス腎炎に対するレチノイン酸の有効性、安全性を検討する目的で表 1 に示す選択基準、除外基準を満たす 7 例の SLE 患者に本人の承諾を得た上で ATRA を投与した．尚、本

表 1

対象疾患	SLE の診断 (分類) 基準 (ACR) により SLE と診断されたループス腎炎患者
選択基準	<ol style="list-style-type: none"> 18 歳以上 プレドニゾロン換算 10 mg 以上のステロイド薬が投与され、次のいずれも該当する患者 <ol style="list-style-type: none"> 一日尿蛋白量 0.5 g 以上 免疫学的活動性を有する患者 <ol style="list-style-type: none"> 抗 dsDNA 抗体価 > 10 IU/ml 補体 CH50 < 30 U/ml 治験への参加について本人より同意の得られた患者
除外基準	<ol style="list-style-type: none"> 妊娠中または妊娠を希望する女性 肝機能障害を有する患者 高脂血症を有する患者 本剤投与開始前 8 週以内にステロイド薬の増量など尿蛋白に影響を与える薬剤の投与を行った患者 糖尿病 (HbA1c > 8%) を有する患者 血清クレアチニンが 1.5 mg/dl 以上の患者

表 2 患者背景

患者 No	性別	年齢	罹病期間 (年)	腎生検 (WHO 分類)	ステロイド投与量 (PSL 換算 mg)
1	女性	47	1	IV	20
2	女性	38	4	IV	30
3	女性	37	2	IV	12.5
4	女性	27	7	IV	35
5	女性	31	15	—	15
6	女性	28	9	—	25
7	女性	59	23	—	10

表 3 ATRA 治療開始時検査データ

患者 No	蛋白尿 (g/日)	尿潜血 (毎視野)	血清アルブミン (g/dl)	血清クレアチニン (mg/dl)	抗 DNA 抗体 (U/ml)	補 体 (CH50)
1	2.7	30~49	2.5	0.76	13	29
2	6.4	>100	2.5	0.59	13	20
3	0.6	1~4	3.8	0.76	70	21
4	6.2	>100	1.7	0.55	5	28
5	3.0	1~4	4.0	0.95	24	25
6	5.9	1~4	1.8	1.11	70	27
7	1.5	1~4	4.0	0.64	18	14

臨床試験は近畿大学医学部倫理委員会の承諾を得たものである。対象症例7例の患者背景は、全員が女性、平均年齢は34.8歳、平均罹病期間は 8.7 ± 7.8 年、腎生検の所見は施行した4例すべてWHO-IV型、平均ステロイド投与量はプレドニゾロン(PSL)換算で 20.7 ± 9.8 mgであった(表2)。また、治療開始時の検査データは表3のとおりである。この活動性ループス腎炎患者7症例に対しATRA(トレチノイン)10 mgを1日1回6ヶ月間投与し、表4に示す観察項目を比較検討した。その結果、投与した7例中4例にネフローゼ症候群の効果判定基準の完全寛解に達するとともにいずれの観察項目においても改善傾向を認めた(表5, 図5)。残り3例は効果不十分にて投与3ヶ月で中止となった。ATRAによる肝機能障害、脂質代謝異常、精神症状、皮膚症状を含む重篤な副作用はいずれの症例においても認められなかった。ATRA著効例の臨床経過を図6に示す²⁵⁾。症例は47歳女性。1997年顔面紅斑、抗核抗体、抗DNA抗体、リンパ球減少を認めたためSLEと診断し経過観察していた。2006年4月下肢浮腫が出現したため、腎生検を行いループス腎炎

(WHO-IV)と診断しPSLを増量投与するも改善せず、レチノイン酸の経口投与を開始したところ、急速に蛋白尿の軽減、血清蛋白の増加および抗DNA抗体、補体価の改善を認めた。

ま と め

ループス腎炎モデルを含めた自己免疫疾患、腎疾患モデル動物に対するレチノイン酸の抗炎症効果が解明されつつある。それによれば従来の免疫抑制薬とは違った作用機序を持つことから、これまで治療抵抗性であったり副作用等のため治療に難渋した症例に対する次の一手として大いに期待が持てそうである。実際、活動期ループス腎炎症例に投与したところ7例中4例にネフローゼ症状および血清免疫学的異常の改善を認め、また重篤な副作用を認めなかった。今後さらに症例数が増え、詳細な検討が加えられることにより、レチノイン酸がループス腎炎の新しい選択枝の一つとなることを期待して稿を終える。

表4 評価項目

1. 蛋白尿 (g/日)
2. 尿潜血 (/毎視野)
3. 血清アルブミン (g/dl)
4. 血清クレアチニン (mg/dl)
5. 抗DNA抗体 (U/ml)
6. 補体 (CH50)

表5 腎疾患アウトカム

患者No	ATRA継続症例	ATRA中断症例(投与月数)
1	完全寛解	
2	完全寛解	
3		不応例(3ヶ月)
4	完全寛解	
5	完全寛解	
6		不応例(3ヶ月)
7		不応例(3ヶ月)

図5 各観察項目の推移

図6 症例1 臨床経過

文 献

- 1) Cantorna, M. T., et al. : In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. *J. Immunol.* **152** : 1515-1522, 1994.
- 2) 深澤弘志, ほか : レチノイドによる自己免疫疾患の治療. 日本臨床免疫学会会誌 **29** : 114-126, 2006.
- 3) Huang, M. E., et al. : Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* **72** : 567-572, 1988.
- 4) Ward, A. et al. : Etretinate : a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in psoriasis and other skin disorders. *Drugs.* **26** : 9-43, 1983.
- 5) Peck, G. L., et al. : Isotretinoin versus placebo in the treatment of cystic acne : a randomized double-blind study. *J. Am. Acad. Dermatol.* **6** : 735-745, 1982.
- 6) Iwata, M., et al. : Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int. Immunol.* **15** : 1017-1025, 2003.
- 7) Racke, M. K., et al. : Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course. *J. Immunol.* **154** : 450-458, 1995.
- 8) Nozaki, Y., et al. : Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis. *Clinical Immunology.* **119** : 272-279, 2006.
- 9) Wagner, J., et al. : Retinoic acid reduces glomerular injury in a rat model of glomerular damage. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11** : 1479-1487, 2000.
- 10) Lehrke, I., et al. : Retinoid receptor-specific agonists alleviate experimental glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282** : 741-751, 2002.
- 11) Moreno-Manzano, V., et al. : Retinoids as a potential treatment for experimental puromycin-induced nephrosis. *Br. J. Pharmacol.* **139** : 823-831, 2003.
- 12) Kishimoto, K., et al. : Therapeutic Effect of Retinoic Acid on Unilateral Ureteral Obstruction Model. *Nephron Exp. Nephrol.* **118** : e69-e78, 2011.
- 13) Finck, B. K., et al. : Interleukin 6 promotes murine lupus in NZB/NZW F1 mice. *J. Clin. Invest.* **94** : 585-591, 1994.
- 14) Santiago, M. L., et al. : Interleukin-4 protects against a genetically linked lupus-like autoimmune syndrome. *J. Exp. Med.* **185** : 65-70, 1997.
- 15) Takahashi, S., et al. : Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice. *J. Clin. Invest.* **97** : 1597-1604, 1996.
- 16) Nakajima, A., et al. : Roles of IL-4 and IL-12 in the development of lupus in NZB/W F1 mice. *J. Immunol.* **158** : 1466-1472, 1997.
- 17) Kinoshita, K., et al. : Retinoic acid reduces autoimmune renal injury and increases survival in NZB/W F1 mice. *J. Immunol.* **170** : 5793-5798, 2003.
- 18) Felli, M. P., et al. : Retinoic acid-induced down-regulation of the interleukin-2 promoter via cis-regulatory sequences containing an octamer motif. *Mol. Cell. Biol.* **11** : 4771-4778, 1991.

- 1991.
- 19) Cippitelli, M., et al. : Retinoic acid-induced transcriptional modulation of the human interferon- γ promoter. *J. Biol. Chem.* **271** : 26783–26793, 1996.
- 20) Cantorna, M. T., et al. : Vitamin A down-regulation of IFN- γ synthesis in cloned mouse Th1 lymphocytes depends on the CD28 costimulatory pathway. *J. Immunol.* **156** : 2674–2679, 1996.
- 21) Schwarting, A., et al. : IFN- γ receptor signaling is essential for the initiation, acceleration, and destruction of autoimmune kidney disease in MRL-Fas^{lpr} mice. *J. Immunol.* **161** : 494–503, 1998.
- 22) Ozmen, L., et al. Experimental therapy of systemic lupus erythematosus : the treatment of NZB/W mice with mouse soluble interferon-gamma receptor inhibits the onset of glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* **25** : 6–12, 1995.
- 23) Park, C. L., B et al. : Isotypic profiles and other fine characteristics of immune responses to exogenous thymus-dependent and -independent antigens by mice with lupus syndromes. *J. Immunol.* **130** : 2161–2167, 1983.
- 24) Nozaki, Y., et al. : The beneficial effects of treatment with all-trans-retinoic acid plus corticosteroid on autoimmune nephritis in NZB/WF mice. *Clinical and Experimental Immunology.* **139** : 74–83, 2005.
- 25) Kinoshita, K., et al. : Successful Treatment With Retinoids in Patients With Lupus Nephritis. *Am. J. Kid. Dis.* **55** : 344–347, 2010.