

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591260

研究課題名（和文）：DNA 含有免疫複合体が自然免疫を介してループス腎炎の病態に及ぼす影響について

研究課題名（英文）Association between lupus nephritis and innate immunity through toll like receptor9

研究代表者：伊藤秀一（ITO SHUICHI）国立成育医療センター（研究所）・腎臓科・医長

研究者番号：20336572

研究成果の概要：

全身性エリテマトーデス（SLE）における最も特徴的な自己免疫病態として、DNA に対する自己抗体産生が挙げられる。その結果、末梢血液中には DNA 含有免疫複合体が見出される。一方、Toll-like receptor9（TLR9）は、細菌由来の DNA 配列である CpG oligonucleotide（CpG ODN）を特異的に認識し、免疫系を活性化する自然免疫受容体である。SLE の主症状であるループス腎炎において、TLR9 のループス腎炎の病態への関与について検討した。

小児期発症 SLE 患者の腎組織の TLR9 の免疫染色を行ったところ、糸球体における TLR9 の発現は、正常の糸球体やループス腎炎寛解期の糸球体では認められず、腎炎の増悪期にのみ認められた。さらに、TLR9 と Synaptopodin の二重染色により、TLR9 は糸球体上皮細胞に一致して発現していることが判明した。また、TLR9 が強発現する時期は、血清学的に抗二重鎖 DNA 抗体価の上昇と低補体血症を認める時期であり、血中に DNA 含有免疫複合体が多い時期に一致することが推測された。また、ループス腎炎の急性期や増悪期には、synaptopodin、nephrin、podocin 等の糸球体上皮細胞スリット膜関連蛋白の発現が低下する事実から、TLR9 が糸球体上皮細胞傷害に関与している可能性が推測された。

この結果を基にマウス由来糸球体上皮細胞（MPC）を cytokine（IL-6, IL-1 β , TNF- α , VEGF, IFN- β ）、CpG ODN、DNA 含有免疫複合体等で刺激したところ。これらの全てが、無刺激では発現の見られなかった TLR9 mRNA の発現を誘導した。また、CpG ODN、DNA 含有免疫複合体等の刺激により MPC での synaptopodin mRNA の発現の低下を認めた。

これらの結果より糸球体上皮細胞は、TLR9 を介してループス腎炎における炎症病態や糸球体上皮細胞傷害に関与する可能性が推測された。本研究は、ヒトのループス腎炎と TLR9 の関わりを明らかにした初めての報告である。今回の知見は、ループス腎炎の活動性の新たな指標や自然免疫系をターゲットとした新たな治療法の開発などにつながる可能性を秘めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学、小児腎・泌尿器学

キーワード：SLE、toll-like receptor、自然免疫、ループス腎炎、糸球体上皮細胞

1.研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) における最も特徴的な自己免疫病態として、抗 DNA 抗体の産生が挙げられる。その結果、末梢血液中には DNA 含有免疫複合体が見出される。これらの免疫異常は、特異的抗原認識に基づく獲得免疫による。一方、SLE における抗原特異性をもたない自然免疫の関与については、近年研究が進んできた。

Toll-like receptor9 (TLR9)は、細菌由来の DNA である CpG oligonucleotide (非メチル化された特徴的な DNA 配列：CpG DNA) を特異的に認識し、自然免疫系を活性化する。近年、TLR9 が、CpG DNA のみでなく、SLE 患者の DNA 含有免疫複合体を認識する可能性が指摘され始めた。また、TLR9 が SLE において抗 DNA 抗体の産生に関与する可能性も論議されている。

また、NZB/NZW マウス、MRL-lpr/lpr マウス等の SLE のモデルマウスのループス腎炎において、TLR9 の発現が糸球体で増加するという報告がある。しかし、マウスモデルの糸球体内に観察される TLR9 はループス腎炎の病態において、促進的か抑制的のどちらに働くかは未だに不明である。さらに、ヒトのループス腎炎における TLR9 の発現を調べた報告はこれまでにない。ヒト SLE における TLR9 を介した、DNA 含有免疫複合体の認識機構や TLR9 の病態への関与の解明は、全く新しい治療法や疾患活動性の評価指標の開発につながる可能性がある。

本研究の目的は、SLE の主症状であるループス腎炎において、自然免疫受容体である TLR9 の関与を解明することである。

2.研究の目的

本研究の目的は、SLE の主症状であるループス腎炎において、自然免疫受容体である TLR9 の関与を解明することである。

3.研究の方法

A. SLE患者の腎組織の免疫染色

当科で小児期発症の SLE と診断され治療を行っている患者のうち、複数回腎生検を行っている患者を対象とした。このうち、初回腎生検で International Society of Nephrology/Renal Pathology Society 2003 (INS/RPS 2003) 分類でIV型ループス腎炎と診断され、かつ治療後に抗 ds-DNA 抗体価の低下、尿蛋白改善を認めた 4 例を対象とした。

これらの患者の腎生検組織を用いて免疫組織学的評価を行った。正常コントロールとしては、若年腎腫瘍患者の摘出腎の組織学的

健常部位を用いた。ホルマリン切片を TLR9 および糸球体上皮細胞マーカーである synaptopodin で単染色した。さらに凍結切片で、TLR9、synaptopodin の蛍光二重免疫染色を行い、TLR9 の局在、発現強度、さらに疾患活動性との関係を調べた。また、上皮細胞のスリット膜を構成する蛋白である nephrin, podocin の発現についても観察した。観察はオリンパス社顕微鏡 (BX50, Tokyo, Japan) を用いた。検体の使用に関してはインフォームドコンセントを取得した。

B. マウス糸球体上皮細胞を用いた実験

Mount Sinai School of Medicine の Peter Mundel 博士から分与されたマウス腎糸球体上皮細胞の培養系を確立した。

マウス腎糸球体上皮細胞 (mouse podocyte cell:MPC) 株は、マウス腎糸球体上皮細胞に遺伝子導入を行い不死化させたもの (不死化遺伝子: ts-T-Ag) である。温度感受性株であり、33°C での培養相では、細胞増殖能 > 足突起伸長能であるが、37°C での培養相では、細胞増殖能 < 足突起伸長能となる特徴をもつ。患者腎組織を用いた免疫染色の結果から、in vitro でも同様の変化が再現可能か検討した。分与された MPC 株を、Interleukin-6 (IL-6)、Interleukin-1 β (IL-1 β)、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、Vascular endothelial growth factor (VEGF) 等の cytokine や TLR9 の ligand である CpG DNA、さらには合成 DNA 含有免疫複合体で刺激し、TLR9-mRNA, synaptopodin の発現を RT-PCR (reverse-transcription PCR)、real-time PCR などを用いて測定した。

4. 研究成果

A. SLE患者の腎組織の免疫染色

①ループス腎炎における TLR9 と

synaptopodin の発現について

予備実験として、成人 SLE 患者の剖検時に得られた腎臓、脾臓、リンパ節の各剖検組織について抗 TLR9 抗体、抗 synaptopodin 抗体で免疫染色を行った。その結果、腎では尿細管上皮細胞および糸球体領域に、また脾臓、リンパ節では濾胞領域に TLR9 の発現が認められた。また synaptopodin は、糸球体上皮細胞と推定される領域に発現していた。この結果から、小児期発症の SLE 活動期の患者のホルマリン固定腎組織においても、抗 TLR9 抗体、抗 synaptopodin 抗体で単染色の免疫染色を試みたところ、前述の成人 SLE と同様の所見を得た。続いて、TLR9 が糸球体上皮細胞に発現していることを確認するために、小児期発症の活動期 SLE 患者の凍結腎組織を TLR9 と synaptopodin で蛍光二重染色を行ったところ、その染色領域は一致し、TLR9 が糸球体上皮細胞で発現している事が判明した。

②疾患活動性に伴う TLR9 と synaptopodin の発現の変化について

4名の小児期発症 SLE 患者の活動期 (初発時 4例、再発時 1例)、寛解期 (4例) における、TLR9 と synaptopodin の発現を蛍光二重染色で比較した。全症例の活動期の検査で、抗 ds-DNA 抗体価の上昇と著名な低補体血症、蛋白尿を認めた。また全症例で、活動期には腎組織分類 (ISN/RPS 2003) 上、びまん性管内増殖性病変を伴う IV 型を呈していた。

SLE 活動期には全例で TLR9 の発現を糸球体上皮細胞に認め、一部の例で軽度尿細管上皮にその発現を認めた。しかし、寛解時は全例で TLR9 の発現が消失していた。しかし、再燃時には再び TLR9 の発現が糸球体上皮細胞に強く認められた。さらに正常腎組織においては、寛解時同様 TLR9 の発現を全く認めなかった。これらの結果より、SLE において

は、疾患活動性に比例して糸球体上皮細胞特異的に TLR9 が発現し、その発現は病勢に応じ可逆的であることが判明した。さらに、synaptopodin も活動期には、その発現が部分的に減少し、寛解期においては改善する事が判明した。すなわち、SLE 活動期に糸球体上皮細胞障害が生じる可能性が示唆された。

③疾患活動性に伴う腎糸球体スリット膜構成蛋白の発現変化

②で得られた知見を基に、SLE の活動期と寛解期の検体を用い、糸球体スリット膜の主要構成蛋白である nephrin、podocin を蛍光免疫染色し糸球体上皮細胞傷害の程度を評価した。正常腎、寛解期 SLE 組織においては糸球体上皮細胞領域に nephrin、podocin とともに明瞭かつ均一に発現が見られたのが、SLE 活動期には、nephrin、podocin とともに発現の低下を認めた。この際の臨床症状として全例で蛋白尿を認め、免疫染色との相関が密接に認められた。すなわち、SLE 活動期には synaptopodin、nephrin、podocin 等の糸球体スリット膜の主要構成蛋白の発現低下より蛋白尿が出現する機序が示唆された。

B. マウス糸球体上皮細胞を用いた実験

腎組織を用いて得られた実験結果を踏まえ、in vitro で同様の結果が得られるか検討するため、分与されたマウス由来糸球体上皮細胞 (MPC) を様々な条件で刺激し total RNA を抽出し、TLR9-mRNA の発現変化の有無を RT-PCR (reverse-transcription PCR)、real-time PCR を用いて調べた。RT-PCR は細胞株を樹立したマウスと同系での C57/BL6 マウスの腎、脾臓を control 群とし条件設定を行った。マウス腎、脾において TLR9-mRNA の発現を認めたが、無刺激の MPC では TLR9-mRNA の発現を認めなかった。また、

synaptopodin は、マウス腎、MPC とともに synaptopodin の発現を認めた。ちなみに、nephrin、podocin はマウス腎で発現が確認できたが、MPC では発現を欠き、MPC の分化の特性が生体内と異なることが示唆された。

続いて、MPC の種々の刺激に対する TLR9 の発現の変化を調べるため、MPC を以下の因子で刺激し、TLR9mRNA の発現の変化を評価した。

- ① Interleukin-6 (IL-6)、
- ② Interleukin-1 β (IL-1 β)、
- ③ Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、
- ④ Vascular endothelial growth factor (VEGF)
- ⑤ Interferon- β (IFN- β)

上記全ての刺激に対して MPC において、わずかであるが TLR9mRNA の発現が誘導された。

また、TLR9 の ligand である

- ① CpG oligonucleotide (CpG ODN)、
 - ② DNA 含有免疫複合体
 - ③ control oligonucleotide (control ODN)
- で刺激したところ、CpG ODN、DNA 含有免疫複合体の刺激により TLR9mRNA の発現が誘導されたが、control ODN では TLR9 mRNA 発現の誘導は認められなかった。

考察

本研究により、ループス腎炎の活動期にのみ TLR9 が糸球体上皮細胞に発現する現象が明らかになった。同時に血糸球体上皮細胞の細胞骨格である synaptopodin、スリット膜構成蛋白である nephrin、podocin も腎炎の活動期に減弱し、寛解とともに回復することが示唆された。SLE のマウスモデルで、糸球体内における TLR9 の発現に関する研究はあるが、本研究はヒトのループス腎炎において、自然免疫受容体である TLR9 が、糸球体上皮細胞傷害に関与する可能性があることを示した初めての報告である。

また、MPCを用いた実験では、CpG oligonucleotide、DNA含有免疫複合体で刺激したMPCにTLR9のmRNAが誘導される可能性を明らかにできた。しかし、今回用いたMPCはin vivoで発現すべきnephrin、podocinの発現を認めず、スリット膜を隣接する細胞と形成しないという特性をもつ。そのため、より糸球体上皮細胞の特性が備わった細胞やマウスモデルでの検討が必要である。

現時点でSLEの病態における、TLR9の真の役割は不明である。とりわけ、免疫複合体の刺激により糸球体上皮細胞に発現したTLR9が「免疫複合体の糸球体からの除去に働き症状の改善を促す」のか、「抗DNA抗体の産生に関与し、症状の増悪を招く」のかという点に関しては今後の解明が待たれる。しかし、本研究の結果は、TLR9がループス腎炎の疾患活動性の指標、あるいはTLR9を含む自然免疫系を標的とする新規治療法の開発などの可能性を示すものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者・分担者、連携研究者に下線)

[雑誌論文] (計15件)

1. Ito S, Okuyama K, Nakamura T, et al. Intravenous gamma globulin for thrombotic microangiopathy of unknown etiology. *Pediatr Nephrol.* 22, 301-305, 2007 査読有
2. Ito S, Machida H, Inaba A, et al. Amelioration of steroids and cyclosporine-resistant nephrotic syndrome by pravastatin. *Pediatr Nephrol.* 22, 603-606, 2007 査読有
3. Ito S, Aihara Y, Yokota S. Intravenous gamma globulin for atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 22, 909, 2007 査読有
4. Harada T, Machida H, Ito S, et al.

- Henoch-Schonlein purpura presenting duodenal involvement similar to superior mesenteric artery syndrome in a girl. *Eur J Pediatr.* 166, 489-490, 2007 査読有
5. Ueda I, Kurokawa Y, Koike K, Ito S, et al. Late-onset cases of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with missense perforin gene mutations. *Am J Hematol.* 82, 427-32, 2007 査読有
 6. Aihara Y, Ito R, Ito S, Aihara M, Yokota S. Toxic epidermal necrolysis in a child successfully treated with cyclosporin A and methylprednisolone. *Pediatr Int.* 49, 659-62, 2007 査読有
 7. Ito S, Harada T, Nakamura T, et al. Mizoribine for renal sarcoidosis: effective steroid tapering and prevention of recurrence. *Pediatr Nephrol* 24, 411-414, 2009 査読有
 8. Harada T, Ito S, Shiga K, et al. A report of two cases of Kawasaki disease treated with plasma exchange. *Ther Apher Dial.* 12, 176-9, 2008 査読有
 9. Yasuda H, Leelahavanichkul, A, Tsunoda S, Dear J, Takahashi Y, Ito S, et al. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol-renal* 294, F1050-1080, 2008 査読有
 10. 宮前多佳子, 伊藤秀一, 町田裕之, 他. 小児期発症全身性エリテマトーデスと混合性結合組織病の臨床的特徴の差異と抗U1-RNP抗体の意義. *日本臨床免疫学会会誌*, 31, 405-411, 2008. 査読有
 11. 佐野史絵, 小澤礼美, 町田裕之, 宮前多佳子, 伊藤秀一, 他. 小児期発症全身性エリテマトーデスの姉妹例. *日本臨床免疫学会会誌* 31, 172-177, 2008 査読有

12. 岩田直美, 森雅亮, 宮前多佳子, 伊藤秀一, 他. 小児期発症全身性エリテマトーデスにおける二次性シェーグレン症候群合併の位置づけ. 日本臨床免疫学会会誌 36, 166-171, 2008 査読有
13. 伊藤秀一, 原田知典, 他. γ -グロブリン不応性川崎病への血漿交換療法. 日本小児腎不全学会雑誌 27, 112-115, 2008. 査読有
14. 伊藤秀一. ステロイド感受性、依存性ネフローゼ症候群. 小児内科増刊号 40, 850-855, 2008 査読なし
15. 伊藤秀一. 【自己免疫疾患 病態と治療】 治療とその作用機序 シクロホスファミドパルス療法(解説/特集). 小児内科40, 1951-1954, 2008 査読なし

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Miyamae T, Sano F, Machida H, Ozawa R, Nakajima S, Ito S, Naruto T, Imagawa T, Mori M, Yokota S. Difference of clinical manifestations and laboratory findings between childhood-onset systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. Annual European Congress of Rheumatology Of The European League Against Rheumatism. 2007, 7, Barcelona, Spain
2. 安田日出夫, 角田慎一郎, DearJames W., 土井研人, 伊藤秀一, 他. Toll-like receptor 9 pathwayの阻害は、敗血症による死亡率および急性腎不全を改善する. 第50回日本腎臓学会学術総会. 2007. 4, 浜松
3. 伊藤秀一, 稲葉 彩, 堤 晶子, 他. γ -グロブリン不応性川崎病への血漿交換療法と白血球除去療法併用の試み. 第29回日本小児腎不全学会. 2007. 9 松江
4. Ito S, Harada T, et al. Remission maintenance therapy with mizoribine after cyclophosphamide therapy to steroid

- dependent nephrotic syndrome. 第43回日本小児腎臓病学会 2008. 6 福岡
5. 町田裕之, 伊藤秀一, 武下文彦, 大城久, 稲山嘉明, 楊國昌, 横田俊平, 他. ループス腎炎の発症機転におけるToll like receptor 9とDNA含有免疫複体の関与. 第43回日本小児腎臓病学会 2008. 6. 福岡
6. 中村智子, 町田裕之, 奥山健一, 堤晶子, 稲葉彩, 伊藤秀一, 他. 小児期発症SLEに対するCyclophosphamide大量静注療法(IVCY)とステロイド剤中心の治療の効果の差異. 第43回日本小児腎臓病学会 2008. 6. 13 福岡
7. 伊藤秀一, 相原雄幸, 西小森隆太, 他. TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS)の一男児例. 第52回日本リウマチ学会総会・第17回国際リウマチシンポジウム・17回 2008. 4. 21 札幌

8. 金子詩子, 佐野史絵, 原良紀, 笠井和子, 中野直子, 篠木敏彦, 町田裕之, 宮前多佳子, 伊藤秀一 他. 小児期発症SLEに対するミコフェノール酸モフェチルの有効性. 第52回日本リウマチ学会総会、第17回国際リウマチシンポジウム 2008. 4. 21 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件) ○取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤秀一 (SHUICHI ITO)

国立成育医療センター(研究所)・腎臓科・医長

研究者番号: 20336572

(2) 研究分担者

横田俊平 (SHUNPEI YOKOTA)

横浜市立大学医学部 小児科学 教授

研究者番号: 10158363

(3) 連携研究者

なし