

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17319

研究課題名(和文) ループス腎炎における自然免疫系を介するPAI-1発現の解明と治療への応用

研究課題名(英文) The elucidation of the PAI-1 expression through the natural immunity system in a lupus nephritis.

研究代表者

相澤 知美 (Aizawa, Tomomi)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90836248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：正常ヒト腎血管内皮細胞を培養し、全身性エリテマトーデス(SLE)の患者血清を添加した(初発時、安定期)。quantitative real-time PCR法を用いて、PAI-1、tPAのmRNAの発現を測定した。PAI-1とtPAの発現を比較対照のネフローゼ症候群の血清を添加した群と、何も添加しなかったコントロール群ではPAI-1とtPAのmRNAの有意な上昇は認めなかったが、SLEの血清を添加した群ではPAI-1、tPAのmRNA産生の上昇が有意に認められた。疾患活動性との相関を検討したところ、PAI-1とtPAの発現と補体やSLEDAIとの相関が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ループス腎炎(LN)と凝固線溶系因子の関連性を解明するため、正常ヒト腎血管内皮細胞(GECs)におけるPAI-1、tPAの発現を調べている。我々はこれまでToll-like receptor (TLR3)を介してGECsからPAI-1が産生されることを確認し報告した。本研究では、全身性エリテマトーデス(SLE)患者血清をGECsへ直接添加し、よりLNの病態に近い培養系でのPAI-1発現を調べた。その結果、SLEの疾患活動性の指標である補体、SLEDAIとPAI-1のmRNA発現の相関が認められた。以上より、PAI-1がループス腎炎の進展に関与している可能性が示唆され、今後解析を続けていく。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of the systemic lupus erythematosus (SLE) patient's serum on plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and tissue plasminogen activator (t-PA) expression in glomerular endothelial cells (GECs). We analyzed the expression of PAI-1 and tPA mRNA using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. We also added the serum of nephrotic syndrome (NS) cases as a comparison. Expression of PAI-1 and tPA mRNA in GECs was intentionally observed by the group which added the serum of SLE but not by the serum of NS. We also examined correlation with a disease activity and PAI-1 or tPA mRNA expression in GECs. Expression of mRNA of PAI-1 and tPA correlates with a serum complement level and SLE disease activity index (SLEDAI).

研究分野：小児科

キーワード：PAI-1 全身性エリテマトーデス ループス腎炎 腎血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) の病態は未だ不明な点が多いが、要因の一つとして Toll-like receptor (TLR) の関与が挙げられる。TLR は病原体のパターンを認識し自然免疫系を活性化させるが、SLE の病態ではアポトーシス細胞処理の低下により遊離された自己核抗原が形質細胞様樹状細胞に発現している TLRs (特に TLR3, TLR7, TLR9) に認識され、Ⅱ型 IFN の産生を促し自己抗体の産生が増強されることが推測されている。このような背景のもとに、申請者らはこれまでにヒト培養メサンギウム細胞における TLR3 を介する自然免疫系のケモカイン産生経路を検討してきた (Aizawa T, et al. *Pediatr Res.* 2013, Tanaka H and Imaizumi T. *Clin Dev Immunol* 2013)。また、その経路のループス腎炎 (LN) の病態への関わりを報告してきた (Imaizumi T, et al. *CEN* 2015, *Nephron* 2016, *Mod Rheumatol* 2017)。また、ヒト培養腎系球体内皮細胞 (GECs) においても TLR3 を介するケモカインの発現を報告した (Liu Q et al. *Nephron* 2018)。加えて、申請者は凝固線溶系抑制因子の plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) に着目し GECs において TLR3 の刺激により PAI-1 の発現が促進されるが、tissue plasminogen activator (tPA) の発現は促進されないことを報告した。また、SLE の治療薬である抗マラリア薬クロロキンが TLR3 を介する PAI-1 産生を抑制することも報告している (Aizawa T, et al. *CEN.* 2019)。

PAI-1 は主に血管内皮細胞から分泌され tPA を抑制する線溶系阻害因子である。PAI-1 は慢性腎疾患において、糸球体硬化を促進することが知られており、LN の活動性と関連も想定されている。よって、PAI-1 を含む凝固線溶系関連因子は LN の新たな治療の標的となりうる可能性がある。腎系球体構成細胞局所における凝固線溶系反応の詳細は未だ不明な点が多く、研究の余地があると考えられる。

## 2. 研究の目的

上記の背景を基に、SLE や LN の病態解明のため GECs の PAI-1 を含む凝固線溶系反応を更に詳しく調べるため、以下の項目を検討することとした。

GECs で TLR3 に加えて TLR7, TLR9 の活性化により PAI-1, tPA 等の凝固線溶系因子の産生が認められるのかどうか、またステロイド剤、抗マラリア薬などの既存の治療薬でそれらの発現は抑制されるのかどうかを検討する。

SLE 患者血清を GECs へ添加し、PAI-1, tPA の発現の変化を検討する。

SLE 患者の尿・血液検体中の PAI-1, tPA の濃度を確認する。

本研究の目的は、以上を検討することで SLE, LN の活動性と TLR3, TLR7, TLR9 を介する PAI-1 産生との関連性を明らかとし、PAI-1 をターゲットとした新規の治療応用へと展開するための研究基盤を確立することである。

## 3. 研究の方法

### 細胞処理：

- 1) 正常ヒト糸球体血管内皮細胞 (GECs) を培養し、TLRs (TLR3, TLR4, TLR7, TLR9) のリガンドを添加した。
- 2) TLRs とその経路に関わることが予想される転写因子の RNA 干渉を行った後に TLRs のリガンドを GECs に添加した。
- 3) TLRs のリガンド添加前に、ステロイド薬、免疫抑制薬、抗マラリア薬、抗凝固薬等の既存の SLE の治療薬を GECs に添加した。
- 4) SLE 患者の血清を GECs に添加した。

Real-time quantitative PCR： の処理をした GECs から、RNeasy RNA 抽出キットを用いて total RNA を抽出し、single-strand cDNA を作成し、PAI-1, tPA, Ⅱ型 IFN の mRNA の発現を測定した。

ELISA： の処理をした GECs の培養液中の PAI-1, tPA, Ⅱ型 IFN の蛋白濃度を、ELISA キットを用いて測定した。

SLE 患者の尿検体、血液検体中の PAI-1 を含む凝固線溶系因子の濃度を、ELISA キットを用いて測定し、疾患活動性の指標となる抗 dsDNA 抗体、尿蛋白、補体値等との相関の有無を調べた。

#### 4. 研究成果

GECs を培養し、TLR3, TLR4, TLR7, TLR9 のリガンドを添加した系において PAI-1 mRNA を測定した。TLR7, TLR9 の刺激では PAI-1 mRNA の発現亢進は認められなかった。TLR4 の刺激において、PAI-1 mRNA の発現亢進は認められ、今後 ELISA にて蛋白発現を確認する予定である。

TLR3 のリガンドである Poly IC を添加した系では、MCP-1, CCL5 の測定を行った。いずれも、時間依存性、濃度依存性に発現が増加していることを確認した {Fig 1. (A) ~ (D)}。また、その発現がステロイド薬では抑制されないが、抗マラリア薬クロロキンを低下することも確認し報告した {Fig 2. (A) ~ (D)}。 (Sato R, et al. Ren Fail. 2021)

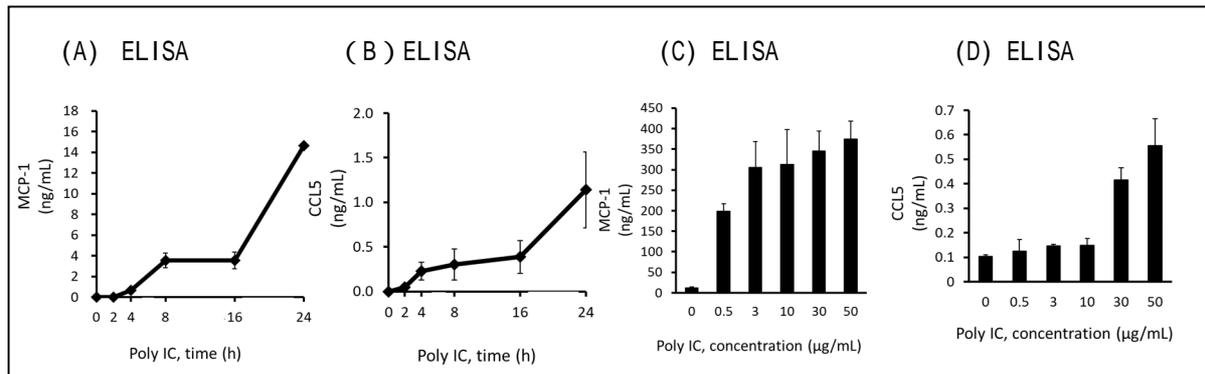


Fig.1 GECs において、Poly IC の刺激により時間依存性、濃度依存性に MCP-1, CCL5 の発現亢進が認められた

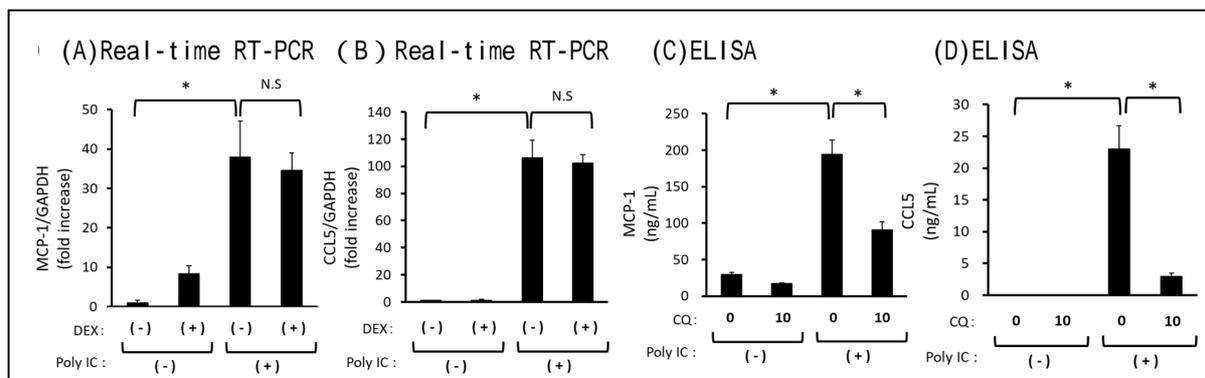


Fig.2 GECs において、抗マラリア薬クロロキンは Poly IC の刺激により産生された MCP-1, CCL5 の発現を抑制する。

GECs を培養し、全身性エリテマトーデス (SLE) の患者血清を添加した (初発時、安定期)。比較対照としてネフローゼ症候群、IgA 腎症、紫斑病性腎炎の血清も添加した。その結果、ネフローゼ症候群の血清を添加した群は PAI-1, tPA の mRNA 発現はコントロール群と比較し有意な上昇は認めなかったが、SLE の血清を添加した群では PAI-1, tPA の mRNA の産生上昇が有意に認められた。同様に、IgA 腎症、紫斑病性腎炎の血清を添加した群でも mRNA 産生は有意に上昇した。SLE 患者血清を添加した系での GECs における PAI-1, tPA の mRNA 発現と、血清補体価や抗 ds-DNA 抗体、尿蛋白、SLEDAI など疾患活動性との相関を検討したところ、補体、SLEDAI との相関は認められた {Fig.3 (A) ~ (D)}。今後結果を論文化し、報告する予定である。

本来、SLE の疾患活動性の指標となっている項目と、腎局所での PAI-1 発現との相関が認められる場合は、腎局所における PAI-1 抑制がループス腎炎の治療の一つとなる可能性があるため、今後も解析を進めていく。

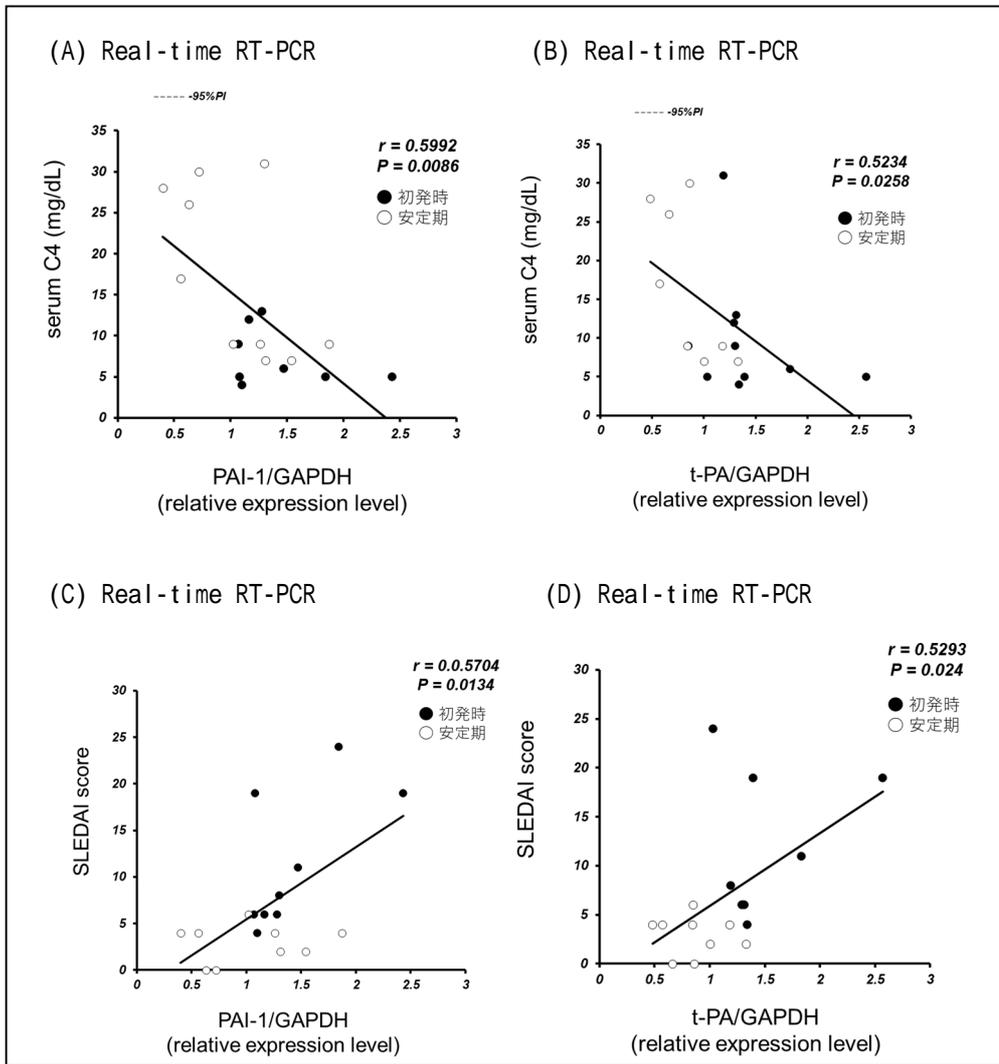


Fig.3 SLE の患者血清を GECs へ添加したところ、PAI-1, tPA の発現の亢進を認め、それらは血清 C4 と SLEDAI score との有意な相関を認めた。

患者血清の PAI-1, tPA 濃度の測定も行ったが、疾患活動性との相関は認められなかった。尿検体中の PAI-1, tPA の測定はまだ行っていないため、今後検討予定である。

腎局所における凝固関連因子やケモカインの解析は、ループス腎炎の病態解明につながる可能性があるため、今後も解析を続けていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Riko, Imaizumi Tadaatsu, Aizawa Tomomi, Watanabe Shojiro, Tsugawa Koji, Kawaguchi Shogo, Seya Kazuhiko, Matsumiya Tomoh, Tanaka Hiroshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Inhibitory effect of anti-malarial agents on the expression of proinflammatory chemokines via Toll-like receptor 3 signaling in human glomerular endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Renal Failure	6. 最初と最後の頁 643 ~ 650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/0886022X.2021.1908901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------