

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591217

研究課題名(和文) ANCA関連腎炎の発症進展に関わる免疫ネットワークの解明とその制御

研究課題名(英文) Immunological network in ANCA associated glomerulonephritis

研究代表者

清水 章 (SHIMIZU, Akira)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00256942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：WKYラットにヒトMPOを免疫したANCA関連血管炎モデルに、MPO追加免疫群、好中球活性化群(TNF- α やG-CSFの追加投与)、炎症反応誘導群(少量のanti-GBM Abの追加投与)を作成した。炎症反応誘導群においてのみ尿所見と半月体形成率の増悪を認めた。血清ではTNF- α 、IL-1 β 、CXCL1、CXCL2が上昇し、糸球体内ではNETsの形成、TNF- α 、CXCL1、CXCL2、CXCL8の発現増強を認めた。in vitroで精製ANCAにより好中球の活性化が誘導された。半月体形成の増悪には好中球に関わるケモカインの発現上昇と好中球の異常活性化が関与している。

研究成果の概要(英文)：In ANCA-associated vasculitis (AAV), necrotizing and crescentic glomerulonephritis (NCGN) was induced in WKY rats by immunization with human MPO (hMPO). The induced anti-hMPO Antibody (Ab) cross-reacted with rat neutrophils with activation in vitro. The crescent formation with NETs in glomeruli was enhanced by the additional injection of sub-nephritogenic anti-GBM Ab, whereas it was not significantly enhanced by the additional administration of TNF- α or G-CSF in vivo. NCGN rats with the sub-nephritogenic anti-GBM Ab showed elevated albuminuria and serum TNF- α , CXCL1 and CXCL2 levels. TNF- α , CXCL1, CXCL2 and CXCL8, which are mainly involved in neutrophil-endothelial interactions, were increased in glomeruli. Our results demonstrated that the acceleration of NCGN in AAV may be necessary not only accumulation of neutrophils in glomeruli, but also aberrant activation of neutrophils with increased glomerular expression of neutrophil activation-associated cytokines and chemokines.

研究分野：病理学(腎臓病理学・移植病理学)

キーワード：ANCA ANCA関連腎炎 ANCA関連血管炎 抗好中球細胞質抗体 半月体形成性糸球体腎炎 抗糸球体基底膜抗体腎炎 サイトカイン NETs

1. 研究開始当初の背景

抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody : ANCA) 関連血管炎 (ANCA associated vasculitis; AAV)は、ヒト好中球細胞質に対する自己抗体が発症に関与する小型血管炎である。pauci-immune 型壊死性半月体形成性糸球体腎炎(necrotizing and crescentic glomerulonephritis; NCGN)を発症するが、壊死性・半月体形成機序や、血管炎の発症機構の詳細は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

(1) AAV ラットモデルの作成： ヒト MPO (hMPO)をラットに免疫してラット AAV モデルを作成する。

(2) AAV ラットモデルに、好中球の活性化因子として知られている G-CSF や TNF- α の追加投与、また糸球体局所での炎症環境を sub-nephritogenic 抗 GBM 抗体を追加投与して誘導し、NCGN の増悪機構を明らかにする。

(3) 増悪した NCGN に関わる、ANCA、好中球、糸球体内皮細胞の関連について in vivo および in vitro において検討し、NCGN の増悪機序を明らかにする。

3. 研究の方法

ラット AAV モデルは WKY ラットを用い、精製したヒト MPO 蛋白 (hMPO)を完全フロイントアジュバントと百日咳菌毒素とともに免疫し作成した。

(1) 適正な MPO の投与量を決定するために hMPO を 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{kg} \times 2$ on day 0 and day 28、1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与群を作成した。

(2) NCGN を増悪させるために、hMPO 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を免疫したラットに、好中球活性化因子として知られている G-CSF または TNF- α を追加投与した。G-CSF 併用群として human G-CSF 20 μg を hMPO 免疫後 28 日目から 56 日目まで毎日皮下注した。TNF- α 併用群として TNF- α 1.0 μg を hMPO 免疫後 28 日目から 1 週間おきに 4 回 静注した。また、糸球体内に炎症環境を誘導するために、ごく少量の anti-GBM Ab を追加投与した。抗 GBM 抗体併用群として hMPO 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 免疫後 28 日目に sub-nephritogenic 抗 GBM 抗体 0.25 μg を追加静注した。

(3) hMPO 免疫後 8 週目に屠殺して、血液検査 (白血球数)、血清 ANCA 値とサイトカインとケモカイン (TNF- α , CXCL1, CXCL2)、尿アルブミンと血尿、病理組織学的評価 (半月体形成率)、単離糸球体のサイトカインとケモカイン (TNF- α , ICXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCR1, CXCR2 の発現) の検討を行った。

(4) ANCA の好中球活性化作用を、各群のラット血清から精製した IgG 抗体をラット骨髄由来細胞 (BMC) に in vitro で反応させ活性化をサイトカイン (TNF- α , IL-1 β , CXCR1, CXCR2 の発現) の産生で評価した。

4. 研究成果

(1) hMPO 単独投与したラットは軽度の半月体を形成する。濃度の異なる hMPO 投与群の全群において血清抗 hMPO 抗体は産生され、その抗体価は hMPO 投与量依存性に増加傾向を示した。特に 800 $\mu\text{g}/\text{kg} \times 2$ 投与群、1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において高い ANCA 価を認めた。しかし、病理学的検討では 800 $\mu\text{g}/\text{kg} \times 2$ や 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 免疫群を含め、半月体形成率は全群ともに 2-4%であった。

(2) 誘導された抗 hMPO 抗体はラット MPO やラット好中球に反応する。hMPO の免疫によりラットに誘導した抗 hMPO 抗体は、蛍光間接抗体法でラット好中球に交差反応性を示し、また、ELISA 法によりラット血清中に抗 rat MPO 抗体を検出した。

(3) 抗 GBM 抗体併用群では半月体形成の増悪を認めたものの、TNF- α 併用群や G-CSF 併用群では増悪は認められなかった。TNF- α 併用群、G-CSF 併用群、抗 GBM 抗体併用群の全群で有意な血尿が出現し、また、尿中アルブミン値では抗 GBM 抗体併用群 (123.1 \pm 54.5 mg/day) が hMPO 単独群 (5.89 \pm 3.61 mg/day) と比較し有意な上昇を認めた。しかし、腎機能を反映する血清 BUN 値や Cr 値には各群有意差は認められず正常範囲であった。半月体形成率は TNF- α 併用群 (3.4 \pm 1.2 %)、G-CSF 併用群 (2.7 \pm 1.2 %) で半月体の形成に増悪は認めないが、抗 GBM 抗体併用群は明らかに半月体形成の増悪を示し、その形成率は約 55%であった (抗 GBM 抗体併用群; 55.0 \pm 14.2 % vs hMPO 単独群; 3.0 \pm 1.7 %, $p < 0.05$)。さらに半月体形成部位に好中球細胞外トラップ (NETs) の形成を認めた。血清中 TNF- α 値は、hMPO 単独群、TNF- α 併用群、G-CSF 併用群において検出感度以下であったが、抗 GBM 抗体併用群においては有意な上昇 (TNF- α ; 3.0 \pm 2.3 ng/ml) を認め、全身性の炎症環境が確認された。糸球体局所に

においても、半月体形成の増悪が認められた抗 GBM 抗体併用群において TNF- α 、CXCL-1、CXCL-2、CXCL-8 の有意な発現増加が認められ、糸球体局所のケモカイン発現が半月体形成の増悪に関連すると考えた。

(4) 抗 MPO 抗体による好中球のサイトカインやケモカイン受容体発現が半月体形成を増悪させる可能性がある。浮遊している骨髄細胞 (BMC) を未刺激の好中球として in vitro 実験に用いた。ラット BMC に対して TNF- α 刺激下における IL-1 β の分泌産生を ELISA で解析したところ、ラットモデル血清から精製した IgG 抗体で有意な上昇を認めた。抗 GBM 抗体併用群から精製した IgG 抗体ではさらに IL-1 β の産生増加を認め、抗 GBM 抗体併用群の ANCA はラット好中球を強く活性化することを確認した。TNF- α 刺激下における好中球内のケモカイン受容体の発現は、ラットモデル血清から精製した IgG 抗体では CXCR1 に有意な発現上昇を認めたが、抗 GBM 抗体併用群から精製した IgG 抗体では逆に CXCR1 および CXCR2 の発現低下が認められた。好中球が CXCR1 および CXCR2 の発現低下を介して血中に長く留まり、血清中の ANCA と強く反応することができるものと考えた。

(5) 好中球数の増加だけでは半月体形成の増悪を誘導していない。AAV では、ANCA と好中球や MPO は重要な因子である。G-CSF 併用群のみに末梢血の白血球数の増加 ($18.7 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^3$ vs 抗 GBM 抗体併用群: $7.0 \times 10^3 \pm 0.5 \times 10^3$ cells / μ l)、および血清 MPO 濃度の増加 (82.7 ± 30.3 ng/ml vs 抗 GBM 抗体併用群: 7.6 ± 4.3 ng /ml) を認めた。糸球体内に浸潤した好中球数は、G-CSF 併用群と抗 GBM 抗体併用群において有意な増加 (G-CSF 併用群: 4.2 ± 0.3 cells/glomerulus, 抗 GBM 抗体併用群: 2.0 ± 0.5 cells /glomerulus, $p < 0.05$ vs コントロール群) を認めた。hMPO 単独群と TNF- α 併用群では糸球体内好中球数はコントロール群と比較し有意な増加は認めなかった。電顕的観察では hMPO 単独群、G-CSF 併用群、TNF- α 併用群では糸球体糸脚内の好中球の形態は保たれていたが、抗 GBM 抗体併用群では、好中球の核分葉の消失、核クロマチンの脱凝縮、脱顆粒、糸脚内皮への接着がみられ、好中球の活性化像を認めた。G-CSF 群のように、糸球体内の好中球の増加だけでは NCGN の増悪はみられず、抗 GBM 抗体併用群のように好中球の活性化が重要であることを確認した。

AAV の NCGN では、半月体形成の増悪には好中球に関わるケモカインの発現上昇と好中球の糸球体内異常活性化が関わっているこ

とが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Masuda Y, Yamanaka N, Ishikawa A, Kataoka M, Arai T, Wakamatsu K, Kuwahara N, Nagahama K, Ichikawa K, Shimizu A. Glomerular basement membrane injuries in IgA nephropathy evaluated by double immunostaining for 5(IV) and 2(IV) chains of type IV collagen and low-vacuum scanning electron microscopy. Clin Exp Nephrol 19: 427-435, 2015 (査読あり)
2. Fujita E, Nagahama K, Shimizu A, Aoki M, Higo S, Yasuda F, Mii A, Fukui M, Kaneko K, Tsuruoka S. Glomerular capillary and endothelial cell injury is associated with the formation of necrotizing and crescentic lesions in crescentic glomerulonephritis. J Nippon Med Sch 82: 27-35, 2015 (査読あり)
3. Ohno D, Sakai Y, Suzuki A, Mugishima K, Sumi Y, Otsuka Y, Otsuka T, Shimizu A, Tsuruoka S. Dense deposit disease in an elderly patient: report of a case. J Nippon Med Sch 81:120-121, 2014. (査読あり)
4. Shimizu A, Ishii E, Masuda Y, Sato A, Piao A, Kunugi S, Takahashi M, Terasaki M, Nagasaka S, Terasaki Y, Ohashi R, Morioka T, Fukuda Y. Renal inflammatory changes in acute hepatic failure-associated acute kidney injury. Am J Nephrol 37: 378-388, 2013. (査読あり)
5. Tanabe M, Shimizu A, Masuda Y, Kataoka M, Ishikawa A, Wakamatsu K, Mii A, Fujita E, Higo S, Kaneko T, Kawachi H, Fukuda Y. Development of lymphatic vasculature and morphological characterization in rat kidney. Clin Exp Nephrol 16: 833-842, 2012. (査読あり)
6. Fujita E, Shimizu A, Kaneko T, Masuda Y, Ishihara C, Mii A, Higo S, Kajimoto Y, Kanzaki G, Nagasaka S, Iino Y, Katayama Y, Fukuda Y. Proliferative glomerulonephritis with monoclonal immunoglobulin G3 deposits in association with parvovirus B19 infection. Hum Pathol 43: 2326-2333, 2012. (査読あり)

7. Kashiwagi T, Hayama N, Fujita E, Hara K, Mii A, Masuda Y, Iino Y, Shimizu A, Katayama Y. A case of (double) ANCA-negative granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). CEN Case Rep 1: 104-111, 2012. (査読あり)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Kanzaki G, Nagasaka S, Higo S, Kajimoto Y, Nagahama K, Masuda Y, Shimizu A: Enhanced glomerular neutrophil chemoattractants expression in experimental ANCA associated vasculitis. ASN Kidney Week 2014(Philadelphia), 2014.11.

2. Masuda Y, Nagahama K, Shimizu A: Morphological and qualitative alterations of glomerular basement membrane in IgA nephropathy. ASN Kidney Week 2014(Philadelphia), 2014.11.

3. 神崎 剛, 永坂真也, 梶本雄介, 肥後清一郎, 益田幸成, 清水 章: MPO-ANCA関連血管炎モデルにおける半月体形成の進展機序. 日本病理学会総会 (第103回), 2014.4.

4. 神崎 剛, 永坂真也, 肥後清一郎, 梶本雄介, 益田幸成, 清水 章: MPO-ANCA関連血管炎モデルにおける半月体形成の進展機序. 日本腎臓学会学術総会 (第57回), 2014.7.

5. 永坂真也, 岩堀 徹, 肥後清一郎, 神崎 剛, 梶本雄介, 益田幸成, 清水 章: 腎局在樹状細胞の表現型解析. 日本腎臓学会学術総会 (第57回), 2014.7.

6. 神崎 剛, 永坂真也, 梶本雄介, 肥後清一郎, 益田幸成, 清水 章: MPO-ANCA 関連血管炎モデルにおける糸球体腎炎の増悪機序. 日本医科大学医学会総会 (第82回), 2014.9.

7. Kanzaki G, Nagasaka S, Kajimoto Y, Higo S, Tsuruoka K, Shimizu A: Aberrant activation of neutrophils allow ANCA to aggravate glomerulonephritis in experimental autoimmune vasculitis. ASN Kidney Week 2013(Atlanta), 2013.11.

8. Nagasaka S, Iwahori T, Higo S, Kanzaki G, Tsuruoka K, Kajimoto Y, Shimizu A: The Reactivity of Renal Dendritic Cells for Prostaglandin E2. ASN Kidney Week 2013(Atlanta), 2013.11.

9. 神崎 剛, 清水 章, 永坂 真也, 肥後清一郎, 梶本雄介, 岩下山連, 益田幸成, 福田 悠: MPO-ANCA 関連血管炎モデルにおける半月体形成と糸球体内のサイトカインの動態. 日本病理学会総会 (第 102 回), 2013.6.

10. 清水 章, 五十嵐徹: 腎からみた血管炎. 日本小児皮膚科学会 (第37回), 2013.8.

12. 三井亜希子, 福井めぐみ, 安田文彦, 金子朋広, 鶴岡秀一, 益田幸成, 飯野靖彦, 清水 章: 管内増殖性病変の活動性には糸球体毛細血管傷害の程度と糸球体内浸潤細胞の相違が関与する. 日本腎臓学会学術総会 (第56回), 2013.5.

13. Kanzaki G, Nagasaka S, Kajimoto Y, Higo S, Tsuruoka K, Shimizu A: Glomerular expression of chemokines and proinflammatory cytokines in an experimental model of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody associated glomerulonephritis. ASN Renal Week 2012 (San Diego), November, 2012.

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
清水 章 (SHIMIZU Akira)
日本医科大学・医学(系)研究科(研究院) 教授
研究者番号: 00256942

(2)研究分担者
永坂 真也 (NAGASAKA Shinya)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00573239

益田 幸成 (MASUDA Yukinari)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70173755

(3)連携研究者
()
研究者番号: