

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791012

研究課題名(和文) ループス腎炎に対する抗Kim-1抗体の治療効果について

研究課題名(英文) The therapeutic effect of anti-Kim-1 antibody in lupus nephritis

研究代表者

野崎 祐史 (NOZAKI, Yuji)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90411595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円、(間接経費) 420,000円

研究成果の概要(和文)：Tim-1(Kim-1)はCD4+T細胞の免疫応答を調節し、尿細管障害にて発現する。今回、抗Tim-1抗体(RMT1-10)をループスモデルであるMRL-Faslprマウスに3ヶ月齢から16週間投与した。結果、生存率、リンパ節腫脹、皮疹増悪は改善した。腎機能、蛋白尿、抗DNA抗体産生、リンパ球浸潤程度は改善した。Th1/17免疫応答は低下したが、制御性B/T細胞は増加した。RMT1-10治療群はまた、糸球体免疫グロブリン・C3沈着、細胞増殖・アポトーシスも抑制された。尿中・尿細管Kim-1発現は低下し、尿細管間質障害は改善した。RMT1-10は治療薬となりうる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The T-cell immunoglobulin mucin 1 (Tim-1), (Kim-1), modulates CD4+ T-cell responses and is also expressed by damaged proximal tubules. This study investigated the effects of an inhibitory anti-Tim-1 antibody (RMT1-10) in lupus-prone MRL-Faslpr mice. The mice were treated with RMT1-10 from 3 months of age for 16 weeks. RMT1-10 treatment significantly improved survival, limited the development of lymphadenopathy and skin lesions, preserved renal function and decreased proteinuria, reduced serum anti-DNA antibody levels, and attenuated renal leukocyte accumulation. Th1/Th17 cellular responses were reduced, but regulatory T/B cells were increased. RMT1-10 treatment also reduced glomerular immunoglobulin and C3 deposition and suppressed cellular proliferation and apoptosis. Urinary excretion and renal expression of Kim-1 was reduced, reflecting diminished interstitial injury. As RMT1-10 attenuated manipulating immune system Tim-1 may represent a therapeutic strategy in autoimmune diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系 臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：lupus nephritis, RMT1-10

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生物学的製剤がリウマチ膠原病領域に登場して以来、治療は激変しパラダイムシフトをもたらした。しかし難治性ループス腎炎に対する生物学的治療の成績は必ずしも現時点では満足の得られる結果ではない。今回、我々は CD4 陽性細胞に作用し、細胞間刺激伝達系に重要な役割をもつ Tim-1(Kim-1 と同義)のアンタゴニストである抗 Kim-1 抗体 (RMT1-10)をループス腎炎モデルマウスとして確立している MRL-Fas<sup>lpr</sup> マウスに投与し、腎機能に与える影響やサイトカイン産生、自己抗体に与える影響をて検討する。さらにヒトの腎生検組織や尿検体を用いて、ループス腎炎やその他の腎炎を分類し、Kim-1 の発現と疾患活動性や腎障害の程度について相関があるか検討する。

## 2. 研究の目的

ループス腎炎は全身性エリテマトーデス (SLE) の 50-80%に発症するといわれ、予後を規定する重要な臓器合併症である。難治性ループス腎炎は大量のステロイド、シクロホスファミド、他の免疫抑制剤併用投与でも再発を繰り返し、長期的には腎不全に至り透析導入を余儀なくされる症例が現在においても多く存在する。近年、このような既存の治療抵抗例に対する SLE の新たな治療として生物学的製剤が注目されており様々な臨床試験が現在行われている。しかしそれらの多くは課題が残る結果に終わっている。今回我々は新しい生物学的製剤の可能性を持つ抗 Kim-1 抗体 (順天堂医学部 免疫学教室 八木田先生から供与) をループス腎炎モデルマウスとして確立している MRL-Fas<sup>lpr</sup> マウスに投与し治療効果及び細胞性免疫におけるサイトカイン・ケモカイン、液性免疫における免疫グロブリンにおける影響を検討した。また、近年自己免疫疾患における制御性 T/B 細胞の役割が注目されており、ループス腎炎における RMT1-10 の制御性 T/B 細胞に対する影響についても検討した。これらの実験は研究代表者の私が留学中に抗 Kim-1 抗体 (RMT1-10) を抗 GBM 抗体による糸球体腎炎やシスプラチンによる急性腎障害において腎障害の改善効果を認めることを基礎実験としている (Nozaki Y et al. Am J Physiol Renal Physiol. 301; 1098-1104, 2011. Kidney Int. 79; 977-986, 2011)。

また、当科における腎生検検体を使用しループス腎炎、その他の腎炎、健常人群に分けて尿中 Kim-1 測定や生検組織において Kim-1 発現を免疫染色にて定量化する。それらの発現と臨床的疾患活動性 (SLEDAI) やループス腎炎組織における活動性 (Activity, chronicity index; Austin HA III, et al. Am J Med 75:

382-391, 1983) を評価し Kim-1 発現との相関性を検討することで SLE において Kim-1 発現を抑制することは疾患活動性を低下させ、腎炎の改善をもたらせる可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### A) MRL-Fas<sup>lpr</sup> マウス

無作為に 3 ヶ月齢から 6 ヶ月齢まで治療群を 2 群に分け、週二回にて腹腔内投与を施行した。

コントロール群 (Rat IgG) ; n=32

RMT1-10 250ug/body ; n=32

### 評価項目

生存率

皮疹; 3 ヶ月齢から 6 ヶ月齢まで皮疹の大きさ・数で評価した (0, none; 1, <5mm; 2, ≥2 <5mm; 3, multiple, >5mm)。

リンパ節; 処分時に頸部、腋窩、単径リンパ節腫脹程度をスコア化し評価した(0-3+)。

蛋白尿; 3 ヶ月齢から 6 ヶ月齢まで経時的に 24 時間蓄尿し、試験紙法にて半定量 (0-4)、6 ヶ月齢の処分時には ELISA 法にて定量化し評価した。

尿中 Kim-1; 3 ヶ月齢から 6 ヶ月齢まで経時的に 24 時間蓄尿し、ELISA 法にて定量化し評価した。

腎機能; 処分時に血清保存し BUN 測定し、評価した。

腎・肺組織標本 (パラフィン固定)

PAS 染色にて以下の項目を評価した。

腎組織; 糸球体細胞浸潤, 尿細管間質障害、傍血管細胞浸潤程度を評価した。

●糸球体細胞浸潤 0, normal (35-40 cells per glomerular cross section [c/gcs]); 1, few lesions with mild hypercellularity (41-50c/gcs); 2, moderate hypercellularity (51-60c/gcs), segmental and/or diffuse proliferative changes, hyalinosis and moderate exudates; and 3, severe hypercellularity (>60c/gcs) with sclerosis and/or severe necrosis, crescent formation, and heavy exudates.

### ●尿細管間質障害

Tubular pathology was evaluated by counting cortical tubules with dilation, atrophy, or necrosis: 0=normal; 1=<10%; 2=10-25%; 3=26-75%; 4=>75%.

#### ●傍血管細胞浸潤程度

Perivascular infiltrates were evaluated by numbers of cell layers surrounding 10 randomly chosen inter- and intralobular arteries (0, none; 1, <5 layers around <50% of vessel; 2, 5-10 layers around >50% of vessel; 3, >10 layers around >50% of vessel).

●肺組織；傍血管細胞浸潤程度を評価した。(0, none; 1, <3 cell layers surrounding <50% of vessel; 2, 3-6 layers around >50% of vessel; 3, >6 layers).

□特殊免疫染色 (OCT コンパウンド)

Macrophages, CD4+, CD8+, CD68+, B220+ cells, Kim-1, Tim-4, Ki-67, cleaved caspase-3, foxp-3,

□蛍光染色 (OCT コンパウンド)

IgG, C3 沈着 (Grade; 0-3)

□Realtime-PCR (腎・脾臓)

IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p40, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, GATA3, ROR $\gamma$ , T-bet, foxp3, ICAM-1, CCL1, CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, IL-4, IL-10発現を $\Delta/\Delta$ Ct法にて評価した。

□Cytokine 定量 (リンパ球)

処分時にリンパ節からリンパ球を分離し、ConA で刺激した後 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A を培養し、ELISA にて定量化した。

□FACS 解析

処分時にリンパ節からリンパ球を分離し、CD4/8 における細胞内サイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-17A), Tregs として foxp3+CD4+CD25+ cells, また Bregs として CD19+CD5+IL-10+ cells を解析した。

#### 4. 研究成果

□生存率；6 ヶ月齢までにコントロール群は 16/32 匹死亡したが RMT1-10 治療群は 4/32 のみ死亡し、有意に生存率は改善した。

□皮疹；5 ヶ月齢から RMT1-10 治療群において有意に改善した。

□リンパ節；RMT1-10 治療群において有意に縮小を認めた。

□蛋白尿；5 ヶ月齢から RMT1-10 治療群において有意に低下した。

□尿中 Kim-1；6 ヶ月齢から RMT1-10 治療群において有意に低下した。

□腎機能；RMT1-10 治療群において BUN は有意に低下した。

□腎組織；RMT1-10 治療群において有意に糸球体障害程度・尿管障害程度、傍血管細胞浸潤程度は改善した。

□肺組織；RMT1-10 治療群において傍血管細胞浸潤程度は有意に改善した。

□特殊免疫染色 (腎)；RMT1-10 治療群にお

いて acrophages, CD4+, CD8+, CD68+, B220+ cells, Kim-1, Tim-4, Ki-67, cleaved caspase-3 有意に陽性細胞数の低下を示した。反対に、Foxp3 陽性細胞は RMT1-10 治療群において有意に増加した。

□蛍光染色；RMT1-10 治療群において IgG, C3 沈着程度は有意に低下した。

□Realtime-PCR (腎・脾臓)；RMT1-10 治療群において IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, GATA3, ROR $\gamma$ , T-bet, ICAM-1, CXCL2, CXCL9, CXCL10 発現は有意に低下した。

□Cytokine 定量 (リンパ球)；RMT1-10 治療群において IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17A 産生は有意に低下した

□FACS 解析；IFN- $\gamma$  は CD4/8 において RMT1-10 治療群において有意に低下し、IL-17A は CD8 において有意に低下した。また Foxp3+CD4+CD25+ cells, CD19+CD5+IL-10+ cells において RMT1-10 治療群では有意に増加した。

#### 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 2 件)

1. Yuji Nozaki, A. Richard Kitching, Hisaya Akiba, Hideo Yagita, Koji Kinoshita, Masanori Funauuchi, and Itaru Matsumura. Endogenous Tim-1 promotes severe systemic autoimmunity and renal disease MRL-Fas<sup>lpr</sup> mice. Am J Physiol Renal Physiol. in press. 2014.

2. Yuji Nozaki, Koji Kinoshita, Tomohiro Yano, Toshihiko Shiga, Shoichi Hino, Kaoru Niki, Kazuya Kishimoto, Masanori Funauuchi, Itaru Matsumura. Estimation of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in patients with lupus nephritis. Lupus. in press. 2014.

[学会発表] (計 2 件)

##### ① 野崎 祐史

「ループス腎炎に対する抗 Kim-1 抗体の治療効果について」

第 56 回 日本腎臓学会学術総会

2013 年 5 月 10 日～2013 年 5 月 12 日

東京 東京国際フォーラム

##### ② 野崎 祐史

「ループス腎炎の疾患活動性と Kim-1 (kidney injury molecule-1) の発現との相関について」

第 57 回 日本リウマチ学会総会・学術集会

2013 年 4 月 18 日～2013 年 4 月 20 日

京都 国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 祐史 (NOZAKI, Yuji)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90411595

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：