

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19485

研究課題名(和文) M蛋白血症に起因する軽鎖結晶蓄積性組織球症による腎障害の病態解析と治療開発

研究課題名(英文) The analysis of pathogenesis and therapy development of kidney involvement of monoclonal kappa chain-induced crystal-storing histiocytosis

研究代表者

原 怜史 (Hara, Satoshi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：80749820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：病原性をもつ変異軽鎖の同定と蛋白の大量精製を行うことができた。この変異軽鎖はマウスマクロファージ、ポドサイト、近位尿細管へ取り込まれ、結晶化する機能を有することがわかったが、それぞれの細胞への病原性や取り込み機序の同定までは至らなかった。変異軽鎖を分泌するトランスジェニックマウスを作成し、脾臓への軽鎖の結晶を形成したが、変異軽鎖の分泌量が少なく、Crystal-storing histiocytosisの腎症の再現へは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージや近位尿細管のみならず、ポドサイトにも結晶を形成しうる変異軽鎖の配列を同定し、その蛋白精製を行うことができた。今後これを用いて、ポドサイトへの取り込み機序の解明を行うことで、軽鎖によるポドサイト障害の機序ひいては慢性腎臓病の機序解明と治療薬開発へつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified the pathogenic kappa light chain causing crystal-storing histiocytosis and succeeded in producing huge amount of the protein. We confirmed that this pathogenic kappa light chain was endocytosed and crystalized in mice macrophages, podocytes, and proximal tubular cells in vitro. However, we did not determine how the light chain has its toxicity for those cells and the mechanism of kappa light chain integration into those cells. We created transgenic mice which secrete the pathogenic kappa light chain. The transgenic mice formed macrophages containing kappa crystals in spleen, but did not show any kidney involvements of crystal-storing histiocytosis due to small amount of pathogenic kappa light chain secretion.

研究分野：腎臓、膠原病、医学教育

キーワード：ポドサイト 軽鎖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

M 蛋白血症は、骨髄におけるモノクローナルな形質細胞の増殖によって、異常な免疫グロブリンが産生される病態である。このような病態をきたす原疾患として血液疾患(多発性骨髄腫や悪性リンパ腫)、膠原病、感染症などが報告されている (Kyle et al. N Engl J Med, 2006)。M 蛋白血症は腎臓に様々な病変を形成することがわかっている。過剰に産生された免疫グロブリンの成分である軽鎖や重鎖が様々な形態をとりながら腎組織に沈着することによって組織障害を起こし、蛋白尿、ひいては末期腎不全へ至る。代表的なものに AL アミロイド シス、クリオグロブリン腎症、軽鎖近位尿細管症(LCPT)、軽鎖結晶蓄積性組織球症(CSH)、軽鎖沈着症などが挙げられる(Bridoux et al. Kidney Int, 2015)。今回、研究代表者らは多発性骨髄腫に合併した CSH の症例を経験した。

CSH は、モノクローナルな軽鎖が近位尿細管や間質組織球に沈着し結晶化するが、本例の極めて特異な点として糸球体ポドサイトにも同様の結晶が沈着し、ポドサイト障害に起因する蛋白尿を呈したことにある。このような症例は世界で過去に 10 例程度しか報告がされていない。ポドサイト障害に起因する蛋白尿は慢性腎臓病の最も重要な増悪因子である。ポドサイトがどのような機序で軽鎖を取り込み、結晶化し、ポドサイト障害に繋がるのかはこれまでにわかっておらず、本症例の病態解析を通じて、ポドサイト障害に伴う腎臓障害に対する特異的治療に繋がる可能性がある。

モノクローナルな軽鎖がどのように腎臓で結晶化されるのかについては、近位尿細管のみに結晶が蓄積する LCPT の症例および動物モデルを用いて解析されてきている。LCPT の動物モデルとして、患者 V をクローニングし軽鎖分泌ハイブリドーマを作成した上で、V 領域のアミノ酸変異導入により病原性を比較した報告(Decourt et al. Blood, 1999)、V トランスジェニックマウスのモデルの報告(Sirac et al. Blood, 2006)がある。これらの解析によると、結晶形成の機序として、軽鎖分子に固有であること、

V 1 サブグループの遺伝的な要因でおきること、蛋白分解に抵抗性の生理学的特性、に基づくことが指摘されている(Herlitz et al. Kidney Int, 2009)。しかしながら、CSH の動物モデルはこれまでに存在せず、糸球体ポドサイトにおける結晶形成の機序が LCPT と同様かは不明である

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、1)本症例由来の軽鎖分泌トランスフェクターマを作成し、CSH の初めてのマウスモデルを作製し、その病態を明らかにすること、2)糸球体ポドサイトにおける結晶形成と傷害の機序を明らかにすることで、ポドサイト障害に起因する蛋白尿の出現する慢性腎臓病の進展予防のための特異的治療の開発へ繋げることである。

### 3. 研究の方法

(1) 軽鎖分泌トランスフェクターマの作製:患者骨髄から RNA を抽出し、過去に報告されている軽鎖プライマーを用いて RT-PCR を行い、VL 領域の遺伝子配列同定を行っている。さらに、この配列を導入したプラスミドコンストラクトも作成完了した状態である。骨髄腫細胞に遺伝子導入することで軽鎖分泌トランスフェクターマを作製する。遺伝子導入の手法としては、エレクトロポレーションを用いる。

(2) CSH マウスモデルの作成と解析:作製した軽鎖分泌トランスフェクターマの大量培養を行い、その細胞をマウスに腹腔内投与する。1 週間毎に、腹水の有無の確認と採血を行う。十分な腹水が作成されたところで屠殺し、組織のホルマリン固定を行う。光学顕微鏡(HE、PAS、PAM 染色)および電子顕微鏡、免疫染色(CD68)を用いて、CSH の腎病変が再現できるかを病理組織学的に解析する。

(3) 糸球体ポドサイトにおける軽鎖の取り込みと結晶化、ポドサイト傷害機序の解析:作製した CSH マウスモデルおよびマウス由来不死化培養ポドサイトを用いて、ポドサイトへの遊離軽鎖の取り込み経路や、ポドサイト内での結晶形成、そしてポドサイト障害の機序を解析する。

### (3-1) CSH マウスモデルの腎組織を用いた軽鎖の取り込み機序の解析

仮説として、エンドサイト シスまたはマクロピノサイト シスが挙げられるため、これらに関する蛋白とポドサイト・軽鎖との共局在を免疫染色で解析する。下記の二重染色を行う。

・ポドサイト構成蛋白 (podocin) と軽鎖 (kappa)

・エンドサイト シス関連蛋白 (megalin/cubilin) , マクロピノサイト シス関連蛋白 (aquaporin, PI3K, cytochalasin) と軽鎖 (kappa)

### (3-2) マウス不死化培養ポドサイトを用いた軽鎖取り込み、結晶形成およびポドサイト障害の病態解析

1) まず作製した軽鎖分泌トランスフェクターマが産生した遊離軽鎖をマウス不死化培養ポドサイトへ貪食させる。自然に貪食しなければオプソニン化を行う。当研究室ではマウス IgG3-antiIgG2a-リウマトイド因子 (RF) ハイブリドマを有しているため (Gyotoku ら, J Immunol, 1987)、前述のコンストラクトの Fc 領域を IgG2a に組み替えることで、この RF を用いて遊離軽鎖のオプソニン化が可能である。

2) ポドサイトの遊離軽鎖の貪食が確認されたら、(3-1)にて推定される取り込み機序を阻害することで、軽鎖のとりこみがなくなるか阻害実験を行う。

3) 次に、取り込まれた遊離軽鎖は、近位尿細管ではライソソーム内のプロテアーゼにて分解されることがわかっている。ポドサイトにおいても同様の機序で分解されるのか、また分解抵抗性を有しているのか解析する。これは軽鎖を取り込んだポドサイトから蛋白を抽出し、プロテアーゼ処理をした後に、ウエスタンブロッティングを行い、バンドのサイズが変化しているかで分解抵抗性を判定する。

4) 最後に遊離軽鎖が結晶化した場合にどのような機序でポドサイト障害が生じるのか、軽鎖を取り込んだポドサイトから RNA や蛋白を抽出し、炎症性サイトカインや活性酸素、ポドサイト構成蛋白について realtime RT-PCR やウエスタンブロッティングで解析を行う。

(4) VL 領域のアミノ酸変異が病態に与える影響の解析: 同定した VL 領域配列において、主に 2 点の興味深いアミノ酸変異を伴っていた。それは次の 2 点であった。1) CDR2 領域の直前のシステインの変異。2) CDR1 領域の最初のアミノ酸がグルタミンからグルタミン酸へ変異。前者は免疫グロブリンの高次構造に重要なジスルフィド結合に、後者は遊離軽鎖の電荷に、それぞれ重要なアミノ酸である。そのため今回の遊離軽鎖が、軽鎖の高次構造や電荷に変化を来し、ポドサイトへの取り込みや結晶化、ポドサイト障害を誘発している可能性について、遺伝子変異導入法を用いて、アミノ酸変異バリエーションを作成し、病原性を比較する。

(5) CSH マウスモデル・蛋白尿マウスモデルへの蛋白取り込み阻害薬の投与実験: 上記までに明らかにした軽鎖によるポドサイト障害の病態に対して、特異的な阻害薬 (メガリン阻害薬、マクロピノサイト シス関連蛋白の阻害薬) を CSH マウスモデルに投与し、蛋白尿および腎機能低下が改善されるか検討する。次に、他の蛋白尿モデル (アドリアマイシン腎症、NEP25 マウス) にも改善効果がみられるか投与実験を行う。

## 4. 研究成果

1) 発現ベクターの作成: 当初予定していたヒト、マウスキメラ抗体ベクターに加え、より患者病態に近い可変領域・定常領域ともヒトの完全ヒト型抗体ベクターの 2 種類を作成した。ヒト 定常領域のクローニングを行い、可変領域を組み込んだベクターに定常領域を組み込み、発現ベクターを作成した。

2) 強制発現系による In vitro モデルの作成: 当初予定していたトランスフェクターマの作成は、エレクトロポレーション後の細胞上清中の蛋白分泌を確認することができなかった。その原因を調べるため、RNA 発現を定量的 PCR にて確認すると発現を認めた。しかしながら、蛋白発現を免疫染色およびウエスタンブロット法にて確認したが、蛋白の発現は確認できなかった。そのため、ストラテジーを変更し、一過性遺伝子導入の系に実験系を変更する方針とした。lipofectamine3000 を用いて、CHO 細胞、HEK293 細胞

胞に遺伝子導入を行った。数日後に免疫染色を行い、 $\alpha$  の発現が確認された。また上清の蛋白濃度を測定すると、CHO細胞で10  $\mu$ g/ml、HEK293細胞で1-5  $\mu$ g/ml程度の濃度を確認し、目的の蛋白を得ることができた。また、HK-2という近位尿細管由来細胞を使用し、同様の検討を行ったが、こちらも $\alpha$  の発現が確認された。

3) In vivoのCSHモデルの作成: ヒト 定常領域を組み込んだ、トランスジェニックマウスを作成するため、コンストラクトを作成した。筑波大学へ受託依頼を行い、トランスジェニックマウスを作成した。経時的に表現系を確認したところ、生後早期から血中に $\alpha$  の発現が確認された。臓器病変に関して、6ヶ月齢頃より脾臓内に結晶の析出が認められ、 $\alpha$  による結晶であることを確認した。しかしながら腎に関しては15ヶ月齢まで観察したが、結晶の析出および病変は確認されなかった。このマウスの分泌している $\alpha$  の発現量が少ないことが理由である可能性があった。このため現在、大腸菌による発現系を用いて大量精製を行い、それを腹腔内投与することで、疾患モデル作成しようと現在試みている。

4) 取り込みによるIn vitroモデルの作成: マウスマクロファージであるRAW264.7をLPSにて刺激し、 $\alpha$  を1時間インキュベートし、その後免疫染色を行ったところ、取り込まれることを確認した。 $\alpha$  変異  $\alpha$  は正常 $\alpha$  と比較し、時間が経っても消失しにくいことを確認した。これが結晶化した  $\alpha$  かどうか細胞電顕で確認した。

6) 不死化培養ポドサイトにおけるIn vitroモデルの作成: マウス不死化培養ポドサイトにマウス変異  $\alpha$  を1hrインキュベートし取り込ませた。その結果、ポドサイトにおいても取り込みが確認され、24hrまで観察し、どの時間帯においても取り込みが残っていることを確認した。しかしながら効率が5-10%と低い結果であった。

まとめると、病原性をもつ変異軽鎖の同定と蛋白の大量精製を行うことができた。この変異軽鎖はマウスマクロファージ、ポドサイト、近位尿細管へ取り込まれ、結晶化する機能を有することがわかったが、それぞれの細胞への病原性や取り込み機序の同定までは至らなかった。変異軽鎖を分泌するトランスジェニックマウスを作成し、脾臓への軽鎖の結晶を形成したが、変異軽鎖の分泌量が少なく、CSHの腎症の再現へは至らなかった。このため現在、大腸菌による発現系を用いて大量精製を行い、それを腹腔内投与することで、疾患モデル作成しようと現在試みている。

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 0件）

1. 著者名 20.Ito K*, Hara S*, Yamada K, Zoshima T, Mizushima I, Fujii H, Miyazaki R, Kawai Y, Yachie A, Nagata M, Izui S, Yamagichi M, Kawano M. (*equally contribution)	4. 巻 98
2. 論文標題 A Case Report of Crystalline Light Chain Inclusion-Associated Kidney Disease Affecting Podocytes but Without Fanconi Syndrome: A Clonal Analysis of Pathological Monoclonal Light Chain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e13915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.00000000000013915.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
---------------------------	-----------------------	----