

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860755

研究課題名(和文) IgG4関連腎臓病モデルマウスの確立とその病態への自己反応性Th2細胞の役割

研究課題名(英文) Establishment of murine model for human IgG4-related kidney disease and determination of the role for autoreactive Th2 cells in the pathology

研究代表者

坂本 夏美(Sakamoto, Natsumi)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60528090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子IRF-1を欠損するSLEモデルマウス(MRL/lpr系統)における腎病変とヒトIgG4関連腎臓病との比較を行い、本マウスのヒトIgG4関連腎臓病モデルとしての有用性について検討した。IRF-1欠損MRL/lprマウスでは、9週齢から腎の尿細管間質に炎症性細胞浸潤を認めた。腎組織の病理解析の結果、好酸球・CD4陽性T細胞・IgG1陽性形質細胞の浸潤が認められた。また、MRL/lprマウスの蛋白尿の主要因となる糸球体病変がIRF-1欠損下では改善されたが、蛋白尿ならびにBUN高値を示した。以上より、本マウスがIgG4関連腎臓病の腎障害を研究するモデルとして有用であることが一部示された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed renal pathology of lupus-prone MRL/lpr mice deficient for a transcriptional regulator, interferon regulatory factor-1(IRF-1), and compared their pathogenesis with those of human IgG4-related kidney disease (IgG4-RKD) for validation of IRF-1 KO MRL/lpr mice as a murine model for IgG4-RKD. They exhibited significant infiltrations of eosinophils, CD4-T cells, and IgG1-plasma cells in their renal tubulointerstitia from 9 weeks of age but not in their glomeruli. Furthermore, they exhibited significant Th2 polarity in their spleens and kidney-infiltrating lymphocytes. Despite the improved glomerular inflammation, they showed a high level of blood urea nitrogen and albuminuria, possibly due to their tubulointerstitial inflammatory lesions. Our results suggested that IRF-1 KO MRL/lpr mice could be conveniently used for a model for IgG4-RKD since they showed significant Th2 polarity and severe tubulointerstitial nephritis with impaired renal function.

研究分野：膠原病・リウマチ内科学

キーワード：IgG4関連腎臓病 IRF-1 MRL/lprマウス

1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は、近年世界的に注目を集めている全身性の慢性炎症性疾患である。本疾患では自己免疫の関与が示唆され、血清 IgG4 高値・傷害組織における Th2 優位のサイトカイン産生などが報告されているが、未だ原因は特定されていない。近年、IgG4 関連疾患の中でも腎臓に境界明瞭な炎症性細胞浸潤を認める IgG4 関連腎臓病 (IgG4-RKD) が新規疾患概念として提唱された (*日腎会誌*, 53:1062, 2011)。

IgG4-RKD 主病変である尿細管間質性腎炎は、腎間質への炎症性細胞浸潤を伴う尿細管機能障害を示し、時に透析治療を要する重篤な腎不全を来す。間質への細胞浸潤はリンパ球を主体とし、その他 IgG4 陽性形質細胞や好酸球の浸潤と線維化、血清 IgG・IgE 高値、低補体血症などが特徴とされる。本疾患の病態機序には IgG4 自体の関与は弱く、Th2 や Treg 細胞の関与が示唆されている (*Clin Nephrol*, 73:385, 2010)、その多くは解明されていない。また、IgG4-RKD ではステロイド治療が非常に有効であるが、ステロイド漸減中に腎炎および腎外多臓器病変を再燃する可能性が高いことが問題となっている。IgG4 関連腎臓病に対する有効な治療法を見出すためには、有用なモデル動物の確立とそれを用いた病態機序の解明が必要不可欠である。

申請者は、Th1 細胞の分化に機能する転写因子 Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) を欠損する自己免疫疾患モデルマウス (MRL/lpr 系)、すなわち *Irf1*-KO MRL/lpr マウスが、18 週齢において腎の白色腫大および間質への境界明瞭なリンパ球主体の炎症性細胞浸潤を呈する IgG4-RKD の病理組織像と類似した尿細管間質性腎炎を自然発症することを報告した (*Arthritis Rheum*, 64:S619, 2012)。一方、非自己免疫性の *Irf1*-KO C57BL/6 マウスでは、32 週齢までに炎症性病変は認められなかった。また、本マウスでは 18 週齢において糸球体病変を認めなかった。以上の成果から、腎における病理像が類似していることと、発症要因に自己免疫が関与することから、本マウスを IgG4 関連腎臓病のモデルとして利用できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、*Irf1*-KO MRL/lpr マウスが発症する尿細管間質性腎炎の免疫細胞解析・血清生化学的解析・病理組織学的解析を行い、本マウスの腎炎発症メカニズムの解明を行う。また、IgG4-RKD の病態と比較することで、本マウスの IgG4-RKD 疾患モデルとしての有用性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 腎炎の病理組織学的解析

18 週齢の *Irf1*-KO MRL/lpr マウスでは、尿細管間質における炎症性細胞浸潤が広域に

起こり、病理像からそのメカニズムを推定するのは困難である。本研究では、6 週齢から 18 週齢までのマウスから採取した腎の切片を HE 染色し、炎症性細胞浸潤の進行について評価した。

(2) 血清生化学的評価

9 週齢から 18 週齢まで、野生型および *Irf1*-KO MRL/lpr マウスから 3 週毎に採血を行い、血清中の C3 量・抗 dsDNA 抗体値・BUN 値・各種炎症性サイトカイン量を ELISA で測定した。

(3) 蛋白尿の評価

9 週齢から 18 週齢まで、野生型および *Irf1*-KO MRL/lpr マウスから 3 週毎に 1 日採尿を行い、尿中のアルブミン含量を ELISA で測定した。

(4) 脾臓・腎臓リンパ球の FACS 解析

9 週齢から 18 週齢までの野生型および *Irf1*-KO MRL/lpr マウス脾臓・腎臓を回収し、T 細胞・B 細胞数ならびにそのサブポピュレーションについて、FACS での解析を行った。

(5) 腎臓の免疫組織化学解析

18 週齢の *Irf1*-KO MRL/lpr マウスの腎臓から凍結切片を作製して、抗 CD4、CD138、IgG1 抗体を用いて蛍光または酵素を用いた組織染色を行った。

4. 研究成果

18 週齢の *Irf1*-KO MRL/lpr マウスの尿細管間質における炎症性細胞浸潤は非常に広域にわたるものであり、病理組織像からその発症要因を推定するのは困難である。本研究では、6 週齢以降の *Irf1*-KO MRL/lpr マウスについて腎の病理組織学的解析を行い、発症要因の推定を行った。その結果、9 週齢以降から尿細管間質領域における炎症性細胞の浸潤が認められ、血管周囲における浸潤が多数認められた。また、初期の浸潤細胞にはリンパ球が多く、その後好酸球の浸潤が増加した。有意差は得られていないが、炎症部位における好酸球数は細胞浸潤が見られてから 15 週齢まで増加し、その後減少傾向にあった。

炎症性病変が認められた 9 週齢から採血・採尿を行い、ELISA を用いて各種因子の測定を行った。サイトカインは IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TNF の測定を行った。その結果、IL-10 のみに有意差が認められ、*Irf1*-KO MRL/lpr マウスで低値であった。IL-10 は主に抑制性の免疫細胞で産生され、Treg はその主要な 1 つである。また、ヒトにおいて IgG4 へのクラススイッチは IL-4、IL-10 により誘導されることが知られている。今後、Treg、IL-4 および IL-10 の炎症局所での特異的検出等を行うことで、これらの病態への関与をより詳細に評価する。

血清中の抗 dsDNA IgG 自己抗体値を測定した結果、野生型と同等の高値が認められた。血清中の C3 量についても、野生型と同等に

C3 低値であった。以上の結果から、*Irf1*-KO MRL/*lpr* マウスは自己免疫背景を持ち、低補体血症を示すことが明らかとなった。

炎症性病変に伴う腎機能の変化を、血清中尿素窒素量(BUN)と尿中アルブミン量で評価した。*Irf1*-KO MRL/*lpr* マウスの BUN 値は野生型と同等に高値であり、尿中アルブミン量は野生型と比較して低い傾向にあったが有意差は認められなかった。

FACS で脾臓・腎臓の免疫細胞の検討を行った結果、18 週齢の *Irf1*-KO MRL/*lpr* マウスでは野生型と比較して、CD4 陽性 T 細胞数の増加と CD8 陽性 T 細胞の減少が認められた。一方、B 細胞数に差は認められなかった。CD4 陽性 T 細胞のサブpopulation (Th1、Th2、Tfh、Treg) について検討を行った結果、*Irf1*-KO MRL/*lpr* マウスの脾臓・腎臓で Th1・Th2 の増加が認められた。一方、Tfh と Treg については有意差は認められなかった。これまでに判明していた *Irf1*-KO MRL/*lpr* マウスの腎臓における Th2 に加え、Th2 と相互に抑制する関係にある Th1 の増加も同時に認められ、Th2 だけでなく各種ヘルパー T 細胞の関与を評価する必要があると考えられた。

腎臓の免疫染色の結果、*Irf1*-KO MRL/*lpr* マウスの炎症部位には CD4 陽性 T 細胞に加えて IgG1・CD138 共陽性の形質細胞が一部検出された。マウスは IgG4 クラスの抗体を産生せず、IgG1 がヒトの IgG4 と類似した性状を示すと言われている。そのため、本研究では IgG1 のみの検出を行っていたが、CD138 陽性で IgG1 陰性の細胞が多数存在することから、より多種の免疫組織染色による検討を行う必要があると考えられた。さらに、CD4 陽性 T 細胞についてもマスターレギュレーターとなる転写因子の同時染色を行うこと、野生型マウスへの分離細胞移入実験を行うことにより、より詳細なメカニズムが判明すると考えられた。

以上の結果より、*Irf1*-KO MRL/*lpr* マウスは尿細管間質病変依存性・糸球体非依存性の腎障害を示し、局所に形質細胞・CD4 陽性 T 細胞・好酸球の高度浸潤を認めること、さらに自己免疫が関与し、低補体血症を示すことから、ヒト IgG4-RKD のモデルとして有用である可能性が示された。より詳細に病態の解析を行うことで、本マウスを用いた IgG4-RKD の治療戦略の開発研究への有用性が示されることが期待される。

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 1 件)

- (1) Natsumi Sakamoto, Takeshi Machida, Minoru Takahashi, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine, Essential role of mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 (MASP-1/3) in the

development of lupus-like glomerulonephritis in MRL/*lpr* mice. *Immunobiology*, 221:1166 (2016), 査読有

〔学会発表〕(計 件)

- (1) Natsumi Sakamoto, Takeshi Machida, Minoru Takahashi, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine, Essential role of mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 (MASP-1/3) in the development of lupus-like glomerulonephritis in MRL/*lpr* mice. XXVIth International Complement Workshop, 81, Kanazawa, Japan, 2016 年 9 月 6 日
- (2) Takeshi Machida, Tomoko Omori, Natsumi Sakamoto, Xian Zhang, Gary S. Gilkeson, and Hideharu Sekine, IFN- γ receptor-1 is required for intrafollicular localization of marginal zone B cells in the spleens of lupus-prone MRL+/+ mice. 16th International Congress of Immunology, 946, Melbourne, Australia, 2016 年 8 月 25 日
- (3) Takeshi Machida, Natsumi Sakamoto, Tomoko Omori, Xian Zhang, Gary S. Gilkeson, Hideharu Sekine, IFN- γ receptor-1 is required for recruitment of CD19⁺CD1d^{hi} marginal zone-B cells into the splenic germinal centers in lupus-prone MRL/*lpr* mice, 第 44 回日本免疫学会学術集会, 1-B-W1-10-O/P, 札幌コンベンションセンター, 2015 年 11 月 18 日
- (4) Takeshi Machida, Natsumi Sakamoto, Tomoko Omori, Xian Zhang, Gary S. Gilkeson, and Hideharu Sekine, Altered localization of CD19⁺ B cells in the splenic germinal centers of IFN- γ receptor-1 deficient lupus-prone MRL+/+ mice. The 11th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus, P2.02, Vienna, Austria, 2015 年 9 月 4 日
- (5) 高住美香, 高橋実, 大森智子, 町田豪, 坂本夏美, 石田由美, 関根英治, マウス型リコンビナントタンパク rmMAp44-PA, rmMAp44-Ig の作成と補体レクチン経路の阻害作用, 第 52 回補体シンポジウム, D-1, 名古屋大学, 2015 年 8 月 22 日
- (6) Takeshi Machida, Natsumi Sakamoto, Gary S. Gilkeson, and Hideharu Sekine, A dual role for IFN- γ in development of peripheral B cells in lupus-prone MRL/*lpr* mice. 2014-Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 1923, Boston, MA, USA, 2014 年 11 月 18 日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 夏美 (SAKAMOTO NATSUMI)
福島県立医科大学・免疫学講座・助教
研究者番号：60528090

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし