

ループス腎炎発症機序

—— ヒストン・DNA・ヌクレオソーム・抗核抗体の役割 ——

新潟大学医学部腎研究施設機能制御学分野

森岡哲夫

Pathogenesis of Lupus Nephritis

—— Role of Histones, DNA, Nucleosome, Anti-Nuclear Antibodies ——

Tetsuo MORIOKA

*Department of Cellular Physiology,
Institute of Nephrology, Niigata
University School of Medicine*

A possibility involving cationic nuclear autoantigens is presented in detail. Histone was employed as a model antigen, representative of this group. Histones were shown to have high affinity for the rat GBM; they could also act as planted antigen and induce IC formation; furthermore they were able to mediate the binding of highly anionic DNA. The demonstration of histones in glomerular deposits in both lupus mice and patients with SLE is important evidence, linking such molecules with the kidney lesions. Nucleosome-like structures as well as nucleosome-anti-DNA immune complexes were shown to have the affinity for the GBM. We discussed the importance of the nucleosome in the induction of lupus nephritis.

Key words: lupus nephritis, nucleosome, charge, histones, anti-DNA antibody

ループス腎炎, ヌクレオソーム, 荷電, ヒストン, 抗 DNA 抗体

Reprint requests to: Tetsuo MORIOKA MD,
Department of Cellular Physiology,
Institute of Nephrology, Niigata
University School of Medicine,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部腎研究施設機能制御学分野
森岡哲夫

はじめに

SLE は自己免疫疾患のなかでも多臓器障害を起こす代表的なものである。関節炎、血管炎、漿膜炎、腎炎、中枢神経障害などを引き起こす。なかでもループス腎炎は SLE の臓器障害の予後を左右する重要な病態であり、糸球体係蹄壁に免疫グロブリン、補体の沈着が見られることから免疫複合体性腎炎 (immune complex glomerulonephritis) と考えられている¹⁾。免疫複合体性腎炎とは免疫複合体が腎に沈着する事が initiation となる腎炎で、どのような IC が形成されるかによりその腎炎像が変わってくる事が知られており、どんな IC が形成されるのか、すなわちどんな抗原が pathogenic antigen であるか、またその IC がどの様に糸球体に沈着するかについてを知ることが重要となる²⁾。

SLE は多くの自己抗体とりわけ核抗原に対する自己抗体を産生する事が特徴であり、DNA、ヒストン、Sm、RNP などに対する抗体が出現してくる。この中でも抗 DNA 抗体特に抗 dsDNA 抗体は、腎炎発症に先行して血中抗体価が上昇する、病勢に伴って抗体価が変動する、ループス腎炎患者 biopsy およびループス自然発症マウスの腎から溶出してきた抗体には抗 DNA 抗体が含まれる、ことなどからループス腎炎の病態発現に、抗 DNA 抗体・DNA-抗 DNA 抗体 IC が重要な役割を果たすと考えられてきた³⁾。

IC の糸球体への沈着機序

IC の沈着機序には大きく分けて CIC と in situ IC の考え方がある²⁾。CIC の考え方では循環血中で抗原と抗体が免疫複合体を形成しこの IC が組織に沈着すると考える。抗原と抗体の割合により様々な大きさの IC が形成される。この中のある特定の大きさを持った IC が大きさにより糸球体のメサンギウム領域・内皮下・上皮へ沈着すると考える。これに対し in situ IC の考え方は組織 (この場合は糸球体) に抗原が結合しその結合した抗原に抗体が反応するとの考え方である。この場合抗原の性状が特に重要となる。すなわち抗原が糸球体構成物に対して親和性を持つ必要がある。in situ IC の機序に関してはフライブルグ大 Vogt 等のグループの陽性荷電物質を用いた研究により多くが明らかとなった⁴⁾。このことを理解するために糸球体の構造特に糸球体基底膜の構造を理解する必要がある。糸球体は血液の濾過すなわち必要なものを体内に残し不必要なものを排出することが役割である。その中で基底膜が高分子のアルブミ

ンなどを体内に残し尿毒素などを排出する役目の主な機能を担っていると考えられている。基底膜はⅣ型コラーゲンの編み目構造を中心としてそこにヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニンなどの陰性荷電をもった糖蛋白、プロテオグリカンが存在している。このような構造で基底膜は 50Å 以上の中性デキストランの通過を阻止するサイズバリアーとして働いている。また HSPG やラミニンなど陰性荷電物質が多く存在することで全体として陰性に荷電しておりチャージバリアーとしても働いている²⁾。血清蛋白の多くは表面が陰性に荷電している。そのため基底膜とは電氣的反発力で結合しにくくなっている。逆に表面が陽性に荷電している蛋白は糸球体に結合しやすい性質を持つことになる。糸球体は分子篩としても働いているのでその大きさによっても基底膜への沈着のしやすさは変わってくる。Vogt 等は様々な分子量を持つ蛋白を修飾し荷電状態を変えて実験を行った結果糸球体に macromolecule の沈着する条件として、等電点 9 以上、分子量 50 kd 以上が必要であることを明らかにした⁵⁾。

ループス腎炎における IC の沈着

ループス腎炎における IC の沈着機序については次のような仮説があった⁶⁾。

- i) IC が passive に糸球体にトラップされる。
- ii) DNA が GBM に結合しそれに抗 DNA 抗体が結合する。
- iii) 抗 DNA 抗体が GBM 成分に交差反応性がある。
- iv) cationic 抗 DNA 抗体が GBM に結合する。

これらのなかで我々の大きな疑問の1つが DNA のような強陰性荷電物質が果たして糸球体基底膜に沈着しうるかということであった。実際 DNA の核内における存在形式を考えると DNA は強陽性荷電物質であるヒストンと結びついてヌクレオソームを形成していることがわかる。これらのことから我々は、DNA は強陽性荷電物質であるヒストンを介して糸球体基底膜に沈着するとの仮説をたてた。

ヒストンを介した IC の糸球体への沈着

ヒストンを介した DNA 抗体あるいは DNA-抗 DNA IC の沈着機序には次の4つが考えられる⁷⁾。

1. ヒストンが GBM に結合しそれに DNA、抗 DNA 抗体が結合する。
2. ヒストンが GBM に結合し、それに血中の DNA-抗 DNA IC が結合する。

3. ヒストン—DNA 複合体 (ヌクレオソーム様構造) が GBM に結合し、それに抗 DNA 抗体が結合する。

4. 血中でできたヒストン—DNA—抗 DNA 複合体が GBM に結合する。

これらをラットを用いた実験モデルで検証した。

ヒストンは H1, H2A, H2B, H3, H4 の5つのサブクラスからなる⁸⁾。等電点11以上で各サブフラクションは分子量 11 kd から 22 kd である。これだけを考えると分子量が小さすぎて沈着しないのではないかと考えられるがヒストンは self-aggregatoin を起こすため十分に結合することが可能となる⁹⁾。Schmiedeke 等はまずヒストンをラット尾静脈より静注し30分後にラットを屠殺しその腎を抗ヒストン抗体を用いた間接蛍光抗体法で検索したところ糸球体係蹄壁、ペリチュブラーキャピラリーに陽性像が認められた。コントロールとしてリゾチーム (リゾチームは等電点はヒストンと同様であり分子量もサブフラクションと同様であるが self-aggregation を起こさない) を静注したものでは陽性像は認められなかった。腎還流モデルでも同様にヒストンの沈着が認められた。次に彼らはヒストンを腎還流した後 DNA を同様に腎還流し、抗 DNA 抗体により DNA の局在を検索した。ヒストンを還流した群においてのみ糸球体係蹄壁に DNA の沈着が認められた⁹⁾。このことから糸球体係蹄壁に沈着したヒストンは DNA の糸球体への沈着を介在できることが明らかとなった。次に我々はヒストンが DNA—抗 DNAIC の沈着を介在しうるかについて検討した。DNA, DNA—抗 DNAIC の in vivo における動態をみると、次のようなことが知られている。DNA を静注すると肝で速やかに血中から clear される。また内因性ヌクレアーゼにより消化される。DNA—抗 DNAIC は largeDNA を含む DNA 単独投与の時と同様な早さで血中から速やかに clear される¹⁰⁾。ある種の抗 DNA 抗体は DNA と結合すると DNA を DNase 消化から守ることができる¹¹⁾。この抗 DNA 抗体を含む IC を DNase で消化すると small DNA—anti-DNA complex ができこのような small IC は血中に長くとどまることができる¹²⁾。このことから我々はこのような small IC がヒストンを介して GBM に結合するかを検討した。モノクローナル抗 DNA 抗体と ¹²⁵I でラベルした牛胸腺由来 DNA を抗原過剰で IC を形成させた後 DNase で消化し small IC を形成させた。この IC はほぼ 7S の大きさを示し、抗原：抗体比は 1：1 であった。この IC をヒストン還流後に還流すると、15分後では腎臓で約20%単離糸球体で約15%の沈

着を認め、蛍光抗体法でもヒストン、抗 DNA 抗体の沈着を確認できた。電顕的にも上皮皮下、内皮皮下に electron dense deposit を認めた¹³⁾。

ついでヒストン—DNA が沈着後に抗 DNA 抗体の結合する3番目の可能性について検討した。最初にヌクレオソームコア粒子を単離しこれを腎還流したが結合は認められなかった。これはヒストンの陽性荷電部位を DNA がほとんどすべておおってしまっていると考えられた。そこでこのコア粒子をヌクレアーゼで処理し、その陽性荷電部位を露出させようと試みたがこの処理によりヌクレオソームコアがほとんどすべて沈殿してしまい可溶性のヒストン—DNA を得ることができなかった。そのため牛胸腺由来ヒストンと平均 200 bp の DNA を用いて再構成したサブヌクレオソームを腎還流したところ、糸球体にヒストンと DNA の沈着を認めた¹⁴⁾。さらにヒストン—DNA—抗 DNAIC の沈着の可能性を検証した。まずヒト由来抗 DNA 抗体と DNA を反応させた後 DNase で消化し small IC を作成し、これにヒストンを加えヒストン—DNA—抗 DNAIC を作成した。この IC を左腎より還流し15分後に屠殺し検索した。糸球体にヒストン、ヒト IgG が認められ電顕的にも Electron dense deposits が認められた。これらの結果からヒストンを介し DNA, 抗 DNA 抗体が糸球体へ沈着しうることが明らかとなった¹⁵⁾。

ループス腎炎におけるヒストンの存在

Stoeckle 等はこれが実際ループス腎炎において働いているのかをループスモデルマウスとループス腎炎患者腎バイオプシーを用いて検索している。ループスモデルマウスとして B/WF1 マウスと GvH マウスを用いているが、ヒストンが糸球体係蹄壁に沿ってマウス IgG の沈着と同様なパターンで認められた。GvH マウスでは27例中25例にヒストンが検出され、B/WF1 マウスでは39例中10例にヒストンが認められている。また尿蛋白の有無で比較すると GvH マウスにおいては尿蛋白陽性例では全例、B/WF1 マウスでも12例中8例でヒストンの沈着が認められている¹⁶⁾。またループス患者腎バイオプシーでは39例中26例にヒストンの沈着が認められている。これらのことから実際のループス腎炎においてもヒストンが大きな役割を担うことが考えられる¹⁷⁾。

抗 DNA 抗体の GBM への交差反応性におけるヌクレオソームの役割

また抗 DNA 抗体の持つ GBM への交差反応性にも

ヒストン-DNA 複合体 (ヌクレオソーム) が介在していることが明らかとなった。この仮説はオランダの Berden グループの提唱したものであるが、彼らはモノクローナル抗 DNA 抗体のうちあるものは HSPG に対する交差反応性があることを示し、この交差反応性によって抗 DNA 抗体が直接 GBM に結合するとの仮説をたてた¹⁸⁾。彼らは抗 DNA 抗体を産生するミエローマ細胞を培養し抗体を得ていたが、この培養液中にはミエローマ細胞の細胞死によって核成分も放出される。この核抗原と抗体が反応し IC を形成しており通常の抗体精製方法では IC として精製されていた。これを高塩濃度下に proteinG を用いて抗体だけに精製すると、DNA に対する反応性には変化がなかったが HSPG に対する反応性は消失した。この精製時の抗原にはヒストンが含まれており、抗体をこの抗原と再び反応させると HSPG に対する抗体活性が回復することを報告した¹⁹⁾。またこの IC を腎還流すると糸球体糸体壁に沈着する事も報告している²⁰⁾。このことからヌクレオソームが抗 DNA 抗体の糸球体への結合に大きな役割を果たすことが明らかとなった。これらのことから、ループス腎炎発症においてヌクレオソームがかなり中心的な役割を果たすのではないかと考えられる。

ヌクレオソームを中心としたループス腎炎発症機序の仮説

図 1 にヌクレオソームを中心としたループス腎炎の発症機序についての現在我々が考えている仮説を示す²¹⁾。SLE ではリンパ球にアポトーシスの異常があることが明らかになってきている²²⁾。このことによりリンパ球の増殖がリンバ器官内で起こり、除去されるはずの自己反応性 T 細胞が残る。また、逆に抹消ではリンパ球は正常リンパ球よりもアポトーシスを起こしやすいことも明らかになっている²²⁾。このような細胞のアポトーシスによりヌクレオソームが血中に放出される。通常、ヌクレオソームはマクロファージ或いは肝細胞で処理されるが、この量が増加すると通常よりも血中に長時間ヌクレオソームは存在することになる。このヌクレオソームが抗原として T 細胞の stimulator として働き、抗 DNA 抗体、抗ヌクレオソーム抗体などの産生が亢進する。これらの抗体が血中のヌクレオソームと IC をつくる。ヌクレオソーム自身或いは IC は内因性のヌクレアーゼの消化を受け陽性荷電部位が露出しこの陽性荷電部位によって GBM の陰性荷電部位に結合し、immune complex glomerulonephritis が発症すると考えられる。

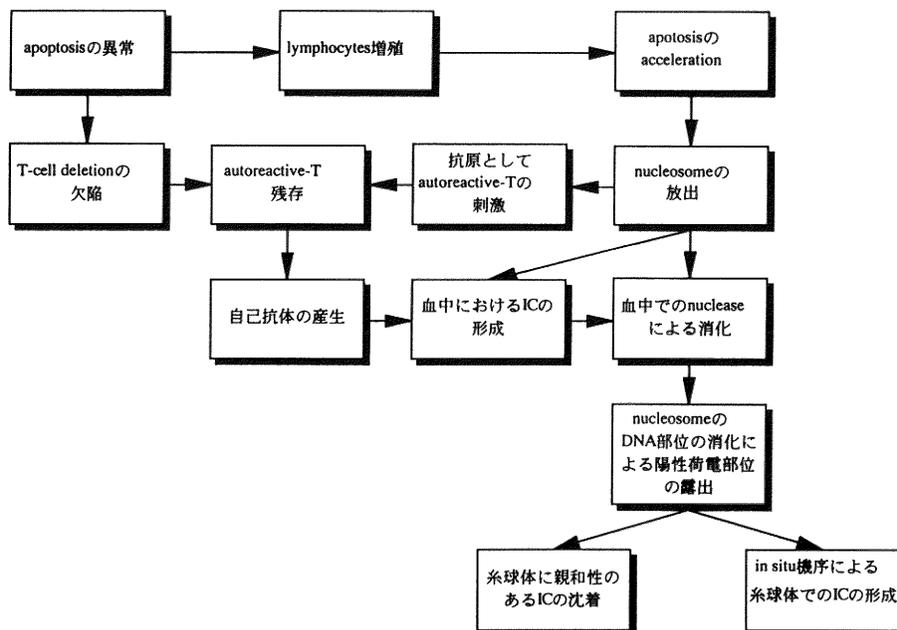


図 1 ヌクレオソームを中心としたループス腎炎発症機序の仮説。
文献²¹⁾より

終わりに

本稿ではヌクレオソーム・抗 dsDNA 抗体を中心に述べてきた。しかしループス腎炎では例えば抗 DNA 抗体の一部のみが腎障害性を有すること、抗 dsDNA 抗体陰性でもループス腎炎を発症する例がある事などより単一の機序で引き起こされているとは考えにくく、他の抗原抗体系の関与も十分に考えられる。それら抗原を検索すること、また組織障害性を持つ自己抗体を検索しそれらがどのように組織を傷害するのかを明らかにすることが今後重要になると考えられる。

本研究は主としてフライブルグ大学 Vogt 教授研究室でのデータであり、Professor Arnold Vogt, Professor Stefan Batsford, Dr. Frank Soteckl, Dr. Rainer Woitas (フライブルグ大学), 藤垣嘉秀博士 (浜松医科大学第一内科), 清水不二雄教授, 追手 巍教授 (腎研) との共同研究によるものです。ここに心から感謝いたします。また発表の機会を与えてくれた新潟医学会, 座長の労をとっていただいた追手巍教授に深謝いたします。

参考文献

- 1) **Glassock, R.J., Cohen, A.H., Adler, S.G. and Ward, H.J.:** Secondary glomerular diseases. In: *The Kidney*, B.M. Brenner and F.C. Rector, Philadelphia, Saunders, W.B., 1280~1368, 1991.
- 2) 森岡哲夫, 追手 巍: 免疫複合体沈着様式と腎病変, 別冊医学の歩み, 腎疾患—state of arts—Ver. 2, 36~39, 1997.
- 3) **Abrass, C.K.:** Immune complex disease. In: *Textbook of Nephrology*, Voll edited by Massry SG and Glassock RJ, Baltimore, Williams and Wilkins, 562~, 1989.
- 4) 追手 巍: In situ IC 形成と糸球体腎炎. *Medical Immunology*, **16**: 337~343, 1988.
- 5) **Vogt, A., Rohrbach, R., Shimizu, F., Takamiya, H. and Batsford, S.:** Interaction of cationized antigen with rat glomerular basement membrane: in situ immune complex formation. *Kidney Int*, **22**: 27~35, 1982.
- 6) **Vogt, A., Batsford, S.R., Morioka, T. and Woitas, R.:** Changing concepts in the pathogenesis of lupus nephritis. In: *International year book of Nephrology 1993*, A.V.E. and L.G. Fine, Springer-Verlag, 25~44, 1992.
- 7) 森岡哲夫: ループス腎炎発症におけるヒストンの役割. *新潟県医師会報* No. 527, 1~6, 1994.
- 8) **Tan, E.M.:** Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. In: *Adv. Immunol*, F.J. Dixon, Academic Press, 93~15, 1989.
- 9) **Schmiedeke, T.M., Stockl, F.W., Weber, R., Sugisaki, Y., Batsford, S.R. and Vogt, A.:** Histones have high affinity for the glomerular basement membrane. Relevance for immune complex formation in lupus nephritis. *J. Exp. Med.*, **169**: 1879~94, 1989.
- 10) **Emlen, W. and Mannik, M.:** Clearance of circulating DNA-anti-DNA immune complexes in mice. *J. Exp. Med.*, **155**: 1210~1215, 1982.
- 11) **Emlen, W., Ansari, R. and Burdick, G.:** DNA-anti-DNA immune complexes: Antibody protection of a discrete DNA fragment from DNase digestion in vitro. *J. Clin. Invest.*, **74**: 85~190, 1984.
- 12) **Emlen, W. and Burdick, G.:** Clearance and organ localization of small DNA anti-DNA immune complexes in mice. *J. Immunol.*, **140**: 1816~1822, 1988.
- 13) **Morioka, T., Woitas, R., Fujigaki, Y., Batsford, S. and Vogt, A.:** Histone mediates glomerular deposition of small size DNA anti-DNA complex. *Kidney Int.*, **45**: 991~997, 1994.
- 14) **Morioka, T., Woitas, R., Stoeckl, F., Batsford, S. and Vogt, A.:** Nucleosome-like histone-DNA complex can bind to the renal glomerulus of the rat. *Lupus 1 (Suppl. 1)*, 128 (Abstract), 1992.
- 15) **Morioka, T., Fujigaki, Y., Batsford, S., Woitas, R., Oite, T., Shimizu, F. and Vogt, A.:** Anti-DNA antibody derived from a systemic lupus erythematosus (SLE) patient forms histone-DNA-anti-DNA complexes that bind to rat glomeruli in vivo. *Clin. Exp. Immunol.*, **104**: 92~96, 1996.
- 16) **Schmiedeke, T., Stoeckl, F., Muller, S., Sugisaki, Y., Batsford, S., Woitas, R. and Vogt, A.:** Glomerular immune deposits in murine lupus models may contain histones. *Clin. Exp. Immunol.*, **90**: 453~8, 1992.

- 17) **Stoeckl, F., Muller, S., Batsford, S., Schmiedeke, T., Waldherr, R., Andrassy, K., Sugisaki, Y., Nakabayashi, K., Nagasawa, T., Rodriguez-Iturbe, B., Domini, U. and Vogt, A.:** A role for histones and ubiquitin in lupus nephritis? *Clin. Nephrol.*, **41**: 10~17, 1994.
 - 18) **Brinkman, K., Termaat, R., Berden, J.H. and Smeenk, R.J.:** Anti-DNA antibodies and lupus nephritis: the complexity of crossreactivity. *Immunol. Today*, **11**: 232~4, 19907.
 - 19) **Termaat, R.M., Brinkman, K., van, G.F., van, d.H.L., Veerkamp, J.H., Smeenk, R.J. and Berden, J.H.:** Cross-reactivity of monoclonal anti-DNA antibodies with heparan sulfate is mediated via bound DNA/histone complexes. *J. Autoimmun.*, **3**: 531~45, 1990.
 - 20) **Kramers, C., Hylkema, M.N., van Bruggen, M.C.J., van de Lagemaat, R., Dijkman, H.B.P.M., Assmann, K.J.M., Smeenk, R.J.T. and Berden, J.H.M.:** Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *J. Clin. Invest.*, **94**: 568~577, 1994.
 - 21) **森岡哲夫, 清水不二雄:** ループス腎炎発症に果たすアポトーシスの役割. *医学のあゆみ*, **178**: 781~785, 1996.
 - 22) **熊谷俊一:** SLE とアポトーシス. *医学のあゆみ*, **176**: 314~319, 1996.
-