

糸球体腎炎をめぐる最近の話題

Current Topics of Glomerulonephritis

第539回新潟医学会

日時 平成10年5月16日(土)午後3時10分～5時10分

会場 新潟大学医学部 有壬記念館

司会 荒川正昭(第二内科)

演者 山本 格(腎研・構造病理学), 成田一衛(第二内科), 早川広史(小児科), 西 慎一(血液浄化療法部)

発言者 追手(腎研機能制御学), 大森(大森内科医院)

司会 本日は糸球体腎炎をめぐる最近の話題について勉強したいと思います。大きく二つに分けて、一つは糸球体腎炎の基礎研究についての話題、今一つは実際

の治療に関する話題をお聞きしたいと思います。それは、最初に抗基底膜型糸球体腎炎の障害機序について、山本先生にお話をお願いします。

1) 抗基底膜型糸球体腎炎の新しいモデル

新潟大学医学部腎研究施設構造病理学分野(主任:木原 達)

山本 格

A New Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis Model

Tadashi YAMAMOTO

*Department of Pathology, Institute of Nephrology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Itaru KIHARA)*

A prototype of anti-glomerular basement membrane (GBM) nephritis is induced by administrating rabbit anti-rat GBM antibody in rats. Glomerulonephritis occurs

Reprint requests to: Tadashi YAMAMOTO,
Department of Pathology, Institute of
Nephrology, Niigata University School of
Medicine, 1-757 Asahimachi-dori, Niigata
951-8510, JAPAN

別刷請求先:
〒951-8510 新潟市旭町通り1番町757
新潟大学医学部 腎研究施設 構造病理学分野
山本 格

within minutes after binding of the antibody to GBM, followed by fixation of complement and accumulation of polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages. In contrast to the prototype of anti-GBM nephritis, a novel type was evoked a few days after anti-GBM antibody of smaller dose was given in Wistar Kyoto (WKY) rats. The model is characterized by glomerular accumulation of CD8-positive lymphocytes and monocytes/macrophages, crescent formation and critical renal insufficiency. Interestingly the anti-GBM nephritis is almost completely suppressed in CD8-positive lymphocyte-depleted WKY rats, indicating a crucial role of the lymphocytes in the induction. The glomerular accumulation of CD8-positive lymphocytes and monocytes/macrophages is mediated by ICAM-1- β 1 integrin interaction and chemokines such as MCP-1. The CD8-positive lymphocytes express $\alpha\beta$ T cell receptor and perforin/granzyme B, indicating that they are cytotoxic T cells and injure glomerular cells through release of perforin/granzyme B. These results strongly suggest that cellular immunity is involved in mediation of the novel anti-GBM nephritis model in WKY rats even though anti-GBM antibody is the trigger. A possible involvement of cellular immunity in human glomerulonephritis should be examined in the future.

Key words: anti-glomerular basement membrane, cell-mediated immunity, glomerulonephritis, CD8⁺ lymphocyte
抗糸球体基底膜抗体, 細胞性免疫, 糸球体腎炎, CD8陽性リンパ球

抗基底膜抗体型糸球体腎炎モデルは異種の動物で作製した抗基底膜抗体を静脈注射するとそれが腎糸球体に結合し, その抗原-抗体反応により発症するモデルである。歴史的には1930年代の馬杉復三博士がネズミの腎臓をすりつぶし, それをウサギの皮下に注射し, そのウサギから得た血清をネズミに静脈注射すると腎炎が発症することを見いだしたことに始まり, Masugi nephritisとも呼ばれてきた。その血清は腎毒性血清 (nephrotoxic serum) と呼ばれたがその中の糸球体基底膜に対する抗体がその毒性の本体であることが分かり, 現在ではさらに糸球体基底膜を構成する4型コラーゲンの α 3鎖のnon-collagenous domain 1 (NC1領域) に対する抗体がその主たる本体とされている。

抗糸球体基底膜抗体を作製する動物と腎炎を誘導する動物の組み合わせを変えることでいくつかのバリエーションがあるがそのプロトタイプともいうものがネズミの腎臓から糸球体基底膜を分離し, それをアジュバントと共にウサギの皮下に免疫し, ウサギから得た抗血清をラットに静脈注射して発症させるものである。そこでは抗基底膜抗体が糸球体基底膜に結合し, その抗原-抗体複合体により補体が活性化され, そこのできるC5aなどの白血球走化因子やC3bなどを介する免疫粘着反応

により多形核白血球や単球がそこに集められ, それらの細胞が抗原-抗体複合体を除去しようとする課程で糸球体基底膜も傷害し, 糸球体機能が障害されることが分かっている。このモデルは作製が簡単で確実なためもっとも代表的な糸球体腎炎モデルとしてさまざまな目的の研究に使われている。

一方, 私どもはラットの腎糸球体から基底膜を分離し, それをトリプシン処理し, 可溶化した4型コラーゲンのNC1に富むに分画をウサギに免疫し, 得た抗血清をWistar Kyoto系ラットに静脈注射すると前述の抗基底膜抗体腎炎のプロトタイプと異なった特異な抗基底膜抗体腎炎が発症することを見いだした¹⁾。この糸球体腎炎モデルを解析した結果, このモデルは抗基底膜抗体腎炎のプロトタイプモデルと異なる発症機序のモデルであることが明らかになった。すなわち, プロトタイプモデルが液性免疫 (抗基底膜抗体) だけで発症するのに対して, 私どもが発見したモデルでは細胞性免疫が主要な役割を演じていると考えられた。以下に私どもの解析を中心にこのモデルの特徴を紹介する。

1. 抗基底膜抗体型糸球体腎炎のプロトタイプと新しいモデルの相異点

これまでの古典的なラットの抗基底膜抗体型糸球体腎炎のプロトタイプモデルではウサギなど異種の抗基底膜抗体をラットに静注すると二相性に糸球体腎炎が発症、進展することが示されている。すなわち、抗基底膜抗体が糸球体基底膜と結合した直後には、その抗原-抗体反応で補体が活性化され、補体 C5a などの白血球走化因子と補体 C3b などを介する免疫粘着反応で多形核白血球が糸球体に集積し、それらが出す蛋白分解酵素などにより、糸球体が傷害され、ただちに蛋白尿がでる（異種相, heterologous phase）。その後、3～4日経つとラットは異種動物の抗体に対して抗体を作り、作られた抗体が糸球体基底膜上に結合した異種の抗体と反応して再び、単球などが糸球体に集積する炎症反応が加わる（自己相, autologous phase）。このモデルは二つの相とも抗体、すなわち液性免疫だけで起こり、その病変形成には感作 T リンパ球などの細胞性免疫は全く関与しないか、していても主要な役割は演じていないモデルである。

それに対して、私どもは Wistar Kyoto (WKY) ラットにウサギの抗ラット基底膜抗体をプロトタイプモデルで投与する量の 1/20 程度の少量を静注すると、3～4日後に糸球体にリンパ球と単球が集積し、高度な蛋白尿がでて、10日ほどするとほとんどの糸球体に半月体がみられる糸球体腎炎が誘導されることを発見した¹⁾。このモデルを解析した結果、このモデルは従来のモデルと異なり、細胞傷害性 T リンパ球が主役を演じており、そのリンパ球と単球の糸球体集積には白血球の接着分子や化学走性サイトカイン（ケモカイン）が関与し、少なくとも細胞傷害性 T リンパ球由来のパーフォリン、グランザイムが糸球体傷害に働くモデルであることが分かつ

てきた（表 1）。

2. CD8 陽性リンパ球の役割

WKY ラットにウサギ抗ラット基底膜抗体を少量を静注すると、3～4日後には糸球体にリンパ球と単球が集積し、それに伴い蛋白尿が検出され、10日後には単球が糸球体に高度に集積し、ほとんどの糸球体には半月体が形成され、ラットは腎不全に陥り、死に始める。腎組織を免疫組織学的に検索した結果、糸球体に集積したリンパ球は CD3 陽性、CD8 陽性、CD4 陰性、 $\alpha\beta$ T 細胞受容体陽性、NK 細胞マーカー陰性であることから細胞傷害性 T 細胞であると想定された。この細胞は抗ラット基底膜抗体投与後 3 日ぐらいをピークとして糸球体に集積した。

このモデルにおける CD8 陽性リンパ球の役割を知るために、ラットに抗 CD8 抗体を投与し、CD8 陽性リンパ球を枯渇させ、抗基底膜抗体を投与したところ糸球体へのリンパ球の集積だけでなく、単球の集積も無いか顕著に抑制され、半月体形成、蛋白尿もほとんど起きないことが分かった。このことはこのモデルの発症に CD8 陽性リンパ球の関与が必須であることを示した。

この細胞は $\alpha\beta$ T 細胞受容体を持つことから、この受容体を介する糸球体傷害機序が考えられたので、この受容体に対する抗体を投与してこの受容体を阻害する実験を行った²⁾。抗 $\alpha\beta$ T 細胞受容体抗体をラットに投与し、その受容体を阻害しておいて抗基底膜抗体を投与すると糸球体への CD8 陽性リンパ球、単球の集積が顕著に抑制され、同時に蛋白尿も著明に抑制された。このことは CD8 陽性リンパ球はその $\alpha\beta$ T 細胞受容体を用いて、class I 組織適合抗原に表出されたペプチドを認識し、糸球体細胞を傷害する細胞傷害性 T 細胞と考えられた。この糸球体に集積している CD8 陽性リンパ球の $\alpha\beta$ T 細胞受容体の β 鎖の可変領域 ($V\beta$) レパー

表 1 古典的抗基底膜抗体型腎炎モデルと新しいモデルとの比較

	古典的抗基底膜抗体型	新しいモデル
動物	ほとんどのラットの系統	WKY ラットだけ
惹起法	異種抗基底膜抗体の静注	ウサギ抗基底膜抗体の静注または同種/異種動物の基底膜の免疫
主たる浸潤白血球	多形核白血球, 単球	リンパ球, 単球
白血球集積機序	補体に依存	白血球接着分子やケモカインに依存
組織傷害因子	蛋白分解酵素	パーフォリン/グランザイム

トリーを PCR で検索すると V β 2をもつものだけがそこに集積していることが示された。さらに、PCR で増幅された V β 2 遺伝子の塩基配列を決定したところ、その配列が非常に近似していたことから、ほとんど同一のエピトープを認識する $\alpha\beta$ T 細胞受容体をもつリンパ球が集積している可能性が高いことも分かってきた。

3. 白血球接着分子の役割

このモデルを解析している過程でこのモデルの糸球体に接着分子である ICAM-1 の発現が亢進していることが分かり、糸球体への CD8 陽性リンパ球と単球の集積機序には内皮細胞の接着分子 ICAM-1 とそれと接着する白血球接着分子、 β 1 インテグリンとの接着が関与していることが推定された。また、それらの発現を高めるように働くサイトカイン、IL-1 β 、TNF α 、IFN γ などの発現も糸球体で亢進していた³⁾。 β 1 インテグリン-ICAM-1 の接着が白血球の集積に重要であるかを明らかにするために、抗 β 1 インテグリン抗体や抗 ICAM-1 抗体を投与して β 1 インテグリン-ICAM-1 の接着を阻害し、それで糸球体への白血球集積が抑制できるかどうかを検討した⁴⁾。その結果、抗 β 1 インテグリン抗体や抗 ICAM-1 抗体をそれぞれ単独で投与しても投与量依存性に糸球体への CD8 陽性リンパ球や単球の糸球体への集積が抑制され、同時に蛋白尿も抑制された。その抑制は抗 β 1 インテグリン抗体と抗 ICAM-1 抗体を同時に投与した場合により効果的であった。このことは CD8 陽性リンパ球や単球の糸球体への集積には β 1 インテグリン-ICAM-1 の接着が重要であることを示した。

4. ケモカインの関与

ケモカインは白血球の遊走活性をもつサイトカインであるが、このモデルでの各種サイトカインの関与を検討してみると、内皮細胞の ICAM-1 の発現を促すような IL-1 β 、TNF α 、IFN γ などの他に、さまざまなケモカインの発現が糸球体で増加していることが分かった。その中で monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) が特にその発現量が多かったことから、それに対する抗体を投与し、糸球体への白血球集積に対するこのケモカインの中和の影響を検討した⁵⁾。その結果、ケモカインを中和すると糸球体への白血球の集積、蛋白尿が部分的ではあったが有意に抑制され、このケモカインが糸球体への白血球の集積に関与していることも明らかになった。

5. パーフォリン、グランザイム系の関与

糸球体に集積してくる CD8 陽性リンパ球が細胞傷害性 T 細胞であると考えられたのでその細胞が細胞傷害するのに機能するとされているパーフォリン-グランザイム系の関与を検討した⁶⁾。このモデルの糸球体でそれら分子の発現を調べると、パーフォリンとグランザイム B の発現が検出され、それらの関与が考えられた。そこでラットパーフォリンに対する抗体を作製し、それをこのモデルラットに投与し、その中和効果を検討した。その結果、この抗体を投与すると蛋白尿が顕著に抑制され、パーフォリン-グランザイム系がこのモデルの糸球体傷害に重要な関与をしていることが明らかになった。

6. 単球の役割

CD8 陽性リンパ球が主役的に糸球体傷害に重要な役割を演じているようなデータが集まりつつあるが、この細胞より圧倒的に数の多い単球は糸球体で何をしているのであろうか。その命題も単球を減少させて、このモデルを惹起するとどのような病態になるかで検討した。単球を減少させるのは本学部第二病理学教室の内藤教授らが行っているクロドロネートーリポソームをラットに投与して行った。このモデルで単球を減少させておくと糸球体への単球の集積が抑制されると共に、蛋白尿も抑制された。このことは単球も組織傷害の一役を担っていること示唆しており、糸球体傷害機序の複雑性が想定された。

ま と め

WKY ラットの抗糸球体基底膜抗体型糸球体腎炎は従来他の系統のラットに惹起したモデルと異なり、細胞傷害性 T 細胞が中心的役割を演じる特異なモデルであることを紹介した。すなわち、糸球体に抗基底膜抗体が結合すると糸球体で IL-1 β 、TNF α 、IFN γ など産生され、それらが糸球体内皮細胞の ICAM-1 の発現を亢進させ、同時に産生されるケモカインと共に糸球体への CD8 陽性リンパ球、単球の集積を促し、その CD8 陽性リンパ球が細胞傷害性 T 細胞としてパーフォリン-グランザイム系を用いて、糸球体細胞を傷害していると想定された(図1)⁷⁾。このような細胞傷害性 T 細胞がヒトの糸球体腎炎に関与しているかどうかは充分検討されていないので今後の検討が必要となろう。また、このモデル自体の解析もまだまだ不十分であるので今後さらに検討して行きたいと考えている。

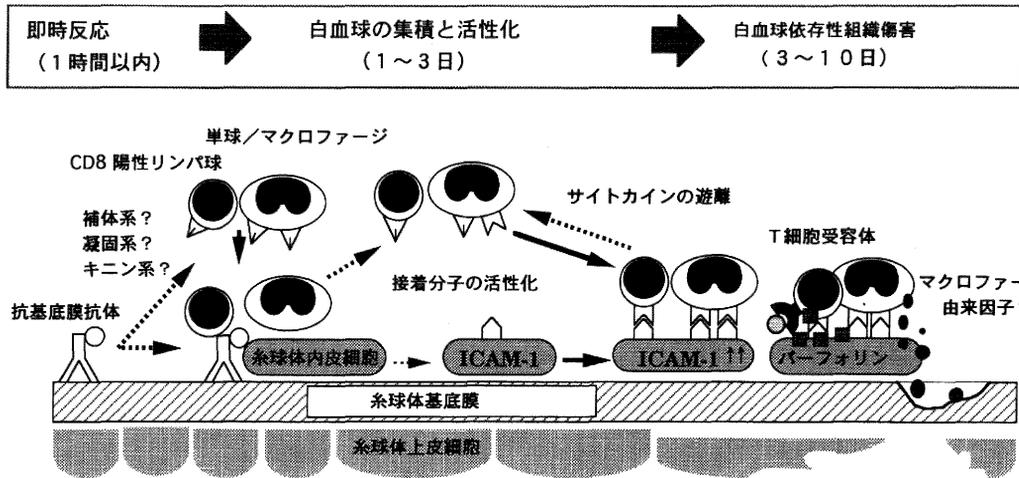


図1 推定される WKY ラットの抗基底膜抗体型腎炎の発症、進展機序

参考文献

- 1) Kawasaki, K., Yaoita, E., Yamamoto, T. and Kihara, I.: Depletion of CD 8 positive cells in nephrotoxic serum nephritis of WKY rats. *Kidney Int* 41:1517~1526, 1992.
- 2) Yamamoto, T., Fujinaka, H., Feng, L., Kawasaki, K., Yaita, E., Wilson, C.B. and Kihara, I.: Significance of T cell receptor ab-mediated immunity in development of anti-GBM nephritis in WKY rats. *J Am Soc Nephrol* 7: 1726, 1996.
- 3) Kawasaki, K., Yaoita, E., Yamamoto, T., Tamatani, T., Miyasaka, M. and Kihara, I.: Antibodies against intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 prevent glomerular injury in rat experimental crescentic glomerulonephritis. *J Immunol* 150: 1074~1083, 1993.
- 4) Fujinaka, H., Yamamoto, T., Feng, L., Kawasaki, K., Yaoita, E., Hirose, S., Goto, S., Wilson, C.B., Uchiyama, M. and Kihara, I.: A crucial role of CD 8-positive lymphocytes in glomerular expression of ICAM-1 and cytokines in crescentic glomerulonephritis of WKY rats. *J Immunol* 158: 4978~4983.
- 5) Fujinaka, H., Yamamoto, T., Takeya, M., Feng, L., Kawasaki, K., Yaoita, E., Kondo, D., Wilson, C.B., Uchiyama, M. and Kihara, I.: Suppression of anti-GBM nephritis by administration of anti-MCP-1 antibody in WKY rats. *J Am Soc Nephrol* 8: 1174~1178, 1997.
- 6) Fujinaka, H., Yamamoto, T., Garcia, G., Chen, S., Feng, L. and Wilson, D.B.: CD 8⁺ lymphocyte-dependent perforin expression and anti-perforin antibody treatment in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 8: 405A, 1997.
- 7) Yamamoto, T., Fujinaka, H., Kawasaki, K., Yaita, E., Feng, L., Wilson, C.B. and Kihara, I.: CD 8⁺ lymphocytes play a central role in the development of anti-GBM nephritis through induction of ICAM-1 and chemokines in WKY rats. *Contrib. Nephrol.* 118: 118~121, 1996.

司会 ありがとうございます。質問ございませんか。
追手 二つ質問がございます。一つは、出ている CD 8 陽性の細胞が何のエピトープを認識しているのかという問題なのですが、確かに、 $V\beta 2$ にクロナリティがありそうだという話なのですが、それはある抗原を認識しているという話には僕はならないと思います。そこで、なにを抗原として認識しているのかということ、もし、CD 8 陽性細胞が何かを認識していたら activate されている訳ですが、何に対して activate されているのかということです。

山本 それに対する答えは、それを知りたくてやっているわけですけども、一つは、CD8陽性細胞ですから、MHCにトラップされたペプチドを認識していると思われまふ。そのペプチドを知りたいのですが、予想されるものは、基底膜のある成分のエピトープではないかと思ひます。

追手 ということは、抗GBM抗体ではなく基底膜がエピトープとなっているということですか。

山本 それはどうしてかと言ひますといろいろなモデルがござひまして、たとえば、アクティブモデルというものがあります。そのモデルはラットの基底膜をラットに免疫して作製しますが、それでも同じ腎炎が起きます。もう一つは、僕らがやっていますが、ラットの基底膜に対するモノクローナル抗体でも同じ腎炎が起きますので、おそらくウサギIgGを認識するようなCD8ではないと考へてひます。

追手 川崎君の仕事で、ICAM-1とLFA-1の抗体で腎炎が抑制されるということですが、最後の漫画でみてもICAM-1の発現は内皮細胞になってひますね。ところが実際にメッセージの発現や蛋白の発現をみても必ずしも内皮細胞でなくても説明ができそう

な気がしますが、根拠は何ですか。

山本 抗基底膜抗体を用いた二重蛍光抗体法で検討したのですが、ほとんど内皮細胞という結論です。

追手 メサングウム細胞でもいい訳ですし。

山本 それはありませんでした。

追手 ありがとうございます。

司会 大変おもしろく聞かせていただきました。通常の馬杉腎炎から一歩踏み出して、この糸球体腎炎を研究したきっかけは何ですか。

山本 これは川崎君が最初に報告したモデルなのですが、このモデルは細胞性免疫が関与している可能性があるということ、そうひますと、ヒトの腎炎でも最近T cellの関与などいわれてひますが、そういうことでつながるものがあるのではないかと思ひまして、検討させてもらひました。

司会 これは激しい腎炎ですね。糸球体硬化に進むプロセスはどういうものですか。

山本 半月体が激しくなりまして、そして、線維性半月体になりまして、腎不全で死んでひまうモデルです。

司会 ありがとうございます。では次に、糸球体硬化の機序について、成田先生にお話をお願いひます。