

Rituximab のラットアドリアマイシン腎症における B 細胞非依存性ポドサイト保護作用と抗蛋白尿効果

高橋雄一

新潟大学大学院医歯学総合研究科

生体機能調節医学専攻小児科学分野

B-lymphocyte-independent protection of podocytes and anti-proteinuric effect of rituximab in rat adriamycin-induced nephropathy

Yuichi Takahashi

Division of Pediatrics, Department of Homeostatic Regulation and Development,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

要旨

背景：近年、CD20 抗原モノクローナル抗体である Rituximab は、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) といった難治性ネフローゼ症候群の蛋白尿抑制効果が報告されているが、その作用機序については明らかにされていない。また、Rituximab はポドサイトに直接作用する報告もあり、B 細胞抑制とは異なる作用機序が示唆されている。本研究では、Rituximab が直接ポドサイトに結合することで難治性ネフローゼ症候群における蛋白尿抑制とスリット膜構成分子への効果を検証した。

方法：難治性ネフローゼ症候群を呈する FSGS の実験モデルとして多用されているアドリアマイシン腎症 (ADR 腎症) をラットに惹起し、病態誘導 1 日目、8 日目、14 日目、18 日目、28 日目の尿検体を用いて 24 時間蛋白尿を測定した。10mg/kg 体重の Rituximab を尾静脈からアドリアマイシン投与直後、7 日目、14 日目、21 日目に投与した。病変誘導 28 日後の腎糸球体におけるスリット膜関連分子 Nephrin、Podocin の発現を免疫染色法により解析した。正常ラットにおける Rituximab 結合蛋白と、ポドサイトマーカーである Synaptopodin、内皮細胞のマーカーである RECA 1、メサンギウム細胞のマーカーである Thy 1 との二重染色を行い、糸球体内結合部位を検証した。

結果：Rituximab は、ADR 腎症ラットにおける Nephrin、Podocin 発現の低下を抑制し、ADR 腎症ラットの 18 日目から 28 日目の蛋白尿を有意に抑制した。Rituximab 結合蛋白は Synaptopodin と共局在し、内皮細胞やメサンギウム細胞とは共局在しなかった。

結論：Rituximab はポドサイトに直接作用しスリット膜を保護することで、難治性ネフローゼ症候群の抗蛋白尿効果をもたらす可能性が示された。

キーワード：Rituximab, 蛋白尿, アドリアマイシン, ネフローゼ症候群, Nephrin

緒言

ネフローゼ症候群は糸球体障害の結果、高度蛋白尿、低蛋白血症、全身の浮腫が起こる。小児ネフローゼ症候群の約 90%は原因不明な特発性ネフローゼ症候群 (INS) であり、わが国では1年間に小児 10 万人に 5 人が発症する。INS の初発時の第一選択薬は経口ステロイドで、その多くは治療に反応する (ステロイド感受性ネフローゼ症候群: SSNS) が、約 80%は再発を起し、40%は頻回再発型ネフローゼ症候群 (FRNS) あるいはステロイド依存性ネフローゼ症候群 (SDNS) である。また、INS の約 10%はステロイド治療に反応しないステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 (SRNS) であり、その多くは高度蛋白尿の長期化により様々な症状を引き起こす¹⁾。シクロスポリン A やシクロフォスファミドといった免疫抑制剤は難治性ネフローゼ症候群に有効ではあるが、それでも 10~20%の SRNS では寛解に至らず腎不全に進行する²⁾。

Rituximab は B 細胞表面に発現する分化抗原 CD20 に対するモノクローナル抗体である³⁾⁴⁾。近年 Rituximab が、FRNS や SDNS に対する有効性が示唆されている⁵⁾。巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) といった SRNS における抗蛋白尿効果も同様に多数報告されている⁶⁾。Rituximab 投与後、末梢血 B 細胞数が枯渇・減少することから、FRNS、SDNS、SRNS の病態に B 細胞が関与する可能性が示唆されている。一方、B 細胞欠失状態にもかかわらず Rituximab 治療に反応しない症例も報告されており、抗蛋白尿効果が必ずしも B 細胞数に相関しないことも指摘されており⁷⁾⁸⁾、Rituximab の抗蛋白尿効果には、B 細胞非依存的な、新たな作用機序が存在する可能性が示唆される。

近年 Rituximab は、糸球体ポドサイトに発現している SMPDL3b のアミノ酸配列を認識し、直接結合すると報告されている⁹⁾。加えて、SMPDL3b に結合することでポドサイトに直接結合し、抗蛋白尿効果をもたらす可能性が示唆されている¹⁰⁾が、*in vivo* での Rituximab の直接効果を示した報告はない。

今回の申請者は、B 細胞非依存的なネフローゼ症候群モデルであるラットアドリアマイシン腎症 (ADR 腎症) を用いて、Rituximab の B 細胞非依存的なポドサイト直接作用を検証した。

対象と方法

動物ネフローゼモデル

6 週齢雌性の体重 150~170g の Wistar ラット (Charles River Japan, Atsugi, Japan) を用いた。全ての動物実験は、新潟大学動物実験施設の設けるガイドラインに従い行った。ADR 腎症は、Wistar ラットの尾静脈に 10mg/kg 体重のアドリアマイシンを投与することにより作成した。

総数 12 匹をランダムに正常群、ADR 腎症群、ADR 腎症+Rituximab 群の 3 群に分けた。8 匹のラットに ADR 腎症を惹起し、そのうち 4 匹のラットに 10mg/kg 体重の Rituximab

を尾静脈からアドリアマイシン投与直後、7日目、14日目、21日目に投与した。ラットを代謝ケージに入れ、24時間蓄尿を1日目、8日目、14日目、21日目、28日目に行い、Bio-Rad社のProtein Assay Reagentを用いて、ウシ血清アルブミンを標準とした比色分析法で1日蛋白尿量を測定した。計12匹のラットを28日目に安楽死させ、腎臓を摘出した。

総数6匹をランダムにRituximab群、ヒトIgG群の2群に分けた。3匹のラットに10mg/kg体重のRituximabを尾静脈から単回投与し、もう3匹のラットに10mg/kg体重の精製したヒトIgGを尾静脈から単回投与した。計6匹のラットを投与1時間で安楽死させ、腎臓を摘出した。

抗体

本法において使用した一次抗体は以下である。Rituximab；抗ヒトCD20抗体（中外製薬）、G1D4；抗シナプトポドイン抗体（マウスIgG1、Progen社）、5-1-6；抗Nephrin抗体（マウスIgG1）、1-22-3；抗ラットThy 1.1抗体（マウスIgG3）^{11) 12)}、HIS52；抗ラットRECA-1抗体（マウスIgG1、Serotec社）、抗ラットPodocin抗体¹³⁾。正常マウス血清と正常ヒト血清を陰性コントロールとして使用した。

二次抗体は以下のものを使用した。fluorescein isothiocyanate (FITC)標識ウサギ抗ヒトIgs抗体とFITC標識ヤギ抗ウサギimmunoglobulins抗体（Dako社）、FITC標識ヤギ抗マウスIgG1抗体（Southern Biotechnology Associates社）、tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC)標識ヤギ抗ウサギimmunoglobulins抗体（Dako社）、TRITC標識ヤギ抗マウスimmunoglobulins抗体とTRITC標識ヤギ抗マウスIgG1抗体（Southern Biotechnology Associates社）。

さらに、FITC標識抗ヒトimmunoglobulins抗体を、Rituximabあるいは精製したヒトIgGを投与されたラット腎組織の直接免疫蛍光染色法として使用した。

免疫蛍光染色

腎組織は皮質部分を切り出した後、-70度のn-hexaneを用いて急速凍結した。クリオスタットで3μmに薄切し、アセトンまたはPLP（periodate-lysine-paraformaldehyde）で1分間固定し、上述の一次、二次抗体を用いた間接法にて免疫染色を行った。二重蛍光染色では、一次抗体のサブクラスまたは宿主に対応する、異なった蛍光標識の二次抗体を用いて染色を行った。

統計解析

2群間比較にMann-Whitney testを行った。one-way analysisを用いた後に、データは統計上 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした

結果

1、Rituximab の ADR 腎症における抗蛋白尿効果とポドサイト保護作用

正常群、ADR 腎症群、ADR 腎症+Rituximab 群の 3 群における蛋白尿量の推移を図 1 に示した。ADR 腎症ラットは 14 日目から蛋白尿を認め、経時的に増悪した。Rituximab は、ADR 腎症ラットの 14 日目からみられた蛋白尿量に減少傾向を示し、18 日目から 28 日目の蛋白尿を有意に抑制した。また、28 日目の ADR 腎症ラット群では Nephrin、Podocin の発現が低下したが、Rituximab はその発現低下を抑制した (図 2)。

2、Rituximab 結合蛋白の局在

Rituximab を一次抗体として用いた免疫蛍光染色において、Rituximab は正常ラットの糸球体を認識し、Rituximab 結合蛋白の発現を認め、一方で精製したヒト IgG や正常マウス血清を用いた染色では発現は確認されなかった (図 3)。Rituximab 結合蛋白の発現は糸球体係蹄壁に沿って顆粒状のパターンを示した。さらに、ラットに Rituximab を単回投与した腎組織では、FITC 標識抗ヒト immunoglobulins 抗体の直接染色で染色性を示したが、FITC 標識抗マウス immunoglobulins 抗体の直接染色では染色性を示さなかった (図 4)。また精製したヒト IgG を単回投与した腎組織を用いた FITC 標識抗ヒト immunoglobulins 抗体の直接染色では、染色性を示さなかった。正常ラット腎組織の Rituximab 染色と Rituximab 投与ラットの直接染色では、同様の発現パターンで観察された。B 細胞が集積している脾臓組織では Rituximab の染色性を確認できなかった (図 5)。

二重蛍光抗体法を用いた検討で正常ラット糸球体では、Rituximab 結合蛋白とポドサイト機能分子である Synaptopodin がほぼ一致して観察されたが、スリット膜関連分子である Nephrin、メサンギウム細胞のマーカーである Thy 1、内皮細胞のマーカーである RECA 1 とは異なる局在を呈した (図 6)。

考察

本研究では、B 細胞を含めた炎症性細胞の関与のない難治性ネフローゼ症候群である ADR 腎症ラットを用いて、Rituximab の抗蛋白尿効果を詳細に解析した。Rituximab は、ポドサイト関連分子である Nephrin と Podocin における病態誘導 28 日目の発現低下を抑制した。さらに、Rituximab 結合蛋白は Synaptopodin と共局在し、内皮細胞やメサンギウム細胞とは共局在しなかった。

Rituximab はヒト CD20 のアミノ酸配列 170ANPS173 を認識すると報告されている¹⁴⁾。ラット CD20 ではこの部位のアミノ酸が 170SNSS173 に置換されており、そのため、Rituximab はラット CD20 を認識しないと考えられている¹⁴⁾。最も B 細胞が集積するラット脾臓組織での検討においても、Rituximab は反応性がみられなかった (データ未提示)。ADR 腎症は ADR 投与による直接のポドサイト傷害により誘導されると考えられているモ

デルであり、B 細胞を含めた免疫細胞に非依存的に誘発される難治性ネフローゼ症候群の実験モデルである。Rituximab の B 細胞非依存的な蛋白尿抑制効果をみる上で、本研究で用いた ADR 腎症ラットは最も相応しい系と考えられる。

今回、二重蛍光抗体法を用いた分子間の位置関係の解析を、ポドサイト機能分子である Synaptopodin、スリット膜関連分子である Nephrin、メサンギウム細胞マーカーである Thy 1、内皮細胞マーカーである RECA 1 と比較検討した。ポドサイトの 2 次突起（足突起）に位置するアクチン関連蛋白である Synaptopodin は、ポドサイト、足突起構造の形態維持に関与していると考えられている。Rituximab は正常ラット糸球体での染色性を認め、Synaptopodin と共局在したことから、Rituximab 結合蛋白はポドサイトに局在していると考えられた。これは Rituximab が難治性の病態、巣状分節性糸球体硬化症などの不可逆的なポドサイト障害を改善させる可能性があるという観点からも、極めて重要な所見である。スリット膜機能維持に最も重要な分子であると考えられている Nephrin とは共局在を認めなかったが、発現が最も低下した病態誘導 28 日目の材料において、Rituximab 投与でその発現低下を抑制していた。これは Rituximab が Synaptopodin あるいはその近傍の蛋白に何らかの反応を起こすことで、最終的にはスリット膜構造を維持すると示唆され、スリット膜の機能維持の機序を考える上で極めて重要な所見であると考えられる。

Rituximab は、酸性スフィンゴミエリナーゼに属する SMPDL3b 蛋白を安定化させ、スフィンゴミエリン代謝経路に関与し、細胞メッセンジャーであるセラミドを調整する可能性が示唆されている¹⁵⁾¹⁶⁾。SMPDL3b はポドサイトにおけるアクチン骨格をリモデリングし、Rituximab がそれを促進させるという報告も存在する¹⁷⁾。SMPDL3b に関して明らかにされていない点が多く、動物モデルでの検証を含め、今後更なる検討が必要である。結論

Rituximab は直接ポドサイトに反応しスリット膜を保護することで、難治性ネフローゼ症候群の抗蛋白尿効果をもたらす可能性が示された。本研究は、Rituximab が B 細胞非依存的に抗蛋白尿効果を示す初めての *in vivo* 研究である。Rituximab はポドサイト障害を防ぐことで、ネフローゼ症候群の治療に有用であると考えられる。

結論

Rituximab は直接ポドサイトに反応しスリット膜を保護することで、難治性ネフローゼ症候群の抗蛋白尿効果をもたらす可能性が示された。本研究は、Rituximab が B 細胞非依存的に抗蛋白尿効果を示す初めての *in vivo* 研究である。Rituximab はポドサイト障害を防ぐことで、ネフローゼ症候群の治療に有用であると考えられる。

文献

- 1) Lombel RM, Hodson EM, Gipson DS. Kidney Disease: Improving Global Outcomes. Treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome in children: new guidelines from KDIGO. *Pediatr. Nephrol.* 28: 409-14, 2013.
- 2) Iijima K, Sako M, Nozu K. Rituximab Treatment for Nephrotic Syndrome in Children. *Curr. Pediatr. Rep.* 3: 71-7, 2015.
- 3) Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocytespecific antigen. *J. Immunol.* 125: 1678-85, 1980.
- 4) Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology.* 107: 176-82, 2002.
- 5) Kari JA, El-Morshedy SM, El-Desoky S, Alshaya HO, Rahim KA, Edrees BM. Rituximab for refractory cases of childhood nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 26: 733-7, 2011.
- 6) Prytuła A, Iijima K, Kamei K, et al. Rituximab in refractory nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 25: 461-8, 2010.
- 7) Iijima K, Sako M, Nozu K, et al; Rituximab for Childhood-onset Refractory Nephrotic Syndrome (RCRNS) Study Group. Rituximab for childhood-onset, complicated, frequently relapsing nephrotic syndrome or steroid-dependent nephrotic syndrome: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 384(9950): 1273-81, 2014.
- 8) Magnasco A, Ravani P, Edefonti A, et al. Rituximab in children with resistant idiopathic nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23: 1117-24, 2012.
- 9) Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9: 162-76, 2008.
- 10) Fornoni A, Sageshima J, Wei C, et al. Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Sci. Transl. Med.* 3: 85ra46, 2011.
- 11) Kawachi H, Koike H, Shimizu F. mAb 5-1-6 nephropathy and nephrin. *Microsc. Res. Tech.* 57: 236-40, 2002.
- 12) Kawachi H, Orikasa M, Matsui K, et al. Epitope-specific induction of mesangial lesions with proteinuria by a MoAb against mesangial cell surface antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 88: 399-404, 1992.
- 13) Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Sakai T, Shimizu F. Cloning of rat homologue of podocin: expression in proteinuric states and in developing glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 46-56, 2003.
- 14) Perosa F, Favoino E, Caragnano MA, Dammacco F. Generation of biologically

active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor. *Blood*. 107: 1070-7, 2006.

15) Merrill AH Jr. De novo sphingolipid biosynthesis: an ecessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 25843-6, 2002.

16) Fornoni A, Merscher S, Kopp JB. Lipid biology of the podocyte--new perspectives offer new opportunities. *Nat. Rev. Nephrol.* 10: 379-88, 2004.

17) Chan AC. Rituximab's new therapeutic target: the podocyte actin cytoskeleton. *Sci. Transl. Med.* 3: 85ps21, 2011.

図 1 蛋白尿量の経時的変化

ADR 腎症ラットでは 14 日目から蛋白尿を認め、漸増した。ADR 腎症ラット+Rituximab 群では、18 日目、28 日目の蛋白尿を有意に抑制した。

図 2 病態誘導 28 日目の Nephrin、Podocin の発現

ADR 腎症ラット群では Nephrin、Podocin の発現の低下を認めたが、Rituximab 投与で発現低下を抑制した。

図 3 正常ラット腎組織における Rituximab 結合蛋白の発現

Rituximab 結合蛋白は顆粒状のパターンを呈し糸球体係蹄壁に沿って発現した。

図 4 Rituximab 投与ラットの直接染色

Rituximab 投与ラットの腎組織を用いた抗ヒト IgGs 抗体直接染色で染色性を示した。精製したヒト IgG を単回投与した腎組織や正常ラット腎組織では染色性を示さなかった。

図 5、正常ラット脾組織における Rituximab 結合蛋白の発現

Rituximab 結合蛋白は脾組織に発現しなかった。

図 6、Rituximab 結合蛋白の正常ラットにおける糸球体内局在

Rituximab 結合蛋白と Synaptopodin がほぼ一致して観察された。Nephrin、Thy 1、RECA1 とは異なる局在を呈した。

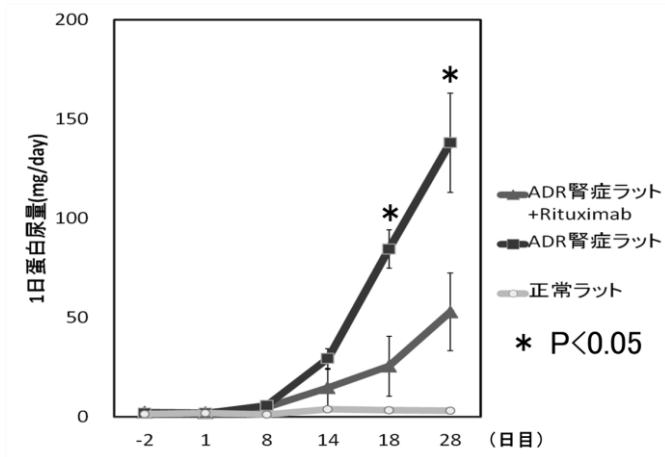


図 1

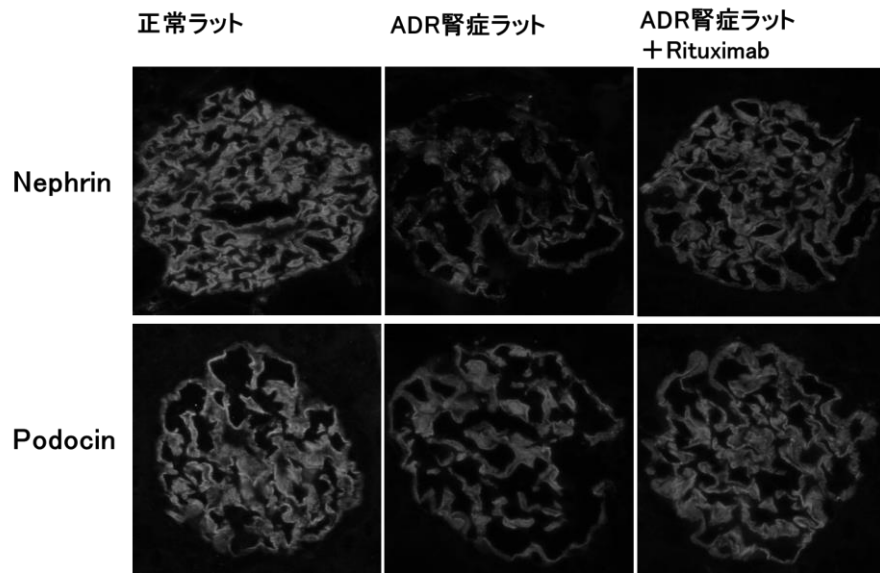


図 2

Rituximab

ヒトIgG

マウス血清



図 3

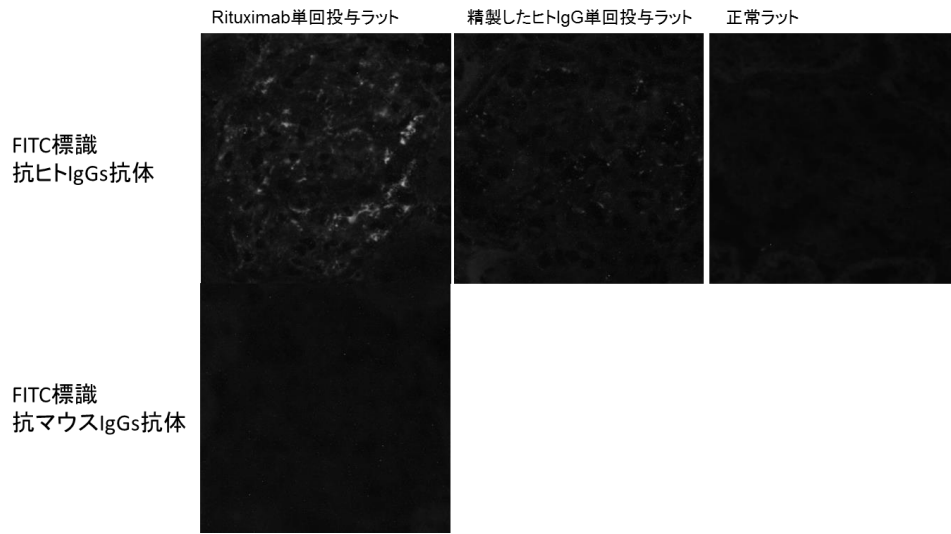
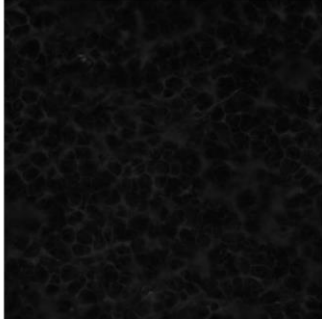
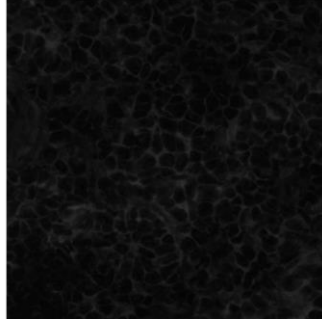


図 4

Rituximab



Et-IgG



☒ 5

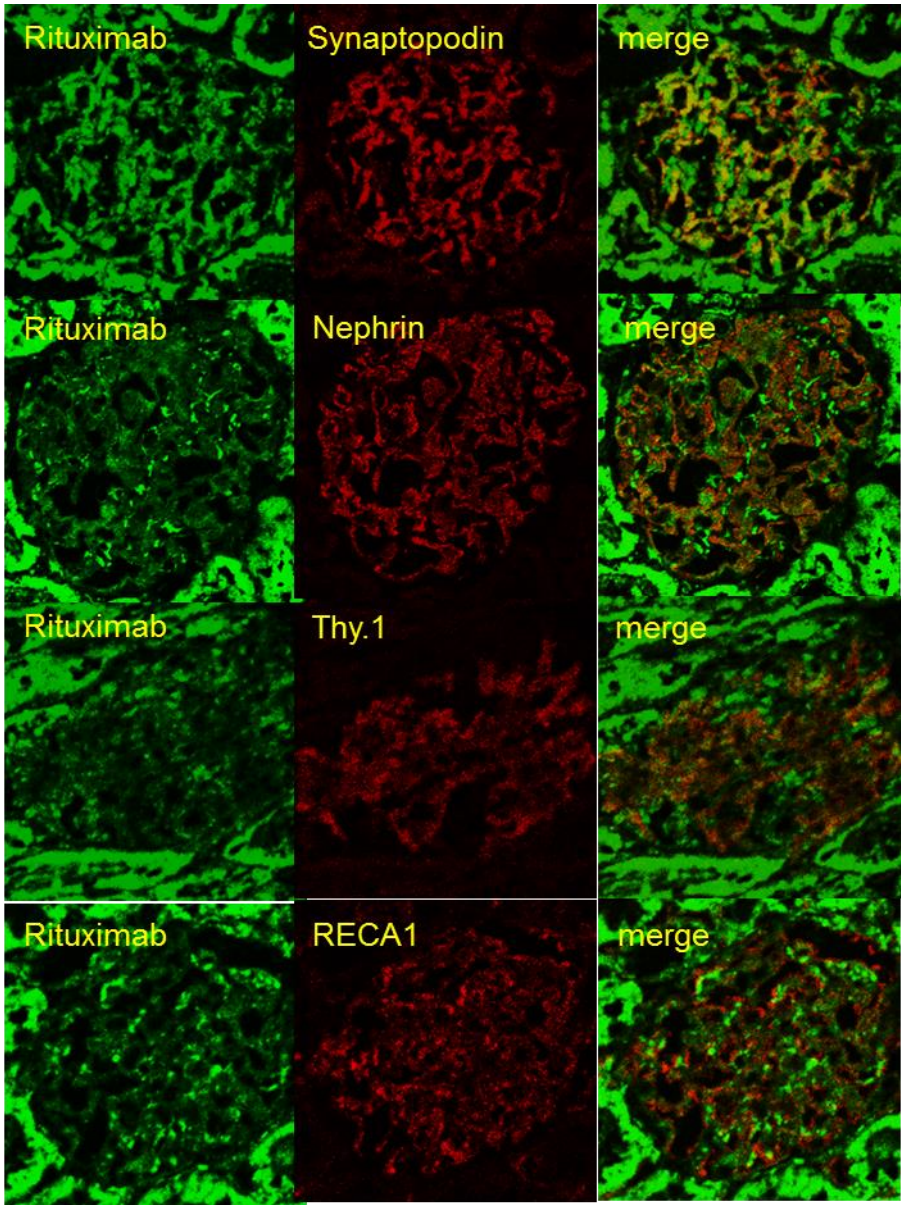


图 6