

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	高橋 雄一
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 681 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	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
論文審査委員	主査 教授 味岡 洋一 副査 教授 齋藤 昭彦 副査 教授 齋藤 和英

博士論文の要旨

背景:近年、CD20 モノクローナル抗体である Rituximab が、頻回再発型ネフローゼ症候群やステロイド依存性ネフローゼ症候群に有効な薬剤であると示されている。巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) といったステロイド抵抗性ネフローゼ症候群における抗蛋白尿効果も同様に多数報告されている。一方で、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、抗蛋白尿効果が必ずしも B 細胞数に相関していない。抗蛋白尿効果には、B 細胞非依存的で、新たな作用機序が存在する可能性が示唆される。また、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。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が、in vivo での Rituximab の直接効果を示した報告はない。そこで申請者は、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 (ADR) 腎症をラットに惹起し検証した。総数 12 匹をランダムに正常ラット群、ADR 腎症ラット群、ADR 腎症ラット+Rituximab 群の 3 群に分けた。8 匹のラットにアドリアマイシン 10mg/kg を尾静脈から単回投与した。そのうち 4 匹に Rituximab 10mg/kg 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。24 時間蓄尿を 1 日目、8 日目、14 日目、18 日目、28 日目に行い、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、病理組織標本を作製した。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 Rituximab 10mg/kg を尾静脈から単回投与し、もう 3 匹のラットに精製したヒト IgG 10mg/kg 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、病理組織標本を作製した。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、メサングウム細胞のマーカーである Thy 1 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 Nephryn、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 は正常ラットの糸球体を認識し、Rituximab

結合蛋白は糸球体係蹄壁に沿って顆粒状のパターンを呈して発現し、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。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。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。Rituximab 結合蛋白は正常ラット腎組織に発現し、Rituximab 染色と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。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。

審査結果の要旨

近年、CD20 モノクローナル抗体 Rituximab の難治性ネフローゼ症候群に対する抗蛋白尿効果が報告されているが、その作用機序について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 のポドサイトへの直接結合性と難治性ネフローゼ症候群における蛋白尿抑制・スリット膜構成分子への効果を検証した。アドリアマイシン腎症ラットに Rituximab を隔週計 4 回投与し、蛋白尿を測定した。病変誘導 28 日後のスリット膜関連分子 Nephrlin、Podocin の発現を解析した。正常ラットにおける Rituximab 結合蛋白の糸球体内局在を解析した。Rituximab は、アドリアマイシン腎症ラットにおける Nephrlin、Podocin 発現低下を抑制し、18 日目から 28 日目の蛋白尿を有意に抑制した。Rituximab 結合蛋白はポドサイトマーカーである Synaptopodin と共局在した。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、抗蛋白尿効果をもたらす可能性が示された。

以上より、本研究は、難治性ネフローゼ症候群に対する Rituximab の抗蛋白尿効果が、ポドサイトに直接作用してスリット膜を保護することに起因することを明らかにした点で、学位論文としての価値を認める。