

論文名 : Leptin deficiency down-regulates IL-23 production in glomerular podocytes resulting in an attenuated immune response in nephrotoxic serum nephritis.

(レプチン欠乏は糸球体上皮細胞における IL-23 産生の抑制を介し抗基底膜抗体腎炎を軽減する)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 後藤 慧

【背景】肥満は慢性腎臓病のリスクファクターであることが知られているが、肥満患者における慢性腎臓病や末期腎不全患者数は実際に世界的な増加傾向を示しており、問題となっている。その背景として、肥満に伴ったアディポサイトカインの分泌変化が様々な病態と関連することが報告されている。レプチンは脂肪細胞から分泌され、摂食抑制やエネルギー消費亢進作用を代表とした代謝、内分泌などの多彩な生理機能を調節するアディポサイトカインの一つである。これまでレプチンはヘルパーT (Th) 細胞のバランスを Th1 細胞へ増強する方向に偏位させることにより、自己免疫性脳脊髄炎モデルやコラーゲン誘導関節炎モデルなどの自己免疫疾患の感受性を増強することが、疾患モデルマウスを用いた研究にて報告されていた。しかし、近年ではレプチンが Th1 細胞だけでなく Th17 細胞の細胞応答を促進することも報告されており、レプチンと Th17 細胞との関係が注目されている。Th 細胞は獲得免疫応答において中心的な役割を果たしているが、これまで Th1 細胞が優勢と考えられていた様々な自己免疫疾患において Th17 細胞がより重要な役割をもつことが明らかにされている。マウスの nephrotoxic serum nephritis (NTN) モデルはヒツジ抗基底膜抗体が腎糸球体基底膜に沈着し、さらにマウスに事前免疫することにより惹起されたヒツジ IgG に対する抗体が、沈着したヒツジ抗基底膜抗体に結合することで免疫複合体の形成を惹起し、マクロファージが細胞表面上の IgG-Fc 受容体を介して活性化され、腎炎を発症する疾患モデルである。ヒトの抗糸球体基底膜抗体腎炎に類似する病態を呈するモデルとして多くの報告がされている。NTN も以前は他の自己免疫疾患と同様に Th1 優位であることが病態形成に影響すると考えられてきたが、近年では Th17 細胞の働きがより重要であることが示されている。Th17 細胞から産生されるインターロイキン (IL) -17 は抗体産生細胞となる B リンパ球の二次濾胞形成とクラススイッチを誘導すると報告されている。この作用により液性免疫反応に影響を与えると考えられており、NTN モデルを含む様々な炎症性疾患の病態に関与するとされている。また、IL-23 は Th17 細胞の増殖や維持に必要なサイトカインであり、Th17 細胞からの IL-17 産生を促進する因子である。IL-23 もまた NTN の病態進展に必要であると報告されている。しかし、腎炎モデルにおける IL-23 産生細胞については現在のところ解明されていない。また、レプチン欠損マウスは NTN による腎障害が軽減されることが報告されており、腎炎の進展とレプチンとの関連が示唆され

ていたが、その機序についても未だ不明である。

【目的】マウスの NTN モデルにおいて、NTN 発症におけるレプチン欠損による腎障害への影響、特に Th17 細胞や IL-23、IL-17 をはじめとした Th17 細胞関連サイトカイン発現に対する作用およびマクロファージ活性化への作用について検討した。

【方法】12 週齢の野生型マウス (C57BL/6J) およびレプチン欠損 (*ob/ob*) マウス (C57BL/6J-*ob/ob*) にヒツジ IgG と完全フロイントアジュバントのエマルジョンを腹腔内投与することで感作し、その 4 日後にヒツジ由来の抗糸球体基底膜抗血清を静脈内投与し、NTN モデルを作製した。*ob/ob* マウスは過食となり野生型マウスとの体重差が発生するため、この影響を避ける目的でマウスは 5 週齢時から 1 日あたり 2.5g の食事制限下で飼育した。抗糸球体基底膜抗血清の静脈内投与から 7 日後にサクリファイスを行い、血液および腎組織を採取し腎障害度を血清学的、組織学的に評価した。また、腎凍結切片を用いヒツジ IgG およびマウス IgG の沈着を蛍光抗体法で比較した。さらに腎臓の total RNA を抽出し、マクロファージマーカーや Th 細胞関連サイトカインの発現を定量的リアルタイム PCR 法で測定し比較した。また、NTN 発症時の腎臓への Th17 細胞浸潤を免疫染色法とフローサイトメトリー法で評価し、腎臓における IL-23 産生細胞を同定するため免疫染色法を用い検討した。さらに、培養糸球体上皮細胞とマウス腹腔マクロファージに対するレプチンの直接作用について定量的リアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法を用い検討した。

【結果】5 週齢時からの食事制限下の飼育により、12 週齢時の野生型マウス群と *ob/ob* マウス群の体重に有意差は認めなかった(野生型マウス, 25.8 ± 1.1 g ; *ob/ob* マウス, 27.4 ± 1.0 g)。*ob/ob* マウス群は野生型マウス群と比べて NTN 発症時の血清尿素窒素濃度(野生型マウス, 233.0 ± 17.9 mg/dl ; *ob/ob* マウス, 83.6 ± 18.3 mg/dl ; $P < 0.01$)、シスタチン C 濃度(野生型マウス, 1.65 ± 0.15 mg/dl ; *ob/ob* マウス, 0.69 ± 0.17 mg/dl ; $P < 0.01$)が有意に低下しており、腎障害は野生型マウスに比べて軽減されていた。また抗糸球体基底膜抗血清の静脈注射後にサクリファイスを行わず経過を観察した場合は、抗糸球体基底膜抗血清の静脈注射 18 日後までに野生型マウス群では 8 頭中 7 頭が死亡したのに対して、*ob/ob* 群は全て生存しており、生存率に有意な差を認めた。腎切片における PAS 染色では野生型マウス群は高度な管内細胞増殖所見や糸球体血管内腔の血栓所見などの糸球体障害を認めたが、*ob/ob* マウス群ではこれらの所見が軽度であり糸球体障害度が軽減されていた。マウスのマクロファージマーカーである F4/80 で免疫染色を行ったところ、野生型マウス群では糸球体および間質に著明なマクロファージ浸潤を認めたが、*ob/ob* マウス群はマクロファージ浸潤が著しく減少した。さらに、腎臓における F4/80 および MCP-1 の mRNA 発現も同様に野生型マウス群で有意な上昇を認めた。ヒツジ IgG の前感作により、ヒツジ IgG が糸球体基底膜に沈着した後に autologous phase と呼ばれる免疫反応により基底膜に結合したヒツジ IgG に対するマウス IgG 抗体が産生され腎炎を加速させる。腎糸球体へのヒツジ IgG の沈着は野生型マウス群と *ob/ob* マウス群ともに同等であったが、マウス IgG の沈着は *ob/ob* マウス群で有意に低下した。さらにヒツジ IgG に特異的な血清 IgG 濃度を ELISA 法で測定したところ、IgG1,

IgG2b, IgG3 が *ob/ob* マウス群で有意に抑制されていた。NTN を発症した *ob/ob* マウス群の腎臓では Th17 細胞関連サイトカインである IL-6、IL-23p19、IL-17A の mRNA 発現が野生型マウス群と比して有意に抑制されていた。一方で、Th1 細胞に関連する IFN- γ や Th2 細胞に関連する IL-4 は両群に有意差を認めなかった。NTN を発症した野生型マウスの腎臓切片を CD3 で免疫染色を行ったところ糸球体内、間質ともに CD3 陽性 T 細胞の浸潤を認めたが、*ob/ob* マウス群では CD3 陽性細胞の浸潤がほとんど認められず、さらに IL-17A で免疫染色を行ったところ、CD3 の場合と同様に NTN を発症した野生型マウス群では陽性所見を認めたが、*ob/ob* マウス群では陽性所見を認めなかった。CD3 と IL-17A の二重染色を行うと、IL-17A 陽性細胞の一部が CD3 陽性 T 細胞であり野生型マウス群では糸球体、間質ともにこれらの陽性細胞の浸潤を認めたが、*ob/ob* マウス群では陽性細胞をほとんど認めなかった。そこで野生型マウス群と *ob/ob* マウス群の両群についてそれぞれ NTN 発症群とヒツジ IgG のみを静脈内投与した対照群を用意し、これらの計 4 群について腎臓から単核細胞を抽出し、フローサイトメトリー法で IL-17A 産生 T 細胞の数を調べたところ、野生型 NTN マウス群は *ob/ob* NTN マウス群より IL-17A 産生 T 細胞の数が有意に増加しており、中でも IL-17A 産生 $\alpha\beta$ T 細胞の著しい増加を認めた。IL-17A 産生 $\alpha\beta$ T 細胞は対照群においても *ob/ob* マウス群に比して野生型マウス群で有意な増加を認めた。これらの所見より、レプチンが腎臓の構成細胞のいずれかに作用し IL-17A 産生を促進するサイトカインである IL-23 の発現を亢進する可能性を考え、IL-23 の免疫染色を行ったところ、野生型 NTN マウス群の糸球体上皮細胞に IL-23 の陽性所見を認めた。糸球体上皮細胞へのレプチンの直接作用を調べるため、レプチン受容体を発現していることを確認した培養糸球体上皮細胞にレプチンを作用させたところ、レプチンの濃度依存性に IL-23 p19 の mRNA 発現増加を認めた。その一方で、Th1 細胞を誘導するサイトカインである IL-12p35 の mRNA 発現にはレプチン添加による差は認められなかった。最後に、レプチンのマクロファージに対する直接作用についてマウスの腹腔マクロファージを用いて検討した。NTN モデルではマクロファージは糸球体に浸潤して炎症性サイトカインやケモカインを産生し、マトリックスメタロプロテアーゼなどのプロテアーゼを発現することで糸球体障害を進展させる。マウス腹腔マクロファージにレプチンを直接作用させたところ、MCP-1 の mRNA 発現増加を認めた。この反応はレプチン受容体の一つである Ob-Rb 受容体を欠損している *db/db* マウスの腹腔マクロファージでも同様に認められた。腹腔マクロファージにレプチンをさせたときのシグナル伝達経路に関わるリン酸化反応をウェスタンブロット法で確認したところ、Ob-Rb 受容体に関連する STAT3 のリン酸化は認められず、ERK1/2 や Akt のリン酸化を認めたことから、レプチンによるマクロファージの活性化は Ob-Rb 非依存性であることが明らかとなった。

【考察】本研究で *ob/ob* マウス群は野生型マウス群と比べて NTN 発症時の腎臓障害が軽度であった。糸球体へのヒツジ IgG の沈着が同程度であった一方で、*ob/ob* マウス群においてマウス IgG の沈着が有意に減少していたことから、レプチン欠損によりヒツジ IgG に対する二次免疫応答が減弱したと考えられた。NTN 発症時の *ob/ob* マウス群の腎

臓において Th17 細胞の分化に関わる IL-6、Th17 細胞の分化や増殖に関わる IL-23、Th17 細胞が産生する IL-17A などの Th17 細胞関連サイトカインの発現が抑制され、二次免疫応答に参与する Th17 細胞活性が低下したことが二次免疫応答の減弱作用に影響したと考えられた。NTN を発症した野生型マウス群の腎組織では IL-23 が糸球体上皮細胞に発現していた。IL-23 は p40 サブユニットと p19 サブユニットからなるヘテロ二量体タンパク質である。IL-23 は Th17 細胞の分化と維持に関与し Th17 細胞の増殖因子となり、さらに IL-17 の産生を誘導する。糸球体上皮細胞にはレプチン受容体が存在しているため培養糸球体上皮細胞にレプチンを直接作用させたところ、レプチンの濃度依存性に IL-23 p19 の mRNA 発現増加を認め、糸球体上皮細胞にレプチンが作用することによる IL-23 産生亢進が NTN モデルにおける腎局所の Th17 細胞の増加と IL-17A、IL-6 の mRNA 発現増加に寄与している可能性が考えられた。また、マウス腹腔マクロファージにレプチンを直接作用させたところ、STAT3 リン酸化非依存的に MCP-1 の mRNA 発現増加を認めた。以上のことからレプチンは糸球体上皮細胞を刺激し IL-23 産生を増加することにより Th17 細胞による免疫応答を活性化し、さらにマクロファージに直接作用し炎症性サイトカイン発現を亢進することで NTN における腎障害を増悪すると考えられた。レプチンは尿細管再吸収により主に腎で代謝されることが知られており、慢性腎臓病による腎機能低下でレプチンの血中濃度が上昇すると報告されている。さらに、高レプチン血症は直接的に腎の病態生理学的な変化をもたらす。本研究の結果は肥満状態や高レプチン血症が腎障害を悪化させる新たな機序として重要な役割を持つと考えられた。

【結論】レプチンは糸球体上皮細胞に作用し IL-23 の発現量を増加させる。また、マクロファージに直接作用してマクロファージからの MCP-1 の産生を亢進し、この反応は Ob-Rb/STAT3 経路に非依存的に引き起こされる。マウスの NTN モデルにおいてレプチンは IL-23 産生亢進に伴った Th17 細胞の発現増加による免疫反応の増強とマクロファージの活性化作用を介して腎障害を増悪させた。高レプチン血症により糸球体障害が増悪する機序の一つである可能性がある。