

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, メサング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、内皮細胞やメサング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%は再発を起こし、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6mg/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；抗シナプトポディン抗体(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

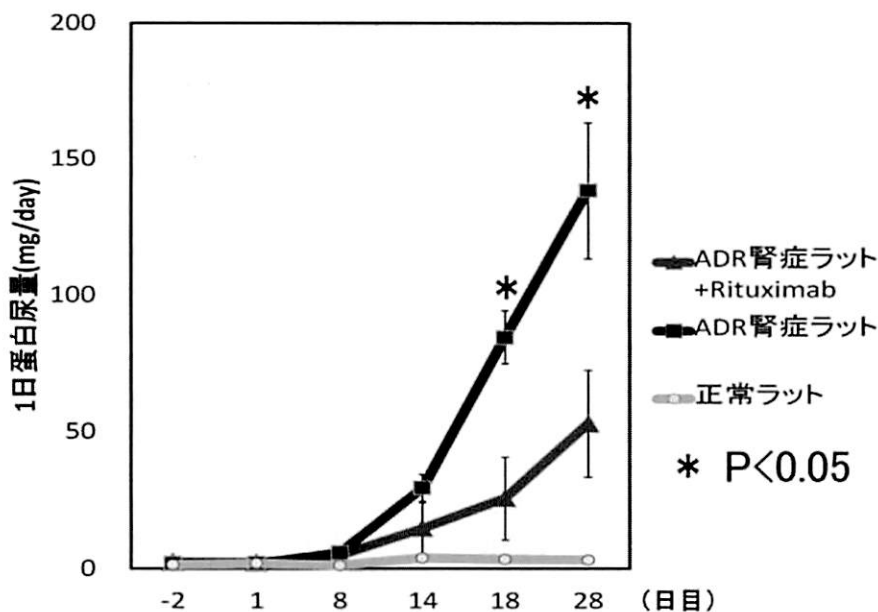


図1 蛋白尿量の経時的変化

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。

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°C の

n -hexane を用いて急速凍結した。クリオスタットで $3\mu\text{m}$ 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

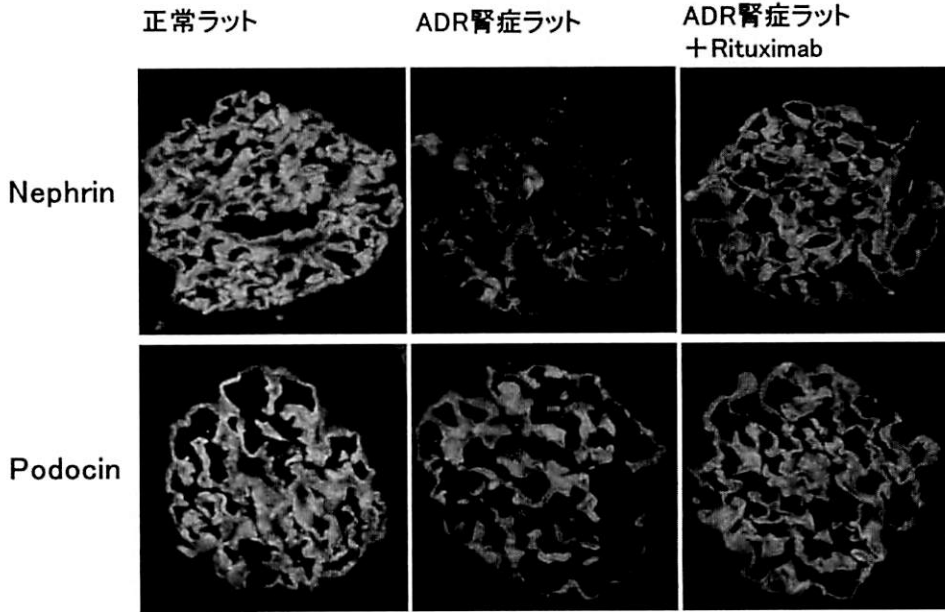


図 2 病態誘導 28 日目の Nephrin, Podocin の発現

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。

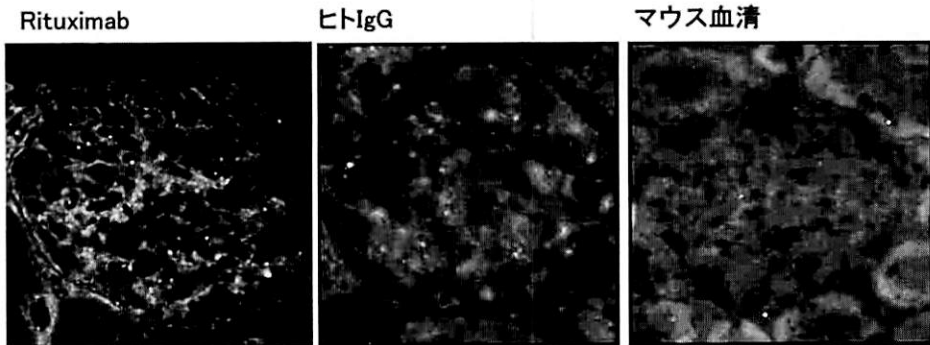


図 3 正常ラット腎組織における Rituximab 結合蛋白の発現
Rituximab 結合蛋白は顆粒状のパターンを呈し糸球体係蹄壁に沿って発現した。

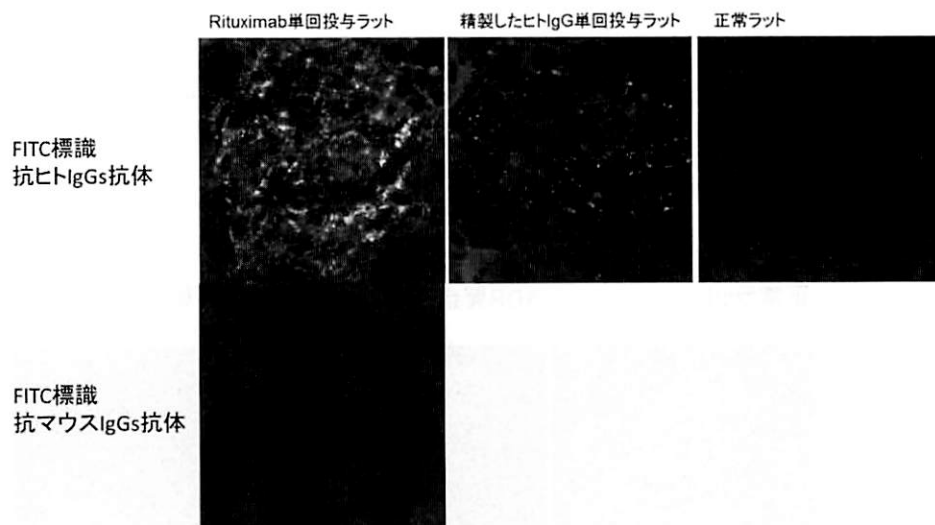


図4 Rituximab投与ラットの直接染色

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。

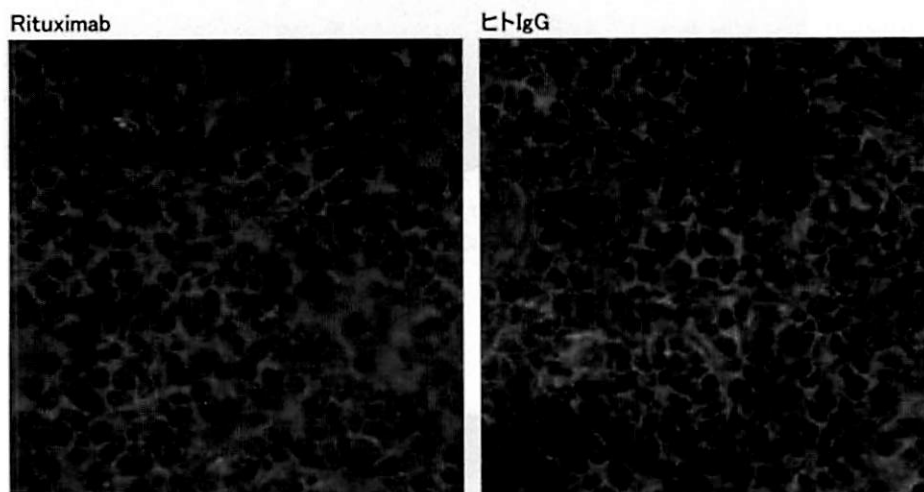


図5 正常ラット脾組織におけるRituximab結合蛋白の発現
Rituximab結合蛋白は脾組織に発現しなかった。

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

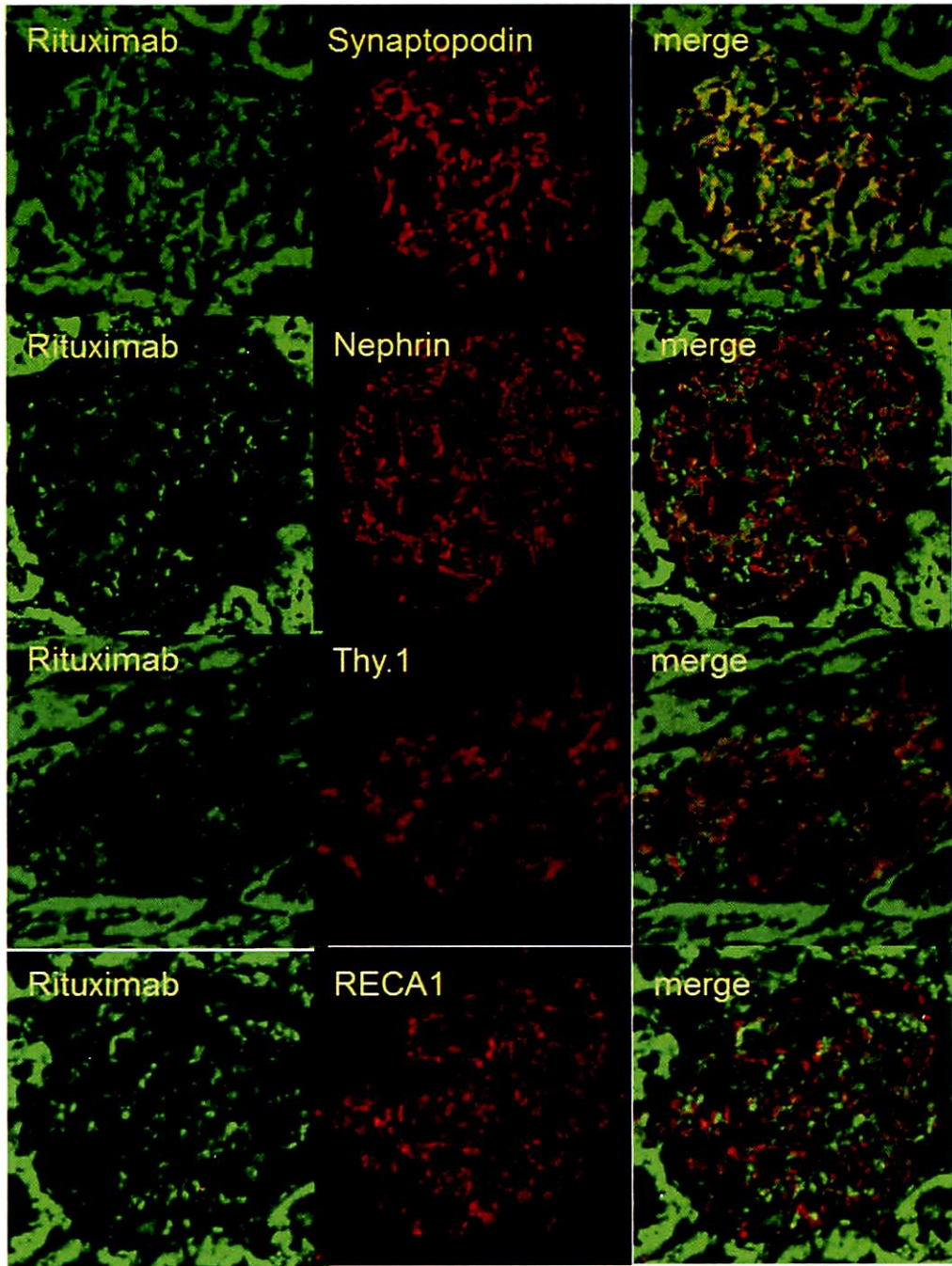


図6 Rituximab結合蛋白の正常ラットにおける糸球体内局在
Rituximab結合蛋白とSynaptopodinがほぼ一致して観察された。Nephrin, Thy 1, RECA1とは異なる局在を呈した。

(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Thy1、内皮細胞のマーカーであるRECA1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170SNS173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。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Synpto-

podin、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Thy1、内皮細胞マーカーであるRECA1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。

文 献

- 1) Lombel RM, Hodson EM and Gipson DS: Kidney Disease: Improving Global Outcomes. Treatment of steroid - resistant nephrotic syndrome in children: new guidelines from KDIGO. *Pediatr. Nephrol.* 28: 409 - 414, 2013.
- 2) Iijima K, Sako M and Nozu K: Rituximab Treatment for Nephrotic Syndrome in Children. *Curr. Pediatr. Rep.* 3: 71 - 77, 2015.
- 3) Stashenko P, Nadler LM, Hardy R and Schlossman SF: Characterization of a human B lymphocytespecific antigen. *J. Immunol.* 125: 1678 - 1685, 1980.
- 4) Deans JP, Li H and Polyak MJ: CD20 - mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology.* 107: 176 - 182, 2002.
- 5) Kari JA, El - Morshedy SM, El - Desoky S, Alshaya HO, Rahim KA and Edrees BM: Rituximab for refractory cases of childhood nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 26: 733 - 737, 2011.
- 6) Prytula A, Iijima K, Kamei K, Geary D, Gottlich E, Majeed A, Taylor M, Marks SD, Tuchman S, Camilla R, Ognjanovic M, Filler G, Smith G and Tullus K: Rituximab in refractory nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 25: 461 - 468, 2010.
- 7) Iijima K, Sako M, Nozu K, Mori R, Tuchida N, Kamei K, Miura K, Aya K, Nakanishi K, Ohtomo Y, Takahashi S, Tanaka R, Kaito H, Nakamura H, Ishikura K, Ito S and Ohashi Y: Rituximab for childhood - onset, complicated, frequently relapsing nephrotic syndrome or steroid - dependent nephrotic syndrome: a multicentre, double - blind, randomised, placebo - controlled trial. *Lancet.* 384: 1273 - 1281, 2014.
- 8) Magnasco A, Ravani P, Edefonti A, Murer L, Ghio L, Belingheri M, Benetti E, Murtas C, Messina G, Massella L, Porcellini MG, Montagna M, Regazzi M, Scolari F and Ghiggeri GM: Rituximab in children with resistant idiopathic nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23: 1117 - 1124, 2012.
- 9) Wymann MP and Schneider R: Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9: 162 - 176, 2008.
- 10) Fornoni A, Sageshima J, Wei C, Merscher - Gomez S, Aguillon - Prada R, Jauregui AN, Li J, Mattiazzi A, Ciancio G, Chen L, Zilleruelo G, Abitbol C, Chandar J, Seeherunvong W, Ricordi C, Ikehata M, Rastaldi MP, Reiser J and Burke GW 3rd: Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Sci. Transl. Med.* 3: 85ra46, 2011.
- 11) Kawachi H, Koike H and Shimizu F: mAb 5 - 1 - 6 nephropathy and nephrin. *Microsc. Res. Tech.* 57: 236 - 240, 2002.
- 12) Kawachi H, Orikasa M, Matsui K, Iwanaga T, Toyabe S, Oite T and Shimizu F: 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 and 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 and 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 - 1077, 2006.
- 15) Merrill AH Jr: De novo sphingolipid biosynthesis: an ecessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 25843 - 25846, 2002.
- 16) Fornoni A, Merscher S and Kopp JB: Lipid biology of the podocyte - new perspectives offer new opportunities. *Nat. Rev. Nephrol.* 10: 379 - 388, 2004.
- 17) Chan AC: Rituximab's new therapeutic target: the podocyte actin cytoskeleton. *Sci. Transl. Med.* 3: 85ps21, 2011.