

Search for therapeutic targets focusing on lymphocyte
infiltration in kidney of MRL/lpr mice

(MRL/lprマウスの腎臓におけるリンパ球浸潤に
着目した治療標的の探索)

まつばら
松原

ひでひと
秀史

(腎臓病学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

目 次

第1章 緒言	1頁
第2章 SLEモデルマウス(MRL/lpr)の腎臓における浸潤細胞の検討	3頁
第1節 目的	3頁
第2節 材料と方法	4頁
第3節 結果	5頁
第4節 考察	5頁
第5節 小括	6頁
第3章 MRL/lprマウスの腎炎におけるヒストン脱アセチル化酵素の関与	7頁
第1節 目的	7頁
第2節 材料と方法	7頁
第3節 結果	10頁
第4節 考察	12頁
第5節 小括	13頁
第4章 MRL/lprマウスにおけるPEPITEM/cadherin (CDH) 15 axisを介した浸潤細胞制御及び腎症抑制効果の検討	14頁
第1節 目的	14頁
第2節 材料と方法	15頁
第3節 結果	20頁
第4節 考察	23頁

第5節 小括	25頁
第5章 MRL/lprマウス及びループス腎炎における新たな治療標的の探索	26頁
第1節 目的	26頁
第2節 材料と方法	27頁
第3節 結果	29頁
第4節 考察	31頁
第5節 小括	32頁
第6章 統括的考察	33頁
第7章 結論	36頁
謝辞	38頁
引用文献	39頁
図表	47頁

第1章 緒言

Systemic lupus erythematosus (SLE)は慢性の自己免疫疾患であり、腎炎、関節炎、漿膜炎、皮疹、自己抗体産生などその症状は多岐に渡り、再燃と寛解を繰り返しながら慢性的な経過を辿り、腎臓においては末期腎不全にまで進行するものである。その病態は複雑で未だ不明な点も多く、様々な因子をターゲットにした治療法が日々開発されている(1)。

ループス腎炎における病態は immune mechanism と non-immune mechanism に大別される。前者は炎症性メディエーターや細胞浸潤に伴う組織障害である。後者は細胞間クロストークの廃絶や血管機能異常に伴う組織低酸素、尿細管間質の線維化などである(2)。腎臓における炎症性細胞浸潤の制御はループス腎炎における主要な治療ターゲットの1つである。ループス腎炎における浸潤リンパ球の制御においてはステロイドと免疫抑制薬が主要な治療法であるが、長期的な内服に伴う易感染性や骨粗鬆症、妊孕性の問題など様々な合併症が治療継続を困難なものにすることも临床上しばしば遭遇するところである。

今回、我々は実験動物として MRL/lpr マウスを使用した。この MRL/lpr マウスは自己免疫疾患モデル動物の一系であり、抗 DNA 抗体や抗 Sm 抗体などの多彩な自己抗体の産生を伴い、腎炎、関節炎、皮疹といった SLE 様症状を自然発症する(3)。初めにループス腎炎における浸潤リンパ球のポピュレーションや役割が不明なことから、MRL/lpr マウスの腎浸潤リンパ球のポピュレーション

ョンについて flow cytometry analysis (FCA) を使用して検索した。その後、腎に浸潤するリンパ球の制御を目的とした新たな治療ターゲットを 2 つの視点から探索した。1 点目はエピゲノム修飾の一つであるヒストン脱アセチル化を制御することによって腎症進展抑制効果を検索した。一般に、ヒストンのアセチル化は遺伝子の発現を促進する方向に働き、逆に脱アセチル化によって抑制的に働く。近年 SLE を含む様々な疾患においてヒストン脱アセチル化の異常が報告されている (4, 5)。そのため、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase) の阻害薬としてバルプロ酸を用いた。

2 点目は T リンパ球の血管外への遊走を制御する sphingosine 1 phosphate (S1P) を中心とした peptide inhibitor of trans-endothelial migration (PEPITEM)/cadherin (CDH) 15 axis に注目した。S1P は血管内皮細胞から産生されるスフィンゴ脂質由来の脂質メディエーターで T リンパ球に発現している S1P 受容体に作用し、血管外への遊走を抑制している。S1P の産生は内因性ペプチドである PEPITEM が血管内皮細胞に発現する受容体である cadherin (CDH) 15 を介して行われている。これまでの報告では、CDH15 は持続する炎症状態においてのみ発現し、PEPITEM/CDH15 axis は臓器局所における炎症に重要な役割を果たすといわれている (6)。そのため、外因性の PEPITEM を使用し、MRL/lpr マウスの腎臓における PEPITEM/CDH15 axis の効果を検索した。

最後に糸球体のポドサイトに存在する c-maf inducing protein (c-mip) に注目し、バルプロ酸あるいは PEPITEM の c-mip における抑制効果を検索した。炎

症が糸球体に及ぶとき、ポドサイトの *WT1* 遺伝子発現が減弱し、その結果 *c-mip* 遺伝子の転写抑制が解除され、*c-mip* 遺伝子発現が上昇する。*C-mip* 蛋白はチロシンキナーゼのリン酸化阻害を介してポドサイトのスリット隔膜に存在する膜貫通性蛋白であるネフリンの産生低下を起こす。ネフリンの産生低下はスリット膜の破綻を起こすと同時にアクチン細胞骨格の破綻が起こり、蛋白尿が惹起される。この *c-mip* 遺伝子発現の増加は微小変化群や膜性腎症などで報告されている(7)。上記の 2 つの実験による仮説が正しいとすれば、腎のリンパ球浸潤の抑制を介して *c-mip* の働きが抑制され、蛋白尿の改善に繋がると考えられた。

第 2 章 SLE モデルマウス (MRL/lpr) の腎臓における浸潤細胞の検討

第 1 節 目的

正常な腎臓における resident なリンパ球およびループス腎炎における浸潤リンパ球が、どのようなポピュレーションをしているかは不明な点が多い(8-10)。MRL/lpr マウスはアポトーシス誘導受容体である Fas をコードする遺伝子 *lpr* の異常を背景にもつマウスであり、 $CD3^+CD4^-CD8^-$ の double negative T

(DNT)細胞が末梢血、脾臓、リンパ節などで著増することが知られている(11)。
C57BL/6 マウスを用いた検討では正常腎臓の resident リンパ球においては
DNT 細胞が 20%ほどであるとする報告もある(12)。ループス腎炎と診断され
た腎生検臨床検体を用いた免疫組織化学的検討においても浸潤細胞中に DNT
細胞を数多く認め、IL-17 を産生し病態に関与しているとする報告もある(13)。
治療ターゲットとする MRL/lpr マウスの腎臓のリンパ球がどのようなポピュ
レーションを有しているかをまず検討した。

第2節 材料と方法

(1) 対象

22 週齢の雌の MRL/lpr マウス (SLC、Tokyo、Japan) (n = 5)を使用した。本
実験は防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認を得て行った (承認番号
16043)。

(2) 抗体

表 1 に実験で使用した抗体について示す。

(3) 腎単核球におけるリンパ球の解析

摘出した腎臓をメス刃で細切した後に 70 μ m のメッシュに通しながら 15ml

の遠心管に細胞浮遊液を回収した。遠心 (300g、4°C、5 分) をして上清を除去した。1ml の Hanks' balanced salt solution を加えて攪拌して腎単核球を分離した (14)。浮遊液を 1×10^7 /ml に調整した後に Fc ブロッカーを混じ、各種一次抗体を冷暗所で反応させた。Lysing solution (Bay biosciences、Hyogo、Japan) を室温で 10 分間反応させた後に遠心 (400g、4°C、5 分) した。上清を除去し phosphate buffered saline (PBS) で攪拌して再度同条件で遠心した。上清を除去して stain buffer を添加し、FACS Canto II (BD Biosciences、San Diego、CA) を用いて FCA を行った。

第 3 節 結果

MRL/lpr マウスの腎臓におけるリンパ球のポピュレーションの検討

図 1 に FCA の結果を示す。全リンパ球に対する $CD3^+CD4^+$ T 細胞は $53.5 \pm 2.5\%$ 、 $CD3^+CD8^+$ T 細胞は $16.4 \pm 1.9\%$ 、 $CD3^+CD4^+CD8^+$ T 細胞は $29.0 \pm 4.1\%$ であった (n = 5)。

第 4 節 考察

MRL/lpr マウスにおける浸潤細胞において、末梢血では数%しか存在しない DNT 細胞が $CD3^+CD4^+$ T 細胞に次ぐ大きなポピュレーションとなっていた。こ

れは MRL/lpr マウスにおける末梢血、脾臓、リンパ節の単核球における FCA の解析報告を追認する結果である(11)。DNT 細胞は、ループス腎炎においては IL-17 を産生し病態に関与するとする報告もあれば(13, 15)、虚血再灌流モデルにおいては病初期には保護的に作用するとする報告もあり(16)、DNT 細胞の役割については未だ一定の見解を得られていない(17)。従来の Th1、Th2、Th17 等による反応系以外の病態関与(18)として DNT 細胞のサイトカイン産生などのプロフィールを更に詳細に検討していく必要があると思われた。

第5節 小括

MRL/lpr マウスの腎臓におけるリンパ球のポピュレーションで DNT 細胞が $CD3^+CD4^+T$ 細胞につき多く、病態への関与が示唆された。

第3章 MRL/lpr マウスの腎炎におけるヒストン脱アセチル化酵素の関与

第1節 目的

自己免疫疾患には DNA メチル化の低下やヒストン脱アセチル化のようなエピゲノム修飾が報告されている。このようなエピゲノム修飾のうち、ヒストン脱アセチル化が起こると、転写因子の DNA への結合が抑制され、転写活性は減弱する。SLE の場合、DNA メチル化の低下が報告されているが、ヒストンのアセチル化修飾についての報告はない。SLE モデル動物の MRL/lpr マウスではヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の阻害薬を投与すると多臓器腫大の抑制や蛋白尿の減少が報告されている (11, 19) が、腎病変について詳細に検討した報告はない。今回、HDAC の阻害薬であるバルプロ酸 (valproic acid; VPA) を用いて MRL/lpr マウスの腎病変の効果を検索した。

第2節 材料と方法

(1) 対象

12 週齢の雌の MRL/lpr マウス (SLC) に対し 0.4%VPA を自由飲水下で投与した (以下 VPA 群)。Vehicle 群は通常 of 自由飲水下で飼育した。各群 n = 6。20 週齢の時点でサクリファイスして腎臓、脾臓、リンパ節、末梢血を採取した後

に組織学的および生化学的評価を行った。MRL/+マウスを wild type として用いた。本実験は防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 16043）。マウスの飼育は防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い specific pathogen free (SPF) 環境下で通常のマウス飼料及び自由飲水にて行った。

(2) 抗体

表 2 に使用した抗体を示す。

(3) 血清、尿を用いた生化学的検査

血清及び尿中の creatinine (Cr) は酵素法で、総蛋白質は biuret 法、albumin (Alb) は bromocresol green (BCG) 法、blood urea nitrogen (BUN) は酵素法、抗 ds-DNA 抗体価は市販の ELISA kit (Shibayagi, Gunma, Japan) を使用して測定した。

(4) 免疫組織化学

Hematoxylin eosin (HE) 染色はパラフィン切片を用いた。パラフィン切片を用いた酵素抗体法では脱パラフィン後、流水中で親水化を行いクエン酸バッファ一中での加熱処理で抗原賦活化を行った。非特異的結合を防ぐためのブロックエース (DS-Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を室温で 30 分間反応させた。

その後各種一次抗体を 4℃で一晩反応させた。Peroxidase Blocking Solution (DAKO、Santa Clara、CA)を室温で 10 分間反応させて内因性ペルオキシダーゼをブロックした。二次抗体を室温で 30 分間反応させたのち 3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB)を用いて発色させた。腎臓新鮮凍結切片については ice cold アセトンを室温で 10 分間反応させたのちに各種 1 次抗体を 4℃で一晩反応させた。酵素抗体法についてはシンプルステイン MAX-PO (Nichirei、Tokyo、Japan)シリーズを使用した。免疫蛍光染色については Alexa fluor 488 もしくは alexa fluor 594 標識二次抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用した。

(5) 組織学的評価

糸球体への IgG の沈着の程度はマウス 1 匹あたり少なくとも 20 個以上の糸球体を観察し相対蛍光強度で比較した。T 細胞のマーカーである CD3e 陽性細胞数はマウス 1 匹あたり少なくとも 40 個の糸球体についてカウントした。ポドサイトのマーカーである Wilms' tumor 1 (WT1)陽性細胞数については thick and thin section method を用いてカウントした(20)。ポドサイトの足突起間のスリット膜を構成するネフリンの相対蛍光強度は以下の式を用いて算出した(7)。

$$\text{specific fluorescence site} = \frac{\text{fluorescence intensity lining area (lining capillary loops)}}{\text{total glomerular area}}$$

画像処理は image J (v. 1.4.3.67)を使用した。

(6) HDAC 活性の測定

HDAC Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision、Milpitas、CA)を使用して測定した。

(7) 統計処理

統計解析は Wilcoxon rank sum test を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

統計解析処理は JMP v.8.0.2 software (SAS Institute Inc、Cary、NC)を使用した。

第3節 結果

(1) VPA の多臓器腫大に対する効果の検討

図2に摘出した腎臓、脾臓、腋窩リンパ節の外観と臓器重量を示す。臓器重量は腎臓、脾臓、腋窩リンパ節全てにおいて VPA 群で有意に低値だった。

(2) 尿、血清を用いた生化学的評価

表3にサクリファイス時に採取した血清、尿を用いた生化学的評価を示す。Cr、Alb に両群間で差は認めなかった。抗 ds-DNA 抗体価と尿の総蛋白は VPA 群で有意に低値であった。

(3) 組織学的評価による浸潤細胞に対する VPA の効果の検討

Vehicle 群に比し間質及び血管周囲へのリンパ球浸潤は VPA 群で軽微だった (図 3a 上)。また糸球体の血管腔は VPA 群で保たれていた (図 3a 下)。糸球体内に浸潤している CD3e (汎 T 細胞マーカー)陽性細胞数は vehicle 群に比し VPA 群で有意に低値だった (図 3b)。間質における F4/80 (マクロファージ及び単球のマーカー)陽性細胞数も vehicle 群に比し VPA 群で有意に低値だった (図 3c)。

(4) 糸球体における免疫複合体沈着に対する VPA の効果の検討

図 4 に糸球体における IgG 沈着の程度を示す。相対蛍光強度で比較すると VPA 群で有意に低値であった。

(5) ポドサイトにおける VPA の効果の検討

パラフィン切片を用いたネフリン (スリット膜の構成タンパク質) の免疫蛍光染色において糸球体あたりの相対蛍光強度は、VPA 群で有意に高値だった。 (図 5a)。糸球体あたりの WT1 陽性細胞数は VPA 群で高値だった (図 5b)。

(6) 腎皮質における HDAC 活性の検討

図 6 に腎皮質より抽出したタンパク質中の HDAC 活性を示す。Vehicle 群の HDAC 活性は、MRL/+マウス (wild type) より有意に高値だった。VPA 群では

vehicle 群に比し HDAC 活性は有意に低値だった。

(7) 腎臓における histone H3 lysine 9 (H3K9) のアセチル化の組織学的検討

パラフィン切片を用いて免疫蛍光染色を行い、H3K9 のアセチル化の程度を相対蛍光強度で比較した。浸潤リンパ球の H3K9 のアセチル化の相対蛍光強度は VPA 群で有意に高値だった (図 7a, b)。糸球体における H3K9 のアセチル化の相対蛍光強度は VPA 群で有意に高値だった (図 7c-e)。次に WT1 (赤) と H3 acetyl K9 (緑) で免疫蛍光二重染色を行い、糸球体における WT1 陽性細胞 (ポドサイト) と非 WT1 陽性細胞 (糸球体におけるポドサイト以外の細胞) の相対蛍光強度を比較した。非 WT1 に対する WT1 の比として算出した結果、VPA 群で有意に高値だった (図 7c, d, f)。

第4節 考察

今回の実験で、VPA 群では vehicle 群と比較して、臓器重量の低下、尿所見の改善、糸球体浸潤 T リンパ球の低下、ポドサイトのネフリンの増加、HDAC 活性の低下、H3K9 のアセチル化の増加が認められた。この結果から、VPA 群でまず HDAC 活性の低下が起こり、それに伴って腎間質でのリンパ球のアセチル化やポドサイトのアセチル化が増加し、糸球体への T リンパ球浸潤の減少に繋がり、IgG の糸球体への沈着減少やポドサイトのネフリンの増加により尿

所見の改善に寄与したと考察する。これらの所見は *in vitro* において HDAC 阻害薬による peripheral blood mononuclear cells (PBMC) の増殖能の低下やアポトーシス誘導を報告した論文(11, 21)、HDAC 阻害薬によるアセチル化を介した p53 活性化がアポトーシス誘導したとする報告(22)を考慮すると、T リンパ球の減少にはアポトーシスが関与した可能性が示唆される。

第5節 小括

MRL/lpr マウスの腎臓において HDAC 活性が上昇しており、HDAC 阻害薬である VPA で腎炎が軽快したことから、ヒストンの脱アセチル化も SLE の病態に関与している可能性が示唆された。VPA 投与により組織学的に浸潤細胞は減少し、HDAC 活性にも変化が認められたことから、エピジェネティックな変化はリンパ球浸潤をコントロールに有用である可能性が示唆された。

第4章 MRL/lpr マウスにおける PEPITEM/cadherin (CDH) 15 axis を介した浸潤細胞制御及び腎症抑制効果の検討

第1節 目的

T リンパ球の血管外への遊走を抑制する S1P を中心とした PEPITEM/CDH15 axis が近年報告された(6)。S1P は血管内皮細胞から産生されるスフィンゴ脂質由来の脂質メディエーターで、T リンパ球に発現している S1P 受容体に作用し、血管外への T リンパ球の遊走を抑制している(23-25)。S1P の産生は内因性ペプチドである PEPITEM が血管内皮細胞の受容体である CDH15 を介して行われる。これまでの報告では、CDH15 は持続する炎症状態においてのみ発現し、PEPITEM/CDH15 axis は臓器局所における炎症に重要な役割を果たすといわれている。実験的には S1P 受容体のアゴニストである Fingolimod (FTY720) の投与により、MRL/lpr マウスの生存率を改善させる報告(26-28)や実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療効果が実証された報告がある(29, 30)。そのため、外因性の PEPITEM を使用し、腎における PEPITEM/CDH15 axis の効果を検索した。

第2節 材料と方法

(1) 対象

18 週齢の雌の MRL/lpr マウス(SLC)に対して、PBS に溶解した 400 μ g の PEPITEM を dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposome に包含して週 2 回、計 4 週間皮下注射をした。Vehicle 群には PBS のみを DPPC liposome に包含したものを同様のスケジュールで投与した。各群 n = 6。22 週齢の時点でサクリファイスして腎臓、脾臓、リンパ節、末梢血を採取した後に、組織学的および生化学的評価を行った。

PEPITEM (SVTEQGAELSNEER) は合成後 high performance liquid chromatography を用いて精製した (Scrum, Tokyo, Japan)。PEPITEM の半減期が 2 分未満と非常に短く、分解されやすいため、95%以上の純度の PEPITEM を滅菌した PBS に溶解した後、DPPC liposome に包含することで徐放化を図った(31, 32)。DPPC liposome は東海大学工学部生名化学科准教授 清水佳隆博士よりご提供いただいた。本実験は防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 16076、16078)。マウスの飼育は防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い SPF 環境下で通常のマウス資料及び自由飲水に行なった。

(2) 抗体

表 4 に使用した抗体を示す。

(3) リンパ球の解析

第 2 章第 2 節(3)と同様の方法で行った。

(4) 尿、血清を用いた生化学的検査

尿中アルブミンはレビスアルブミン assay kit (Shibayagi) を使用して測定した。血清及び尿中の Cr は酵素法で、TP は biuret 法、アルブミンは BCG 法、BUN は酵素法で測定した。

(5) 免疫組織化学

HE 染色と periodic acid Schiff (PAS) 染色はパラフィン切片を用いた。パラフィン切片を用いた酵素抗体法では脱パラフィン後、流水中で親水化を行い、クエン酸もしくは Tris - ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) バッファー中での加熱処理で抗原賦活化を行った。非特異的結合を防ぐためのブロックエース (DS-Pharma Biomedical) を室温で 30 分間反応させた。その後各種一次抗体を 4℃で一晩反応させた。Peroxidase Blocking Solution (DAKO) を反応させて内因性ペルオキシダーゼをブロックした。酵素抗体法にはシンプルステイン MAX-PO シリーズ (Nichirei) を室温で 30 分間反応させたのち DAB を用いて発

色させた。腎臓新鮮凍結切片については ice cold アセトンで室温で 10 分間反応させたのちに各種 1 次抗体を 4°Cで一晩反応させた。蛍光抗体法には Alexa fluor 488 もしくは alexa fluor 594 標識二次抗体 (Invitrogen)を使用した。免疫蛍光二重染色の結果は pulse SIM BZ-X700 (Keyence、Osaka、Japan)を用いて撮影した。

標識 PEPITEM を用いた組織染色には新鮮凍結切片を使用した。Ice cold アセトンで室温で 10 分間反応させた後に N 末端を FITC 標識した PEPITEM (0.02mg/dl) を室温で 30 分間反応させた。PBS で軽く洗浄した後に 4% paraformaldehyde (PFA) / PBS を用いて室温で 15 分間再固定を行った。HRP 標識抗 fluorescein isothiocyanate 抗体 (HPI、Burlington、MA) 及びシンプルステイン MAX-PO(R) (Nichirei)を室温で 30分間それぞれ反応させ DAB で発色した。

(6) 組織学的評価

糸球体への IgG と C3 の沈着の程度はマウス 1 匹あたり少なくとも 20 個以上の糸球体を観察し、相対スケール (0~3+) で評価した。CD3e 陽性細胞数及び Ki-67 陽性細胞数はマウス 1 匹あたり少なくとも 40 個の糸球体についてカウントした。WT1 陽性細胞数については thick and thin section method を用いた (20)。ネフリンの相対蛍光強度は以下の式を用いて算出した (7)。

$$\text{specific fluorescence site} = \frac{\text{fluorescence intensity lining area (lining capillary loops)}}{\text{total glomerular area}}$$

画像処理は image J (v. 1.4.3.67) を使用した。

(7) 電顕及び免疫電顕

パラフィン切片を用いて戻し電顕を行った。

免疫電顕用の試料については摘出した腎臓を 4%PFA / PBS 中で 4°C、一晩反応させた後にスクロース置換を行い、液体窒素を用いて凍結させ使用するまで -80°C で保存した。Tris-EDTA バッファーを用いて賦活化した後に 1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。直径 10nm の金コロイドを標識した二次抗体 (Cytodiagnostics, ON, Canada) を室温で 1 時間反応させた。Can Get Signal solution B (Toyobo, Osaka, Japan) を抗体希釈液として使用した。観察には JEM-1400 plus (Japan Electron Optics Laboratory, Tokyo, Japan) を使用した。

(8) 糸球体単離

竹本らの報告した磁気ビーズ法に若干の変更を加えて行った (33)。

Dynabeads M-450 Epoxy (Veritas, Tokyo, Japan) を混じた冷 PBS を用いて心嚢穿刺による灌流を行った。皮質を細切し 15ml の遠心管に移し遠心 (500rpm、4°C、5 分間) した。上清を吸った後 DNaseI を混じたコラゲナーゼ中で 37°C、30 分間反応させた。懸濁液を 100µm メッシュに 2 回通し、メッシュ上に残った組織を 15ml の遠心管に回収した。遠心 (500rpm、4°C で 5 分間) した後に上清を吸い、PBS で 1ml にメスアップした。氷上でマグネットにつけて 2 分間静置した

後にパスツールピペットを用いてマグネットの反対側から PBS を回収した。

再度 PBS で再懸濁して同様の操作を計 3 回行ったものを単離糸球体とした。

(9) 電気泳動及び Western blotting

2 匹分のマウスから摘出した腎臓を用いて糸球体を単離してプールした。プロテアーゼ阻害薬を混じた radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (WAKO、Tokyo、Japan)中で超音波破碎を行った。等量の蛋白抽出液を sample buffer solution (2ME+) (Wako pure chemicals industries, Osaka, Japan)で変性させた後に 98℃で 5 分間加熱し遠心分離後の上清を使用した。10% sodium dodecyl sulfate (SDS) – polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (ATTO、Tokyo、Japan)を行った後に polyvinylidene difluorid (PVDF)膜にブロッティングした。膜は ChemiDoc XPS+system (Bio-Rad、Hercules、CA)を用いて可視化した。バンドの濃度は Lab software (Bio-Rad)を用いて測定した。

各群 5μl の尿は sample buffer で変性後 12%SDS-PAGE (TGX Stain Free Fast Cast Acrylamide kit) (Bio-Rad)を行った。ゲル上の蛋白は紫外線光を用いて可視化した。

(10) 統計処理

統計解析は Wilcoxon rank sum test を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

統計解析処理は JMP v.8.0.2software (SAS Institute Inc、Cary、NC)を使用した。

第3節 結果

(1) PEPITEM のリンパ球浸潤抑制効果の検討

PEPITEM 群の腎臓、脾臓および腋窩リンパ節の重量は、vehicle 群に比し有意に低かった (図 8a)。腎単核球数は PEPITEM 群で有意に低値であった (図 8b)。腎単核球を用いた FCA においては $CD3^+CD4^+$ T (helper T)、 $CD3^+CD8^+$ T (CTL, cytotoxic T) の絶対数は減少したが、その比率に有意な差は認められなかった。しかし DNT 細胞については絶対数だけでなく、リンパ球全体における比率も PEPITEM 群で有意に減少した (図 8c,d)。

(2) 蛋白尿に対する PEPITEM の効果の検討

MRL/+マウス (wild type)、vehicle 群、PEPITEM 群の尿を用いて電気泳動を行った。参考として $8\mu\text{g}$ のアルブミン (分子量 66kDa) を同時に流した。MRL/+マウス、PEPITEM 群に比し vehicle 群では、アルブミンに加えて種々の分子量のタンパク質が尿中に出現していることがわかった (図 9a)。アルブミン/クレアチニン比は PEPITEM 群で有意に低値だった (図 9b)。

(3) 血清生化学

表 5 にサクリリフェイス時に採取した血清を用いた生化学的評価を示す。

BUN、total protein (TP)、Alb、抗 ds-DNA 抗体価に両群間で差は認めなかった。

Cr、A/G 比は PEPITEM 群で有意に高値だった。

(4) 組織学的評価による腎炎に対する PEPITEM の効果の検討

HE 染色では腎臓間質における浸潤細胞が vehicle 群に比し PEPITEM 群で少なかった (図 10a)。PAS 染色では糸球体のメサンギウム器質の増生は vehicle 群に比し PEPITEM 群で軽微だった。糸球体内に存在する CD3e 陽性細胞数も vehicle 群に比し PEPITEM 群で有意に低値だった (図 10b, c)。F4/80 の間質における陽性細胞数も PEPITEM 群で有意に低値だった (図 10b,d)。S 期のマーカーである Ki-67 の糸球体内における陽性細胞数も PEPITEM 群で有意に低値だった (図 10b, e)。

(5) 糸球体における IgG 及び C3 沈着に対する PEPITEM の効果の検討

FITC 標識した IgG 及び C3 を用いて免疫蛍光染色を行った (図 11a)。IgG、C3 共に糸球体への沈着の程度は PEPITEM 群で有意に低かった (図 11b)。

(6) ポドサイトにおける PEPITEM の効果の検討

糸球体あたりのポドサイト数を WT1 の陽性細胞数としてカウントして比較した。糸球体あたりの WT1 陽性細胞数は vehicle 群に比し PEPITEM 群で有意に高値だった (図 12a, b)。ネフリンをパラフィン切片を用いて免疫蛍光染色した。糸球体あたりのネフリンの相対蛍光強度は vehicle 群に比し PEPITEM 群で

有意に高値だった (図 12c, d)。パラフィン切片を用いた戻し電顕による糸球体の観察ではポドサイトの effacement が vehicle 群で目立った (図 12e)。

(7) MRL/lpr マウスの腎臓における、受容体 CDH15 発現に対する組織学検討

腎炎発症前の 4 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓における CDH15 の発現を免疫組織化学的に評価した。細動脈及び小葉間動脈の血管平滑筋細胞(矢印)に陽性像(茶色)が得られたが、血管内皮細胞には陽性像は認められなかった (図 13a, b)。しかし、腎症極期である 22 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓では細動脈及び小葉間動脈の血管平滑筋細胞(矢印)だけでなく、血管内皮細胞(矢頭)および糸球体にも陽性像 (茶色) が得られた (図 13c, d)。糸球体における CDH15 陽性細胞の同定及び血管内皮細胞内での局在確認のため、直径 10nm の金コロイドを標識した二次抗体を使用して、免疫電顕を行った。糸球体毛細血管内皮細胞及び、小葉間動脈内皮細胞の内腔側に金コロイドの粒子を確認した (矢印) (図 13e, f)。

マウス 2 匹の腎臓から磁気ビーズ法により単離した糸球体をプールして抽出したタンパク質を用いて Western blotting を行い CDH15 を検出した (図 13g)。糸球体内に α smooth muscle actin 陽性細胞が存在していないことを組織化学染色で確認した (図 13h)。

(8) 22 週齢の MRL/lpr マウスの皮膚、腹膜における CDH15 発現の組織学

的検討

SLE は腎病変だけでなく皮膚や漿膜にも炎症性病変を呈する。そこで MRL/lpr マウスにおける皮膚、漿膜における CDH15 の発現を検索した。22 週齢の MRL/lpr マウスの皮膚を血管内皮細胞のマーカーである CD31 (緑) (図 14a) と CDH15 (赤) (図 14b) で免疫蛍光二重染色を行ったところ CD31 と CDH15 は共局在を示した (図 14c)。また同様の操作を腹膜においても行い、CD31 (図 14d) と CDH15 (図 14e) が共局在をしていることが示された (図 14f)。

(9) 外因性 PEPITEM の結合部位に対する組織学的検討

CDH15 の組織化学染色の結果と同様、細動脈及び小葉間動脈の血管平滑筋細胞にのみ陽性だった。(図 15a, b)。FITC 標識した PEPITEM を省略したものを negative control とした (図 15c)。次に 22 週齢で同様の操作を行った。細動脈及び小葉間動脈の血管平滑筋細胞 (矢印)、血管内皮細胞 (矢頭) 及び糸球体に PEPITEM 陽性像が得られた (図 15d-f)。図 15e は図 15d の拡大像である。

第 4 節 考察

慢性炎症病態においてのみ血管内皮細胞上に発現する受容体 CDH15 は、PEPITEM を介して S1P 産生を促すことによりリンパ球遊走を制御している

と考えられている。内因性の PEPITEM については関節リウマチや 1 型糖尿病、高齢者では減少していると報告されていることから (6)、慢性炎症病態における恒常性の維持に関与している機構と推察される (34-36)。今回の研究では内因性 PEPITEM 濃度を測定していないが、同様に慢性炎症病態を呈する SLE でも内因性 PEPITEM の低下に伴う PEPITEM/CDH15 axis の破綻がリンパ球浸潤の一因と仮説を立て、外因性 PEPITEM 投与による T リンパ球浸潤抑制効果を検証した。

PEPITEM 投与の結果臓器重量は腎臓、脾臓、腋窩リンパ節共に低値を示し、腎臓における FCA では腎単核球数の低下を確認した。SLE 患者の腎臓における DNT 細胞は IL-17 を産生するとする報告や (13)、in vitro において $CD3^+CD8^+$ T 細胞由来の DNT 細胞は IL-17 を始めとして、様々な炎症性サイトカインを産生することが報告されており (37)、今回の研究において DNT 細胞の比率の減少が起きたことは SLE の病態を考える上で興味深く、今後更なる検討が必要と思われる。腎炎の組織化学的な検討において T リンパ球のみに作用すると報告されていた PEPITEM 投与により F4/80 陽性細胞 (マクロファージ) まで低値であった。これはおそらく直接的な作用ではなく、T 細胞減少に伴う相互活性作用の減弱 (38, 39) が起きたものと思われる。

CDH15 の組織化学的な検討により週齢もしくは腎炎の進展と共に血管内皮細胞での発現が認められるようになった。このことはこれまで報告されていない。さらに標識 PEPITEM での染色でも血管内皮細胞に陽性像が得られた

ことから PEPITEM/CDH15 axis の意義は、炎症に対する生体の防御反応 1 つと捉えることができるかもしれない。

図 16 に想定される PEPITEM の腎臓への作用機序を示す。過去の報告 (6, 40-42) 及び、今回の研究結果を踏まえると PEPITEM が糸球体血管内皮細胞に発現した CDH15 を介して S1P を分泌させ、S1P 受容体を発現している近傍の T リンパ球に作用して、T リンパ球の血管外遊走が抑制されたと考えている。

SLE は腎炎だけでなく、皮疹や漿膜炎も起こすことが知られている。本研究では MRL/lpr マウスにおいて皮膚や腹膜の血管内皮細胞にも CDH15 の発現が認められた。このことは皮膚や腹膜においても PEPITEM により血管内皮細胞からの S1P 発現が誘導されリンパ球浸潤を抑制する可能性があるものと考えられた。PEPITEM が SLE による腎病変のみならず、全身的な病変の新たな治療法になりうるものと考えられた。

第 5 節 小括

MRL/lpr マウスに対して外因性に PEPITEM を投与することで以下の知見が得られた。

- 1) マウスにおける腎臓、脾臓及び腋窩リンパ節の重量が PEPITEM 群で低値だった。
- 2) 腎単核球数は PEPITEM 群で低値であり、DNT 細胞にお

いてはその存在比率も低値だった。3) 組織学的に糸球体におよび腎間質の炎症性細胞浸潤は軽減し、アルブミン尿も低値だった。4) PEPITEM の受容体である CDH15 は腎臓、皮膚及び腹膜の血管内皮細胞に発現していた。5) 短期間の投与ではあるが PEPITEM が MRL/lpr マウスにおけるリンパ球浸潤を抑え、ひいては腎炎の進展を抑制する可能性が示唆された。

第5章 MRL/lpr マウス及びループス腎炎における新たな治療標的の探索

第1節 目的

第3章及び第4章でリンパ球浸潤抑制の可能性をヒストンのアセチル化及びS1P制御の二つの観点から検討した。次に腎臓における炎症細胞浸潤が抑制されることで蛋白尿が抑制された機序について検討をした。一般的には炎症細胞の産生する炎症性サイトカインおよびケモカインによる直接的な糸球体構成細胞の傷害や免疫複合体沈着が、ポドサイト傷害の機序として想定されている。今回我々は微小変化群における再発時の PBMC 中で増加しているタンパク質の一つとして報告(43)された c-maf inducing protein (c-mip)に着目した。c-mipの作用機序を図17に示す。c-mipは糸球体におけるポドサイト足突起間に存在

するスリット膜の構成タンパク質の一つであるネフリンとチロシンキナーゼである Fyn との相互作用を阻害することでポドサイトのアクチン細胞骨格の破綻を招き蛋白尿を惹起させるとされており(44)、これまでのところ特発性の微小変化群、巣状分節性糸球体硬化症や膜性腎症で発現が報告されている(7, 45)。微小変化群を合併した Hodgkin リンパ腫でのみ Reed-Sternberg 細胞で c-mip が発現していたり(46)、ネフローゼ症候群を合併した肺小細胞癌の癌細胞でのみ発現がみられる(47)など、蛋白尿を惹起するだけでなく二次性腎疾患の発症にも関与している可能性が示唆されている蛋白質である。SLE における c-mip 発現の報告は少なく、今回 MRL/lpr マウスを用いて c-mip の病態への関与を検討した。

第2節 材料と方法

(1) 対象

4 週齢及び 22 週齢の雌の MRL/lpr マウス (SLC) を使用した。マウスの飼育は防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い SPF 環境下で通常のマウス資料及び自由飲水にて行った。

(2) 抗体

表 6 に使用した抗体を示す。

(3) *c-mip* in situ hybridization (ISH)

パラフィン切片を用いて以前報告されたプロトコルを参考に ISH を行った(46)。4 μ m 厚のパラフィン切片を脱パラ、親水化を行った後にクエン酸バッファー中で 98°C、40 分間加熱した。0.2N hydrochloric acid 中で室温、20 分間処理後、37°C の 2 \times standard saline citrate (SSC) 中に 10 分間漬けた。PBS で洗浄後 10mg/50% グリセリン ml の proteinase K を 1000 倍希釈で 37°C、10 分間反応させた。4%PFA / PBS で再固定した後に 0.2% グリシン、次いで 0.1M トリエタノールアミン 20ml と無水酢酸 50 μ l を混じた溶液中で 10 分間反応させた。洗浄後 95% エタノールで脱水、風乾を行った。乾燥した切片に anti sense probe または sense probe を乗せ 37°C で一晩反応させた。65°C の 2 \times SSC で 15 分間洗浄を 3 回行い、alkaline phosphatase 標識抗 digoxigenin 抗体 (Fab fragment) (Roche Diagnostics、Penzberg、Germany) を反応させた。

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate / nitroblue tetrazolium で発色を行った。*c-mip* リボプローブはフランス国立医学研究所 Prof. Sahali のご厚意によりご提供いただいたものを使用した。anti sense probe は T7RNA ポリメラーゼを用いて *SaII* で消化して合成した。Sense probe は Sp6 RNA ポリメラーゼを用いて *SacII* で消化した合成した。

(4) 免疫組織化学

4 μ m 厚のパラフィン切片を脱パラフィン後、流水で親水化してクエン酸バッファーまたは EDTA バッファー中での加熱処理で抗原賦活化を行った。非特異的結合を防ぐためにブロックエース (DS-Pharma Biomedical) を室温で 30 分反応させたのちに各種 1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。Peroxidase Blocking Solution (DAKO) を室温で 10 分反応させて内因性ペルオキシダーゼを失活させた後に二次抗体を室温で 30 分反応させた。DAB で発色後鏡検もしくは蛍光顕微鏡で切片を観察した。

(5) 糸球体単離

第 4 章第 2 節(8)で記載した方法と同様。

(6) Western blotting

第 4 章第 2 節(9)で記載した方法と同様。

第 3 節 結果

(1) MRL/lpr マウス及びブルーパス腎炎における *c-mip* mRNA と c-mip 蛋白発現の組織学的検討

ISH では糸球体ポドサイト及び浸潤リンパ球の一部に陽性像を認めた(図

18a, b)。sense probe では陽性像は認めなかった(図 18c)。免疫組織学的には同様に糸球体ポドサイト及び浸潤リンパ球の一部に陽性像を認めた(図 18d, e)が、腎炎発症前の 4 週齢のマウスの腎臓では陽性像は認めなかった(図 18f)。

(2) ネフリン 1217 番のチロシン残基のリン酸化(p-ネフリン^{Y1217})の発現状態の検討

パラフィン切片を用いた蛍光染色と単離した糸球体を用いた Western blotting による相対定量を行った。MRL/lpr マウスは週齢をマッチさせた MRL/+マウスに比し、ネフリンの染色像は血管壁に断片的に陽性であり(図 19a)、Western blotting においても発現量が低かった(図 19b)。MRL/lpr マウスにおける p-ネフリン^{Y1217} については糸球体係蹄壁に陽性像は認められず、western blotting でも検出できなかった(図 19b)。

(3) バルプロ酸投与後及び PEPITEM 投与後における糸球体における c-mip 蛋白発現状態の検討

パラフィン切片を用いた免疫組織化学染色ではバルプロ酸投与後、PEPITEM 投与後両者ともに糸球体における c-mip 陽性像は認めなった(図 20a, b)。

第4節 考察

ループ腎炎における蛋白尿に *c-mip* の関与は現在まで報告されてない。

我々は 22 週齢の *MRL/lpr* マウスの糸球体ポドサイトで *c-mip* mRNA と *c-mip* 蛋白の発現を確認し、*c-mip* 蛋白の発現はバルプロ酸や PEPITEM 投与により糸球体での IHC 発現が減弱した。また、ポドサイトのネフリンは IHC で *wild type* の糸球体にびまん性に染色されるのに比較し、*MRL/lpr* マウス糸球体に陽性部位の断片化がみられ、*MRL/lpr* マウスでリン酸化ネフリンは IHC で発現はみられず、Western blotting でも *wild type* と比較し減弱していた。これまでの報告で *c-mip* はポドサイトのスリット膜構成蛋白であるネフリンとチロシンキナーゼの相互作用を阻害し、ネフリンのリン酸化を減少させることによりアクチン細胞骨格を破綻させ、蛋白尿を惹起させるといわれ(48)、特発性の微小変化群、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症で同様の機序で起こっていると考えられている。今回の我々の結果もバルプロ酸や PEPITEM 投与による *c-mip* 蛋白の発現減少がみられること、22 週齢の *MRL/lpr* マウス糸球体でリン酸化ネフリンは IHC や Western blotting で減弱していたことから考え、これまで考えられている機序により蛋白尿が発生していた可能性が推測される。

バルプロ酸及び PEPITEM 投与での *c-mip* 減少について想定した機序を図 21 に示す。ポドサイトにおける *c-mip* は WT1 により発現が制御(抑制)されていると報告されており(49)、本来 WT1 により抑制されていた *c-mip* が炎症細胞

浸潤に伴うポドサイト障害により WT1 発現量が減少することで、抑制性の制御がなくなりポドサイトに蓄積していくと考えられた。その結果ネフリンの減少を起こし蛋白尿を惹起するものと考えられた。HDAC はオートファジーを介したポドサイト障害に関与しているとする報告もあり (50)、バルプロ酸投与前後で糸球体及びポドサイトの HDAC 活性に変化が見られたことから、ヒストン脱アセチル化も関与している可能性もあり今後更なる検討が必要と思われた。炎症細胞浸潤の抑制は WT1 保護を介して間接的に c-mip 発現を抑制していることが示唆された。

第 5 節 小括

MRL/lpr マウスのポドサイトに c-mip 発現を認めた。炎症細胞浸潤の抑制は従来考えられていた炎症性サイトカインなどによる細胞傷害の軽減以外の、多面的な腎保護効果をもたらす可能性が示された。

第6章 統括的考察

本研究ではループス腎炎における T リンパ球浸潤を抑制することを目的とした新たな治療ターゲットの探索を lupus prone mouse である MRL/lpr マウスを用いて行った。また併せてネフリンを標的として蛋白尿を惹起する c-mip の発現状態を検討した。

始めに MRL/lpr マウスの腎糸球体及び腎間質に浸潤するリンパ球のポピュレーションを検索した。MRL/lpr マウスにおいて末梢血、脾臓、リンパ節の解析では最も多いポピュレーションは $CD3^+CD4^+$ T 細胞で、 $CD3^+CD4^+CD8^+$ T 細胞 (DNT 細胞) が次にみられることが指摘されており、我々の結果はこれを追認するものであった。DNT 細胞はループス腎炎において増加し、IL-17 を初めとするサイトカインを産生し腎障害の発症に寄与しているといわれている。これら腎に浸潤するリンパ球を抑えることは臓器局所での炎症性サイトカインの抑制に繋がるものであると考えられる。

そこで腎のリンパ球浸潤抑制における新たな治療標的として、2つを取り上げた。1点目はエピゲノム修飾の一つであるヒストン脱アセチル化を制御することによって腎症進展抑制効果を検索した。エピゲノム修飾の一つである DNA メチル化は SLE において低下していることが報告されている。ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の阻害剤を使用した実験では、MRL/lpr マウスで多臓器腫大が抑制されたこと、アドリマイシン誘導腎症に対して糸球体の

アセチル化の減少を抑制し、糸球体アポトーシスを抑制したことが報告されている。今回の我々の実験で、HDAC の阻害薬は HDAC 活性の低下、それに伴う腎間質でのリンパ球のアセチル化とポドサイトのアセチル化の増加を誘導し、その結果として糸球体への T リンパ球浸潤の減少、IgG の糸球体への沈着減少、ポドサイトのネフリンの増加をもたらし、尿所見の改善に寄与したと考察できる。今回の実験で使用したバルプロ酸は臨床的に抗てんかん薬として使用されているものであり、長期間の投与が可能で、臨床応用が期待できる。

2 点目は T リンパ球の血管外への遊走を抑制する S1P を中心とした PEPITEM /CDH15 axis を取り上げた。血管内皮細胞から産生されるスフィンゴ脂質由来脂質メディエーターの S1P は、T リンパ球に発現している S1P 受容体に結合し、血管外への T リンパ球の遊走を抑制する。S1P の産生に関しては、内因性ペプチドである PEPITEM が持続する炎症時に出現する血管内皮細胞受容体 CDH15 と結合し、血管内皮細胞に S1P を産生させる。今回の結果は、外因性の PEPITEM であっても、腎糸球体において慢性炎症病態で発現している血管内皮細胞受容体 CDH15 と結合でき、それを介して S1P の産生、T リンパ球の血管外への遊走の制御と繋がったと解釈される。この抑制機序は慢性炎症に対する生体防御反応の 1 つと捉えることができる。また、今回外因性 PEPITEM の投与によって腎単核球の数的減少と DNT 細胞の比率の減少が認められた。前述のごとく、DNT 細胞の減少により、炎症性サイトカインの産生が抑制されることが期待され、腎機能改善に繋がる。今回、MRL/lpr マウスの皮膚や腹膜

の血管内皮細胞にも同様に CDH15 の発現が認められ、外因性 PEPITEM の投与によっても皮膚や腹膜の局所でも抑制作用が惹起されると思われ、SLE の皮膚や腹膜の炎症状態改善においても臨床応用が可能と考えられた。

最後に蛋白尿の発症機序に主な役割を果たす c-mip に関して検索することにより、ポドサイトのスリット膜構成蛋白であるネフリンとの関係を検索した。我々の実験では 22 週齢の MRL/lpr マウスの糸球体には T リンパ球浸潤が認められており、ポドサイトで *c-mip* mRNA と c-mip 蛋白の発現がみられ、バルプロ酸や PEPITEM 投与により糸球体での c-mip 蛋白の発現が抑制された。ポドサイトのネフリンは IHC や Western blotting で wild type の糸球体より発現が減弱していることが認められた。これまでの報告で c-mip はポドサイトのネフリンとチロシンキナーゼの相互作用を阻害し、ネフリンのリン酸化を抑制させることでアクチン細胞骨格を破綻させ、蛋白尿を惹起させるといわれており、我々の実験でもこの機序に関わり、蛋白尿を起こした可能性が窺われる。さらにバルプロ酸や PEPITEM 投与で糸球体での c-mip 蛋白の発現が抑制されたことにより、ネフリンのリン酸化に関して実験を行っていないが、蛋白尿の改善をもたらすものと考えている。

我々はバルプロ酸や PEPITEM 投与により MRL/lpr マウスの尿蛋白の改善が期待でき、SLE の臨床応用の可能性が窺われた。また、ポドサイト局所の抑制機序に関しても考察できた。

第7章 結論

1. MRL/lpr マウスにおける腎単核球のポピュレーションにおいて、double negative T ($CD3^+CD4^-CD8^-$)細胞は helper T ($CD3^+CD4^+$)細胞に次いで多い細胞集団であることが分かった。IL-17 産生の報告も踏まえるとループス腎炎の病態に関与している可能性が示唆された。
2. MRL/lpr マウスの腎臓における HDAC 活性は、MRL/+マウスより有意に高値だったことから、ヒストンの脱アセチル化がループス腎炎の病態に関与している可能性が示された。また選択的 HDAC 阻害薬であるバルプロ酸の投与により MRL/lpr マウスにおける多臓器腫大や腎症が軽減したことから新たな治療標的になる可能性が示唆された。
3. PEPITEM 投与によるリンパ球浸潤、多臓器腫大に対する抑制効果を示すことができた。内因性 S1P を増加させる新たな治療法になる可能性が示唆された。受容体である CDH15 が血管内皮細胞で発現していることを in vivo で初めて示すことができた。またその発現分布から SLE の罹患部位には概ね発現しており、PEPITEM の SLE に対する全身的な治療効果が期待されるものと思われた。

4. MRL/lpr マウスにおいても c-mip の発現が確認された。ループス腎炎における蛋白尿発症機序の解明の一助になるものと思われた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、ご校閲を賜りました防衛医科大学校腎臓内分泌内科教授 熊谷裕生博士に感謝申し上げます。

本研究に際し貴重な御助言、ご協力を賜りました大島直紀准教授をはじめとする防衛医科大学校腎臓内分泌内科学教室の諸先生方並びに秘書の菰田啓子様に深く感謝の意を表します。

糸球体単離方法について詳細に技術指導をしてくださいました新潟大学大学院医歯学総合研究科腎臓構造病理学分野准教授 矢尾板永信博士に深く感謝の意を表します。

DPPC liposome をご提供くださった東海大学工学部生命化学科准教授 清水佳隆博士に深く感謝の意を表します。

ペプチドの取り扱い及び drug delivery system についての知見について御助言をくださった山上和夫博士に深く感謝の意を表します。

c-mip リボプローブをご提供くださったフランス国立医学研究所 Djillali Sahali 教授に深く感謝の意を表します。

本研究の主旨は第 59 回日本腎臓学会総会(2016 年、横浜)、第 60 回日本腎臓学会総会(2017 年、仙台)、第 61 回日本腎臓学会総会(2018 年、新潟)において発表した。

引用文献

1. Parikh SV, Rovin BH. Current and emerging therapies for lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(10):2929-39.
2. Davidson A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(3):143-53.
3. Rottman JB, Willis CR. Mouse models of systemic lupus erythematosus reveal a complex pathogenesis. *Vet Pathol*. 2010;47(4):664-76.
4. Jeffries MA, Sawalha AH. Epigenetics in systemic lupus erythematosus: leading the way for specific therapeutic agents. *Int J Clin Rheumatol*. 2011;6(4):423-39.
5. Garcia BA, Busby SA, Shabanowitz J, Hunt DF, Mishra N. Resetting the epigenetic histone code in the MRL-lpr/lpr mouse model of lupus by histone deacetylase inhibition. *J Proteome Res*. 2005;4(6):2032-42.
6. Chimen M, McGettrick HM, Apta B, Kuravi SJ, Yates CM, Kennedy A, et al. Homeostatic regulation of T cell trafficking by a B cell-derived peptide is impaired in autoimmune and chronic inflammatory disease. *Nat Med*. 2015;21(5):467-75.
7. Zhang SY, Kamal M, Dahan K, Pawlak A, Ory V, Desvaux D, et al. C-mip impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria. *Sci signal*. 2010;3(122):ra39.

8. Turner JE, Becker M, Mittrucker HW, Panzer U. Tissue-resident lymphocytes in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(2):389-99.
9. Fan X, Rudensky AY. Hallmarks of tissue-resident lymphocytes. *Cell*. 2016;164(6):1198-211.
10. Mackay LK, Kallies A. Transcriptional regulation of tissue-resident lymphocytes. *Trends Immunol*. 2017;38(2):94-103.
11. Dowdell KC, Pesnicak L, Hoffmann V, Steadman K, Remaley AT, Cohen JL, et al. Valproic acid (VPA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, diminishes lymphoproliferation in the Fas deficient MRL/lpr^{-/-} murine model of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Exp Hematol*. 2009;37(4):487-94.
12. Ascon DB, Ascon M, Satpute S, Lopez-Briones S, Racusen L, Colvin RB, et al. Normal mouse kidneys contain activated and CD3⁺CD4⁻CD8⁻ double-negative T lymphocytes with a distinct TCR repertoire. *J Leukoc Biol*. 2008;84(6):1400-9.
13. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol*. 2008;181(12):8761-6.
14. Martina MN, Bandapalle S, Rabb H, Hamad AR. Isolation of double negative $\alpha\beta$ T cells from the kidney. *J Vis Exp*. 2014(87):51192.
15. Krebs CF, Schmidt T, Riedel J-H, Panzer U. T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13:647.

16. Martina MN, Noel S, Saxena A, Bandapalle S, Majithia R, Jie C, et al. Double-negative $\alpha\beta$ T cells are early responders to AKI and are found in human kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(4):1113-23.
17. Martina MN, Noel S, Saxena A, Rabb H, Hamad ARA. Double negative (DN) $\alpha\beta$ T cells: misperception and overdue recognition. *Immunol Cell Biol*. 2015;93(3):305-10.
18. Tshilela KA, Ikeuchi H, Matsumoto T, Kuroiwa T, Sakurai N, Sakairi T, et al. Glomerular cytokine expression in murine lupus nephritis. *Clin Exp Nephrol*. 2016;20(1):23-9.
19. Van Beneden K, Geers C, Pauwels M, Mannaerts I, Verbeelen D, van Grunsven LA, et al. Valproic acid attenuates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(10):1863-75.
20. Sanden SK, Wiggins JE, Goyal M, Riggs LK, Wiggins RC. Evaluation of a thick and thin section method for estimation of podocyte number, glomerular volume, and glomerular volume per podocyte in rat kidney with Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte nuclear marker. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2484-93.
21. Chen X, Wong P, Radany E, Wong JYC. HDAC inhibitor, valproic acid, induces p53-dependent radiosensitization of colon cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm*. 2009;24(6):689-99.
22. Paradis FH, Hales BF. Valproic acid Induces the hyperacetylation of p53,

- expression of p53 target genes, and markers of the intrinsic apoptotic pathway in midorganogenesis murine limbs. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2015;104(5):177-83.
23. Swan DJ, Kirby JA, Ali S. Vascular biology: the role of sphingosine 1-phosphate in both the resting state and inflammation. *J Cell Mol Med.* 2010;14(9):2211-22.
24. Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, Ahn MY, Peterson MS, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem.* 2004;279(14):13839-48.
25. Ledgerwood LG, Lal G, Zhang N, Garin A, Esses SJ, Ginhoux F, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics. *Nat Immunol.* 2008;9(1):42-53.
26. Okazaki H, Hirata D, Kamimura T, Sato H, Iwamoto M, Yoshio T, et al. Effects of FTY720 in MRL-lpr/lpr mice: therapeutic potential in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002;29(4):707-16.
27. Suzuki S, Li XK, Shinomiya T, Enosawa S, Amemiya H, Amari M, et al. The in vivo induction of lymphocyte apoptosis in MRL-lpr/lpr mice treated with FTY720. *Clin Exp Immunol.* 1997;107(1):103-11.
28. Wenderfer SE, Stepkowski SM, Braun MC. Increased survival and reduced

renal injury in MRL/lpr mice treated with a novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist. *Kidney Int.* 2008;74(10):1319-26.

29. Chun J, Hartung HP. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 2010;33(2):91-101.

30. Candido K, Soufi H, Bandyopadhyay M, Dasgupta S. Therapeutic impact of sphingosine 1-phosphate receptor signaling in multiple sclerosis. *Mini Rev Med Chem.* 2016;16(7):547-54.

31. Yamakami K, Tsumori H, Sakurai Y, Shimizu Y, Nagatoshi K, Sonomoto K. Sustainable inhibition efficacy of liposome-encapsulated nisin on insoluble glucan-biofilm synthesis by *Streptococcus mutans*. *Pharm Biol.* 2013;51(2):267-70.

32. Kikuchi H, Suzuki N, Ebihara K, Morita H, Ishii Y, Kikuchi A, et al. Gene delivery using liposome technology. *J Control Release.* 1999;62(1-2):269-77.

33. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y, et al. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol.* 2002;161(3):799-805.

34. Lai WQ, Irwan AW, Goh HH, Howe HS, Yu DT, Valle-Onate R, et al. Anti-inflammatory effects of sphingosine kinase modulation in inflammatory arthritis. *J Immunol.* 2008;181(11):8010-7.

35. Tsai HC, Han MH. Sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P signaling pathway: therapeutic targets in autoimmunity and inflammation. *Drugs.*

2016;76(11):1067-79.

36. Suárez-Fueyo A, Bradley SJ, Klatzmann D, Tsokos GC. T cells and autoimmune kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13:329-43.

37. Crispín JC, Tsokos GC. Human TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) T cells can derive from CD8(+) T cells and display an inflammatory effector phenotype.

J Immunol. 2009;183(7):4675-81.

38. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.

39. Swain SL, Dutton RW. Consequences of the direct interaction of helper T cells with B cells presenting antigen. *Immunol Rev.* 1987;99(1):263-80.

40. Kugelberg E. T cell responses: B cells control T cell traffic. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(6):332-3.

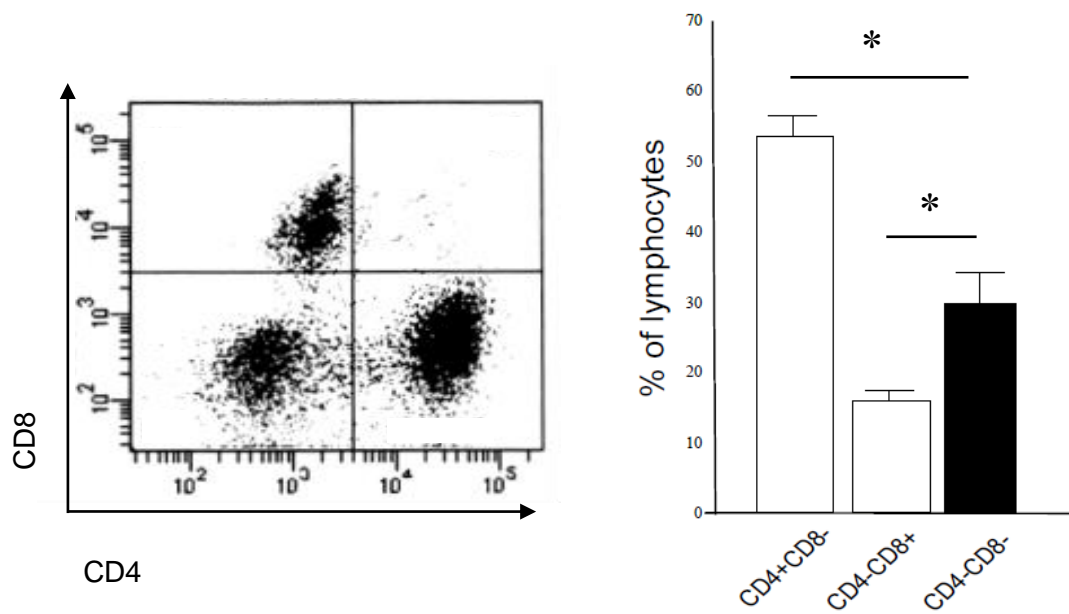
41. Allende ML, Tuymetova G, Lee BG, Bonifacino E, Wu YP, Proia RL. S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J Exp Med.* 2010;207(5):1113-24.

42. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature.* 2004;427(6972):355-60.

43. Grimbert P, Valanciute A, Audard V, Pawlak A, Le gouvelo S, Lang P, et al. Truncation of c-mip (Tc-mip), a new proximal signaling protein, induces c-maf Th2

- transcription factor and cytoskeleton reorganization. *J Exp Med.* 2003;198(5):797-807.
44. Sahali D, Sendeyo K, Mangier M, Audard V, Zhang SY, Lang P, et al. Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome with relapse. *Semin Immunopathol.* 2014;36(4):421-9.
45. Sendeyo K, Audard V, Zhang SY, Fan Q, Bouachi K, Ollero M, et al. Upregulation of c-mip is closely related to podocyte dysfunction in membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2013;83(3):414-25.
46. Audard V, Zhang S-Y, Copie-Bergman C, Rucker-Martin C, Ory V, Candelier M, et al. Occurrence of minimal change nephrotic syndrome in classical Hodgkin lymphoma is closely related to the induction of c-mip in Hodgkin-Reed Sternberg cells and podocytes. *Blood.* 2010;115(18):3756-62.
47. Bouatou Y, Koessler T, Oniszczyk J, Zhang SY, Moll S, Audard V, et al. Nephrotic syndrome in small cell lung cancer and induction of c-mip in podocytes. *Am J Kidney Dis.* 2017;69(3):477-80.
48. New LA, Martin CE, Scott RP, Platt MJ, Keyvani Chahi A, Stringer CD, et al. Nephritin tyrosine phosphorylation is required to stabilize and restore podocyte foot process architecture. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(8):2422-35.
49. Moktefi A, Zhang SY, Vachin P, Ory V, Henique C, Audard V, et al. Repression of CMIP transcription by WT1 is relevant to podocyte health. *Kidney Int.* 2016;90(6):1298-311.

50. Wei Q, Dong Z. HDAC4 blocks autophagy to trigger podocyte injury: non-epigenetic action in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2014;86(4):666-8



【第2章の結果】

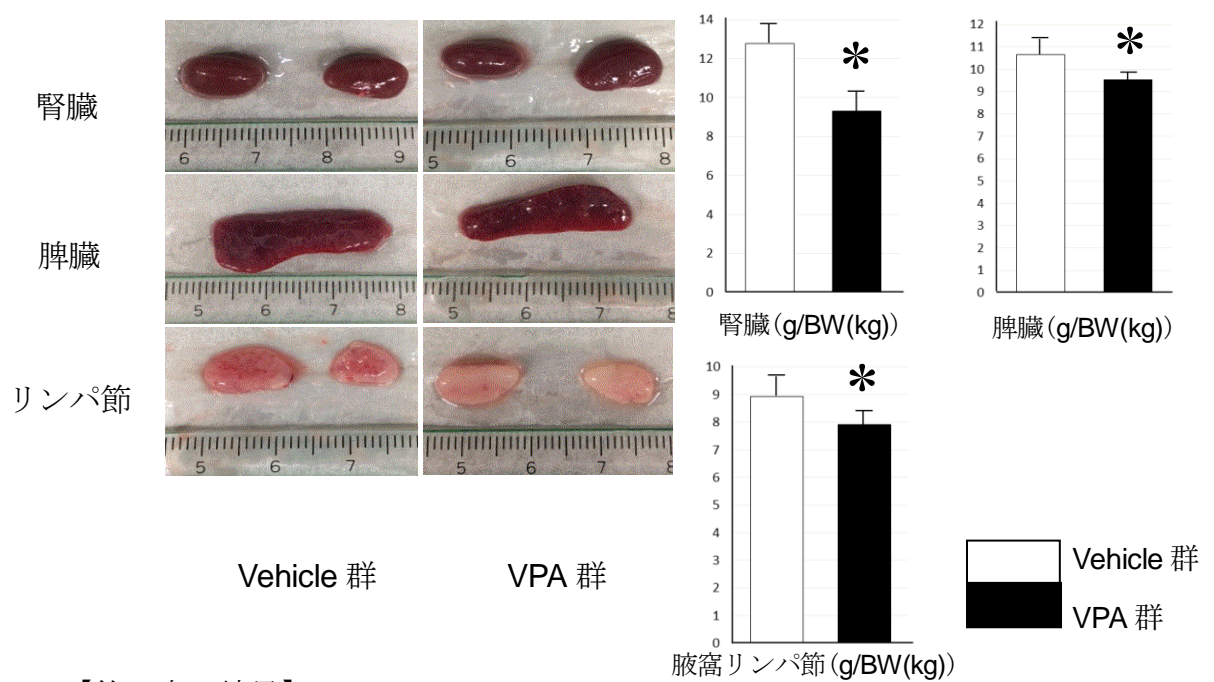
図1. MRL/lpr マウスの腎単核球における flow cytometry analysis (FCA)

22 週齢の MRL/lpr マウスから分取した腎単核球を用いて FCA を行った。

全 T リンパ球における double negative T 細胞 ($CD3^{+}CD4^{-}CD8^{-}$) の比率は helper T 細胞 ($CD3^{+}CD4^{+}CD8^{-}$) に次ぐ細胞集団だった。

各データは平均値±標準偏差で表した(各群 n = 5)。

*P < 0.05



【第3章の結果】

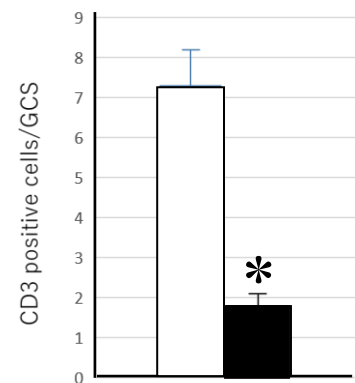
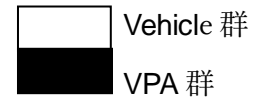
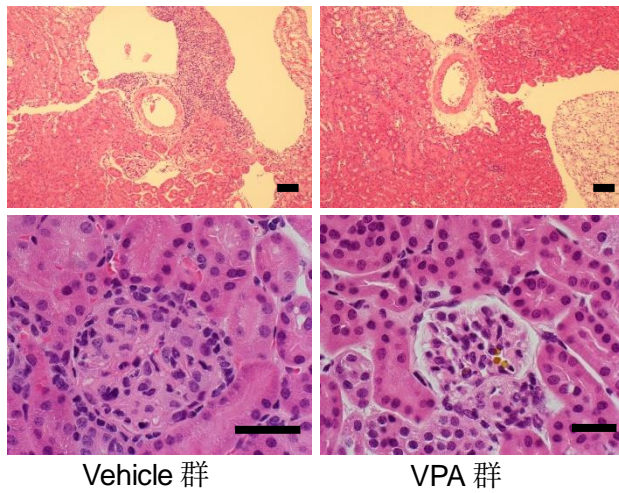
図 2. VPA の多臓器腫大に対する効果

20 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓、脾臓及び腋窩リンパ節重量はいずれも VPA 群で vehicle 群に比し有意に低値だった。

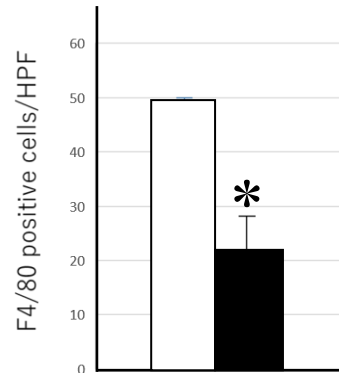
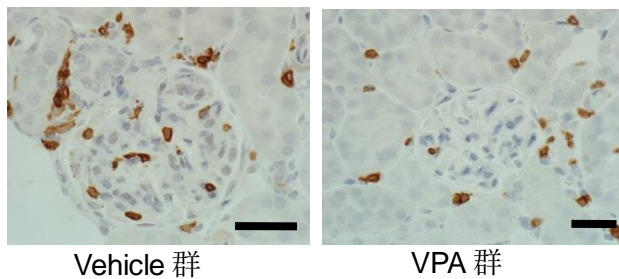
各データは平均値±標準偏差で表した (各群 n = 5)。

*P < 0.05 vs. vehicle

a.



b.



c.

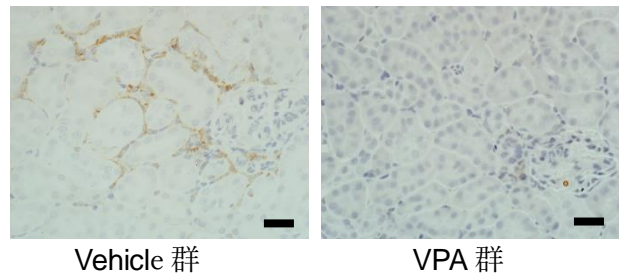


図 3. 腎炎に対する VPA の効果の組織学的検討

- a. HE 染色による腎間質への炎症性細胞浸潤の程度及び糸球体の観察。VPA 群において間質の炎症細胞浸潤は目立たず、糸球体係蹄腔も保たれていた。
- b. 糸球体あたりの CD3 陽性細胞数は、VPA 群で有意に低値だった。
- c. 腎臓間質の強拡大像における F4/80 陽性細胞数の比較。VPA 群で有意に低値だった。結果は平均値±標準偏差で表した。* $P < 0.05$ 、bar = 40 μ m

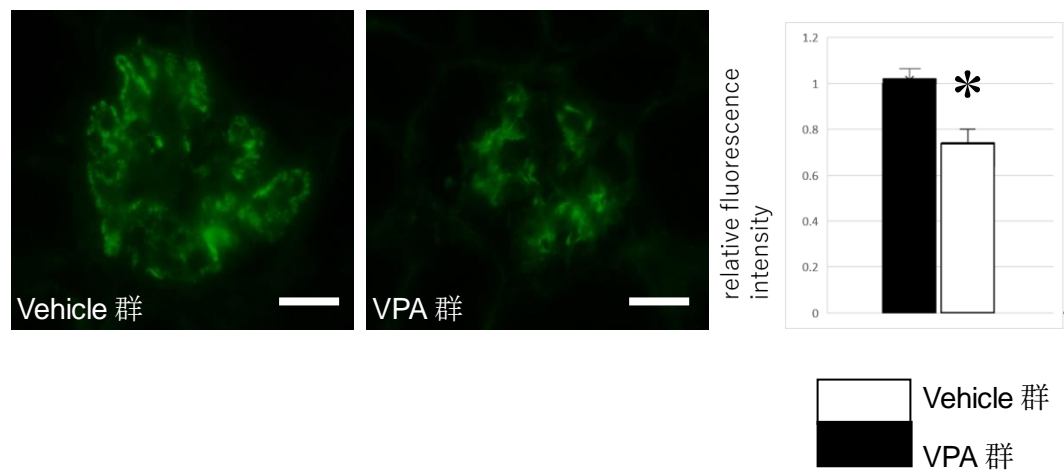
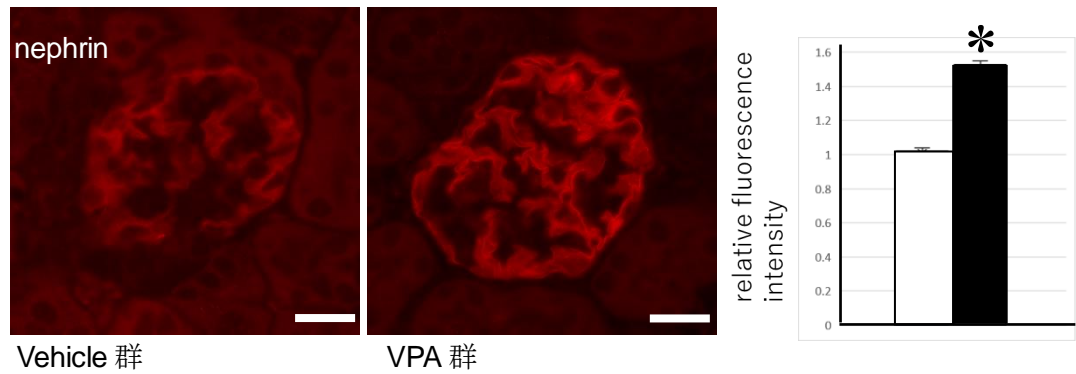


図 4. 糸球体における IgG 沈着の評価

糸球体あたりの IgG 沈着の程度を相対蛍光強度で比較したところ、VPA 群で有意に低値だった。

結果は平均値±標準偏差で表した。* $P < 0.05$ 、bar = 40 μ m

a.



b.

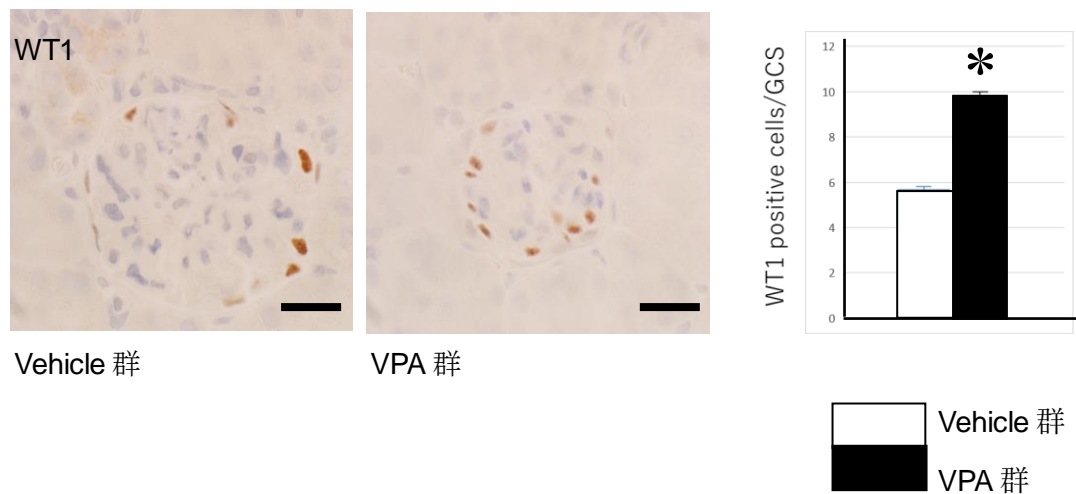


図 5. VPA のポドサイトに対する効果の検討

a. 糸球体あたりのネフリンの相対蛍光強度は VPA 群で有意に高値だった。

b. 糸球体あたりの WT1 陽性細胞数は VPA 群で有意に高値だった。

結果は平均値±標準偏差で表した。* $P < 0.05$ 、bar = 40 μ m

ネフリン; スリット膜を構成するタンパク質

Wilms' tumor 1 (WT1); ポドサイトのマーカー

GCS; glomerular cross section

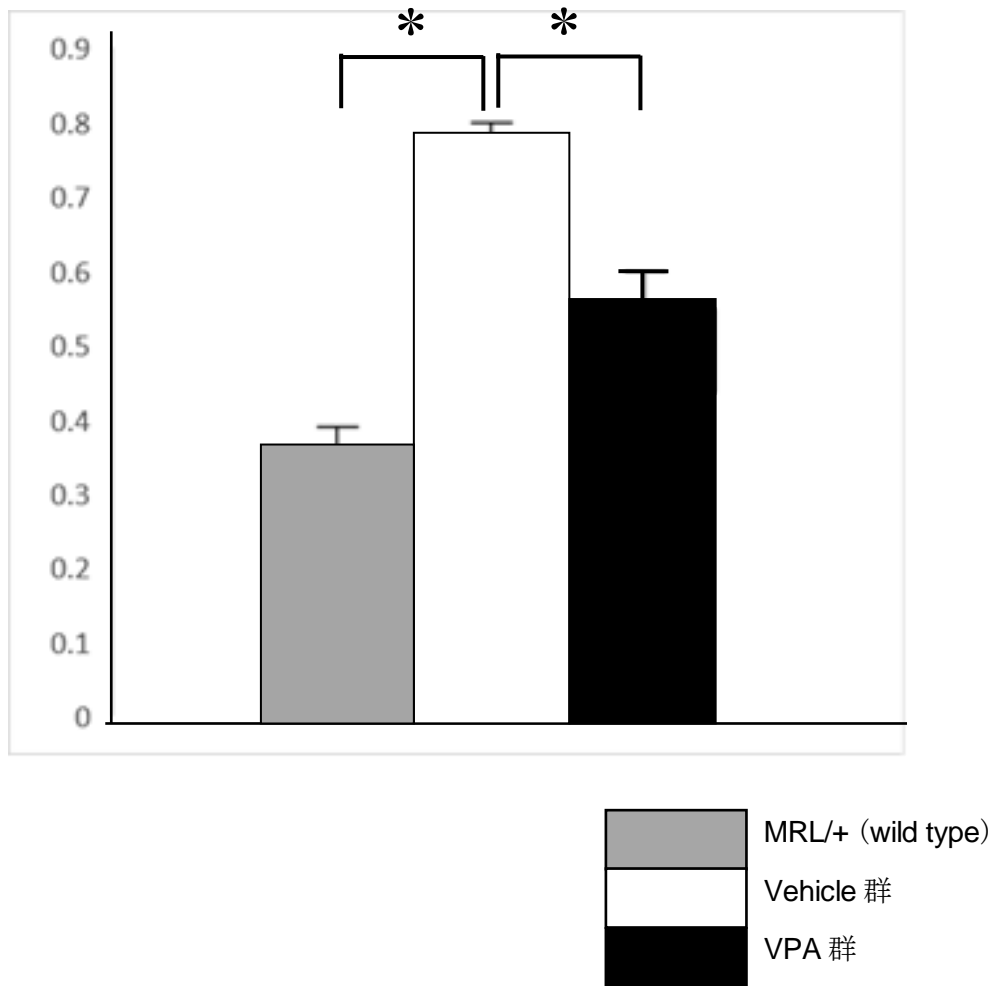


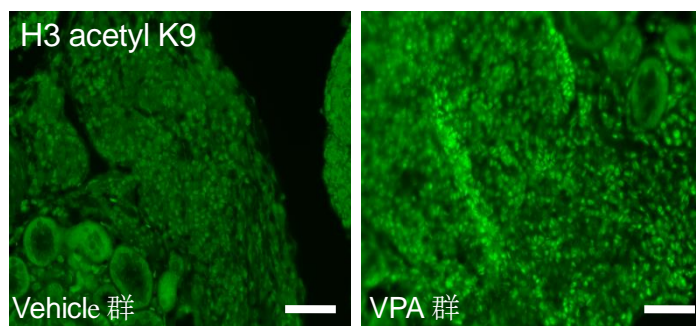
図 6. 腎皮質における histone deacetylase (HDAC)活性の比較

Vehicle 群の HDAC 活性はコントロールマウスの MRL/+マウスより有意に高値だった。VPA 群の HDAC 活性は vehicle 群より有意に低値だった。

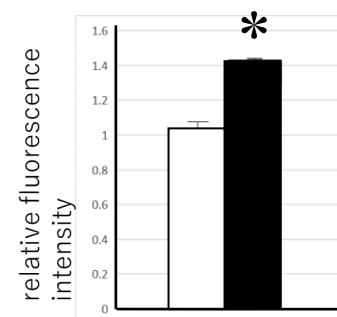
結果は平均値±標準偏差で表した。* $P < 0.05$

图 7.

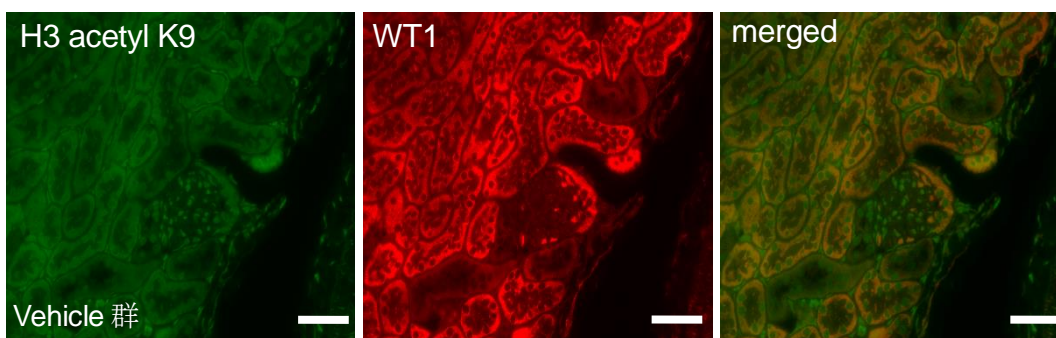
a.



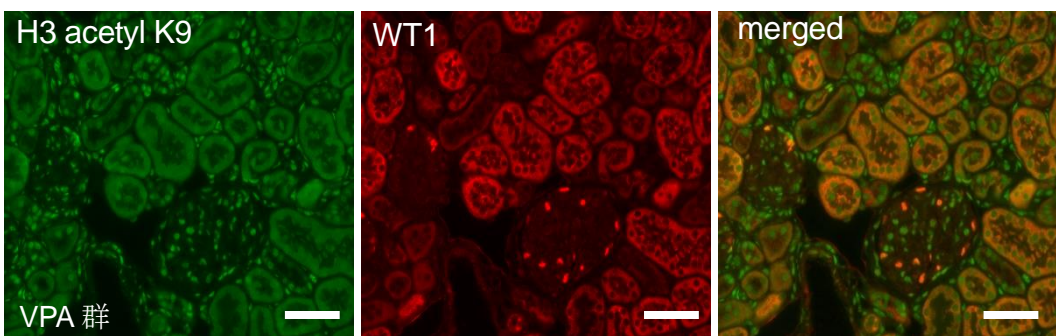
b.



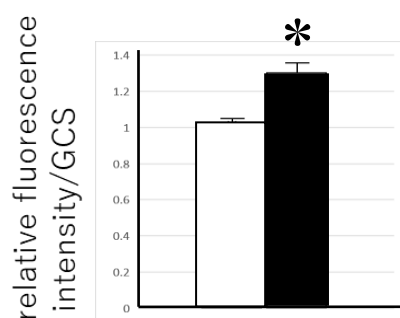
c.



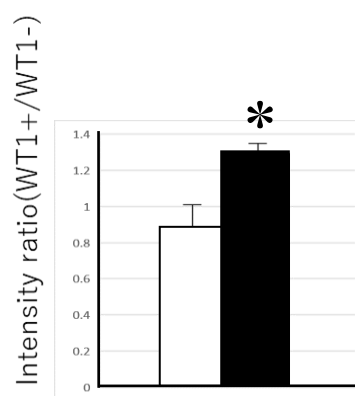
d.



e.



f.



Vehicle 群
VPA 群

マウスの腎臓におけるヒストン H3 の 9 番目のアミノ酸リジン

(H3K9) のアセチル化の免疫組織学的検討

a. 間質の強拡大像における浸潤リンパ球の H3K9 のアセチル化 (H3 acetyl K9) を相対蛍光強度で比較した。

b. 浸潤リンパ球の H3 acetyl K9 の程度は VPA 群で有意に高値だった。

c,d. 糸球体あたりの H3 acetyl K9 の相対蛍光強度を比較した。

e. 糸球体あたりの H3 acetyl K9 の程度 (相対蛍光強度) は VPA 群で有意に高値だった。

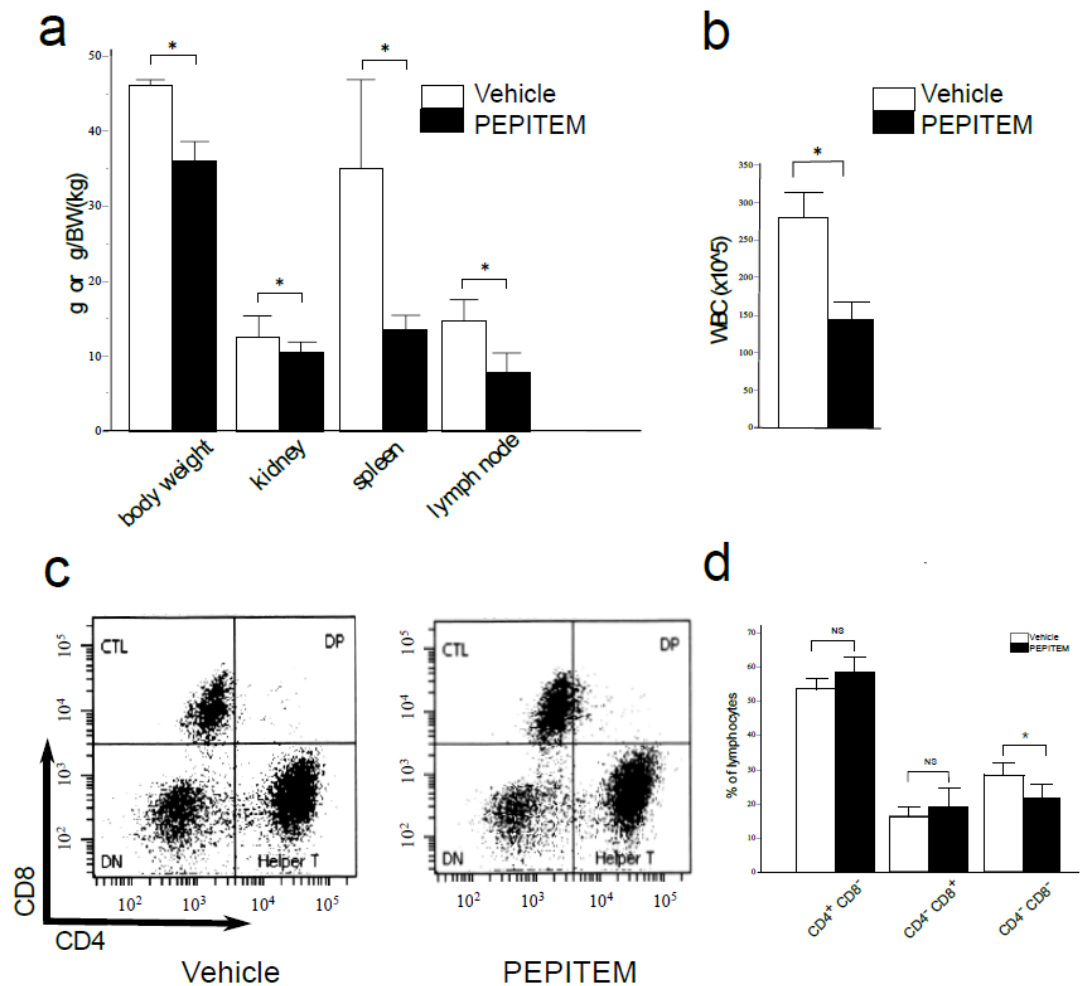
c,d. ポドサイトの H3 acetyl K9 の程度を相対蛍光強度で比較した。WT1 (赤) と H3 acetyl K9 (緑) の免疫蛍光二重染色を行い以下の式を用いて算出した。

WT1 陽性細胞の相対蛍光強度 / 非 WT1 陽性細胞の蛍光強度

f. ポドサイトの H3 acetyl K9 の程度 (相対蛍光強度) は VPA 群で有意に高値だった。

結果は平均値 ± 標準偏差で表した。* $P < 0.05$ 、bar = 40 μm

GCS; glomerular cross section



【第4章の結果】

図 8. PEPITEM のリンパ球浸潤抑制効果の検討

a. 腎臓、脾臓、腋窩リンパ節の重量を比較した。臓器重量は体重あたりの重量(g/kg)で表記した。体重及び腎臓、脾臓、腋窩リンパ節の重量は PEPITEM 群で有意に低値だった。

b. 腎単核球における白血球数を比較した。PEPITEM 群で有意に低値だった。

c,d. FCA による腎単核球中の T リンパ球のポピュレーションを検討した。

Helper T 細胞 (CD3⁺CD4⁺CD8⁻) と cytotoxic T 細胞 (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) の比率に各群間で差は認めなかった。しかし double negative T 細胞 (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) の比率は、PEPITEM 群で vehicle 群より有意に低値だった。結果は平均値±標準偏差で表した。* P < 0.05、各群 n = 5。

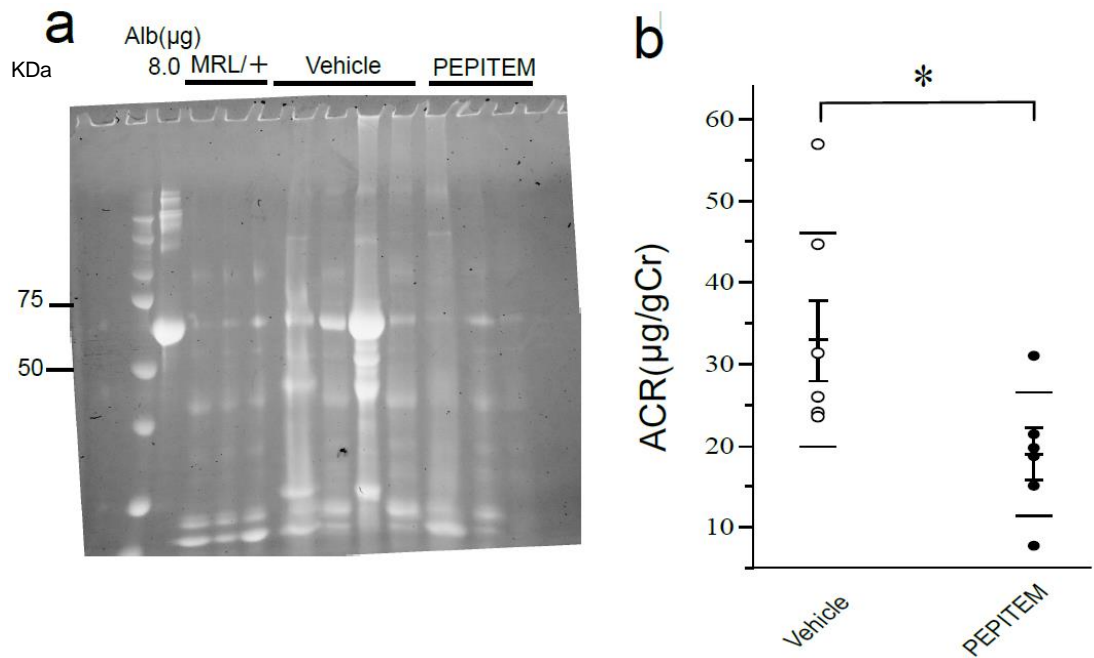


図 9. 尿蛋白に対する PEPITEM の効果の検討

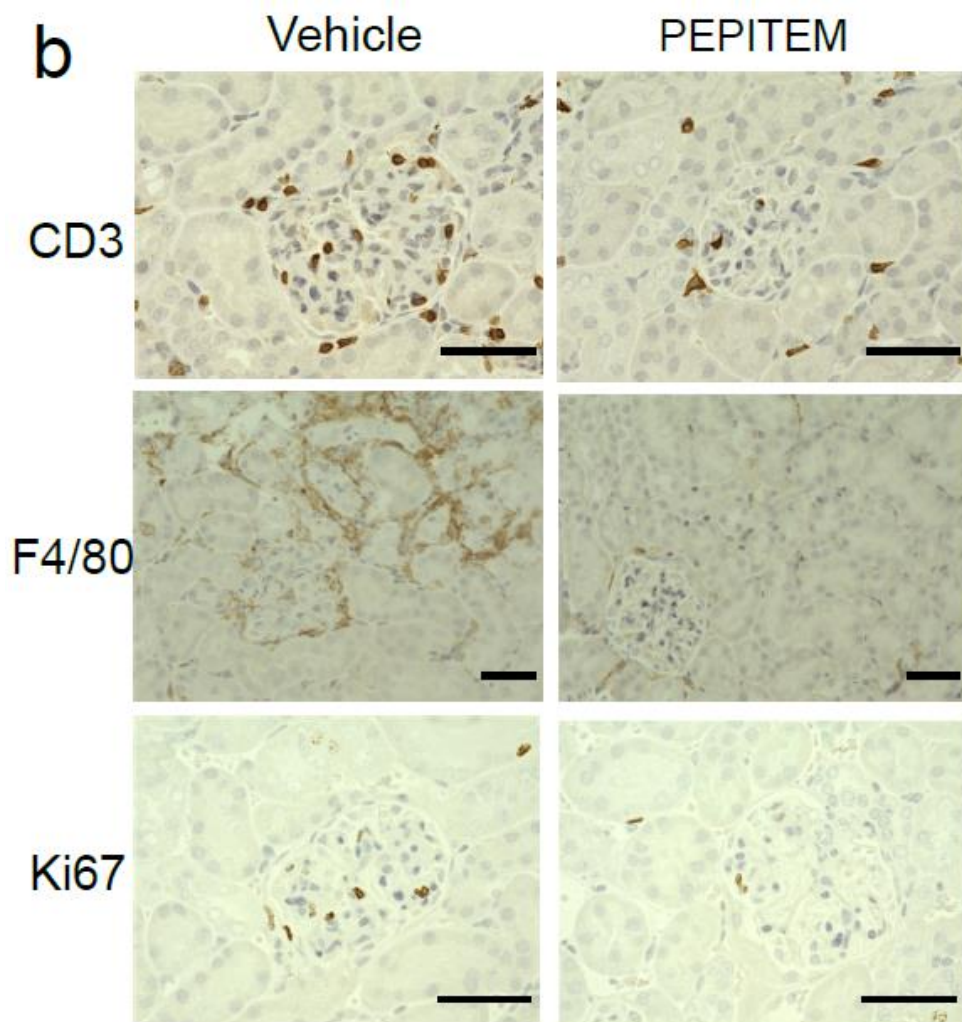
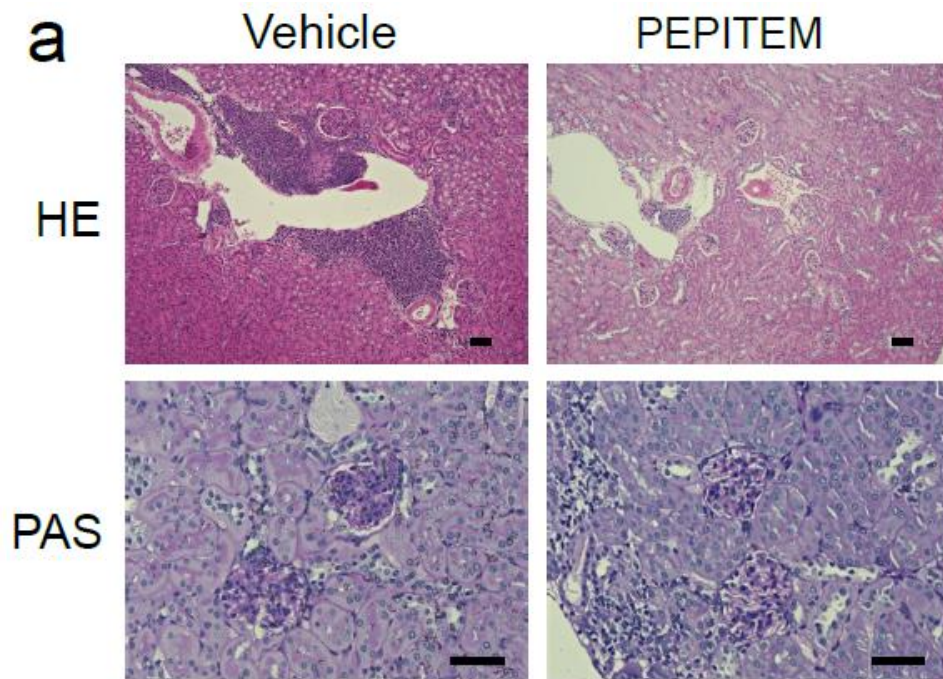
a. MRL/+マウス (n = 3)、MRL/lpr マウスの vehicle 群 (n = 4)、MRL/lpr マウスの PEPITEM 群 (n = 4)の尿を用いて電気泳動を行った。standard としてアルブミン (分子量 66 kDa)を同時に泳動した。

vehicle 群ではアルブミン以外にも様々な分子量のタンパク質が含まれていた。

b. アルブミン/クレアチニン比は PEPITEM 群で有意に低値だった。n = 6

結果は四分位数及び最大値、最小値で表した。* P < 0.05

ACR; albumin creatinine ratio



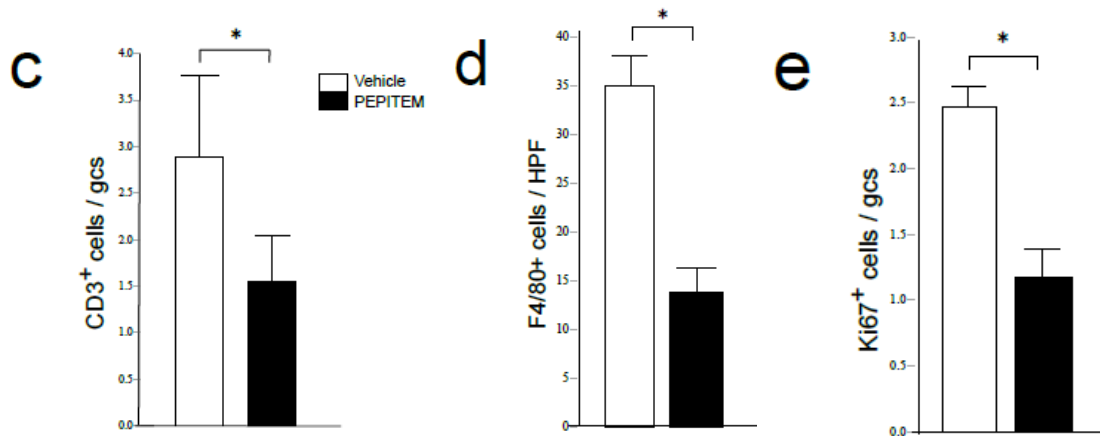


図 10. 腎炎に対する PEPITEM の効果の組織学的検討

a. HE 染色において間質や血管周囲への炎症性細胞浸潤は PEPITEM 群において少なかった。PAS 染色において糸球体のメサンギウム基質の増生は軽減していた。

b,c. 糸球体あたりの CD3 陽性細胞数は PEPITEM 群で有意に低値だった。

b,d. 間質の強拡大像における F4/80 陽性細胞数は PEPITEM 群で有意に低値だった。

b,e. 糸球体あたりの Ki-67 陽性細胞数は PEPITEM 群で有意に低値だった。

結果は平均値±標準偏差で表した。* $P < 0.05$ 、bar = 40 μ m、各群 n = 6。

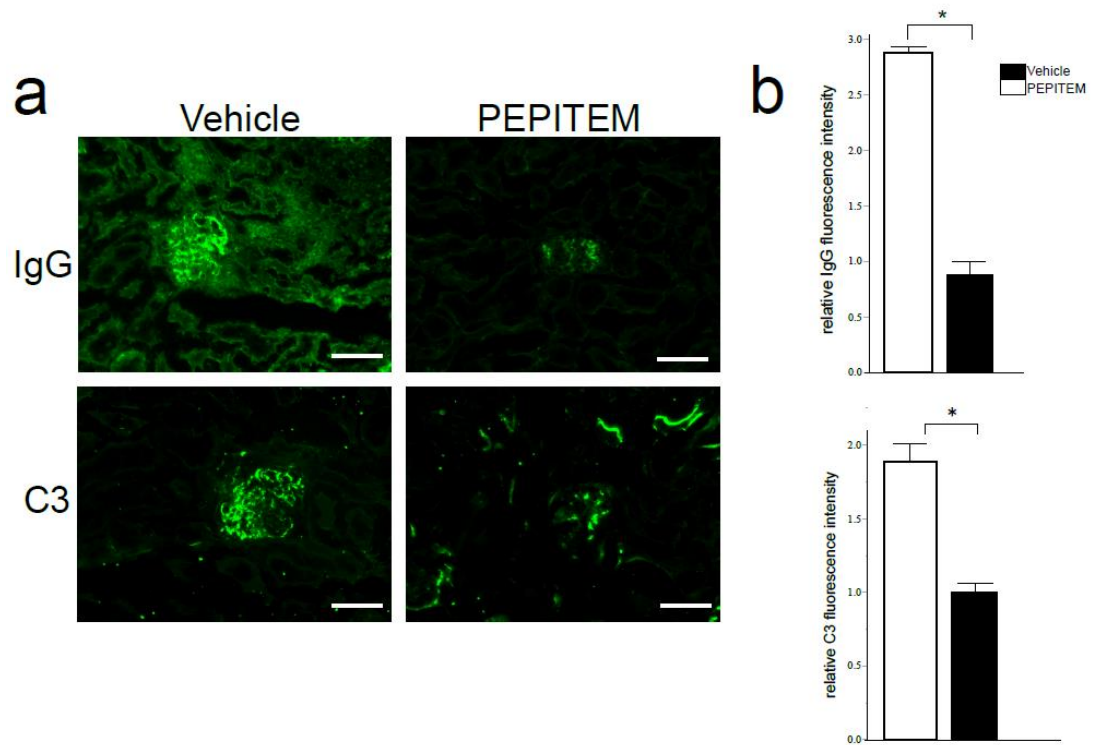


図 11. 糸球体における IgG 及び C3 沈着に対する PEPITEM の効果の検討

a. FITC 標識した IgG 及び C3 の免疫蛍光染色像。

b. a の蛍光強度を 0~3+ で評価した。IgG、C3 共に PEPITEM 群で蛍光強度は有意に低値だった。

結果は平均値±標準偏差で表した。* $P < 0.05$ 、bar = 40 μ m、各群 n = 6。

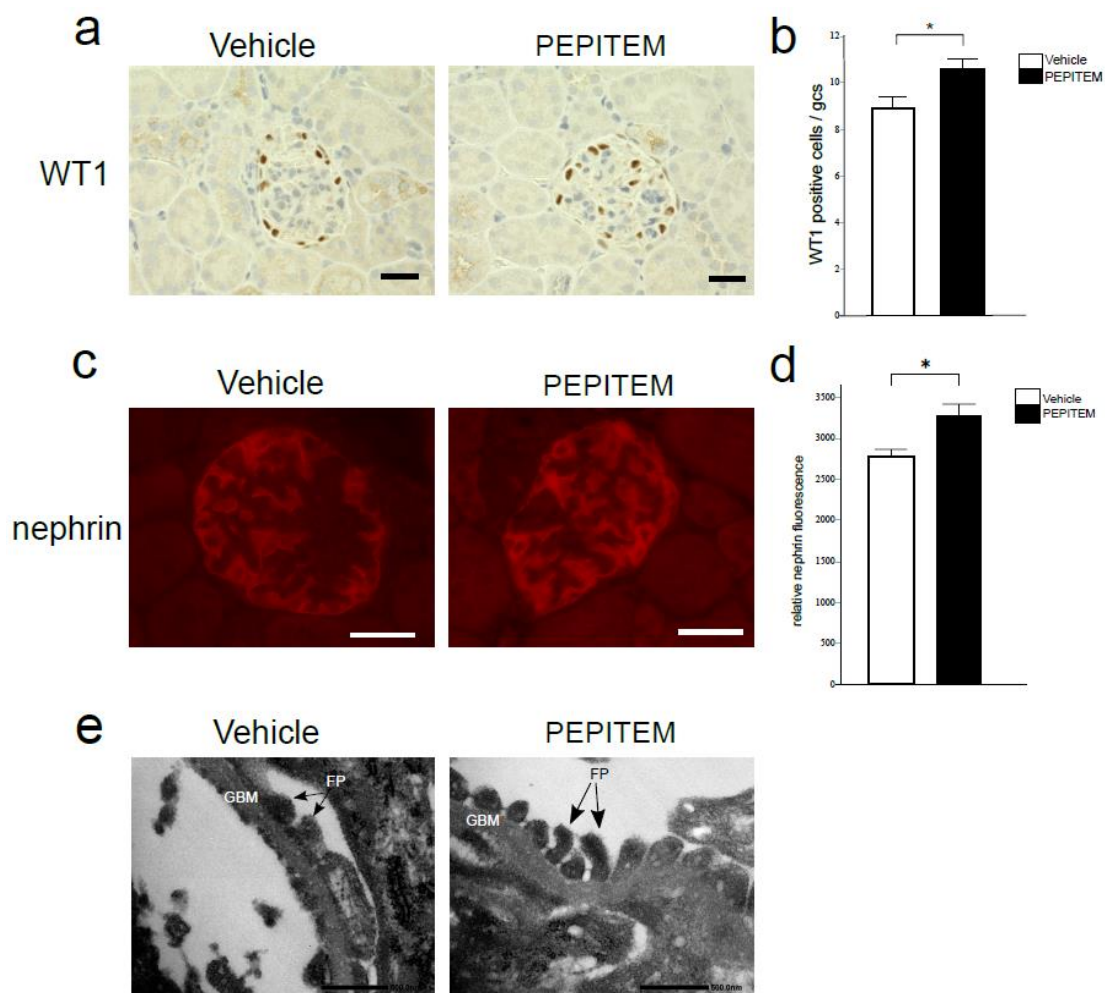


図 12. ポドサイトに対する PEPITEM の効果の組織学的検討

a,b 糸球体あたりの WT1 陽性細胞数は PEPITEM 群で有意に高値だった。

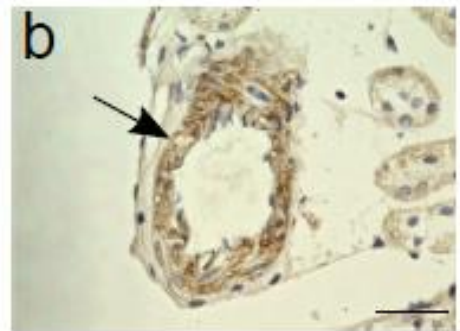
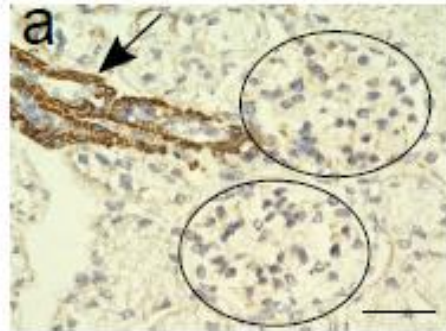
c,d 糸球体あたりのネフリンの相対蛍光強度は PEPITEM 群で有意に高値だった。

e パラフィン切片を用いた電子顕微鏡での糸球体の観察。ポドサイトの effacement が vehicle 群で目立った。

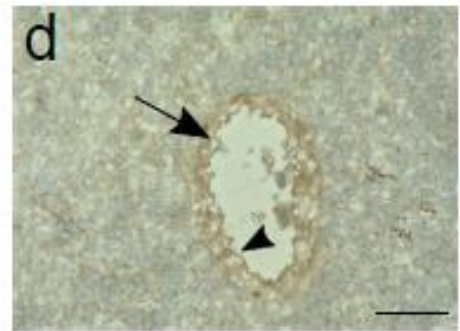
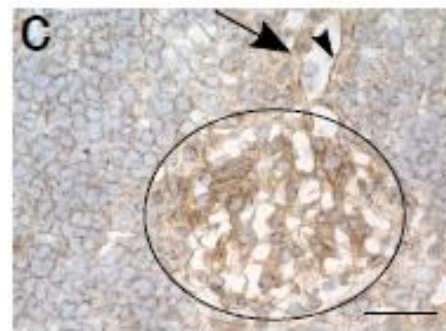
結果は平均値±標準偏差で表した。* $P < 0.05$ 、a, c の bar = $40\mu\text{m}$ 、e は bar = 200nm 。

各群 $n = 6$ 。

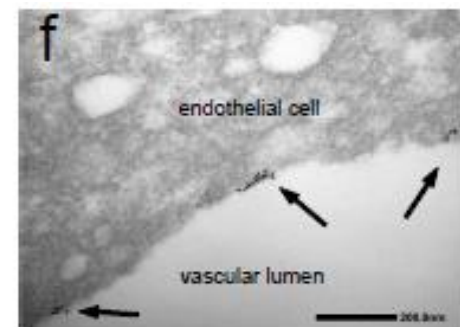
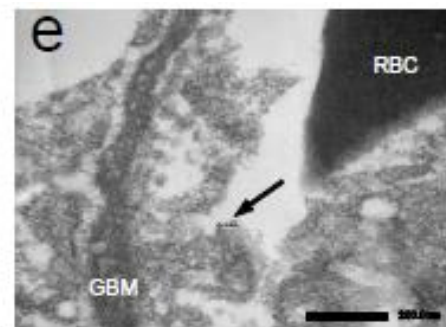
4-week old
MRL/lpr
kidney
CDH15



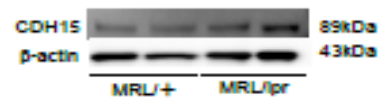
22-week old
MRL/lpr
kidney
CDH15



22-week old
MRL/lpr
kidney
CDH15

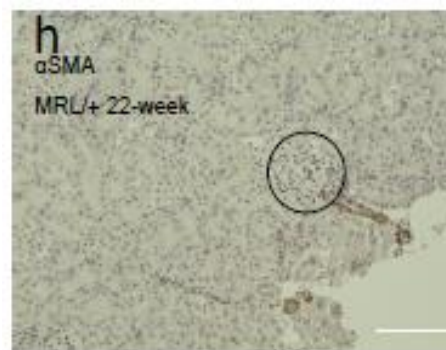


g



h

α SMA
MRL/+ 22-week



α SMA
MRL/lpr 22-week

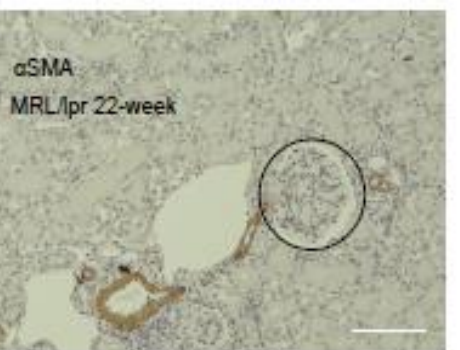


図 13. 腎臓における cadherin (CDH)15 発現の組織学的検討

- a. 4 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓の細動脈の平滑筋細胞に陽性像が得られた (矢印)。円の内側が糸球体。
- b. 4 週齢の MRL/lpr マウスの小葉間動脈の平滑筋細胞に陽性像が得られた (矢印)。
- c. 22 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓の細動脈の平滑筋細胞 (矢印) と血管内皮細胞 (矢頭) に陽性像が得られた。円の内側が糸球体。
- d. 22 週齢の MRL/lpr マウスの小葉間動脈の平滑筋細胞 (矢印) と血管内皮細胞 (矢頭) に陽性像が得られた。
- e. 22 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓に対して免疫電顕を行った。検出には直径 10nm の金コロイドを使用した。糸球体毛細血管の内皮細胞の血管腔側に金コロイドを認めた。
- f. 22 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓に対して免疫電顕を行った。検出には直径 10nm の金コロイドを使用した。小葉間動脈の内皮細胞の血管腔側に金コロイドを認めた。
- g. 2 匹のマウスから磁気ビーズ法にて単離した糸球体をプールして抽出した蛋白質を用いて Western blotting を行った。CDH15:89KDa。内因性コントロールには β -actin を使用した。各群 n = 2。
- h. g で使用したマウスの腎臓における α SMA の発現の検討。酵素抗体法を用いて検出した。血管平滑筋細胞には陽性 (茶) だったが、糸球体 (円の内側) に陽性像は認めなかった。

bar = 40 μ m

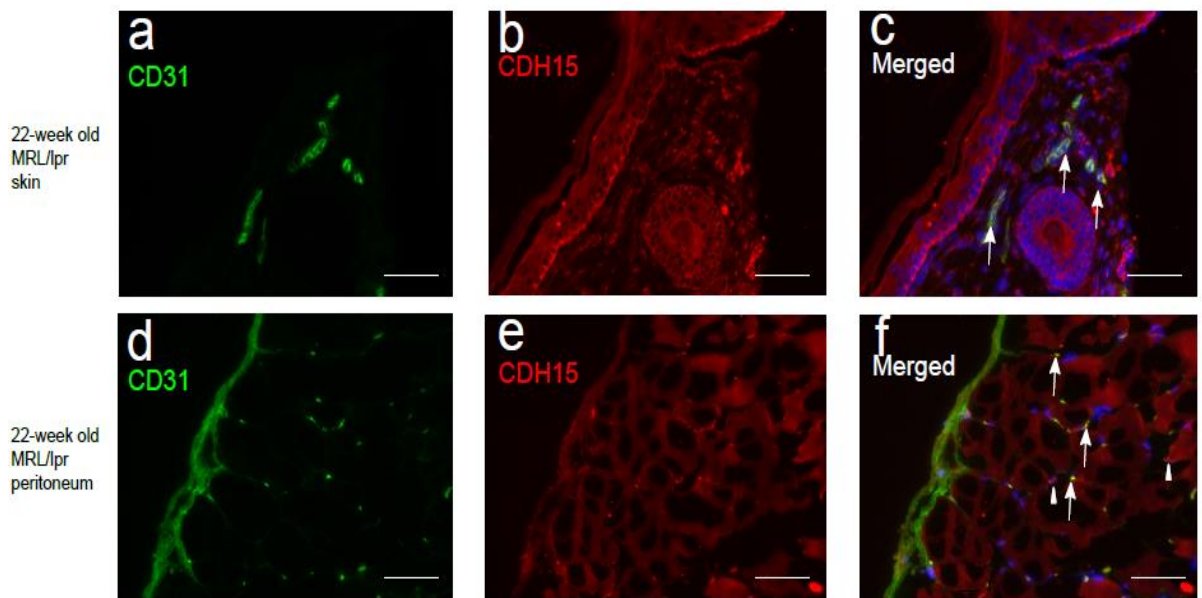


図 14. 皮膚、腹膜における CDH15 の発現に対する組織学的検討

- a. 22 週齢の MRL/lpr マウスの皮膚に対する CD31(緑)の免疫蛍光染色。
- b. 22 週齢の MRL/lpr マウスの皮膚に対する CDH15(赤)の免疫蛍光染色。
- c. a,b の画像を merge させたところ、CD31 と CDH15 は共局在(矢印)を示した。血管内皮細胞に CDH15 が発現していることが確認された。
- d. 22 週齢の MRL/lpr マウスの腹膜に対し CD31(緑)の免疫蛍光染色を行った。
- e. 22 週齢の MRL/lpr マウスの腹膜に対し CDH15(赤)の免疫蛍光染色を行った。
- f. d,e の画像を merge させたところ、CD31 と CDH15 は共局在(矢印)を示した。
- g. 矢頭は平滑筋の CDH15 を示している。血管内皮細胞に CDH15 が発現していることが確認された。

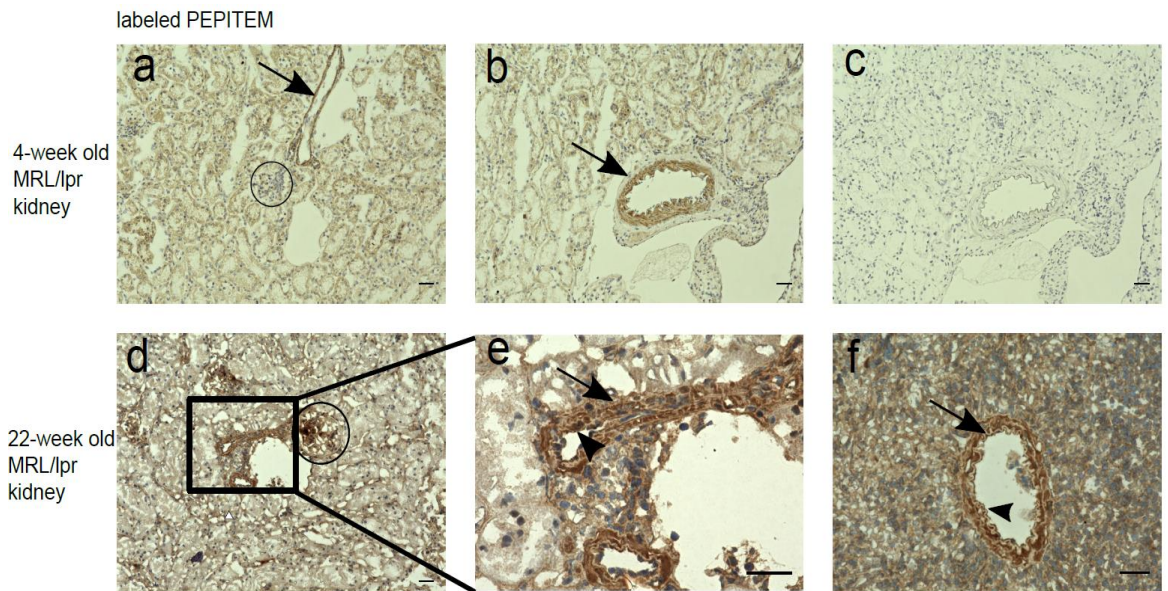


図 15. PEPITEM 結合部位探索のための標識 PEPITEM を用いた組織学的検討

- a. 4 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓の細動脈の平滑筋細胞に陽性像が得られた (矢印)。糸球体は陰性だった。円の内側が糸球体。
- b. 4 週齢の MRL/lpr マウスの小葉間動脈の平滑筋細胞に陽性像が得られた (矢印)。
- c. 4 週齢の MRL/lpr マウスにおいて標識 PEPITEM を省略した染色を陰性対照とした。非特異的陽性像は認めなかった。
- d. 22 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓の細動脈及び糸球体に陽性像 (茶色) が得られた。円の内側が糸球体。
- e. d の拡大像。血管平滑筋細胞 (矢印) と血管内皮細胞 (矢頭) に陽性像が得られた。
- f. 22 週齢の MRL/lpr マウスの腎臓の小葉間動脈の平滑筋細胞 (矢印) と血管内皮細胞 (矢頭) に陽性像が得られた。

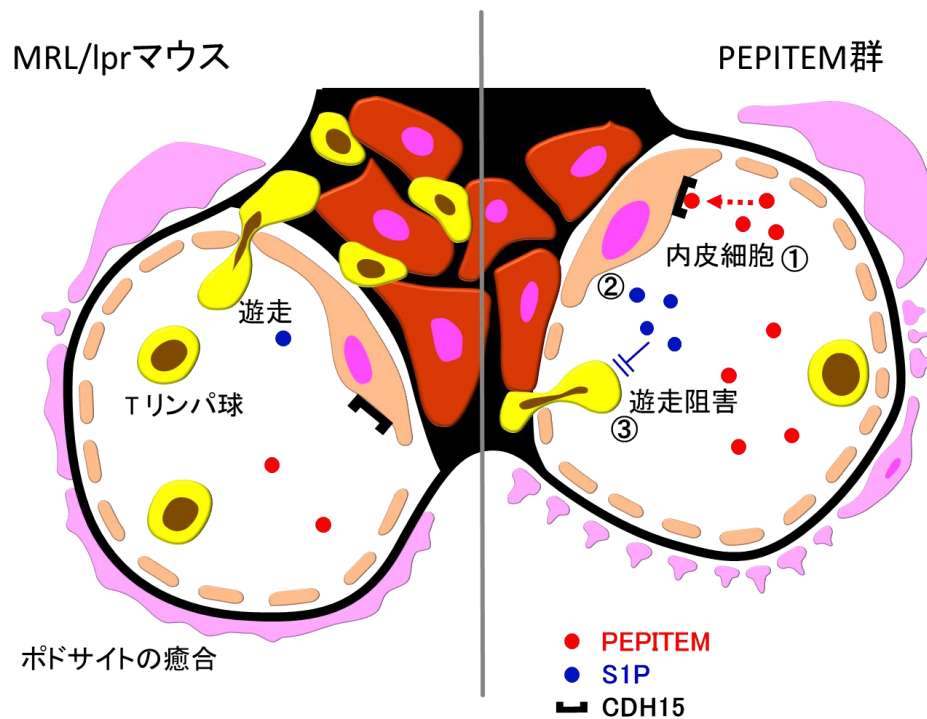


図 16. 外因性に投与した PEPITEM の、腎臓糸球体における作用機序の仮説

①PEPITEM は CDH15 を受容体として糸球体毛細血管内皮細胞に作用する。

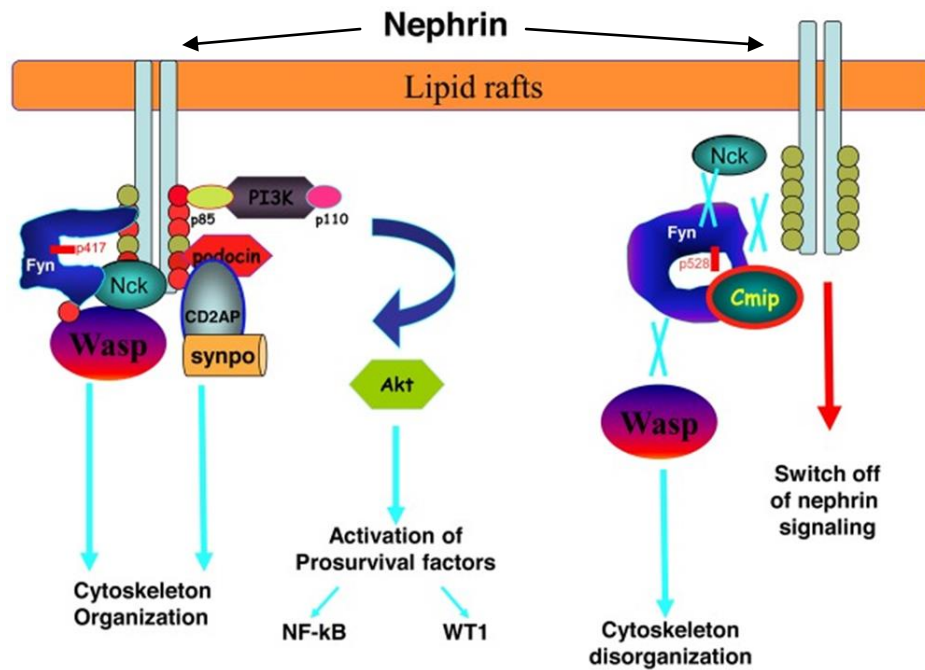
②内皮細胞から S1P が分泌される。

③S1P receptor を発現した T リンパ球に作用して、血管外への T リンパ球遊走を抑える。

peptide inhibitor of trans-endothelial migration; PEPITEM

cadherin 15; CDH15

sphingosine 1 phosphate; S1P



Semin Immunopathol.2014;36(4):421-9 より改編

【第5章の結果】

図 17. ポドサイトにおける c-mip の作用機序

WASP; wiskott Aldrich syndrome protein

c-maf inducing protein; c-mip

c-mip は Fyn のリン酸化阻害を介してネフリンの生存シグナルを阻害する。
その結果スリット膜の破綻とポドサイトにおけるアクチン細胞骨格の破綻
が起きて蛋白尿が惹起される。

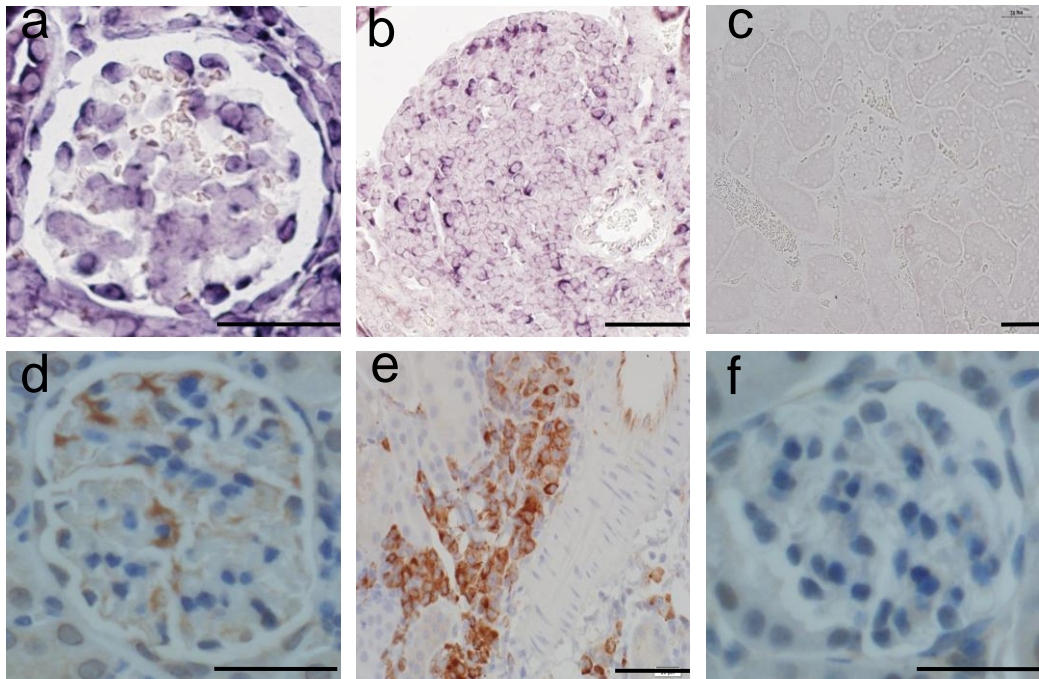


図 18. MRL/lpr マウスの腎臓における c-mip の発現状態の組織学的検討

ISH; in situ hybridization

IHC; immunohistochemistry

- a. ISH ではポドサイトに陽性像を認めた。
- b. ISH では間質に浸潤したリンパ球の一部にも陽性像を認めた。
- c. sense probe では非特異的結合は認めなかった。
- d. IHC では 22 週齢の MRL/lpr マウスのポドサイトに陽性像を認めた。
- e. IHC では 22 週齢の MRL/lpr マウスの浸潤リンパ球の一部に陽性像を認めた。
- f. IHC では 4 週齢の MRL/lpr マウスの糸球体に陽性像は認められなかった。

bar = 40μm、各群 n = 4。

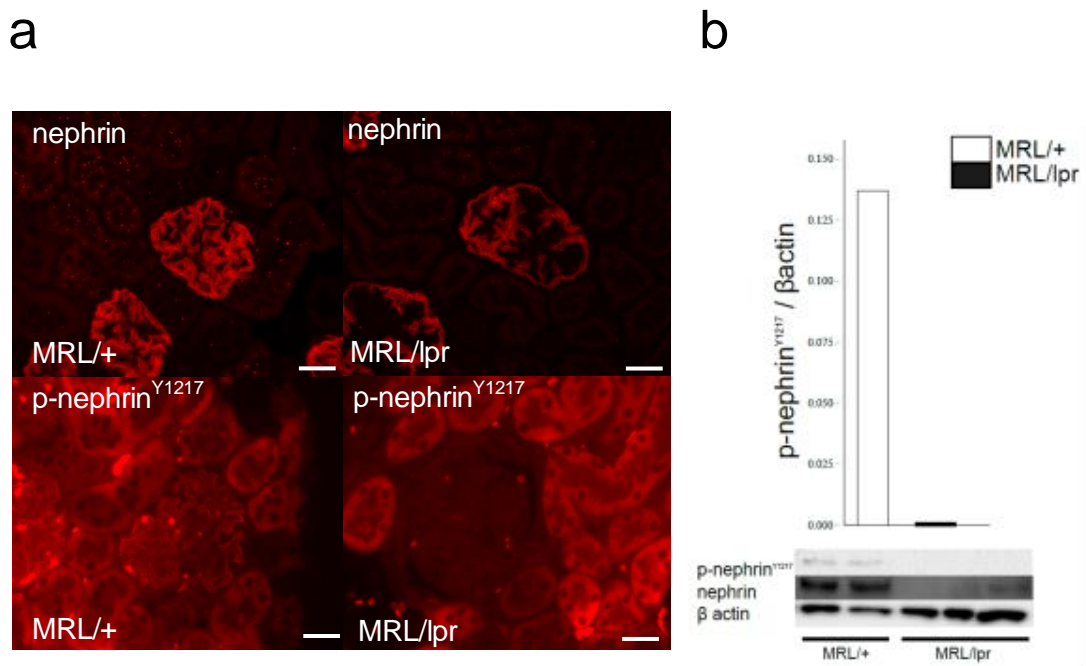


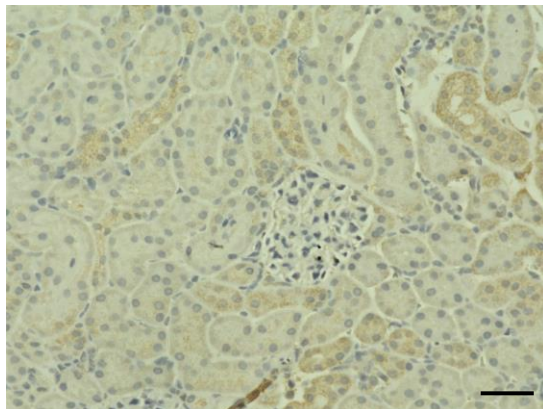
図 19. MRL/lpr マウスにおけるネフリン及びリン酸化ネフリン^{Y1217}の検討

a. パラフィン切片を用いたネフリン及びリン酸化ネフリン^{Y1217}の免疫蛍光染色。22 週齢の MRL/+マウスの糸球体にはネフリン及びリン酸化ネフリン^{Y1217}が糸球体に沿って diffuse に発現を認めた。一方 22 週齢の MRL/lpr マウスの糸球体のネフリンの発現は糸球体に沿って断片的に発現していた。リン酸化ネフリン^{Y1217}の発現は認めなかった。

bar = 40μm、各群 n = 4。

b. 2 匹分のマウスから磁気ビーズ法にて単離した糸球体をプールして、抽出した蛋白質を用いて Western blotting を行った。MRL/+ は n = 2、MRL/lpr は n = 3。MRL/+マウスではリン酸化ネフリン^{Y1217}のバンドを認めたが、MRL/lpr マウスでは認めなかった。

a



b

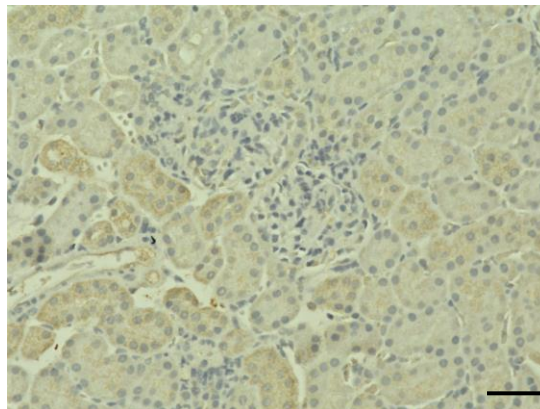


図 20. VPA 群及び PEPITEM 群の腎臓における c-mip 発現の組織学的検討

a. VPA 群の糸球体に陽性像は認めなかった。

b. PEPITEM 群の糸球体に陽性像は認めなかった。

bar = 40 μ m、各群 n = 4。

抗体	動物種	製造元
CD45	rat, monoclonal	30F-11, BD Biosciences Pharmingen, Sandiego, CA
CD3e	rat, monoclonal	17A2, Biolegend, Sandiego, CA
CD4	rat, monoclonal	RM4-5, Biolegend
CD8	rat, monoclonal	53-6.7, Biolegend

表 1. 第 1 章で使⽤した抗体

抗体	動物種	製造元
CD3e	Goat	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
F4/80	Rabbit	Santa Cruz
nephrin	guineapig	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany
WT1	rabbit	Santa Cruz
FITC-IgG	goat	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
H3 acetyl K9	rabbit	Abcam, Cambridge, UK

表 2. 第 2 章で使用した抗体

laboratory characteristics		
	Vehicle n=5	VPA n=5
Cr (mmol/l)	12.3±0.88	12.8±0.88
Alb (g/l)	33.8±0.7	35.7±1.1
A/G	0.82±0.04	1.28±0.05*
anti ds-DNA IgG	1624±187	1489±122*
尿蛋白 (mg/day)	3.5±1.2	1.32±0.4*

表 3. 血清生化学及び尿蛋白

P < 0.05 vs. vehicle

抗体	動物種	製造元
CD45	rat, monoclonal	30F-11, BD Biosciences Pharmingen
CD3e	rat, monoclonal	17A2, Biolegend
CD4	rat, monoclonal	RM4-5, Biolegend
CD8	rat, monoclonal	53-6.7, Biolegend
CD3e	Goat	Santa Cruz Biotechnology
F4/80	rabbit	Santa Cruz Biotechnology
Ki-67	rat	DAKO Agilent Technology, Santa Clara, CA
CDH15	rabbit	Cusabio Biotech, Newark, DE
Nephrin	guineapig	PROGEN Biotechnik GmbH
WT1	rabbit	Santa Cruz Biotechnology
CD31	rat	ER-MP12, Acris, Herford, Germany
FITC-IgG	goat	MP Biomedicals
FITC-C3	goat	MP Biomedicals
HRP- α SMA	mouse	1A4, DAKO
HRP- β actin	goat	Santa Cruz Biotechnology

表 4. 第 4 章で使用した抗体

Laboratory characteristics

	Vehicle n = 6	PEPITEM n = 6
BUN (mmol/L)	9.85 ± 0.34	8.82 ± 0.61
Cr (mmol/l)	10.6 ± 0.88	13.2 ± 0.88 *
TP (g/l)	67.8 ± 3.0	65.6 ± 1.3
Alb (g/l)	31.8 ± 0.7	33.8 ± 1.1
A/G	0.88 ± 0.06	1.06 ± 0.05 *

* P-value (PEPITEM vs vehicle <0.05)

表 5. 血清生化学所見

抗体	動物種	製造元
c-mip	rabbit	Proteintech Group, Chicago, IL
nephrin	guineapig	PROGEN
p-nephrin ^{Y1217}	rabbit, monoclonal	Abcam
HRP- β actin	goat	Santa Cruz Biotechnology

表 6. 第 5 章で使用した抗体