

学 位 論 文 要 旨

氏 名 翁 千香子 

論 文 題 目

「A new mouse experimental model of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)
produced by the administration of polyclonal anti-mouse nephrin antibody.」

(抗マウスネフリンポリクローナル抗体投与による新たな
巣状糸球体硬化症マウス実験モデルの確立)

指 導 教 授 承 認 印

鎌田 貞寿  印

A new mouse experimental model of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)

produced by the administration of polyclonal anti-mouse nephrin antibody.

(抗マウスネフリンポリクローナル抗体投与による新たな巣状糸球体硬化症マウス実験モデルの確立)

氏名 翁 千香子

要旨 (3695 字)

(背景と目的)

腎糸球体上皮細胞足突起間のスリット膜に局在するネフリン蛋白は、腎糸球体での尿蛋白透過性に関与する。フィンランド型先天性ネフローゼ症候群や一部の巣状糸球体硬化症 (FSGS) ではこの蛋白の遺伝子に欠損や変異が見られる。今回、我々はマウスネフリン cDNA を家兎に遺伝子免疫して誘導した抗体をマウスに投与し、新しい実験ネフローゼ症候群モデルの確立を試みた。

(方法)

1. 実験動物

2.0~3.0 kg の雌 New Zealand white ラビットと 19~24g の 10 週齢、雄 C57BL/6N マウス (Charles River Breeding Laboratory; Atsugi, Japan) を、動物飼育室で 2 週間飼育した後に使用した。動物の取り扱いに際しては、北里大学医学部動物実験倫理委員会の指針に従った。

2. プラスミド作成

マウスネフリン蛋白をコードしているマウスネフリン cDNA 全長 (アミノ酸 1 番から 1256 番)、Ig 様モチーフ 1-8 領域 (アミノ酸 1 番-953 番)、そしてシグナル分子およびフィブロネクチン領域から細胞内領域 (アミノ酸 1 番-35 番+955 番-1256 番) を TaKaRa custom services (Ohtsu, Japan) で合成した。合成した cDNA は、SV40 プロモーターを含む哺乳類細胞発現ベクター pAP3neo™ (TaKaRa, Shiga, Japan) に挿入し、*E. coli* JM109 Competent cells (TaKaRa) に導入した。二日間培養後、プラスミドを、QIAGEN plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) で回収した。

3. 家兎への免疫

家兎 14 匹を 4 群に分け、コントロール群、マウスネフリン Ig 様モチーフ 1-8 群、マウスフィブロネクチン群、マウスネフリン全長群とした。コントロールはネフリン cDNA を挿入

しないベクターを用いた。精製したプラスミドを直径 $1\mu\text{m}$ の金粒子にコーティングし、遺伝子銃 (BioRad, Hercules, CA) を用いて家兎の両側鼠径部皮下に打ち込んだ。1回 $30\mu\text{g}$ を2週間毎に計4回投与した。8週目に、麻酔下到大腿動脈より全血採血を行った。

4. 家兎血清中抗体の腎糸球体上のマウスネフリン蛋白に対する結合能力

正常 C57BL/6N マウス腎皮質の凍結切片 ($2\sim 3\mu\text{m}$) をアセトン固定し、BSA/PBS にてブロッキング処理した後に、家兎血清を1時間室温にて反応させた。洗浄後に、FITC 標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) を反応させた後に、蛍光顕微鏡 (Olympus, BX51, Japan) で観察した。

5. IgG の精製

家兎血清は、飽和硫酸アンモニウム (Thermo scientific, USA) 沈澱を行い、沈澱物を Melon™ gel IgG purification kit (Thermo scientific, USA) のカラムに通過させた。カラムを通過した溶出物を Amicon 15 (Millipore Corporation, Billerica, MA) を用いて濃縮し、 0.2M リン酸ナトリウムバッファーに溶解した。溶出物を SDS-PAGE で分析し、IgG の含有が 80% 以上であることを確認した。

6. C57BL/6N マウスへの家兎 IgG 投与と尿検体・血液検体の測定

C57BL/6N マウスを4群に分けコントロール群、Ig 様モチーフ 1-8 群、フィブロネクチン群、全長群とした。精製 IgG 0.3ml を、マウス尾静脈より注射した。マウスの蓄尿を行った。投与前から投与後7日目までは連日、および9、14、17、21、24、28日目の尿を採取した。IgG 投与前、投与後3、7、14、28日目にマウス尾静脈より採血した。全長群とコントロール群の IgG を投与したマウスは投与後2、7、28日目に、1-8 群とフィブロネクチン群は投与後2、28日目に屠殺し腎組織を得た。尿蛋白と尿クレアチニンの濃度は、ピロガロールレッド法と酵素法で測定した。血清アルブミン値と総コレステロール値は DRI-CHEM 7000V (Fuji-Film, Tokyo) で測定した。

7. 光学顕微鏡での検討

摘出した腎臓は 10% buffered formalin (pH 7.2) で固定した。Ethanol-xylol で脱水処理後、パラフィンで包埋した。パラフィン切片を $2\sim 3\mu\text{m}$ に薄切し hematoxylin and eosin 染色および periodic acid-Schiff 染色を施した。

8. 蛍光抗体法での検討

腎皮質を O.C.T. compound Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Torrance, CA) に包埋し、液体窒素で凍結した。 $2\sim 3\mu\text{m}$ の凍結切片をアセトン固定した。BSA/PBS にてブロッキング後、FITC 標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) を反応させ、蛍

光顕微鏡 (Olympus, BX51, Japan) で観察した。

9. 電子顕微鏡での検討

腎皮質を 2.5% グルタルアルデヒドを含む 0.1M カコジル酸緩衝液 で前固定した。0.1M カコジル酸緩衝液で洗浄後、2% 四酸化オスミウムを含む 0.1M カコジル酸緩衝液で固定した。エタノール漸次濃度上昇系列にて脱水後、QY-1 (n-butyl glycidyl ether) で置換し、Quetol 812 混合樹脂で包埋した。Leica 超ミクロトームにて 80nm 切片を作製し、3% 酢酸ウラニル水溶液、クエン酸鉛染色で電子染色を行った後、電子顕微鏡 (model JEX-1200EX; JEOL Ltd, Tokyo, Japan) で観察した。

(結果)

1. 家兎血清のマウスネフリン蛋白への結合能

マウスネフリン cDNA 全長を免疫して得た家兎血清は、5 匹中 4 匹が正常 C57 BL/6N マウスの糸球体基底膜 (GBM) に沿って顆粒状の結合を示した。マウスネフリン cDNA の Ig 様 1-8 領域を免疫して得た家兎血清は、3 匹中 1 匹がマウス腎糸球体に結合し、GBM に沿った帯状の結合を示した。ファイブロネクチン領域あるいはベクターのみを免疫して得られた家兎血清各 3 検体は、正常マウス糸球体に結合しなかった。

2. マウス蛋白尿の経時的推移

コントロール群の尿 84 検体の尿中蛋白量の平均 \pm 3SD、29.72 mg/mg \cdot Cr を正常上限値とした。これ以上を顕性蛋白尿とした。マウスネフリン cDNA 全長を免疫した家兎の精製 IgG 4mg を投与したマウスは、10 匹中 8 匹が有意な蛋白尿を示し、最大 440mg/mg \cdot Cr に達した。マウスネフリン cDNA の Ig 様 1-8 領域、フィブロネクチン領域、ベクターのみを免疫して得た家兎 IgG 4mg は、マウスに蛋白尿を出現させなかった。

3. マウス血清アルブミン値、総コレステロール値の経時的推移

マウスネフリン cDNA 全長を免疫して得た家兎 IgG 4mg を投与したマウスのうち、陽性蛋白尿を呈したマウスの血清アルブミン値は、3 日、7 日で有意に低下した。血清コレステロール値も 3 日、7 日、14 日で有意に上昇した。

4. 光学顕微鏡所見

マウスネフリン cDNA 全長により誘導された家兎 IgG 4mg を投与したマウスの腎組織は、抗体投与後 7 日目以降の全ての腎組織が巣状糸球体硬化症の所見を示した。一方、マウスネフリン cDNA の Ig 様 1-8 領域、フィブロネクチン領域およびベクターのみを免疫して得られた家兎 IgG 4mg を投与したマウス腎組織は、いずれも微小変化群を呈した。

5. 蛍光抗体法所見

マウスネフリン cDNA 全長より誘導された家兎 IgG4 mgを投与したマウスでは、投与後 2 日目に家兎 IgG が GBM に沿って顆粒状に局在し、クラスターを形成した。マウスネフリン cDNA の Ig 様 1-8 領域を免疫して得た家兎 IgG を投与したマウスの腎組織は、投与後 2 日目に家兎 IgG が GBM に沿って帯状に結合した。フィブロネクチン領域およびベクターのみにより誘導された家兎 IgG4 mgを投与したマウスでは家兎 IgG の染色は陰性だった。

6. 電子顕微鏡所見

マウスネフリン全長 cDNA により誘導された家兎 IgG4 mgを投与したマウスでは、投与 2 日目の腎組織は、腎糸球体上皮細胞足突起の消失が明らかであった。残り 3 群の家兎 IgG4 mg を投与したマウスの腎組織は変化を認めなかった。

(考察)

本モデルの腎糸球体病変は、ヒトの FSGS によく類似しており、本モデルはヒトの FSGS に対応するモデルであると考えられる。本方法では、抗原蛋白の精製が不要であり、簡便にモデルを作製できる。薬物投与によるマウスネフローゼ症候群モデルは、薬物が細胞を広汎に障害するために、FSGS への進展過程の分子機構の解析は困難であった。新たに確立したモデルでは、ネフリン蛋白のみを障害させて FSGS を誘導するので、FSGS に至る分子機構の解析が可能となる。

(結論)

後天的 FSGS を呈する新たなマウス実験モデルを確立した。