

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名            竹内 和博



論 文 題 目

「 New Anti-Nephrin Antibody Mediated Podocyte Injury Model Using a  
C57BL/6 Mouse Strain 」

(C57BL/6 マウス系統を用いた、抗ネフリン抗体により誘導される  
新しいポドサイト障害モデル)

指 導 教 授 承 認 印

竹内 康雄



# New Anti-Nephrin Antibody Mediated Podocyte Injury Model

## Using a C57BL/6 Mouse Strain

(C57BL/6 マウス系統を用いた、抗ネフリン抗体により誘導される

新しいポドサイト障害モデル)

氏 名 竹内 和博

---

( 以 下 要 旨 本 文 )

### 【背景】

巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)は不可逆性の糸球体上皮細胞(ポドサイト)障害により、治療抵抗性のネフローゼ症候群(NS)から進行性腎障害をきたす疾患である。ポドサイトは隣り合う足突起間にスリット膜を形成し、糸球体ろ過バリア機構を担っている。近年の研究からスリット膜のネフリン分子がろ過機構に重要であることが認識されている (Kestilla et al, Mol. Cell: 1, 575, 1998)。しかし、ヒト腎生検で得られる試料は少量であり、ポドサイト障害に至る病態の詳細を明らかにすることはできない。従ってヒトポドサイト障害類似の疾患動物モデルが不可欠である。我々はこれまでマウス・ネフリン (mNep) 遺伝子免疫法を用いて作成したポリクローナル・ウサギ抗マウス・ネフリン抗体( $\alpha$ -mNep Ab)を C57BL/6 (B6)マウスに投与することによりヒト FSGS 様病変の誘導を試みてきた。今回我々はこのモデルにおけるポドサイト障害の詳細な解析を試みた。

### 【方法】

#### I. 遺伝子免疫法を用いた抗体の作成と抗体特異性の解析

遺伝子銃を用いて、mNep plasmid DNA または mock vector をウサギ大腿部に 2 週間ごとに 30  $\mu$ g/回を計 4 回、皮下投与し、抗ネフリン抗体 ( $\alpha$ -mNep Ab) または、コントロール抗体(control Ab)を作成した。最終投与から 2 週間後に、ウサギ血清を採取し硫酸ナトリウム沈殿法を用いて

IgG を精製した。

(i) HEK293/mNep を用いた  $\alpha$ -mNep Ab の抗体特性の解析

mNep 遺伝子を遺伝子導入したヒト胎児腎細胞 (HEK293/mNep)を用いて、 $\alpha$ -mNep Ab 及び control Ab を一次抗体としたウエスタンブロット法、または免疫細胞染色により、 $\alpha$ -mNep Ab の Nep への特異的な結合を確認した。

(ii) 正常マウス組織を用いた  $\alpha$ -mNep Ab の抗体特性の解析

正常マウス腎組織を用いて、 $\alpha$ -mNep Ab および、ポドサイトマーカー (抗 Synaptopodin または podocin 抗体) を用いて、二重染色を行った。

## II. FSGS の誘導及び解析

(i) 体重、尿量、尿・血清生化学データの解析

B6 マウス (10 週令、雌) に精製した  $\alpha$ -mNep Ab (n=13) または control Ab (n=10)を各々4 mg を尾静脈から経静脈的に一回投与した。抗体投与後の体重および尿量の推移を 14 日目まで測定した。また、尿アルブミン・クレアチニン比(ACR:  $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{Cr}$ )を対数変換した後、解析した。抗体投与前、投与 1、7 及び 14 日後に血清アルブミン、クレアチニン、尿素窒素、コレステロールを測定した。

(ii) 糸球体硬化病変の解析

投与後 7 及び 14 日目の腎組織を PAS 染色し、糸球体硬化病変をスコア化した (0: 硬化病変がない、1: 硬化病変が糸球体の 1-25%、2: 硬化病変が糸球体の 26-50%、3: 硬化病変が糸球体の 51-75%、4: 硬化病変が糸球体の 76-100%)。一個体につき 30 個の糸球体を評価し、その平均を一個体のスコアとして解析した。

(iii) 免疫染色を用いたポドサイト障害の解析

抗 WT1 抗体を用いて、糸球体単位面積当たりのポドサイト数を定量化し、抗 Synaptopodin 抗体を用いて、1 糸球体に占める染色面積の割合を定量化し、解析した。

(iv). 透過型電子顕微鏡を用いた足突起の形態学的解析

抗体投与後 7 及び 14 日目の足突起の構造変化を、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

(v). 病態形成に關与するマウス(宿主)の免疫反応系の解析 (補体、抗体およびマクロファージ)

抗マウス C3 抗体、抗マウス IgG 抗体及び抗マウス F4/80 抗体を用いて、抗体投与後 7 及び 14 日目のマウス組織に対して免疫染色を行い、解析した。

## 【結果】

### I. 遺伝子免疫法を用いた抗体の作成と抗体特異性の解析

(i) ウエスタンブロットでは、 $\alpha$ -mNep Ab は非還元状態の mNep を認識したが、還元状態の mNep は認識しなかった。また、免疫細胞染色では、 $\alpha$ -mNep Ab は、HEK293/mNep 細胞表面に強い結合が認められた。

(ii) 正常マウス腎組織の免疫染色では  $\alpha$ -mNep Ab は、ポドサイトマーカーである Synaptopodin

及び Podocin と共染色を認めた。

## II. FSGS の誘導及び病変の解析

### (i) $\alpha$ -mNep Ab モデルの病態

$\alpha$ -mNep Ab 投与後翌日に、一過性の尿量低下と体重増加が起こり、尿 ACR( $\mu\text{g}/\text{mg}$ , Log) ( $6.24 \pm 0.84$  vs. コントロール群  $1.70 \pm 0.30$ ,  $p < 0.05$ ) も上昇した。尿量は 3 日後には改善した後、再度増加した。体重は、7 日目以降はコントロール群と同等に推移した。蛋白尿は 14 日目 ( $6.32 \pm 0.21$  vs. コントロール群  $1.77 \pm 0.28$ ,  $p < 0.001$ ) まで上昇していた。

血清クレアチニン、尿素窒素とも、投与翌日より急激に上昇した。アルブミンは投与翌日に急激に低下した。

### (ii) 糸球体硬化病変の解析

$\alpha$ -mNep Ab 投与後 7 及び 14 日目において、FSGS が出現した。[糸球体硬化スコア：7 日目 ( $0.91 \pm 0.05$  vs. コントロール群  $0.04 \pm 0.01$ ,  $p < 0.001$ )、14 日目 ( $0.74 \pm 0.07$  vs. コントロール群  $0.03 \pm 0.01$ ,  $p < 0.001$ )]。

### (iii) 免疫染色を用いたポドサイト障害の解析

$\alpha$ -mNep Ab 投与後 7 日目に WT1 陽性細胞数 (個/ $\text{mm}^2$ ) ( $3.4 \pm 0.1$  vs. コントロール群  $5.1 \pm 0.1$ ,  $p < 0.001$ )、Synaptopodin 陽性エリア (%) ( $19.8 \pm 0.7$  vs. コントロール群  $32.6 \pm 0.6$ ,  $p < 0.001$ ) とも減少し、投与 14 日目も同様に減少していた。

### (iv). 透過型電子顕微鏡を用いた足突起の形態学的解析

$\alpha$ -mNep Ab 投与後 7・14 日目ともに、ポドサイトの足突起の癒合・退縮を認めた。コントロール群では、足突起の明らかな形態変化は認められなかった。

### (v). 病態形成に関与するマウス(宿主)の免疫反応系の解析 (補体, 抗体およびマクロファージ)

$\alpha$ -mNep Ab 投与後、マウス C3 および IgG が巣状分節性に糸球体に沈着し、マクロファージは糸球体ボウマン嚢周囲に浸潤していた。

## 【考察】

今回我々は、以前に報告した、遺伝子免疫法で作成した  $\alpha$ -mNep Ab により誘導された組織学的 FSGS 様病変がヒト FSGS で見られるポドサイト障害によるものであることを検証した。

ウェスタンブロット及び HEK293/mNep 細胞染色において、我々が作成した  $\alpha$ -mNep Ab は非還元状態の mNep を認識することを示した。mNep に存在する 8 つのジスルフィド結合部位は細胞外の免疫グロブリン様ドメインにのみ存在することから、 $\alpha$ -mNep Ab は mNep 免疫グロブリン様ドメインを認識している可能性が高い。正常なマウス腎組織を用いた免疫組織染色では、ポドサイトマーカーである Synaptopodin 及び Podocin との共染色が認められ、 $\alpha$ -mNep Ab はポドサイトの Nep に特異的に結合することが確認され、今後のポドサイト障害の研究に有用である。

尿蛋白の経過では  $\alpha$ -mNep Ab 投与後、早期 (投与後 1 週間) と、後期 (投与後 1 週間以降) の

2 相性変化が認められた。早期相では投与翌日から (1)尿量低下、(2)体重増加、(3)BUN/血清 Cr 比上昇、(4)アルブミン尿の増加と血清アルブミンの低下、(5) 足突起の癒合・退縮が認められた。この経過はモノクローナル抗ラット・ネフリン抗体(抗 5-1-6 抗体)モデルと同様、 $\alpha$ -mNep Ab のネフリンへの結合とシグナル異常によりポドサイト内細胞骨格蛋白の変化を生じ、一過性のネフローゼ症候群をきたし、急激な低アルブミン血症と腎前性急性腎障害を示したと考える。しかし、投与後 7 日目までの詳細な組織変化の解析を行っていないため今後、早期のポドサイト障害の変化を観察する必要がある。

後期の変化は、投与後 7 日目以降 14 日目まで緩徐にアルブミン尿が増加した。他の抗糸球体抗体投与による FSGS モデルでは尿蛋白出現に 7 日程度を要している。我々のモデルでも尿蛋白増加と共に FSGS 病変が見られ、蛍光抗体染色にて同部に一致した C3 及び IgG の沈着が認められたことから補体関連の免疫反応により発症した可能性が考えられた。

一般に糸球体あたりポドサイト数が 20%以上減少すると FSGS へ至ると考えられており、本モデルでは高度なポドサイト障害が進行していると考えられるが、その発症機序の更なる解析が必要である。

今後は、我々の FSGS モデルを B6 遺伝子改変マウス等へ発症させ、ポドサイト障害の発症機序を解析し、ヒト難治性ネフローゼ症候群に類似した慢性疾患モデルへ発展させる研究へ繋げていきたいと考えている。

#### 【結語】

C57/BL6 マウスへの  $\alpha$ -mNep Ab 投与により、ポドサイト障害による FSGS の発症を認めた。今後はさらに長期持続する安定したモデルの確立と、ポドサイト障害の発症進展機序の解析を進めていく。