

平成 22 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890030

研究課題名（和文） 急速進行性糸球体腎炎における DNAM-1 (CD226) の役割

研究課題名（英文） Role of DNAM-1 (CD226) in rapid progressive glomerulonephritis

研究代表者 甲斐 平康 (KAI HIRAYASU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：60510138

研究成果の概要（和文）：

DNAM-1 は NK 細胞、T 細胞、単核球、血小板の表面に発現している接着分子であり、LFA-1 と会合する。DNAM-1 のリガンドとしてポリオウイルスレセプターファミリーである CD155 と CD112 が知られている。今回我々は、抗糸球体基底膜抗体を用いて野生型マウスおよび DNAM-1(CD226)遺伝子欠損マウスに対して急速進行性糸球体腎炎を惹起した。DNAM-1 遺伝子欠損マウスにおいては野生型マウスに比べて腎炎惹起の程度が弱く認められた。急速進行性糸球体腎炎の発症に DNAM-1 が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

DNAM-1 (CD226) is an adhesion molecule expressed on the majority of NK cells, T cells, monocytes and platelets and physically and functionally associates with leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). The poliovirus receptor (PVR) CD155 and its family member CD112 (PVR-related family-2 (PRR-2), also called as nectin-2) are ligands for human and mouse DNAM-1. We analyzed rapid progressive glomerulonephritis for wild type mouse and DNAM-1(CD226) gene deficit mouse using antiglomerulus basement membrane antibody. We compared wild type mouse with the DNAM-1 gene deficit mouse, and the degree of the nephritis was showed weakly. The possibility that DNAM-1 related with the onset of the rapid progressive glomerulonephritis was suggested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：腎臓病態医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：急速進行性糸球体腎炎、DNAM-1(CD226)、抗糸球体基底膜抗体型糸球体腎炎

1. 研究開始当初の背景

DNAM-1 (CD226) は我々のグループにて同定した免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子であり、318 個のアミノ酸から構成される分子量 65kDa の 1 型糖蛋白である (Shibuya A, et al, Immunity, 1996)。そして、腫瘍細胞などに発現しているリガンドを認識した後接着し、CTL およびナチュラルキラー細胞 (NK) に細胞障害活性を誘導する活性化化学受容体として同定された (Shibuya A, et al, Immunity, 1996)。ヒト DNAM-1 は血球系に特異的に発現しており、末梢血 NK 細胞の 98% 以上、 $\cdot\cdot$ 型 T 細胞の 80~90% に恒常的に発現している。また、 $\cdot\cdot$ 型 T 細胞、単球/マクロファージ、一部の活性化 B 細胞、樹状細胞、血小板、巨核球にも発現がみられる。最近私達のグループでは DNAM-1 のリガンドがポリオウイルスレセプター (PVR; CD155) および nectin2 (CD112) であることを同定した (Tahara-Hanaoka S, et al, Biochem Biophys Res Commun, 2003)。これらは、お互いにあるいは自分自身で接着する機能を有することから、nectin/poliovirus receptor superfamily を形成し、細胞間接着や細胞-細胞外マトリックスの接着に機能していると考えられている。DNAM-1 は DNAM-1 リガンドと結合することにより、抗腫瘍免疫応答、腫瘍の拒絶に関与していることを共著者として報告した (Tahara-Hanaoka S, et al, Blood, 2006)。その他にもマクロファージの遊走や (Reymond N, et al, J exp med, 2004)、自己免疫疾患 (Tao, D, et al, J Immunol, 2005)、血小板の凝集 (Kojima H, et al, J Biol Chem, 2003) などにも関与することが明らかとなっており、DNAM-1 は多彩な機能を有している。

我々は、CD4 陽性ナイーブ T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激をすると、DNAM-1 と LFA-1 が T 細胞膜上で会合し、DNAM-1 が Th1 細胞への分化誘導に関与することを見いだした (Shibuya K, et al, J Exp Med, 2003)。さらに申請者は、樹状細胞のサブセットの 1 つである CD8 α 陽性樹状細胞上に DNAM-1 が強く発現しており、抗 DNAM-1 抗体にて刺激を行ったところ、CD8 α 陽性樹状細胞から効率よく IL-12 を産生することにより、Th1 への分化を促進することを明らかとした (Tahara-Hanaoka S, et al, Blood, 2006)。以上のことから、これまでに DNAM-1 は Th1 への分化誘導に関与しており、また炎症を惹起する様々な細胞にも発現し、免疫応答に幅広く関与していることを明らかとしてきた。

一方、近年わが国における慢性腎不全に至る患者すなわち、透析患者の増加が社会問題になっている。慢性腎臓病 (CKD) という概念が提唱され、CKD 患者においては腎死 (すな

わち透析導入に至る) 高リスクであるのみならず、心血管合併症を引き起こすことによる生命予後に大きく関与することが明らかとなっている。その原因となる糸球体腎炎は様々な原因によって引き起こされるが、未だその分子学的メカニズムに関しては不明な点が多く、これらの免疫学的な発生機序を明らかにすることは、糸球体腎炎に対する病態を解明するのみならず、新たな糸球体腎炎に対する治療戦略が明らかになる可能性がある。

急速進行性糸球体腎炎は数週から数ヶ月の単位にて末期腎不全に至る糸球体腎炎症候群である。糸球体に半月体が形成し、非常に強い免疫応答が起こっている。これまでに、半月体形成部位においては、エフェクター CD4 陽性 T 細胞やマクロファージの浸潤が見られること (Arrizabalaga P, et al, Am J Nephrol, 1998)、腎生検によって得られた糸球体の mRNA レベルでは IFN \cdot の発現上昇と IL-4 発現の低下が見られること (Masutani K, et al, Clin Nephrol, 2003)、などより、半月体形成糸球体腎炎においては、Th1 優位な病変を呈することが報告されている (Holdsworth SR, et al, Kidney Int, 1999)。また、最近の検討により Th1/Th2 細胞表面マーカーとなりうる分子が注目され、病態解明ならびに治療への応用の観点から注目されている。このうちケモカイン受容体である CCR5 が Th1 細胞に強く発現し (Sallusto F, et al, Immunol. Today, 1998)、半月体形成細胞に浸潤し、リガンドである MIP-1 α と強い相関関係を示す。糸球体内に遊走した CCR5 陽性細胞は活性化され、細胞性免疫機序を介して半月体形成に関与することが明らかとなっている。

DNAM-1 も Th1 細胞に特異的に発現するとの報告も認められ (Dardalhon V, et al, J Immunol, 2005)、また、血管内皮細胞には DNAM-1 リガンドが発現していることから (Reymond N, et al, J exp med, 2004)、DNAM-1 が半月体形成に重要な役割を担っていることが推察される。一方、ヒト急速進行性糸球体腎炎に関するマウスモデルは近年報告されているが (Yumura W, et al, Microbiol Immunol, 2006)、それらの解析報告においても、病態形成におけるその詳細な免疫学的機序は十分に明らかとされていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでの知見を踏まえ、1) DNAM-1 が多くの免疫細胞に発現し、DNAM-1 リガンドと結合することによって炎症細胞の浸潤に関わること、2) CD4 陽性 T 細胞上および樹状細胞上の DNAM-1 は Th1 への分化増殖に関与すること、3) 急速進行性糸球体腎炎 (半月

体形成糸球体腎炎)は炎症細胞の浸潤およびTh1 優位な免疫応答を示すこと、4)DNAM-1はTh1 細胞に強く発現し、そのリガンドが血管内皮に発現していること、などから DNAM-1は急速進行性糸球体腎炎の発症メカニズムに深く関与していることを推察した。

本研究を行うにあたり、我々は世界に先駆けて DNAM-1 遺伝子欠損マウスを樹立した。DNAM-1 遺伝子欠損マウスを用いた報告はこれまでに例がなく、また現時点において即座に研究に用いることが可能である。腎炎惹起物質を投与した場合、DNAM-1 遺伝子欠損マウスにおいてはCD4 陽性T細胞上のTh1細胞への分化増殖が阻害されることや、樹状細胞からのサイトカイン産生の低下、マクロファージなどの炎症細胞の浸潤が抑制されることなどが想定されるため、糸球体腎炎の発症時期の遅延や症状の軽減が観察される可能性が考えられる。また、すでに我々はマウスにおいてDNAM-1とDNAM-1リガンドの結合を阻害するブロックモノクローナル抗DNAM-1抗体を既に作成しており、本抗体を全身性に投与を行う、すなわちDNAM-1とDNAM-1リガンドの結合阻害を行うことによって糸球体腎炎の形成が抑制される可能性が考えられ、将来的な急速進行性糸球体腎炎の重症化予防治療開発に貢献できることもあわせて期待される。

3. 研究の方法

本研究では急速進行性糸球腎炎におけるDNAM-1の役割に関して生体内における機能をより詳細に解析する目的でマウスモデルを用いて行った。解析対象としては、すでに作成したDNAM-1遺伝子欠損マウスを使用する系を用いて機能解析をすすめた。DNAM-1遺伝子欠損マウスを用いる系では、急速進行性糸球体腎炎惹起物質を野生型マウスあるいはDNAM-1遺伝子欠損マウスに投与後、惹起された腎炎の病勢に関して評価を行った。具体的には、蛋白尿および血尿の推移、血液中クレアチニン、尿素窒素などの生化学的検査、病理組織像の推移を観察した。

抗糸球体基底膜型腎炎の誘導方法は以下のように行った。

- (1) NRI(正常家兎血清)とCFA(Complete Freund H37 Rv)を1:1にてエマルジョンを作成した。
- (2) エマルジョンの混合時間は10~20分程度を目安とした。
- (3) エマルジョンは水中に垂らしても分散せず、個体を保てる状態とした。
- (4) マウス1匹あたり0.1mlずつ皮下投与した。投与の際には25G針をマウスの後足より挿入し、左右に半量ずつ投与した。

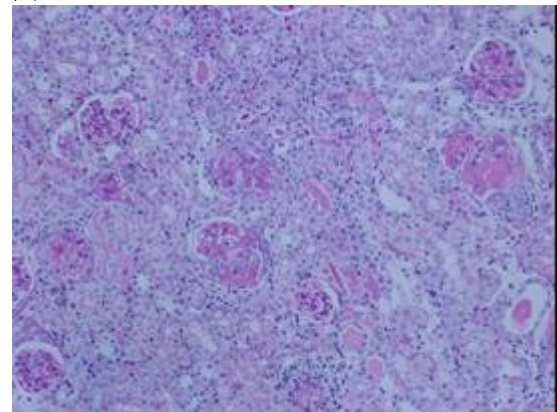
- (5) NRI投与後、5、6日目にNTS(抗糸球体基底膜抗体血清)を投与した。
- (6) まず、-80℃のNTSを溶解し、55度で30分非働化した。
- (7) 27G針で尾静脈より60μlずつ投与を行った。

4. 研究成果

まず、半月体形成糸球体腎炎の系の確立であるが、マウスをpolyclonalなrabbit抗体にて免疫1週間後、rabbit-anti GBM抗体(Ueda et al, Kidney Int, 2003)をマウスに免疫し、マウスにおける半月体形成糸球体腎炎を惹起した。投与するNTSの量が極めて重要であった。すなわち、150μl以上の高容量のNTSを投与すると野生型マウスにおいて約半数のマウスが死亡した。一方で、総投与量を80μl以下で行うと、半月体形成が十分に観察されなかった。よって、上記方法を用いて、免疫を行った。免疫1~2週間後には尿蛋白は+/-から2+程度に増加しており、腎炎が速やかに惹起していると考えられた。

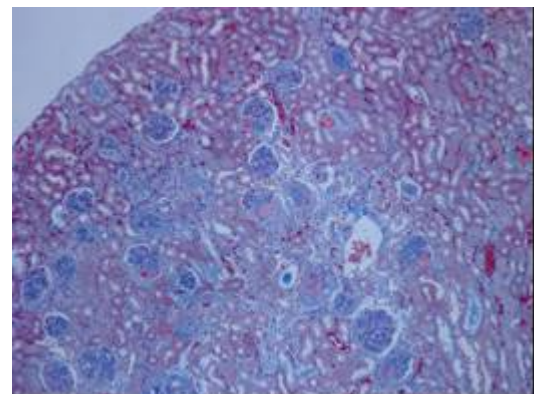
図1および図2に組織像を示す。

図1



(PAS200×)

図2



(Masson Trichrome 100×)

次に、野生型マウスあるいは DNAM-1 遺伝子欠損マウスを用いて半月体形成糸球体腎炎を惹起したところ、野生型マウスにおいては DNAM-1 遺伝子欠損マウスに比べて腎炎惹起の程度が強く認められた。病理組織像においても、半月体形成の出現率は野生型マウスにおいては DNAM-1 遺伝子欠損マウスに比べて高率に認められた。これらの所見から DNAM-1 は半月体形成糸球体腎炎の発症機序に関与していることが推察された。腎炎発症にかかわる DNAM-1 の関与に関する詳細なメカニズムに関しては、現在さらに検討中である。

本研究により、半月体形成糸球体腎炎への DNAM-1 の関与が明らかとなり、その病態をより明らかにすることや、ひいては将来的な治療に結びつくことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 平康 (KAI HIRAYASU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師

研究者番号：60510138