

半月体形成性腎炎におけるp38 mitogen-activated protein kinaseの意義

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4584

半月体形成性腎炎における p38 mitogen-activated protein kinase の意義

金沢大学医学部医学科内科学第一講座(主任：小林健一教授)

坂 井 宣 彦

p38MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) は主要な細胞内シグナル伝達因子である MAPK ファミリーのひとつである。p38MAPK は炎症性サイトカインなどの様々な細胞外刺激によりリン酸化される。このリン酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) は NF- κ B (nuclear factor- κ B) といった核内転写因子活性化を介してサイトカイン、ケモカインならびに接着因子の産生に関与する。本研究ではヒト半月体形成性腎炎の病態における p38MAPK の意義、ならびにその抑制効果を実験半月体形成性腎炎を用いて検討した。ヒト半月体形成性腎炎において、p-p38MAPK は半月体部、尿細管上皮細胞および間質浸潤単核球の核内に認められ、その糸球体内 p-p38MAPK 陽性細胞数は糸球体あたり 4.2 ± 0.4 個であった。一方、微小変化型ネフローゼ症候群においては 0.9 ± 0.1 個であった ($p < 0.01$)。この p-p38MAPK 陽性細胞の一部は CD68 もしくは CCR5 陽性であった。糸球体内 p-p38MAPK 陽性細胞数は細胞性半月体形成率 ($r = 0.551$, $p < 0.01$, $n = 34$)、CD68 陽性細胞数 ($r = 0.587$, $p < 0.01$, $n = 34$) および尿中 MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) 値 ($r = 0.689$, $p < 0.01$, $n = 20$) と正の相関を示した。さらに、活性型 NF- κ B は半月体部、尿細管上皮細胞および間質浸潤単核球に認められ、糸球体内活性型 NF- κ B 陽性細胞数は p-p38MAPK 陽性細胞数と正相関した ($r = 0.639$, $p < 0.01$, $n = 34$)。またステロイド治療により、疾患活動性の低下に一致して p-p38MAPK および NF- κ B 陽性細胞数、尿中 MIP-1 α 値は有意に低下した (各々 $p < 0.01$)。続いて、ラット培養メサンギウム細胞を用いて p38MAPK リン酸化ならびに FR167653 によるリン酸化抑制効果を検討した。IL-1 β 存在下で p38MAPK はリン酸化され、FR167653 前処置により、このリン酸化(活性化)が著明に抑制された。続いてウイスター京都ラットに半月体形成性腎炎を作製し、FR167653 による p38MAPK リン酸化抑制に基づく腎炎治療効果を検討した。対照であるメチルセルロース投与群 (VE 群) では腎炎惹起後 6 日において、p38MAPK リン酸化を半月体部、尿細管上皮細胞および間質浸潤単核球に認め、糸球体当たりの陽性細胞数は 11.5 ± 0.3 個であった。一方、FR167653 (32mg/kg) 6 日間連続皮下投与群 (FR 群) においては腎糸球体の p38MAPK リン酸化抑制が認められた (2.7 ± 0.5 個, $p < 0.01$)。さらに MIP-1 α は、VE 群において半月体部および浸潤単核球に蛋白発現を認めたが、FR 群ではその発現が抑制された。また FR 群において 6 日目の半月体形成ならびに 56 日目の糸球体硬化・間質線維化が抑制され、腎機能の保持効果が確認された。以上の結果より、半月体形成性腎炎の発症・進展に p38MAPK リン酸化を介した活性型 NF- κ B および MIP-1 α の関与が示された。くわえて、p38MAPK が半月体形成性腎炎の新しい治療標的分子となりうることが示唆された。

Key words crescentic glomerulonephritis, p38 mitogen-activated protein kinase, nuclear factor- κ B, macrophage inflammatory protein-1 α , CCR5

MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) は、細胞外刺激を核内転写因子群に伝えるシグナル伝達機構の中心として重要な役割をはたしている¹⁾。MAPK は、MAPK キナーゼ (MAPKK) によりリン酸化され活性型となり、さらに MAPKK も MAPKK キナーゼ (MAPKKK) により活性化される。これら MAPK, MAPKK および MAPKKK からなるカスケードは、MAPK カスケードと総称されている¹⁾。近年、MAPK には 3 つのサブグループ、すなわち ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK/SAPK (c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase) ならびに p38MAPK が存在する事が明らかとなってきた¹⁾²⁾。このうち p38MAPK は、培養条件下において腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α やイン

ターロイキン (interleukin, IL) -1 β といった炎症性サイトカイン刺激によりリン酸化される³⁾⁴⁾。リン酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) は核内に移行して、AP-1 (activating protein-1) や NF- κ B (nuclear factor- κ B) といった核内転写因子を活性化する。その結果、サイトカイン、ケモカインおよび接着因子といった遺伝子発現を調節する^{5)~9)}。実際、これまで慢性関節リウマチ、シエーグレン症候群といったヒト疾患およびその動物実験モデルにおいて、その炎症過程にはたす p38MAPK のリン酸化の関与が報告されている^{10)~12)}。しかしながら、腎疾患にはたす p38MAPK の役割については十分に明らかとなっていない。

半月体形成性腎炎は急速に腎機能が低下する予後不良な疾患群であり、その病態解明や予後改善は臨床上的重要な課題の一

平成 12 年 11 月 24 日受付, 平成 12 年 12 月 28 日受理

Abbreviations: BUN, blood urea nitrogen; IL, interleukin; m-PSL, methylprednisolone; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCNS, minimal change nephrotic syndrome; MCP-1, monocyte chemoattractant

つである¹³⁾。IL-1 β およびTNF- α は、活性化単球/マクロファージ、リンパ球のみならず腎固有細胞である尿管上皮細胞やメサングウム細胞からも産生され、半月体形成性腎炎の病態に重要な役割をはたしていることが明らかとなってきた^{14)~16)}。くわえてマクロファージ、T細胞の遊走・活性化因子であるMIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α)は、培養条件下においてIL-1 β 、TNF- α 刺激により、免疫担当細胞や腎固有細胞で産生される^{17)~20)}。さらに培養細胞だけでなく、実験腎炎モデル^{21)~23)}に加えてヒト半月体形成性腎炎の発症・進展、ことに極期の細胞性半月体形成に特異的に関与する事が指摘されている²⁴⁾。また、MIP-1 α がNF- κ B活性化により発現調節をうけていることにくわえ、MIP-1 α の受容体、CCR (C-C chemokine receptor)5のシグナル伝達機構においてp38MAPKのリン酸化が関与することが示されている²⁵⁾。以上より、半月体形成性腎炎の発症・進展において重要なサイトカイン、ケモカインの発現調節が、p38MAPKのリン酸化と、それに続くNF- κ B活性化を介している可能性が考えられるが、目下のところその詳細な機序は不明である。

ところでIL-1 β とTNF- α の産生阻害剤として当初開発されたFR167653 (1-[7-(4-fluorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-8-pyridylpyrazolo[5,1-c][1,2,4]triazin-2-yl-2-phenylethanedione sulfate monohydrate)は、IL-1 β およびTNF- α の産生抑制を介して、実験敗血症モデルにおいて血圧低下、死亡率改善、播種性血管内凝固モデルにおいて血小板数低下の抑制効果をもたらすことが報告されている²⁶⁾²⁷⁾。最近の報告により、FR167653と類似の構造を持つSB203580 (4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl) imidazole)が、IL-1 β 、TNF- α 産生阻害作用を有し、その機序としてp38MAPKの活性化抑制であることが明らかとなった²⁸⁾。しかしながら、FR167653によるp38MAPKリン酸化におよぼす影響ならびに腎疾患に対する有効性については、明らかとなっていない。

そこで本研究では、ヒト半月体形成性腎炎における、MIP-1 α を介したp38MAPKリン酸化ならびにNF- κ B活性化の病態への関与と、ウイスター京都(Wistar-Kyoto, WKY)ラットを用いた実験半月体形成性腎炎における、FR167653の治療効果とその機序について検討した。

対 象 と 方 法

I. ヒト半月体形成性腎炎における検討

1. 対象

1971年1月から2000年3月までに金沢大学およびその関連施設に入院し、腎組織生検または剖検にて、全糸球体の50%以上に半月体形成を認め臨床的に急速進行性糸球体腎炎症候群 (rapidly progressive glomerulonephritis)を呈した34例(男性18例, 女性16例, 平均年齢61.1歳)を対象とした(表1)。半月体形成性腎炎の内訳は、抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody)関連型25例, 免疫複合体(immune complex)型9例であった。くわえて尿蛋白3.5g/日以上を呈した微小変化型ネフローゼ症候群(minimal change nephrotic syndrome, MCNS)の3例(男性1例, 女性2例, 平均年齢32.6

歳)を疾患コントロールとして用いた(表1)。さらに検尿異常のない健常者20例(男性11例, 女性9例, 平均年齢57.1歳)を正常コントロールとした(表1)。

2. 病理組織学的検討

光学顕微鏡, 電子顕微鏡および免疫蛍光抗体法による観察は通常の方法に従った²⁹⁾。また半月体の記載に関しては、世界保健機構(WHO)の基準に準じて細胞性, 線維細胞性および線維性の3型に分類し³⁰⁾、観察可能であった全糸球体に占める半月体を有する糸球体の割合を半月体形成率とした。

3. 免疫組織学的検討

腎におけるp38MAPK, p-p38MAPKおよび活性化NF- κ B陽性細胞の局在を同定するため、パラフィン包埋された組織を脱パラフィン化し、抗原賦活緩衝液(DAKO, Glostrup, Denmark)にて処理後、抗ヒトp38MAPKマウスモノクローナル抗体(10 μ g/ml) (SantaCruz Biotechnology inc., Santa Cruz, USA), 抗ヒト p-p38MAPKマウスモノクローナル抗体(10 μ g/ml) (SantaCruz Biotechnology inc.)および抗ヒトNF- κ B (p65サブユニット)マウスモノクローナル抗体(10 μ g/ml) (Chemicon, Tamecula, USA)を用いた間接アビチン-ビオチンペルオキシダーゼ法を行った²⁴⁾。さらにp-p38MAPK陽性細胞を詳細に検討する目的で、抗ヒトCD68マウスモノクローナル抗体(clone KP1) (10 μ g/ml) (DAKO)もしくは抗ヒトCCR5マウスモノクローナル抗体(10 μ g/ml) (Pharmingen, San Diego, USA)を用いて二重染色を行った。すなわち、CD68抗原ないしCCR5抗原を間接アビチン-ビオチンアルカリフォスファターゼ法にて染色した後²⁴⁾、p-p38MAPK抗原をアビチン-ビオチンペルオキシダーゼ法にて染色した。本染色の特異性を検討する目的で、マウスコントロールIgGを用いた免疫組織染色を行った。なお糸球体内マクロファージは全糸球体内のCD68陽性細胞数を計測し、糸球体一個当たりとして表した。

Table 1. Patient demographics

Groups	No. of patients (male: female)	Age
Crescentic GN	34 (18: 16)	61.1 $\pm$ 3.1
ANCA-related	25 (12: 13)	63.8 $\pm$ 2.9
MPO-ANCA	24 (11: 13)	
PR3-ANCA	1 (1: 0)	
Immune complex type	9 (6: 3)	53.3 $\pm$ 8.3
Lupus nephritis	3 (2: 1)	
IgA nephropathy	5 (4: 1)	
Cryoglobulinemia	1 (0: 1)	
Non-crescentic GN	3 (1: 2)	
MCNS	3 (1: 2)	32.6 $\pm$ 10.5
Healthy subjects	20 (11: 9)	57.1 $\pm$ 3.8
Total	57 (30: 27)	58.1 $\pm$ 2.5

Values are given as $\bar{X} \pm \text{SEM}$.

GN, glomerulonephritis; ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibody; MPO, myeloperoxidase; PR3, proteinase 3; MCNS, minimal change nephrotic syndrome.

protein-1 ; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1 α ; NF- κ B, nuclear factor- κ B ; PAS, periodic acid Schiff ; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction ; TGF- β , transforming growth factor- β ; TNF, tumor necrosis factor ; WKY, Wistar-Kyoto

4. 尿中MIP-1 α 測定

治療前検体として腎生検日に早朝中間尿を10ml採取し、室温で5分間遠心し細胞成分を除去した後、上清を-70℃で測定日まで保存した。測定はELISA法により行った²⁰⁾。平底型マイクロプレートウエル(Nunc, Roskilde, Denmark)に抗ヒトMIP-1 α マウスモノクローナル抗体を固相化し、試料を加え4℃で一晩反応させた。各ウエルを洗浄した後、抗ヒトMIP-1 α ウサギポリクローナル抗体を加えた。再度洗浄の後、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体を加え、1M ジェタノールアミン(pH9.8)に1mg/mlリン酸p-ニトロフェニールを添加した基質で発色させた。発色後、マルチプレートリーダーにて吸光度(405nm)を測定し、尿中クレアチニン値で補正した。なお、MIP-1 α の測定感度は66pg/ml以上であり、健常者20例(表1)の尿を正常コントロールとした。また、半月体形成性腎炎ではステロイドパルス療法を含む免疫抑制療法後に検体を採取しえた12例に対して、治療前後で尿中MIP-1 α 値を測定した。

5. ANCA同定

ミエロペルオキシダーゼないしプロテイナーゼ3を固相化したプレートを用いたELISA法にて測定した(SRL Co., 東京)³¹⁾。

6. 治療

半月体形成性腎炎群では、全例にメチルプレドニゾン(methylprednisolone, m-PSL)パルス療法(500-1000mg/日, 3日間)に加え、経口プレドニゾン療法(20-40mg/日)を施行した。

II. ラット培養メサングウム細胞における検討

1. 実験プロトコル

10週齢の雄性Sprague-Dawleyラット(日本チャールス・リバー、東京)の腎皮質より、Tomosugiら³²⁾の方法に従いメサングウム細胞を採取した。培養は補体非働化10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum) (Gibco, New York, USA)を含むRPMI1640 (Gibco) 培地中にて、37℃, 5% CO₂存在下で行った。なお、実験には5-10継代目の細胞を用いた。実験は0.25% FBSを含むRPMI1640培地で24時間培養し、静止期とした後行った³²⁾。FR167653(1 $\times$ 10⁻⁶M)存在下もしくは培地単独で1時間前処置し、その後1.1ng/mlラットリコンビナントIL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, USA)で10分間刺激し、各々IL-1+FR群、IL-1単独群とした。なお、FR167653 (1 $\times$ 10⁻⁶M)存在下もしくは培地単独で1時間前処置した後、IL-1 β 未添加にて10分間処理した群を各々FRコントロール群、培地コントロール群とした。

2. 免疫組織学的検討

ラット培養メサングウム細胞におけるp38MAPKおよびp-p38MAPK発現を検討する目的で、抗p38MAPKマウスモノクローナル抗体(10 μ g/ml) (SantaCruz Biotechnology inc.), 抗p-p38MAPKマウスモノクローナル抗体(10 μ g/ml) (SantaCruz Biotechnology inc.)を用いて間接アビチン-ビオチンペルオキシダーゼ法を施行した³³⁾。

3. ウエスタンブロッティング法

ラット培養メサングウム細胞のp38MAPKリン酸化に対するIL-1 β の影響およびFR167653の効果を検討する目的で、ウエスタンブロッティングを施行した。ラット培養メサングウム細胞をジチオトレイトール(dithiothreitol, 和光, 大阪)100mMと、等量の電気泳動用還元緩衝液(1M Tris-HCl, 50% グリセロール, 10% SDS(pH7.4)で95℃, 5分間処理し、泳動試料とした。SDS-

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は15%ポリアクリルアミドゲルを用いておこない、分離された蛋白質をpolyvinylidene difluoride (PVDF) 膜(アトー, 東京)に転写した。転写後、1%ウシ胎児血清(Gibco)と60分間反応させた。一次抗体として抗p38MAPKウサギポリクローナル抗体(New England Biolabs, Cambridge, USA)および抗p-p38MAPKウサギポリクローナル抗体(New England Biolabs)を用い反応させ、ペルオキシダーゼ法にて発色した³³⁾。

III. ラット半月体形成性腎炎モデルにおける検討

1. 対象動物

10週齢の雄性WKYラット(日本チャールス・リバー)を用い、通常固形飼料(オリエンタル酵母, 東京), 自由飲水で飼育した。飼育は代謝ケージ内で行った。

2. 抗ラット糸球体基底膜抗体の精製

ラット糸球体基底膜はKrakowerら³⁴⁾の方法にしたがって分離し、得られた糸球体基底膜(湿重量25mg)を完全フロイトアジュバントとともに日本白色家兎に皮下投与し、引き続き不完全フロイトアジュバントで溶解した糸球体基底膜を1週ごとに計3回皮下投与した。そして最終投与7日後に血清を採取し、正常ラットの糸球体基底膜に沿って線状に沈着することを間接免疫蛍光抗体法で確認した³⁵⁾。56℃に加熱して補体を非働化した後、以下の実験に用いた。なお非特異的抗体を除去するため、得られた血清をラット赤血球およびウサギ肝粉末により吸収した。

3. 半月体形成性腎炎モデルの作製

WKYラット22匹に抗糸球体基底膜抗体を含む血清0.1mlを静脈内投与することにより半月体形成性腎炎を作製し、これを0日目とした。この際、32mg/kgのFR167653 (FR群;10匹)もしくはコントロールとして溶媒であるメチルセルロース単独 (VE群;12匹)を0日目より5日目まで連日皮下投与した。その後腎炎惹起6日目にFR群6匹、VE群8匹を屠殺し血清ならびに腎組織を得た。さらに腎炎惹起56日目にFR群4匹、VE群4匹を屠殺し、同様に血清ならびに腎組織を得た。また、腎炎惹起前および惹起後6日目、14日目、28日目、42日目、56日目に24時間蓄尿を行い、尿試料を得た。なお、週齢を一致させたWKYラット6匹を正常コントロールとした。

4. 病理組織学的検討

1) 光学顕微鏡による検討

腎組織の一部は10%ホルマリンにて固定しパラフィン包埋した後、薄切し過ヨウ素酸シッフ(periodic acid Schiff, PAS)染色し、組織学的検討を行った。観察可能であった全糸球体に占める半月体を有する糸球体の割合を半月体形成率とした。また糸球体硬化はPAS陽性メサングウム基質の糸球体に占める割合が0%, 0から25%以下, 25から50%以下, 50から75%以下および75から100%以下のものをそれぞれ0, 1, 2, 3, 4度とスコア化し、同一スコアの糸球体数をそれぞれN0, N1, N2, N3, N4(総数50個)とし、以下の計算式にて糸球体硬化スコアをえた³⁶⁾。
糸球体硬化スコア = (0 $\times$ N0+1 $\times$ N1+2 $\times$ N2+3 $\times$ N3+4 $\times$ N4) / 50
また、間質病変については、線維化および尿細管萎縮の程度をそれぞれ、なし、斑状、帯状、びまん性の4段階に分け、それぞれ0, 1, 2, 3度とスコア化した。

2) 蛍光抗体法による検討

腎組織の一部の新鮮標本をOCTコンパウンドに包埋し、ド

ライアスーアセトンで冷却したn-ヘキサンにより凍結した後、クリオスタット(Tissue-Tek Systems, Miles, Naperville, USA)により4 μ mに薄切した。その凍結薄片標本を、単球およびマクロファージの標識抗体として抗ED-1抗体(BMA Biomedicals Ltd., Switzerland)を用いて免疫染色した。30個の糸球体を観察し陽性細胞を糸球体1個当たりの平均値で示した。さらに、FITC標識抗ウサギIgG抗体、抗ラットIgG抗体、抗C3抗体(Organon Teknika Corporation, Burlingame, USA)によりウサギIgG、ラットIgG、C3の糸球体への沈着を0;なし, 1;軽度, 2;中等度, 3;高度沈着の4段階で半定量的に評価し平均点で検討した。

5. 免疫組織学的検討

摘出腎におけるp38MAPK, p-p38MAPKおよびMIP-1 α の局在を同定する目的で、パラフィン包埋された組織を脱パラフィンし、抗原賦活緩衝液(DAKO)にて処理後、抗p38MAPKマウスモノクローナル抗体(10 μ g/ml)(SantaCruz Biotechnology inc.), 抗p-p38MAPKマウスモノクローナル抗体(10 μ g/ml)(SantaCruz Biotechnology inc.)および抗MIP-1 α ヤギモノクローナル抗体(10 μ g/ml)(SantaCruz Biotechnology inc.)を用いて間接アビチン-ビオチンペルオキシダーゼ法もしくは間接アビチン-ビオチンアルカリフォスファターゼ法にて染色した²⁴⁾。

6. 腎内MIP-1 α mRNA発現の検討

1) プライマー

ラットMIP-1 α のcDNA塩基配列より、MIP-1 α の5'プライマーとしてTGCTGTTCTTCTCTGCACCAT, 3'プライマーとしてGTCTCTTTGGGGTCAGCGCAを用いた³⁷⁾。なお対照としてラットglyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)を用い、その5'プライマーとしてCTCTACCCACGGCAAGTTCAA, 3'プライマーとしてGGGATGACCTTGCCACAGCを用いた³⁷⁾。

2) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法

腎炎惹起6日目の各群ラットの腎皮質より全RNAをグアニジン-フェノール法³⁸⁾によって抽出し、RT-PCR法にてMIP-1 α の遺伝子発現を検討した。RNA PCRキット (AMV) Ver.2.1 (宝酒造, 京都)を用い、ランダムヘキサマーを上流プライマーとした逆転写酵素反応を行い、cDNAを合成した。この際、各ラット1 μ gの全RNAを用い、各群の総RNAを鋳型として逆転写酵素にてcDNAを合成した。次に各mRNAに特異的なプライマーを用いて、cDNA1 μ gに対し、Taq DNAポリメラーゼにてPCR反応を行った。PCR反応は、熱変性を94℃で1分間、アニーリングを54℃で1分間、DNAの伸長を72℃で2分間を1サイクルとしてMIP-1 α は33サイクルで行った²²⁾。得られたPCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色をおこなった。なお、23サイクルで増幅したGAPDHを対照とした²²⁾。

7. 蛋白尿, 血清尿素窒素(blood urea nitrogen, BUN)およびクレアチニンの測定

代謝ゲージにて24時間蓄尿した尿の一部を用いて1500回転/分、5分間で遠心し、細胞成分を除去した後、上清を-70℃で測定まで保存した。尿蛋白濃度はピロガロールレッド法にて測定し、24時間排泄量で示した³⁹⁾。BUN、クレアチニンは自動解析機(日立, 東京)によって測定した。

IV. 統計学的処理

統計処理は、Student's *t* 検定, ANOVA 検定, Pearson 相関係数およびSpearmanの順位相関により行った。また、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。なお、数値は平均 $\pm$ 標準誤差で示した。

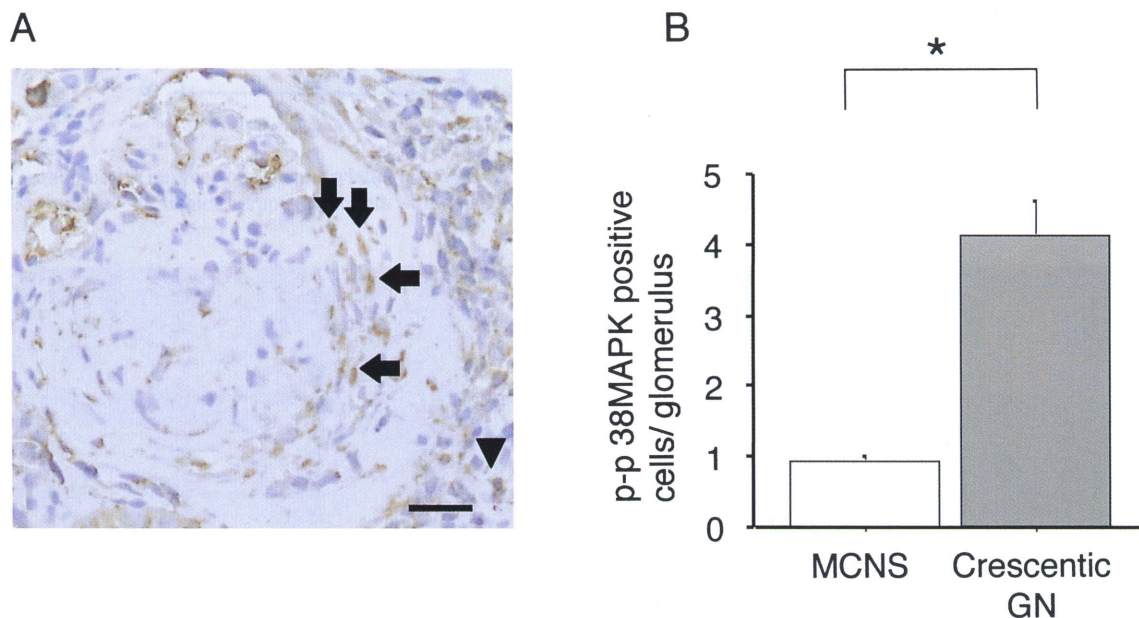


Fig.1. (A) Immunohistochemical examination of phosphorylated p38 MAPK in a representative patient with crescentic glomerulonephritis. Phosphorylated p38 MAPK positive cells were detected mainly in crescentic lesions (arrows) and interstitial mononuclear infiltrates (arrowhead). Scale bar indicates 20 μ m. (B) The number of phosphorylated p38 MAPK positive cells in glomeruli is shown in patients with crescentic glomerulonephritis (n=34) and minimal change nephrotic syndrome (n=3). * $p < 0.01$.

成 績

I. ヒト半月体形成性腎炎の検討

1. p38およびp-p38MAPK発現

腎局所でのp38およびp-p38MAPKの局在を免疫組織学的に検討した。半月体形成性腎炎においてp-p38MAPKは、糸球体半月体部細胞核や尿細管上皮細胞核、および間質内浸潤単核球核に陽性所見を認めた(図1A)。また糸球体当たりのp-p38MAPK陽性細胞数は半月体形成性腎炎 4.2 ± 0.4 個であり、微小変化型ネフローゼ症候群においては 0.9 ± 0.1 個($p<0.01$)と低値であった(図1B)。一方、p38MAPKは、半月体形成性腎炎、微小変化型ネフローゼ症候群ともに糸球体内細胞の細胞質および尿細管上皮細胞の細胞質で陽性であり陽性細胞数は両者に差を認めなかった(図2A, B)。

2. p-p38MAPK陽性細胞数と病理組織所見との相関

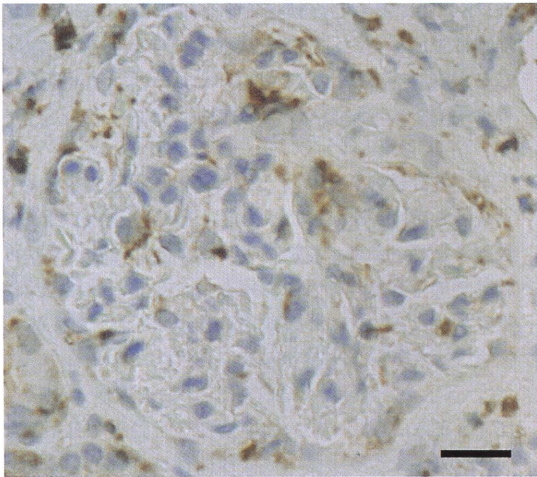
糸球体内p-p38MAPK陽性細胞数は細胞性半月体形成率と正相関を示した($r=0.551$, $p<0.01$, $n=34$, 表2)。しかし、線維細胞性・線維性半月体形成率とは相関を認めなかった(表2)。さらに糸球体内p-p38MAPK陽性細胞数は糸球体内CD68陽性細胞数

Table 2. Correlation of glomerular p-p38MAPK positive cells with pathological findings and urinary MIP-1 α levels

Parameters	r
Glomerulus	
Total crescents	0.118**
Cellular	0.551*
Fibrocellular/fibrous	-0.366**
CD68 positive cells	0.587*
NF- κ B positive cells	0.639*
Urinary MIP-1 α	0.689*

* $p<0.01$. **Not significant.

A



B

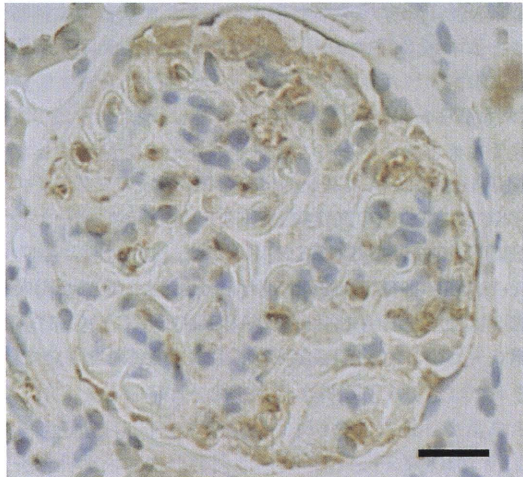
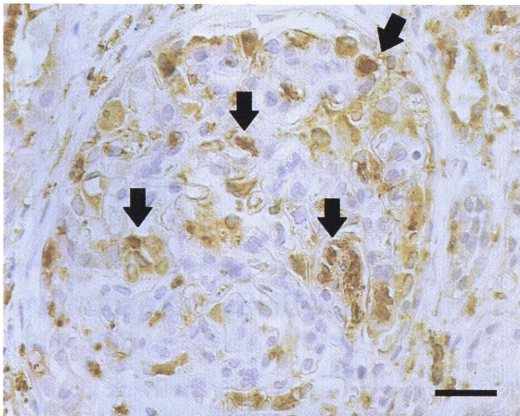


Fig.2. Immunohistochemical examination of p38 MAPK in a representative patient with crescentic glomerulonephritis (A) and minimal change nephrotic syndrome (B). Scale bar indicates 20 μ m.

A



B

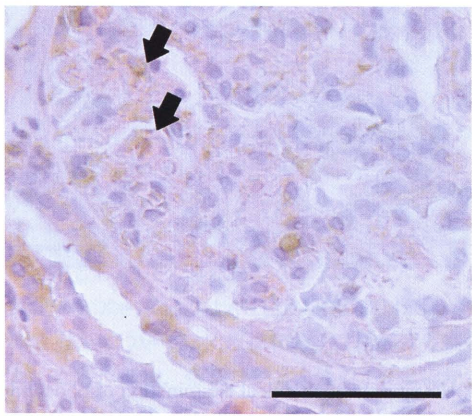


Fig.3. Dual stainings in human crescentic glomerulonephritis. A dual staining of phosphorylated p38 MAPK and CD68 (arrows) (A). A dual staining of phosphorylated p38 MAPK and CCR5 (arrows) (B). Scale bar indicates 20 μ m.

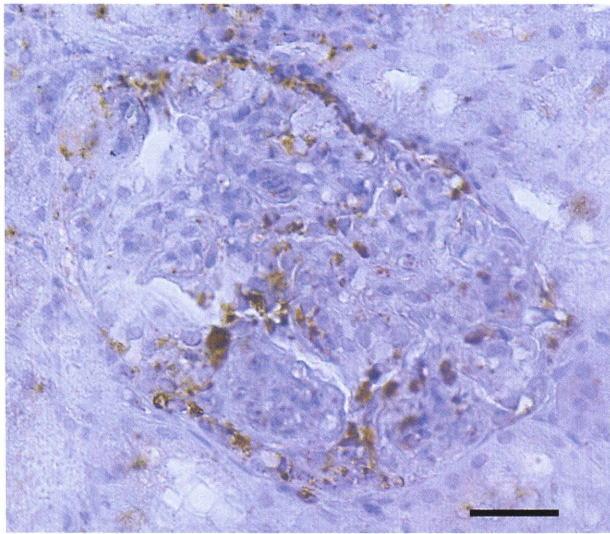


Fig.4. Detection of NF- κ B positive cells in glomeruli. NF- κ B active form positive cells were detected mainly in crescentic lesions, tubular epithelial cells and interstitial mononuclear infiltrates in a representative patient with crescentic glomerulonephritis. Scale bar indicates 20 μ m.

と正相関を示した($r=0.587$, $p<0.01$, $n=34$, 表2).

3. 二重染色

p-p38MAPK 陽性細胞を詳細に検討する目的で, p-p38MAPK と CD68 ないし p-p38MAPK と CCR5 の二重染色を施行した. p-p38MAPK 陽性細胞の一部は CD68 陽性細胞であった(図 3A). 一方, CCR5 陽性細胞の大部分は p-p38MAPK 陽性細胞であった(図 3B).

4. p-p38MAPK 陽性細胞数と尿中 MIP-1 α 値との相関

治療前尿中 MIP-1 α 値は, 半月体形成性腎炎において測定した 20 例中 13 例で陽性であり, $4.2 \pm 2.2 \text{ pg/mg} \cdot \text{クレアチニン}$ であった. 一方, MCNS および健常者においては全例測定感度以下であった. また m-PSL パルス療法を含むステロイド療法により, 治療後尿中 MIP-1 α 値は $0.1 \pm 0.1 \text{ pg/mg} \cdot \text{クレアチニン}$ へと低下し, 疾患活動性の低下に一致した($p<0.01$). 一方で治療前半月体形成性腎炎において p-p38MAPK 陽性細胞数は尿中 MIP-1 α 値と正相関を示した($r=0.689$, $p<0.01$, $n=20$, 表2).

5. 活性型 NF- κ B 発現

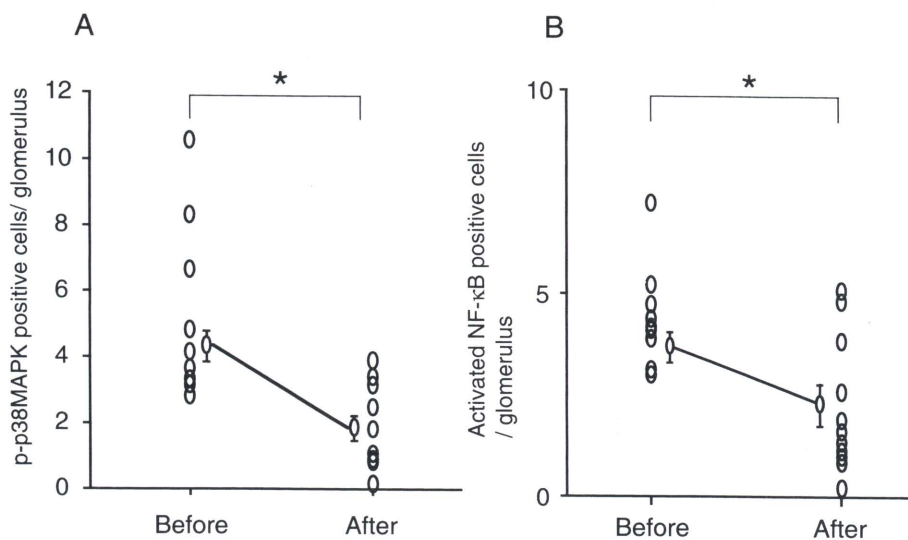


Fig.5. Alteration of the number of phosphorylated p38 MAPK positive cells in glomeruli (A) and activated NF- κ B positive cells in glomeruli (B) following glucocorticoid therapy in patients with crescentic glomerulonephritis. Bars indicate $\bar{X} \pm \text{SEM}$. * $p<0.01$.

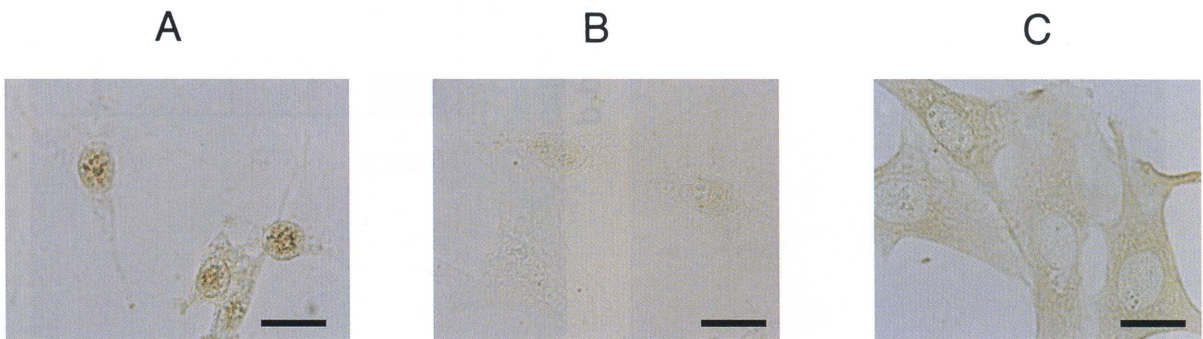


Fig.6. Immunocytochemical examination of p38 and phosphorylated p38 MAPK in cultured rat mesangial cells. Phosphorylated p38 MAPK was detected in the nuclei of IL-1 β -treated cell (A). In contrast, the pre-treatment of FR167653 reduced the phosphorylation of p38 MAPK (B). p38 MAPK was detected mainly in cytoplasm under any conditions (C). Scale bar indicates 10 μ m.

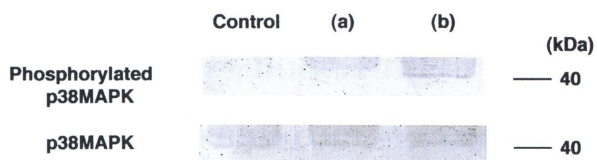


Fig.7. Detection of p38 and phosphorylated p38 MAPKs in cultured mesangial cells by Western blotting analysis. Phosphorylated p38 MAPK was detected in IL-1 β -treated cells (lane b). In contrast, phosphorylated p38 MAPK was reduced by the pre-treatment of FR167653 (lane a) and was absent (control). In contrast, p38 MAPK was detected under any conditions.

半月体形成性腎炎において活性型NF- κ Bは、糸球体半月体部細胞核や尿細管上皮細胞、および間質内浸潤単核球細胞核に陽性所見を認めた(図4)。また糸球体内p-p38MAPK陽性細胞数は糸球体内活性型NF- κ B陽性細胞数と正相関を示した($r=0.639$, $p<0.01$, $n=34$, 表2)。

6. ステロイド治療に伴うp-p38MAPKおよび活性型NF- κ Bの動態

半月体形成性腎炎34例全例にm-PSLパルス療法を含むステロイド療法を施行した。そのうち12例(男性5例, 女性7例)は、治療前後で腎生検を施行した。糸球体内p-p38MAPK陽性細胞

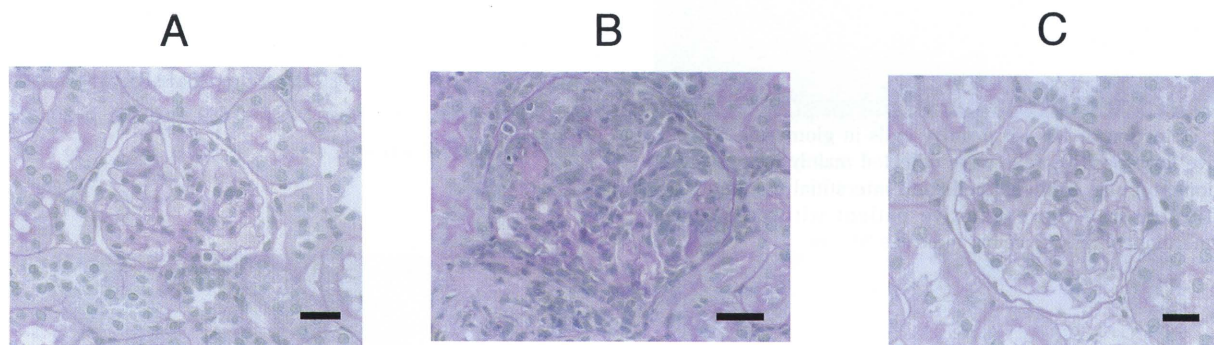


Fig.8. Histopathology of experimental crescentic glomerulonephritis of rats on day 6. Severe necrotizing lesions and crescentic formation were detected in vehicle-treated rats (B) in contrast to normal rats (A). FR167653-treated rats had less renal changes (C). PAS staining. Scale bar indicates 20 μ m.

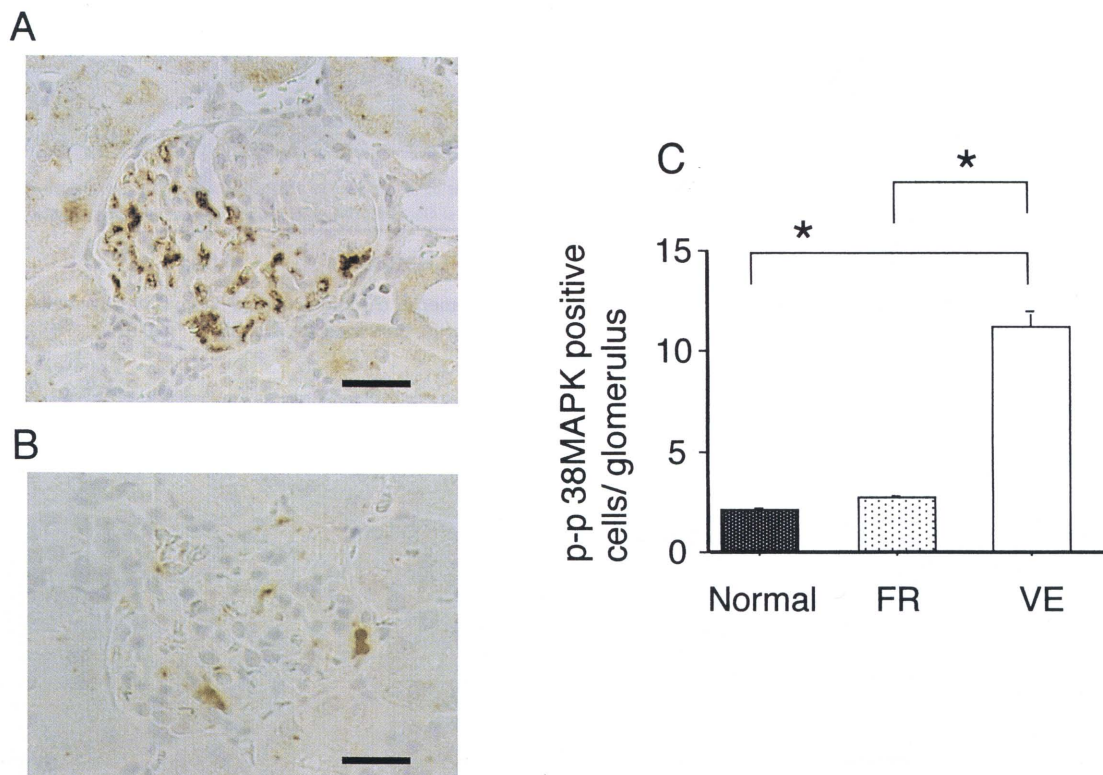


Fig.9. Immunohistochemical detection of phosphorylated p38 MAPK in diseased rat kidneys on day 6. In rats treated with vehicle, phosphorylated p38 MAPK positive cells were detected in crescentic lesions (A). In contrast, in rats treated with FR167653, phosphorylated p38 MAPK was significantly decreased (B, C). Scale bar indicates 20 μ m. * $p<0.01$.

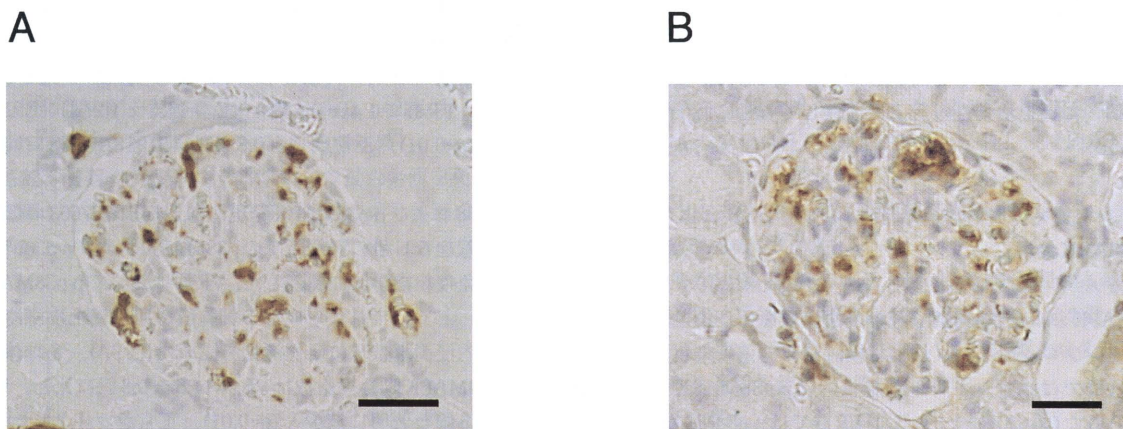


Fig.10. Immunohistochemical examination of p38 MAPK in diseased rat kidneys. p38 MAPK was detected in glomeruli and tubular epithelial cells in rats both treated with vehicle (A) and FR167653 (B). The number of p38 MAPK did not differ between those rats. Scale bar indicates 20 μ m.

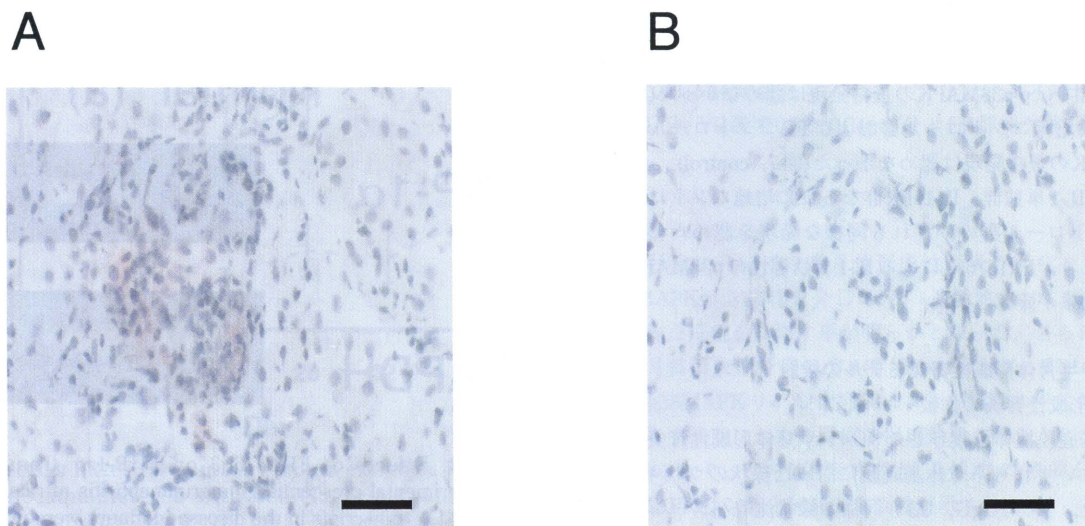


Fig.11. Immunohistochemical examination of MIP-1 α in diseased rat kidneys. In rats treated with vehicle, MIP-1 α positive cells were detected in glomeruli, especially in crescentic lesions on day 6 (A). In contrast, MIP-1 α positive cells were faintly detected in rats treated with FR167653 (B). Scale bar indicates 20 μ m.

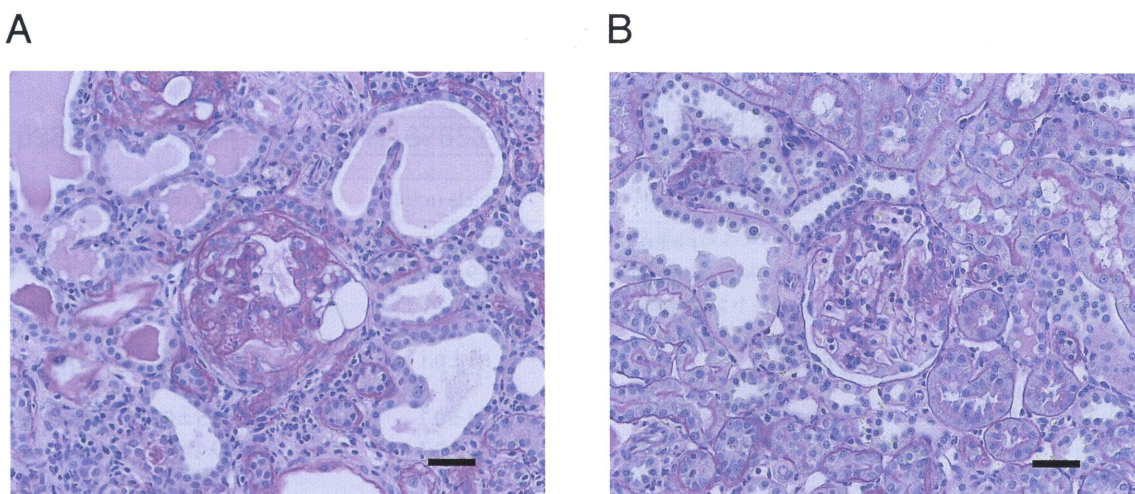


Fig.13. Histopathology of experimental crescentic glomerulonephritis of rats on day 56. Glomerulosclerosis and interstitial fibrosis were the most prominent in rats administered with vehicle (A). In contrast, by the administration of FR167653, the severity of renal changes was reduced (B). PAS staining. Scale bar indicates 20 μ m.

数は、治療前 4.7 ± 0.6 個から治療後 2.1 ± 0.4 個へと疾患活動性の低下に一致して有意に低下した ($p < 0.01$, 図 5A). 同様に、糸球体内活性型 NF- κ B 陽性細胞数も治療前 4.4 ± 0.3 個から治療後 2.2 ± 0.5 個へと疾患活動性の低下に一致して有意に低下した ($p < 0.01$, 図 5B).

II. ラット培養メサンギウム細胞における p38 および p-p38MAPK 発現

ラット培養メサンギウム細胞を IL-1 β 1.1ng/ml で 10 分間刺激し、p38MAPK および p-p38MAPK の蛋白発現を免疫染色法およびウエスタンブロッティング法にて検討した。免疫染色法にて、IL-1 単独群ではメサンギウム細胞核内に p-p38MAPK の陽性所見が得られた (図 6A). 一方、IL-1+FR 群では p-p38MAPK は認めなかった (図 6B). IL-1 β を投与しなかった培地コントロール群および FR コントロール群では、いずれも p-p38MAPK は認めなかった。p38MAPK についても同様に検討したところ、IL-1 単独群、IL-1+FR 群ならびに培地コントロール群、FR コントロール群いずれも主として細胞質に陽性所見が得られた (図 6C). ウエスタンブロッティング法でも免疫染色法と同様に、IL-1 単独群では p-p38MAPK の蛋白発現を認めたが (図 7, lane b), IL-1+FR 群では p-p38MAPK の蛋白発現は認めなかった (図 7, lane a). なお培地コントロール群および FR コントロール群では p-p38MAPK の蛋白発現は認めなかった (図 7, control). 一方、p38MAPK は IL-1 単独群、IL-1+FR 群ならびに培地コントロール群、FR コントロール群のいずれも同様な発現を認めた (図 7). 以上の結果より、FR167653 による IL-1 β 誘導性の p38MAPK リン酸化抑制効果が確認された。

III. ラット半月体形成性腎炎モデルの検討

1. 半月体形成性腎炎の作製

抗糸球体基底膜抗体を投与したラット半月体形成性腎炎モデルにおいて、いずれも糸球体基底膜に沿った線状のウサギ IgG 沈着を認めた。ラット IgG, C3 も同様の線状沈着パターンを示し、半定量的評価でもウサギ IgG, ラット IgG, C3 の沈着はいずれも各群間で差を認めなかった。

2. 病理組織学的検討

VE 群では腎炎惹起後 6 日目に、糸球体において著明な管内

増殖、壊死性病変ならびに半月体形成を認めた (図 8B). 一方、FR 群では糸球体内への単核球浸潤は軽度であり、管内増殖や半月体形成は著明に抑制された (図 8C). 糸球体内 ED1 陽性細胞数は、FR 群で 1.4 ± 0.6 個と VE 群 11.5 ± 1.2 個に比し減少しており ($p < 0.01$), 正常ラット 0.8 ± 0.1 個 (図 8A) とほぼ同等であった。

3. p38 および p-p38MAPK 発現に与える FR167653 の影響

腎炎惹起 6 日目の腎局所での p38MAPK および p-p38MAPK の発現を免疫組織学的に評価した。VE 群において p-p38MAPK は、糸球体、とくに半月体形成部の細胞核や尿細管上皮細胞、および間質内浸潤単核球に陽性所見を認めた (図 9A). 糸球体当たりの p-p38MAPK 陽性細胞数は VE 群 11.5 ± 0.3 個に比し、FR 群で 2.7 ± 0.5 個と著明に減少し ($p < 0.01$), 正常ラット 2.1 ± 0.1 個と同等であった (図 9B, C). 一方 p38MAPK は、VE 群、FR 群ともに糸球体内細胞および尿細管上皮細胞で陽性であり (図 10A, B), 糸球体当たりの陽性細胞数は VE 群、FR 群で差を認めなかった (各々 12.5 ± 0.4 個, 12.3 ± 0.6 個)。

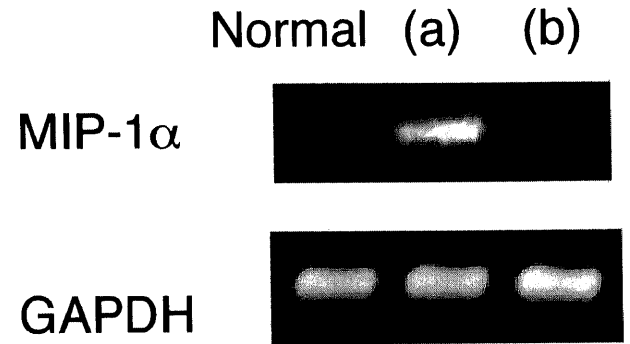


Fig.12. Effects of FR167653 on MIP-1 α transcripts in experimental crescentic glomerulonephritis of rats on day 6. MIP-1 α transcripts in the diseased kidneys were up-regulated in rats administered with vehicle (a). In contrast, MIP-1 α transcripts were markedly decreased in rats treated with FR167653 (b). A representative result of pooled mRNA from 6 to 8 rats in each group.

Table 3. Clinical parameters and pathological findings

Parameters	Normal rats (n=6)	Day 56	
		Vehicle (n=4)	FR (n=4)
24hr Ccr (ml/min)	1.9 ± 0.1	0.2 ± 0.04 ^{a)}	1.4 ± 0.1 ^{c)}
BUN (mg/dl)	13.6 ± 0.6	69.9 ± 24.9 ^{b)}	14.8 ± 1.1 ^{d)}
U-protein (mg/day)	12.6 ± 1.0	145.0 ± 23.6 ^{b)}	38.4 ± 23.3 ^{d)}
Glomerulus			
Glomerular sclerosis index	0	1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1 ^{c)}
Interstitium			
Fibrosis	0	2.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1 ^{c)}
Tubular atrophy	0	2.3 ± 0.3	0.6 ± 0.1 ^{c)}

Values are given as $\bar{X} \pm \text{SEM}$.

Statistical analyses are based on ANOVA test.

^{a)} $p < 0.01$ compared to normal rats. ^{b)} $p < 0.05$ compared to normal rats.

^{c)} $p < 0.01$ compared to vehicle. ^{d)} $p < 0.05$ compared to vehicle.

4. p-p38MAPK陽性細胞数と病理組織所見との相関

糸球体内p-p38MAPK陽性細胞数は細胞性半月体形成率と正相関を示し($r=0.721$, $p<0.01$, $n=22$), さらに糸球体内ED1陽性細胞数との間に正相関を認めた($r=0.826$, $p<0.01$, $n=22$).

5. MIP-1 α 発現に対するFR167653の抑制効果

腎炎惹起6日目の腎局所でのMIP-1 α の蛋白発現を免疫組織学的に評価した. MIP-1 α は, VE群において半月体形成細胞お

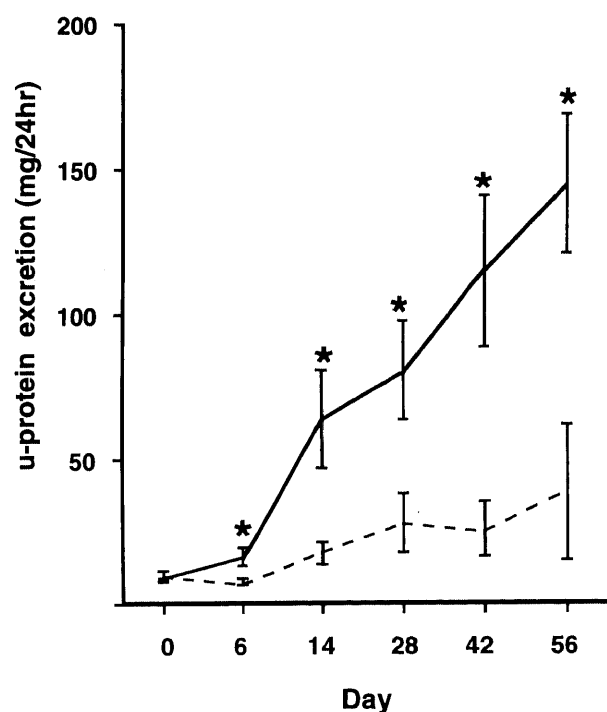


Fig.14. Effects of FR167653 on urinary protein excretion. Results from rats administered with vehicle (—), and rats administered with FR167653 (---) are shown. The administration of FR167653 markedly reduced proteinuria. * $P<0.05$, compared to rats treated with FR167653.

よび浸潤単核球に陽性であった(図11A). 一方, FR群において陽性所見は得られなかった(図11B). さらに, RT-PCRによる腎皮質におけるMIP-1 α mRNA発現の検討では, VE群でMIP-1 α mRNAの発現亢進を認めたが(図12a), FR群ではMIP-1 α mRNAの発現は正常腎(図12 Normal)とほぼ同等であった(図12b).

6. FR167653投与による長期腎機能保持効果

1)病理組織学的検討

腎炎惹起56日目には, VE群において著明な糸球体硬化と間質線維化, 尿細管萎縮ならびに間質細胞浸潤を認めた(図13A, 表3). 一方, FR群においては, 糸球体硬化病変, 間質病変のいずれも改善を認めた(図13B, 表3).

2)蛋白尿

VE群では尿蛋白量は腎炎惹起後, 漸増し, 56日目には 145.0 ± 23.6 mg/日となった. 一方, FR群においては, 各時点でVE群に比し有意に尿蛋白量は抑制された($p<0.05$, 図14, 表3).

3)腎機能

腎炎惹起56日目において, 血中尿素窒素はFR群 14.8 ± 1.1 mg/dl, VE群 69.9 ± 24.9 mg/dlとFR群で低値であった($p<0.05$). 24時間クレアチニンクリアランスはFR群で 1.4 ± 0.1 ml/分, VE群で 0.2 ± 0.04 ml/分とFR群で改善された($p<0.01$, 表3).

考 察

本研究において, 半月体形成性腎炎の発症・進展機序に, p38MAPKリン酸化を介したNF- κ B活性化およびMIP-1 α 発現が重要な役割をはたす事が明らかとなった. さらに, ラット実験半月体形成性腎炎モデルを用いた検討で, FR167653投与によるp38MAPKリン酸化抑制により, 短期の半月体形成抑制のみならず長期にわたる腎機能保護効果が明らかとなった. このことにより, 半月体形成性腎炎治療の標的分子として, p38MAPKリン酸化制御の重要性が示された.

ヒト半月体形成性腎炎においては, 半月体形成を伴った増殖性・壊死性糸球体病変を認めるとともにマクロファージを中心とした腎組織への細胞浸潤を特徴とする⁴⁰⁾⁴¹⁾. 活性化マクロファージはライソゾーム酵素の分泌やスーパーオキシドの産生に加えて, 腎固有細胞との相互作用により腎組織障害を引き起こす⁴⁰⁾⁴¹⁾. これまでマクロファージの走化・活性化因子であるMIP-1 α がヒト半月体形成性腎炎の発症・進展, とくに細胞性半月体形成において重要な役割をはたす事が報告されている²⁴⁾. さらに, 本研究により糸球体内p-p38MAPK陽性細胞数は細胞性半月体形成率, 糸球体内CD68陽性細胞数, 活性型NF- κ B陽性細胞数および尿中MIP-1 α 値と正相関を示した. MIP-1 α はNF- κ Bにより発現調節を受け, かつNF- κ Bの活性化はp38MAPKリン酸化に密接に関与することが報告されている⁵⁾⁴²⁾. したがって今回の結果からヒト半月体形成性腎炎では, 腎局所におけるp38MAPKリン酸化によるNF- κ B活性化を介したMIP-1 α 発現が, マクロファージを遊走・活性化させることで病態形成に関与することが示唆された. さらに最近, 活性化マクロファージなどに存在するMIP-1 α の受容体, CCR5は, その情報伝達系にp38MAPKリン酸化が関与していることが明らかとなった²⁵⁾. 本研究において, CCR5陽性細胞の大部分はp-p38MAPK陽性細胞であることが明らかとなった. 以上の結果

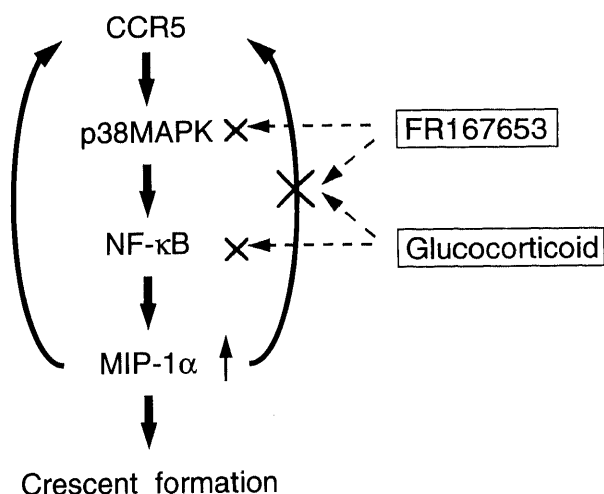


Fig.15. Schema of proposed p38 MAPK-dependent amplification loop via the activation of NF- κ B and MIP-1 α in crescentic glomerulonephritis.

より半月体形成性腎炎において、図15に示すようにp38MAPKリン酸化がNF- κ B活性化を介してMIP-1 α 産生亢進をもたらす、さらに浸潤したCCR5陽性細胞がp38MAPKを介したシグナル伝達により活性化し、MIP-1 α の産生を亢進するという、腎局所での増幅経路が存在する可能性が考えられた。また、本研究でステロイド治療による疾患活動性の低下とともに、p-p38MAPK陽性細胞、活性型NF- κ B陽性細胞ならびに尿中MIP-1 α 値の低下が確認された。近年、ステロイドはNF- κ Bを不活性化する細胞質阻害蛋白、I κ B α を誘導する事でNF- κ B活性化を阻害する事が報告されている⁴³⁾。このことよりステロイド剤投与によるNF- κ B抑制から、この増幅経路が遮断され、半月体形成低下を介して治療に有用であった可能性も考えられた(図15)。また、最近p38MAPKの活性化がIL-8mRNA安定化に働き、IL-8発現を亢進させている事が報告されている⁴⁴⁾。その機序にIL-8mRNAの塩基配列上のアデニン-ウラシルに富む配列が関係していることが推測されている。現在のところMIP-1 α mRNAの安定化に及ぼすp38MAPKの関与は不明であり、今後の課題と考えられる。

本研究において、p38MAPKリン酸化の意義をさらに明確にするため、IL-1 β ならびにTNF- α 産生阻害剤であるFR167653を用いて抑制実験を行った。これまでFR167653によるIL-1 β およびTNF- α 産生阻害の機序は明らかとなっていない。しかし今回の培養メサングيوم細胞を用いた検討により、FR167653の作用機序のひとつとして、p38MAPKリン酸化抑制が考えられた。ところで、ラット半月体形成性腎炎モデルにおいて、腎炎惹起6日目に、半月体形成細胞を中心にp-p38MAPKおよびMIP-1 α 発現を認めた。さらに、p-p38MAPK陽性細胞数は細胞性半月体形成率および糸球体内ED1陽性細胞数と正相関を示した。一方、FR群ではp-p38MAPKは著明に減少し、さらに腎組織障害は著明に抑制され、MIP-1 α 発現は低下した。この機序として、FR167653投与によるp38MAPKリン酸化抑制が図15に示す増幅経路を遮断し、半月体形成性腎炎を抑制した可能性が考えられた。この結果は、炎症性疾患の制御におけるp38MAPKリン酸化抑制の有用性を生体で示した初めての報告と考えられる。今後、かかる阻害剤の至適投与量、投与時期・期間、詳細な作用機序ならびに副作用といったさらなる解明が課題である。

さらに腎炎惹起後6日間のFR167653投与により56日目において蛋白尿を抑制し、かつ腎機能障害、糸球体硬化および間質線維化の抑制が確認された。形質転換増殖因子(transforming growth factor, TGF)- β は腎固有細胞や活性化マクロファージから産生され、線維芽細胞の活性化を介して細胞外基質増加をもたらす、糸球体硬化や間質障害形成に重要な役割をはたす事が知られている⁴⁵⁾。近年培養メサングيوم細胞を用いた検討においてTGF- β 発現にはp38MAPK活性化が重要である事が明らかとなった⁴⁶⁾。今回FR167653投与によるp38MAPKリン酸化抑制が直接的にTGF- β 産生を阻害し、糸球体硬化や間質障害を抑制した可能性も考えられたが詳細な機序は目下のところ不明である。またマクロファージを遊走・活性化するケモカインのMCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)はマクロファージを活性化させTGF- β を産生させる事が報告されている⁴⁷⁾。近年、培養条件下において、MCP-1発現に対しp38MAPKリン酸化が必須の調節機序である事が明らかとなっている⁴⁸⁾。また、これまでラット実験半月体形成性腎炎モデルにMCP-1中和活

性をもつ抗MCP-1抗体を投与することにより、糸球体上皮細胞足突起の癒合が抑制され蛋白尿が減少する事に比べ、長期にわたる糸球体硬化抑制ならびに間質線維化抑制効果が示されている³⁵⁾。したがって、FR167653投与によるMCP-1抑制が、直接あるいはTGF- β 低下を介して糸球体硬化および間質線維化の制御をしている可能性も考えられ、さらなる機序の解明が必要と考えられた。さらに、蛋白尿に含まれる補体成分、鉄やトランスフェリンは、直接的にあるいは活性酸素などの生理活性物質を介して間接的に糸球体硬化や間質障害をひき起こすことが知られている⁴⁹⁾。よってFR167653投与により蛋白尿が減少したことにより、間接的に糸球体硬化や間質障害を抑制した可能性も考えられた。以上より腎炎早期のp38MAPKリン酸化抑制が長期にわたる腎機能保護作用を示すことより、p38MAPKの腎炎治療上の標的分子としての重要性を示唆するものと考えられた。

ところで、最近p38MAPKに5つのアイソフォーム、すなわちp38 α 、p38 β 、p38 β_2 、p38 γ およびp38 δ が存在することが明らかとなった¹⁰⁾。なかでもp38 α は、マクロファージやT細胞などの炎症細胞や血管内皮細胞に存在し、炎症性疾患に関与することが推測されている¹⁰⁾。近年FR167653と同様にIL-1 β 、TNF- α 産生阻害作用を持つSB203580の作用機序が明らかとなった。すなわち、SB203580は側鎖にフルオロフェニル基を有するピリジンイミダゾール(pyridinyl imidazole)化合物であり、p38 α およびp38 β のATP結合部位にフルオロフェニル基が結合することにより、p38MAPK活性化を抑制する¹⁰⁾²⁸⁾。FR167653も側鎖にフルオロフェニル基を有しており、同様の機序によるp38MAPKの抑制作用が推測されるが、その解明は今後の検討課題である。さらに本研究において用いた抗体は、p38 α 、p38 β の両者を認識するものである。今後、半月体形成性腎炎はじめ腎疾患の発症・進展機序における各アイソフォームの寄与を明らかにすることは、病態の解明からひいては、より特異的かつ副作用の少ない治療につながるものと推測される。

本研究において半月体形成性腎炎の発症・進展において、p38MAPKリン酸化からNF- κ Bの活性化を介したMIP-1 α の増幅経路の重要性が示唆された。半月体形成性腎炎の治療を考える上で、このp38MAPKを標的分子としたリン酸化制御の有用性が考えられ、近い将来の臨床応用が期待される。

結 論

ヒト半月体形成性腎炎の発症・進展における、p38MAPKリン酸化を介した活性型NF- κ BおよびMIP-1 α 発現の意義を検討した。さらにラット実験半月体形成性腎炎モデルにおけるp38MAPKリン酸化抑制効果を検討し、以下の結論を得た。

1. ヒト半月体形成性腎炎において、免疫組織学的にp-p38MAPKおよび活性型NF- κ B発現を糸球体半月体形成細胞細胞核に確認した。

2. 糸球体内p-p38MAPK陽性細胞数は細胞性半月体形成率、糸球体内CD68陽性細胞数、糸球体内活性型NF- κ B陽性細胞数および尿中MIP-1 α 値と正相関を示した。また、糸球体内p-p38MAPK陽性細胞の一部はCD68陽性マクロファージであり、CCR5陽性細胞の大部分はp-p38MAPK陽性であった。

3. ステロイド療法による疾患活動性の低下を反映して、糸球体内p-p38MAPK陽性細胞数ならびに糸球体内活性型NF- κ B陽

性細胞数は低下し、さらに尿中 MIP-1 α 値は全例で測定感度以下となった。

4. ラット培養メサンギウム細胞を IL-1 β 存在下に培養することにより p38MAPK リン酸化を確認した。このリン酸化は、FR167653 共存下で著明に抑制された。このことより FR167653 の作用機序として p38MAPK リン酸化抑制効果を考えた。

5. ラット実験半月体形成性腎炎モデルにおいて、メチルセルロース投与群では、腎炎惹起6日目において著明な管内性増殖、壊死病変および半月体形成を認めた。一方、FR167653 投与により、半月体形成性腎炎は著明に改善し、蛋白尿もほぼ正常レベルまで減少した。

6. ラット実験半月体形成性腎炎惹起後6日目において、メチルセルロース投与群では糸球体半月体部を中心に p-p38MAPK が免疫組織学的に確認された。一方、FR167653 投与によりかかる糸球体内の p38MAPK リン酸化抑制を確認した。同様に、MIP-1 α 発現もメチルセルロース投与群で糸球体半月体形成部を中心に確認されたが、FR167653 投与により抑制された。

7. 腎炎惹起後6日間の FR167653 投与により、腎炎惹起後56日目の糸球体硬化および間質線維化が抑制され、腎機能保護効果を認めた。

以上より、半月体形成性腎炎の発症・進展に p38MAPK リン酸化を介した活性型 NF- κ B および MIP-1 α 発現の重要性が示された。くわえて、p38MAPK リン酸化制御が半月体形成性腎炎の新しい治療標的分子となりうることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、終始直接の御指導・御教示を賜りました血液浄化療法部横山仁助教授、第一内科和田隆志博士に心から感謝致します。さらに本研究に際し、御助言を賜りました東京大学大学院医学系研究科分子予防医学部松島綱治教授、ならびに多大の御協力を戴きました第一内科第三研究室の諸先生方、および研究協力員の皆様に深く感謝致します。

文 献

- Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74: 589-607, 1996
- Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell* 80: 199-211, 1995
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270: 7420-7426, 1995
- Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ. Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci* 59: 61-83, 1996
- Berghe WV, Plaisance S, Boone E, Bosscher KD, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- κ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 273: 3285-3290, 1998
- Garcia J, Lamerrier B, Roman-Roman S, Rawadi G. A mycoplasma fermentans-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappa B activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 273: 34391-34398, 1998
- Goebeler M, Kilian K, Gillitzer R, Kunz M, Yoshimura T, Bröcker EB, Rapp UR, Ludwig S. The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor- α -induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *Blood* 93: 857-865, 1999
- Rovin BH, Wilmer WA, Danne M, Dickerson JA, Dixon CL, Lu L. The mitogen-activated protein kinase p38 is necessary for interleukin 1 β -induced monocyte chemoattractant protein 1 expression by human mesangial cells. *Cytokine* 11: 118-126, 1999
- Tamura DY, Moore EE, Johnson JL, Zallen G, Aiboshi J, Siliman CC. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on human pulmonary microvascular endothelial cells. *Surgery* 124: 403-407, 1998
- Herlaar E, Brown Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 5: 439-447, 1999
- Suzuki M, Tetsuka T, Yoshida S, Watanabe N, Kobayashi M, Matsui N, Okamoto T. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF- α or IL-1 beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett* 465: 23-27, 2000
- Nakamura H, Kawakami A, Yamasaki S, Kawabe Y, Nakamura T, Eguchi K. Expression of mitogen activated protein kinases in labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 58: 382-385, 1999
- Glasscock RJ, Cohen AH, Adler SG. Primary glomerular diseases. In: BM Brenner (eds), *The Kidney*, 5th ed, p 1402-1410, W.B. Sanders Company, Philadelphia, 1996
- Schena FP, Gesuado L, Grandalliano G, Montinaro V. Progression of renal damage in human glomerulonephritis: Is there sleight of hand in winning the game? *Kidney Int* 52: 1439-1457, 1997
- Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Zarama M, Vannice JL, Atkins RC. Suppression of experimental crescentic glomerulonephritis by the IL-1 receptor antagonist. *Kidney Int* 43: 479-485, 1993
- Le HM, Haas C, Marino M, Ryffel B. Prevention of crescentic glomerulonephritis induced by anti-glomerular membrane antibody in tumor necrosis factor-deficient mice. *Lab Invest* 78: 1625-1631, 1998
- Davatelis G, Tekamp-Olson P, Wolpe SD, Hermesen K, Luedke C, Gallegos C, Coit D, Merryweather J, Cerami A. Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokine properties. *J Exp Med* 167: 1939-1944, 1988
- Lukacs N, Chensue SW, Smith RE, Strieter RM, Warmington K, Wilke C, Kunkel SL. Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 α by inflammatory granuloma fibroblasts. *Am J Pathol* 144: 711-719, 1994

- 19) Wolpe SD, Davatellis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 167: 570-581, 1988
- 20) Schwartz M, Radeke H, Resch K, Uciechowski P. Lymphocyte-derived cytokines induce sequential expression of monocyte- and T cell-specific chemokines in human mesangial cells. *Kidney Int* 52: 1521-1531, 1997
- 21) Tang WW, Yin S, Wittwer AJ, Qi M. Chemokine gene expression in anti-glomerular basement membrane antibody glomerulonephritis. *Am J Physiol* 263: F323-330, 1995
- 22) Natori Y, Sekiguchi M, Ou Z, Natori Y. Gene expression of CC chemokine in experimental crescentic glomerulonephritis (CGN). *Clin Exp Immunol* 109: 143-148, 1997
- 23) Wu X, Dolecki GJ, Sherry B, Zagorski J, Lefkowitz JB. Chemokines are expressed in a myeloid cell-dependent fashion and mediate distinct functions in immune complex glomerulonephritis in rat. *J Immunol* 158: 3917-3924, 1997
- 24) Wada T, Furuichi K, Segawa C, Shimizu M, Sakai N, Takeda S, Takasawa K, Kida H, Kobayashi K, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsushima K, Yokoyama H. MIP-1 α and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 56: 995-1003, 1999
- 25) Ganju RK, Dutt P, Wu L, Newman W, Avraham H, Avraham S, Groopman JE. β -chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK. *Blood* 91: 791-797, 1998
- 26) Yamamoto N, Sakai F, Yamazaki H, Nakahara K, Okuhara M. Effect of FR167653, a cytokine suppressive agent, on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *Eur J Pharmacol* 314: 137-142, 1996
- 27) Yamamoto N, Sakai F, Yamazaki H, Sato N, Nakahara K, Okuhara M. FR167653, a dual inhibitor of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α , ameliorates endotoxin-induced shock. *Eur J Pharmacol* 327: 169-175, 1997
- 28) Wilson KP, McCaffrey PG, Hsiao K, Pazhenisamy S, Galullo V, Bemis GW, Fitzgibbon MJ, Caron PR, Murcko MA, Su MS. The structural basis for the specificity of pyridinyl-imidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Chem Biol* 4: 423-431, 1997
- 29) Takeda S, Kida H, Yokoyama H, Tomosugi N, Kobayashi K. Two distinct types of crescentic glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 37: 285-293, 1992
- 30) World Health Organization (WHO) Monograph. Classification of glomerular diseases. In Churg J, Bernstein J, Glasscock RJ (eds), *Renal disease*, 2nd ed, p3, Igaku-Shoin Medical Publishers, Tokyo, 1995
- 31) Tervaert JWC, Limburg PC, Elema JD, Huitema MG, Horst G, The TH, Kallenberg CGM: Detection of autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes: A useful adjunct to classification of patients with biopsy-proven necrotizing arteritis. *Am J Med* 91: 59-66, 1991
- 32) Tomosugi N, Sato H, Seiki M, Yamaya H, Yuri T, Nakamura M, Nakazawa T, Asaka M, Ishikawa I. Activation of metalloproteinase-2 by membrane type metalloproteinase expressed on human mesangial cell membrane. *Contrib Nephrol* 118: 135-140, 1996
- 33) Naito T, Yokoyama H, Moore KJ, Dranoff G, Mulligan RC, Kelley VR. Macrophage growth factors introduced into the kidney initiate renal injury. *Mol Med* 2: 297-312, 1996
- 34) Krakower C, Greenspon SA. Localization of nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. *Arch Pathol* 51: 629-639, 1951
- 35) Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi K, Harada K, Naruto M, Su SB, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K. Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J* 10: 1418-1425, 1996
- 36) Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 26: 137-143, 1984
- 37) Ou ZL, Natori Y, Natori Y. Gene expression of CC chemokines in experimental acute tubulointerstitial nephritis. *J Lab Clin Med* 133: 41-47, 1999
- 38) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 39) Wada T, Tomosugi N, Naito T, Yokoyama H, Kobayashi K, Mukaida N, Matsushima K. Prevention of proteinuria by the administration of anti-interleukin 8 antibody in experimental acute immune complex-induced glomerulonephritis. *J Exp Med* 180: 1135-1140, 1994
- 40) Atkins RC, Paterson DJN, Song Q, Lan HY: Modulators of crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 7: 2271-2278, 1996
- 41) Yang N, Isbel NM, Paterson DJN, Li Y, Ye R, Atkins RC, Lan HY: Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 54: 143-151, 1998
- 42) Rangan GK, Wang Y, Tay YC, Harris DCH. Inhibition of NF κ B activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. *Am J Physiol* 277: F779-789, 1999
- 43) Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270: 286-290, 1995
- 44) Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CYA, Shyu AB, Müller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J* 18: 4969-4980, 1999
- 45) Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286-1292, 1994
- 46) Gruden G, Zonca S, Hayward A, Thomas S, Maestrini S, Gnudi L, Viberti GC. Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor- β 1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes* 49: 655-661, 2000
- 47) Diamond JR, Folts DK, Ding G, Frye JE, Restrepo NC. Macrophages, monocyte chemoattractant peptide-1 and TGF- β 1

in experimental hydronephrosis. Am J Physiol 266: F926-933, 1994

48) Burton C, Harris K. The role of proteinuria in the

progression of chronic renal failure. Am J Kidney Dis 27: 765-775, 1996

The Essential Roles of the Phosphorylation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Crescentic Glomerulonephritis. Norihiko Sakai, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **110**, 2 — 15 (2001)

Key words crescentic glomerulonephritis, p38 mitogen-activated protein kinase, nuclear factor- κ B, macrophage inflammatory protein-1 α , CCR5

Abstract

p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a member of the MAPK family that participates in intracellular signal transduction. p38 MAPK is phosphorylated in response to various extracellular stresses including inflammatory cytokines. Phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK) is involved in the induction of various cytokines, chemokines and adhesion molecules through the activation of transcription factors such as nuclear factor- κ B (NF- κ B). This study was designed to explore the essential roles of p38 MAPK in the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis and the impact of the inhibition of phosphorylated p38 MAPK on crescentic glomerulonephritis. In human crescentic glomerulonephritis, p-p38 MAPK positive cells were observed in crescentic lesions, tubular epithelial cells and mononuclear infiltrates in interstitium. The number of p-p38 MAPK positive cells in 34 patients with crescentic glomerulonephritis was 4.2 ± 0.4 /glomerulus, whereas it was 0.9 ± 0.1 /glomerulus in 3 patients with minimal change nephrotic syndrome ($p < 0.01$). In addition, some p-p38 MAPK positive cells were CD68 or CCR5 positive cells. The number of p-p38 MAPK positive cells in glomeruli was positively correlated with the percentage of cellular crescents ($r = 0.551$, $p < 0.01$, $n = 34$), CD68 positive cells ($r = 0.587$, $p < 0.01$, $n = 34$) and urinary macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) levels ($r = 0.689$, $p < 0.01$, $n = 20$). Moreover, in patients with crescentic glomerulonephritis, activated NF- κ B positive cells were detected in crescentic lesions, tubular epithelial cells and mononuclear infiltrates in interstitium. The number of p-p38 positive cells in glomeruli was correlated with the number of activated NF- κ B positive cells in glomeruli ($r = 0.639$, $p < 0.01$, $n = 34$). The number of p-p38 MAPK positive cells and activated NF- κ B positive cells in diseased kidneys decreased and the urinary levels of MIP-1 α fell to undetectable levels during convalescence induced by glucocorticoid therapy. In addition, FR167653 dramatically decreased the phosphorylation of p38 MAPK induced by interleukin-1 β in cultured rat mesangial cells. Wistar-Kyoto rats administered with a small dose of nephrotoxic serum had crescentic glomerulonephritis leading to glomerulosclerosis and interstitial fibrosis. p38 MAPK was phosphorylated in the diseased kidneys after the induction of crescentic glomerulonephritis. In contrast, the number of p-p38 MAPK positive cells in glomeruli was reduced dramatically in rats with the daily subcutaneous administration of FR167653 for 6 days ($p < 0.01$). Concomitantly, the renal expression of MIP-1 α was markedly reduced on day 6. Furthermore, the severity of glomerulosclerosis and interstitial fibrosis was significantly decreased on day 56 in rats treated with FR167653. Collectively, these results suggest that the phosphorylation of p38 MAPK followed by the activation of NF- κ B and production of MIP-1 α may be essentially involved in the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. This study provides evidence that p38 MAPK may be a novel therapeutic target for crescentic glomerulonephritis.