

ラット実験半月体形成性腎炎におけるケモカインの意義

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/2297/9421

ラット実験半月体形成性腎炎におけるケモカインの意義

金沢大学医学部医学科第一内科学講座 (主任: 小林健一教授)

古市賢吾

進行性腎障害を呈する半月体形成性腎炎の発症・進展過程にはたす単球・マクロファージ活性化の機序を解明する目的でラット実験半月体形成性糸球体腎炎モデルを用いて単球・マクロファージの走化・活性化因子である単球走化活性化因子 (monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1, MCAF/MCP-1) の役割を検討した。ウイスター-京都 (Wistar-Kyoto, WKY) ラットに少量の抗糸球体基底膜抗体を投与することにより、投与後6日目までに増殖性・壊死性糸球体腎炎が惹起され、腎炎惹起後2カ月で硬化に至る腎炎モデルを作製した。かかるモデルにおいて中和活性を有する抗ラット MCAF/MCP-1 ヤギポリクローナル抗体 (抗 MCAF/MCP-1 抗体) は腎炎惹起後3日目・6日目の尿蛋白量 ($32.4 \pm 6.8 \text{ mg/dl}$, $44.8 \pm 7.2 \text{ mg/dl}$) を正常レベルまでに抑制した ($12.9 \pm 3.0 \text{ mg/dl}$, $15.4 \pm 3.9 \text{ mg/dl}$, 正常 $12.5 \pm 1.0 \text{ mg/dl}$; $p < 0.001$)。くわえて、腎炎惹起時に投与した抗 MCAF/MCP-1 抗体は ED-1 陽性のマクロファージ浸潤 (抗 MCAF/MCP-1 抗体投与群, 3日目, $7.2 \pm 0.1/\text{糸球体}$, 6日目, $9.0 \pm 0.2/\text{糸球体}$; コントロール IgG 投与群 (以下, 対照群), 3日目, $10.1 \pm 0.2/\text{糸球体}$, 6日目, $11.7 \pm 0.4/\text{糸球体}$; それぞれ, $p < 0.01$), 半月体形成率 (抗 MCAF/MCP-1 抗体投与群, 3日目, $7.0 \pm 1.0\%$, 6日目, $26.1 \pm 1.3\%$; 対照群, 3日目, $15.2 \pm 1.0\%$, 6日目, $38.9 \pm 5.5\%$; 3日目, $p < 0.01$, 6日目, $p < 0.05$) を有意に抑制すると同時に、上皮細胞足突起の融合も軽減した。腎炎惹起時に投与した抗 MCAF/MCP-1 抗体は腎炎惹起56日目の糸球体硬化 (糸球体硬化スコア, 抗 MCAF/MCP-1 抗体投与群, 0.47 ± 0.06 ; 対照群, 0.95 ± 0.19 ; $p < 0.05$), および腎機能低下 (24時間クレアチニンクリアランス, 抗 MCAF/MCP-1 抗体投与群, $1.23 \pm 0.08 \text{ ml/分}$; 対照群, $0.99 \pm 0.10 \text{ ml/分}$; $p = 0.06$; 血液尿素窒素, 抗 MCAF/MCP-1 抗体投与群, $24.5 \pm 2.6 \text{ mg/dl}$; 対照群, $33.2 \pm 2.0 \text{ mg/dl}$; $p < 0.05$) を有意に抑制した。腎炎活動期において免疫組織学的に MCAF/MCP-1 蛋白の局在を検討したところ糸球体内、血管内皮細胞、尿細管上皮細胞および浸潤単核球に MCAF/MCP-1 の発現が確認されたが、正常腎には発現を認めなかった。ELISA法による尿中 MCAF/MCP-1 の検討では、腎炎発症後3, 6, 14, 56日目のいずれにおいても腎炎発症ラットの尿中 MCAF/MCP-1 値は正常ラットと比較して有意な増加を示した。このうち、抗 MCAF/MCP-1 抗体投与群では対照群に比し尿中 MCAF/MCP-1 値が高い傾向を示した。さらに、腎炎発症後の MCAF/MCP-1 の役割を明らかにする目的で抗糸球体基底膜抗体投与後7日目に抗 MCAF/MCP-1 抗体を初回あるいは追加投与した。腎炎惹起14日目における評価では、腎炎惹起時および腎炎発症後7日目の計2回抗 MCAF/MCP-1 抗体を投与した群では、抗 MCAF/MCP-1 抗体を全く投与しない対照群と比較して半月体形成率は有意に抑制されたが、増殖細胞核抗原 (proliferative cell nuclear antigen, PCNA), ED-1 陽性細胞数および蛋白尿には差を認めなかった (PCNA: 抗 MCAF/MCP-1 抗体2回投与群, $3.2 \pm 0.6/\text{糸球体}$; 対照群, $2.3 \pm 0.4/\text{糸球体}$; ED-1: 抗 MCAF/MCP-1 抗体2回投与群, $2.9 \pm 0.5/\text{糸球体}$; 対照群, $4.1 \pm 0.6/\text{糸球体}$)。一方、腎炎発症後7日目のみに抗 MCAF/MCP-1 抗体を投与した群では腎炎惹起14日目における PCNA, ED-1 陽性細胞数は抗 MCAF/MCP-1 抗体を全く投与しない対照群と比較して有意に増加した (PCNA: 7日目抗 MCAF/MCP-1 抗体投与群, $4.2 \pm 0.3/\text{糸球体}$; 対照群, $2.3 \pm 0.4/\text{糸球体}$; $p < 0.01$; ED-1: 7日目抗 MCAF/MCP-1 抗体投与群, $8.1 \pm 0.6/\text{糸球体}$; 対照群, $4.1 \pm 0.6/\text{糸球体}$; $p < 0.005$)。以上より腎局所で産生された MCAF/MCP-1 は腎炎発症早期に、単球・マクロファージの腎局所への浸潤・活性化を介して半月体形成性腎炎の発症・進展過程に重要な役割をはたしていることが推測された。さらに、抗 MCAF/MCP-1 抗体投与が腎炎の進展を抑制したことより、今後、MCAF/MCP-1 を新しい腎炎の治療標的分子とする抗ケモカイン療法が有用であることが示唆される。

Key words crescentic glomerulonephritis, rapidly progressive glomerulonephritis, MCAF/MCP-1, monocyte/macrophage, chemokine

急速進行性糸球体腎炎は数週ないしは数カ月の経過で急速に腎機能が低下し、末期腎不全に移行する予後不良の腎炎であり、組織学的には半月体形成性糸球体腎炎を特徴とする¹⁾。これま

でウイスター-京都 (Wistar-Kyoto, WKY) ラットに少量の抗糸球体基底膜抗体を投与することによりヒト半月体形成性糸球体腎炎類似の腎炎が惹起されることが判明している²⁾³⁾。この

平成11年1月7日受付, 平成11年3月19日受理

Abbreviations: ABC-AP, avidin-biotin complex-alkaline phosphatase; bFGF, basic fibroblast growth factor; IL-1, interleukin-1; MCAF/MCP-1, monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIP, macrophage inflammatory protein; PAS, periodic acid Schiff; PCNA,

ラット実験腎炎で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単球・マクロファージを中心とする単核細胞の腎組織内への浸潤を特徴とし、単球・マクロファージが腎炎発症・進展に重要な役割をはたすと考えられている²⁾。しかし、半月体形成性腎炎の発症・進展過程における単球・マクロファージの腎局所への浸潤および活性化の詳細な機序は目下のところ不明である。

ところで、単球・マクロファージの走化を促進し、活性化させる単球走化活性化因子 (monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1, MCAF/MCP-1) は分子量約8kDa, 76アミノ酸から成る塩基性・ヘパリン結合性のサイトカイン (ケモカイン) で、種々の増殖因子やサイトカイン刺激により免疫担当細胞であるリンパ球をはじめ線維芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、培養腫瘍細胞といった種々の細胞から産生されることが判明している^{4)~5)}。さらに、腎固有細胞であるメサングウム細胞や尿管上皮においてもインターロイキン (interleukin, IL)-1, 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α といった炎症性サイトカインをはじめとした各種刺激により MCAF/MCP-1 が産生されることが報告されており、腎障害への関与が推測されている^{7)~9)}。事実、ラット抗胸腺細胞抗体型実験腎炎において MCAF/MCP-1 の転写および蛋白レベルでの発現増強が報告され、その重要性が指摘されている¹⁰⁾¹¹⁾。加えて各種ヒト腎炎においても腎局所での MCAF/MCP-1 発現が認められるとともに尿中 MCAF/MCP-1 値が病勢に一致して推移し臨床活動性の指標となることが指摘されている^{12)~14)}。しかし、半月体形成性腎炎の発症・進展過程における単球・マクロファージの浸潤・活性化にはたす MCAF/MCP-1 の役割は未だ十分には解明されていない。そこで、かかる腎炎における単球・マクロファージの浸潤・活性化にはたす MCAF/MCP-1 の役割を明らかにする目的で WKY ラットに半月体形成性糸球体腎炎を作製し、腎における MCAF/MCP-1 発現と抗 MCAF/MCP-1 抗体投与による効果を検討した。

対象および方法

I. ラット MCAF/MCP-1 ならびに抗 MCAF/MCP-1 抗体の精製

チロシンプロモーターと pel B 遺伝子¹⁵⁾ を含んだ pSCFV-1 ベクターを用いて大腸菌にラット MCAF/MCP-1 を発現させた。ラット MCAF/MCP-1 cDNA¹⁶⁾ はリポ多糖 (lipopolysaccharide) で刺激したラット脾臓細胞から RNA を抽出し逆転写-PCR (reverse transcription-PCR) 法にて増幅した後、HB101 大腸菌に導入し、3-インドールアクリル酸 M9 培地で 37°C, 24 時間培養した。培養上清を 4600 回転で 10 分遠心し、沈殿を 25% しょ糖含有 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) で 2 回洗浄した。上清は酢酸で pH5.0 に調製し、ヘパリンアガロースゲル (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) で泳動し、1M 塩化ナトリウム含有 0.02M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) で溶出した。溶出液はさらに FPLC システム (Pharmacia-Biotech) のスーパーロース 12 ゲル濾過カラムを通し、0.02M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) で濾過した。試料は Pharmacia-LKB ポンプ 2248 システムのヘパリンカラム (TSK Heparin-5PW, Tosoh, 東京) を

用い、塩化ナトリウム濃度に 0~1M の濃度勾配をつけた 0.02M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) で溶出した。得られた試料内の MCAF/MCP-1 は SDS-PAGE 解析によって同定した。最終的に得られたサンプルはアミノ酸分析により、MCAF/MCP-1 と同定した⁹⁾¹⁶⁾。

ヤギおよびウサギを用いた抗 MCAF/MCP-1 抗体は組換えラット MCAF/MCP-1 をそれぞれに繰り返し免疫して得た。免疫動物および正常動物から血清を得た後プロテイン A カラム (Pharmacia-Biotech) を用いて IgG 分画を精製した。

II. 単球走化活性ならびに抗 MCAF/MCP-1 抗体中和活性の測定

組換えラット MCAF/MCP-1 の活性は Matsushima ら⁹⁾ の報告に従ってラットの末梢単球を用いて測定した。8 μ m の孔を有するポリビニールポリカーボネート膜で隔てられた容器の一方に単球を、他方に組換えラット MCAF/MCP-1 および抗 MCAF/MCP-1 抗体を入れ、37°C, 90 分間反応させた。反応後にポリビニールポリカーボネート膜をメタノールで固定し、ギムザ染色後に膜に接着した細胞数を数え走化活性とした。さらに、各濃度の抗 MCAF/MCP-1 抗体を用いて中和活性を検討した。

III. 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 と Greenspon ら¹⁷⁾ の方法に従って分離した。得られた糸球体基底膜を日本白色家兎の皮下に数回免疫した。得られた血清は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、以下の実験に用いた。非特異的な抗体を除去するためにウサギ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。抗糸球体基底膜抗体は使用前に 56°C に加熱し補体を非働化した。

IV. 抗糸球体基底膜抗体型腎炎モデルの作製

実験 1 として、12 週齢の雄 WKY ラット (日本チャールス・リバー, 東京) 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。WKY ラットに抗糸球体基底膜抗体を含む血清 0.1ml を投与することにより抗糸球体基底膜抗体型腎炎を作製し 0 日目とした。この際抗 MCAF/MCP-1 抗体 (以下抗体投与群) または正常ヤギ IgG (以下対照群) それぞれ 2.5mg を生理食塩水 0.5ml に溶解して静脈内に投与した。1 グループ各 6 匹とし腎炎惹起 3, 6, 14 および 56 日目に屠殺し、血清ならびに腎組織を得た。この際、代謝ゲージで腎炎惹起前および屠殺前に 24 時間蓄尿した。

実験 2 として、腎炎発症後の抗 MCAF/MCP-1 抗体の効果を確認する目的で実験 1 と同様に抗糸球体基底膜抗体型腎炎を作製し、0 および 7 日目に抗 MCAF/MCP-1 抗体を投与する 2 回投与群と腎炎惹起 7 日目のみに抗 MCAF/MCP-1 抗体を投与する後期投与群を作製した。対照群には抗糸球体基底膜抗体型腎炎を作製し、0 および 7 日目に正常ヤギ IgG を投与した。いずれの群も腎炎惹起 14 日目に屠殺し実験 1 と同様の検討を行った。

V. 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に包埋した後、薄切し過ヨウ素酸シッフ (periodic acid Schiff, PAS) 染色し、糸球体について組織学的検討を行った。糸球体内総細

proliferative cell nuclear antigen; PDGF, platelet-derived growth factor; RANTES, regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted; TNF, tumor necrosis factor; WKY, Wistar-Kyoto

胞数は、10個以上の糸球体を観察し糸球体1個当たりの平均細胞数として表した。半月体形成率は30個以上の糸球体を観察の上、陽性率として表した。糸球体硬化はPAS陽性メサンギ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、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得た¹⁸⁾。

糸球体硬化スコア =

$$(0 \times N0 + 1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4) / 50$$

2. 免疫組織化学染色による検討

腎組織の一部の新鮮標本をドライアイス・アセトンで冷却しn-ヘキサンにより凍結後、クリオスタットTissue-Tekシステム(Miles, Naperville, USA)により6 μ mに薄切した。細胞増殖のマーカーとして抗増殖細胞核抗原(proliferative cell nuclear antigen, PCNA)抗体(Leinco Technologies Inc., St. Louis, USA), 単球・マクロファージの標識抗体として抗ED-1抗体(IgG1, BMA Biomedicals Ltd., Switzerland), リンパ球のマーカーとして抗CD8抗体(IgG1, Cedarlane, Ontario, Canada)を用いて各々免疫組織染色した。30個の糸球体を観察し陽性細胞を糸球体1個当たりの平均で表した。さらに、イソシアン酸フルオレセイン標識抗ウサギIgG抗体, 抗ラットIgG抗体, 抗ラット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表した。

3. 電子顕微鏡による観察

腎組織の一部は2.5%グルタルアルデヒドにて前固定し、4%オスミウム酸にて後固定した後、エポック812(応研商事, 東京)に包埋し薄切した。酢酸ウラニール, クエン酸鉛により2重染色した後、電子顕微鏡(日立H600型, 東京)で観察した。

4. MCAF/MCP-1の免疫組織化学的検討

腎局所のMCAF/MCP-1発現は新鮮凍結切片において抗MCAF/MCP-1抗体を用いた間接アビチン-ビオチンアルカリフォスファターゼ(alkaline-phosphatase conjugated avidin-biotin complex method, ABC-AP)法(Vectastain ABC-AP kit, Vector Lab, Burlingame, USA)による免疫組織染色にて検討した¹³⁾。なお、内因性アルカリフォスファターゼ活性はレバミゾール添加により阻害した。

VI. 蛋白尿, 血液尿素窒素, 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200 \times g, 5分間, 室温で遠心し細胞成分を除去した後, 上清を-70 $^{\circ}$ C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た¹⁹⁾。尿蛋白は24時間排泄量として表した。血液尿素窒素, クレアチニンは自動解析機(日立, 東京)によって測定した。

VI. 尿中MCAF/MCP-1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200 \times g, 5分間, 室温で遠心し細胞成分を除去した後, 上清を-70 $^{\circ}$ Cで測定まで保存した。測定はELISA法により行った。平底型マイクロプレートウェル(Nunc, Roskilde, Denmark)に抗ラットMCAF/MCP-1マウスモノクローナル抗体を固相化し, 試料を加え4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。各ウェルを洗浄した後, 抗ラットMCAF/MCP-1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ジエタノールアミン(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, マルチプレイトリーダーにて吸光度(405nm)を測定した。なお測定感度は40pg/mlであった。尿量とあわせて一日MCAF/MCP-1排泄量として表した。

VIII. 統計処理

各群間の比較は対応のないt検定, Wilcoxon符号付き順位和検定法および一元配置分散分析で行った。危険率(p)が0.05以下をもって有意差と判定した。なお, 数値は平均 \pm 標準誤差で示した。

成 績

I. 抗MCAF/MCP-1抗体の走化活性抑制

組換えラットMCAF/MCP-1は濃度依存性に単球に対する強い走化活性を示した(図1)。また, 抗MCAF/MCP-1抗体は濃度依存性に組換えラットMCAF/MCP-1に対する中和活性を示した。実際ヤギ抗MCAF/MCP-1抗体(IgGとして100 μ g/ml)は組換えラットMCAF/MCP-1 10ng/ml(モル比100対1)の走化活性を50%抑制したが, 正常ヤギIgGには抑制効果を認めなかった(図1)。

II. 抗糸球体基底膜型腎炎の作製

抗糸球体基底膜抗体を投与した腎炎ラットでは抗MCAF/MCP-1抗体投与群, 対照群の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の沈着はいずれも両群間に差を認めなかった(データ省略)。

III. 抗糸球体基底膜型腎炎惹起時の抗MCAF/MCP-1抗体単回投与の効果の検討(実験1)

1. 光学顕微鏡による評価

対照群では腎炎発症3日目に糸球体において管内増殖, 炎症

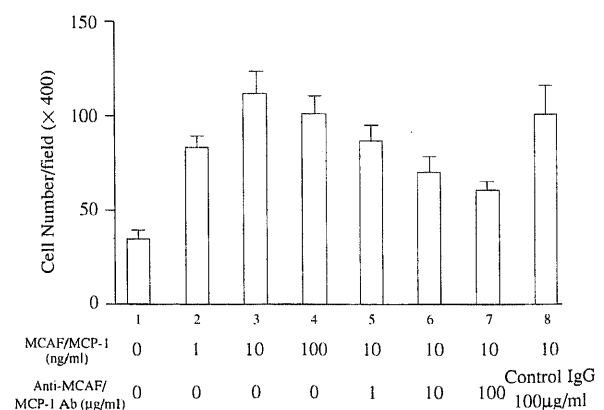


Fig. 1. Monocyte chemotaxis assay. Monocyte chemotaxis assay was performed using rat peripheral blood mononuclear cells in contact with the medium supplemented with rat MCAF/MCP-1 (lane 1, 0 ng/ml; lane 2, 1 ng/ml; lane 3, 5 to 8, 10 ng/ml; lane 4, 100 ng/ml) and goat anti-rat MCAF/MCP-1 antibodies (lane 5, 1 μ g/ml; lane 6, 10 μ g/ml; lane 7, 100 μ g/ml) or control IgG (lane 8, 100 μ g/ml). After incubation, the number of migrated cells were determined as described in Materials and Methods.

細胞浸潤を認めた (図2C, 表1). 一方, 腎炎惹起時, 抗MCAF/MCP-1抗体単回投与群では週齢, 性別を一致させた正常ラット (図2A) と同様, 糸球体内への単核球浸潤は軽度であり, 管内増殖を認めなかった (図2B). さらに, 対照群では腎炎惹起6日目において著明な管内増殖, 壊死性病変, 半月体形成を生じた (図2E). 一方, 半月体形成および壊死性病変は腎炎惹起時の抗MCAF/MCP-1抗体単回投与によって著明に改善

した (図2D, 表1). 糸球体内総細胞数, またPCNA, ED-1およびCD8陽性細胞数の検討では, 対照群の腎炎惹起3日目および6日目において糸球体内総細胞数, PCNA陽性細胞, ED-1陽性細胞のいずれもが正常ラットに比較して増加していた (いずれも $p < 0.01$). また, CD8陽性細胞は腎炎惹起3日目に増加したものの ($p < 0.01$), 6日目には減少していた. 一方, 糸球体内総細胞数, PCNA, ED-1陽性細胞数はいずれも腎炎惹起時抗

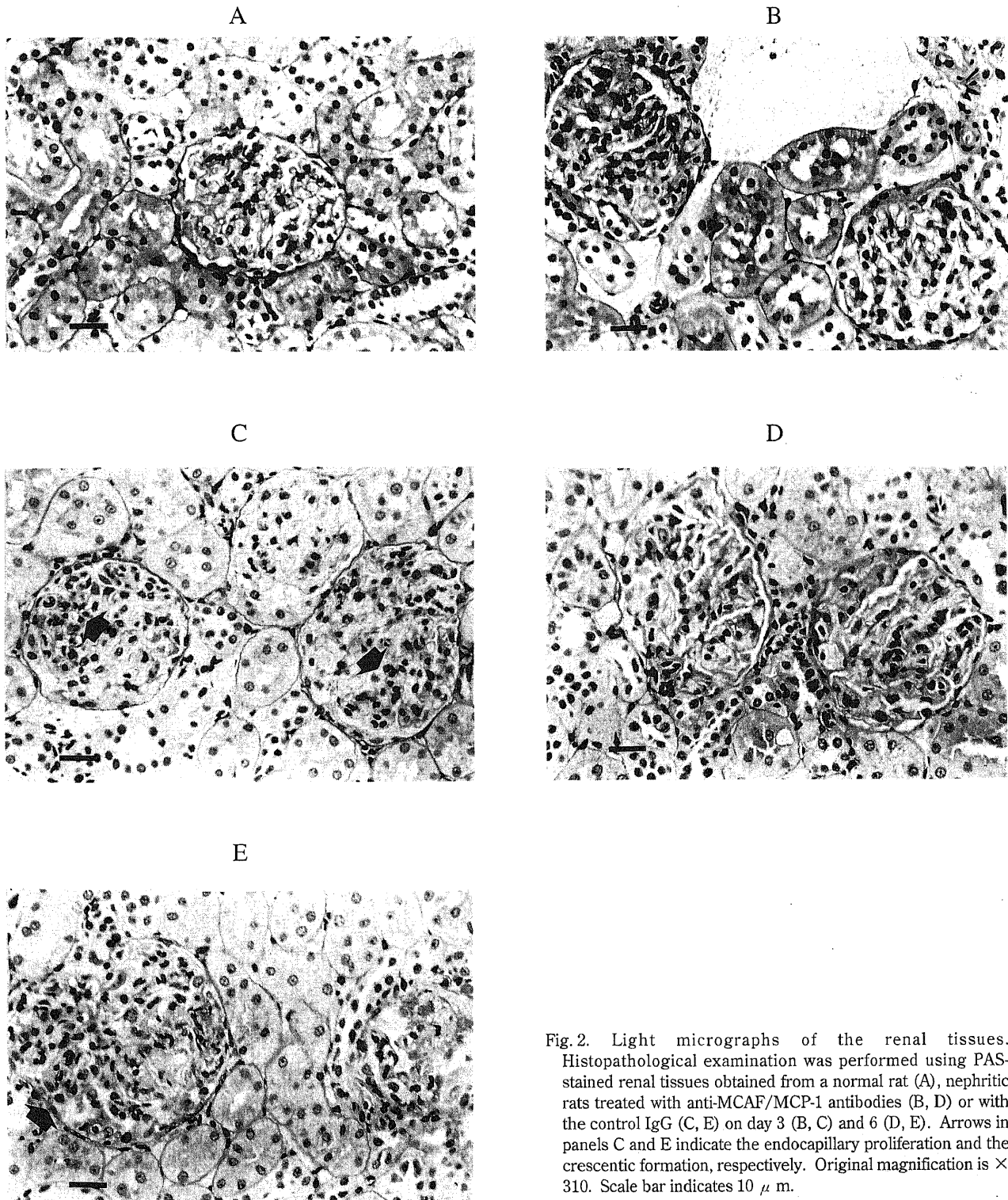


Fig. 2. Light micrographs of the renal tissues. Histopathological examination was performed using PAS-stained renal tissues obtained from a normal rat (A), nephritic rats treated with anti-MCAF/MCP-1 antibodies (B, D) or with the control IgG (C, E) on day 3 (B, C) and 6 (D, E). Arrows in panels C and E indicate the endocapillary proliferation and the crescentic formation, respectively. Original magnification is $\times 310$. Scale bar indicates $10 \mu\text{m}$.

MCAF/MCP-1抗体単回投与によって腎炎惹起3日目、6日目ともに約30%抑制された ($p < 0.01$) が、CD8陽性細胞浸潤の有意な抑制は認められなかった (表1)。腎炎惹起14日目の検討では半月体形成率は腎炎惹起時抗MCAF/MCP-1抗体単回投与群で有意に抑制されたが ($p < 0.05$)、糸球体内総細胞数、PCNA、ED-1、CD8陽性細胞数はいずれにおいても腎炎惹起時抗MCAF/MCP-1抗体単回投与群と対照群との間に有意差を認め

なかった (表1)。

2. 電子顕微鏡による評価

電子顕微鏡観察において正常ラットでは糸球体基底膜足突起の融合は認められなかった。対照群6日目においてはすべての糸球体基底膜足突起に融合を認め、とくに浸潤白血球周囲の糸球体係蹄壁足突起に融合を強く認めた (図3A)。一方、腎炎惹起時抗MCAF/MCP-1抗体単回投与群では糸球体係蹄壁足突起

Table 1. Inhibition of pathological changes in the early phase by anti-MCAF/MCP-1 antibodies

Pathological findings	Normal rat	Day 3		Day 6		Day 14	
		Control IgG	Anti-MCAF Ab	Control IgG	Anti-MCAF Ab	Control IgG	Anti-MCAF Ab
Crescentic formation %	0	15.2±1.0	7.0±1.0 ^{b)}	38.9±5.5	26.1±1.3 ^{a)}	69.1±2.0	47.0±5.8 ^{a)}
Total cell number cells/glomerulus	55.3±1.1	88.9±3.1	59.6±2.0 ^{b)}	136.4±6.2	103.4±6.0 ^{a)}	71.1±3.9	66.6±6.6
PCNA-positive cells cells/glomerulus	1.8±0.5	4.1±0.2	2.9±0.2 ^{b)}	6.9±0.2	4.7±0.3 ^{b)}	2.3±0.4	3.0±0.4
ED1-positive cells cells/glomerulus	0.8±0.1	10.1±0.2	7.2±0.1 ^{b)}	11.7±0.4	9.0±0.2 ^{b)}	4.1±0.6	4.3±0.8
CD8-positive cells cells/glomerulus	0.20±0.02	2.7±0.2	2.4±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	0.14±0.02	0.16±0.07

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

Statistical analyses are based on unpaired *t*-test and ANOVA test.

a) $P < 0.05$, compared to control IgG-treated rats.

b) $P < 0.01$, compared to control IgG-treated rats.

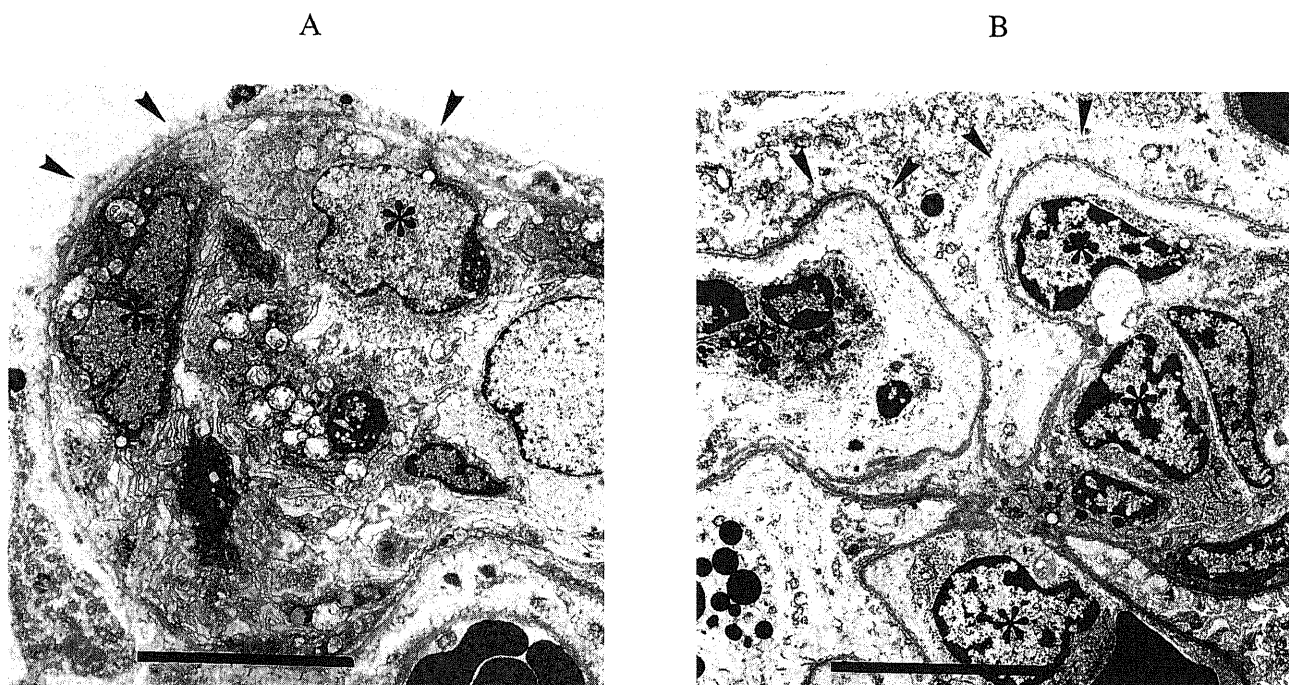


Fig. 3. Representative electron micrographs of the glomeruli. Electron micrographical analysis was performed at day 6 on the glomeruli from the nephritic rats treated with control IgG (A) or anti-MCAF/MCP-1 antibodies (B). An extensive fusion of the foot processes (arrowheads) around the infiltrated leukocytes (asterisks) is observed in A but not in B. Original magnification $\times 1500$. Scale bar indicates 1 μ m.

の融合は軽度であり、ことに浸潤白血球周囲においても足突起の融合は軽度であった(図3B)。

3. MCAF/MCP-1の発現

腎炎惹起3日目の腎局所でのMCAF/MCP-1の発現を免疫組織化学的に評価した。MCAF/MCP-1は糸球体内、血管内皮細胞、尿管上皮細胞および浸潤単核球に陽性であった(図4A)。さらに、免疫組織染色に用いた抗ラットMCAF/MCP-1ウサギポリクローナル抗体に対する、過剰量の組換えラットMCAF/MCP-1を用いた吸収試験では陽性所見は消失し、この染色結果はMCAF/MCP-1に特異的であることが判明した(図4B)。なお正常ラットではMCAF/MCP-1発現は陰性であった。

4. 蛋白尿に対する腎炎惹起時抗MCAF/MCP-1抗体単回投与の効果

正常ラットの蛋白尿は 12.5 ± 1.0 mg/日であった。対照群の3

および6日目の蛋白尿は著明に増加したが(3日目, 32.4 ± 6.8 mg/日, 6日目, 44.8 ± 7.2 mg/日, それぞれ, $p < 0.001$), 腎炎惹起時の抗MCAF/MCP-1抗体投与によって蛋白尿排泄は正常ラットのレベルにまで著明に改善した(3日目, 12.9 ± 3.0 mg/日, 6日目, 15.4 ± 3.9 mg/日, それぞれ, $p < 0.001$)(図5)。腎炎惹起14日目の検討では抗MCAF/MCP-1抗体投与群および対照群に有意差を認めなかった(抗MCAF/MCP-1抗体投与群, 78.7 ± 24.8 mg/日; 対照群, 59.4 ± 12.9 mg/日)。

5. 腎炎惹起時抗MCAF/MCP-1抗体単回投与による長期の腎機能保持および糸球体硬化抑制効果

腎炎惹起56日目の組織ならびに生化学的所見をみると対照群では糸球体硬化スコア 0.95 ± 0.19 と強い糸球体硬化を認めた(図6A, 表2)。しかし、腎炎惹起時の抗MCAF/MCP-1抗体単回投与により糸球体硬化は糸球体硬化スコア 0.47 ± 0.06 と有意

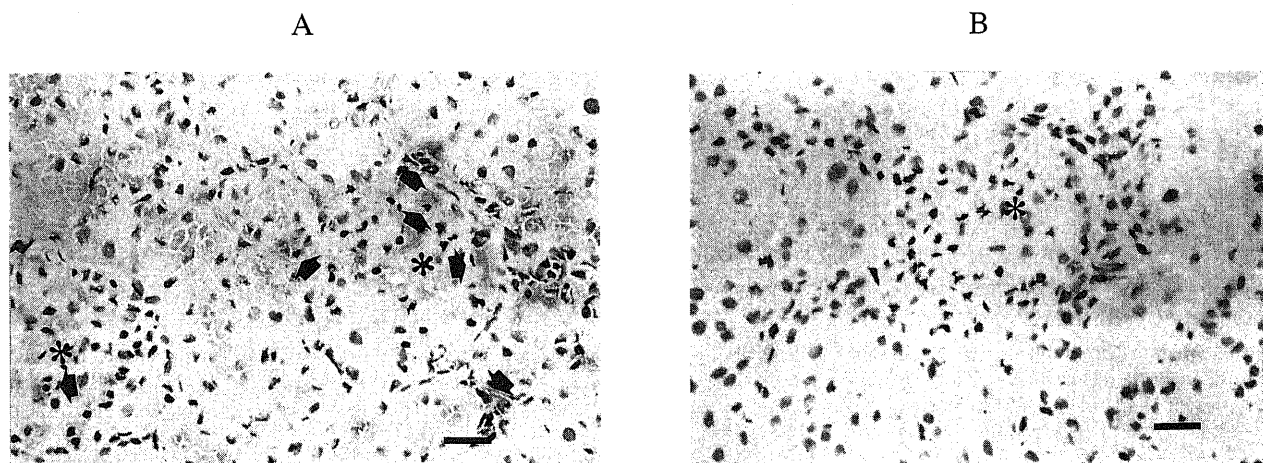


Fig. 4. Immunohistochemical analysis for the expression of MCAF/MCP-1 protein in the renal tissues. Immunohistochemical analyses were performed on renal tissues obtained from nephritic rats treated with control IgG on day 3 as described in Material and Methods using rabbit anti-MCAF/MCP-1 antibodies with (B) or without (A) preabsorption with excess amount of rat recombinant MCAF/MCP-1. Arrowheads indicate MCAF/MCP-1 positive cells. Asterisks indicate glomeruli. Original magnification $\times 160$. Scale bar indicates $20 \mu\text{m}$.

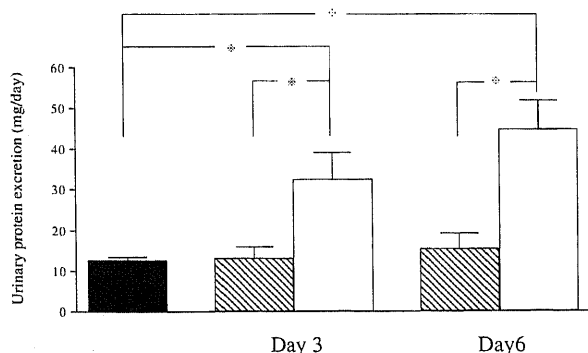


Fig. 5. Effects of anti-MCAF/MCP-1 antibodies on urinary protein excretion. Results from normal rats (■), nephritic rats treated with control IgG (□), and those treated with anti-MCAF/MCP-1 antibodies (▨) are shown. The administration of anti-MCAF/MCP-1 antibodies markedly decreased proteinuria both on days 3 and 6 (*, $p < 0.001$).

Table 2. Improvement of laboratory data and glomerulosclerosis on day 56 by anti-MCAF/MCP-1 antibodies

Laboratory data and glomerulosclerosis	Administration on day 0	
	Control IgG	Anti-MCAF/MCP-1
Urinary protein mg/24 hr	173.7 ± 22.4	$63.5 \pm 33.2^{\text{a}}$
24 hr Ccr ml/min	0.99 ± 0.10	$1.23 \pm 0.08^{\text{b}}$
Blood urea nitrogen mg/dl	33.2 ± 2.0	$24.5 \pm 2.6^{\text{a}}$
Glomerular sclerosis index/glomerulus	0.95 ± 0.19	$0.47 \pm 0.06^{\text{a}}$

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

Statistical analyses are based on unpaired *t*-test or Wilcoxon signed rank test.

a) $P < 0.05$, compared to control IgG-treated rats.

b) $P = 0.06$, compared to control IgG-treated rats.

に改善された (図6B, 表2). さらに蛋白尿も抗体単回投与によって有意に改善された (表2). 対照群では血液尿素窒素の上昇, 24時間クレアチンクリアランスの低下を認めたが, 抗体単回投与によって前者は有意に低下し, 後者は上昇の傾向を示し, 腎機能の改善が確認された (表2).

6. 尿中MCAF/MCP-1の検討

正常ラットの尿中MCAF/MCP-1濃度は測定感度以下であった. 腎炎惹起後の尿中MCAF/MCP-1は3日目に 785 ± 588 pg/日と増加し, その後 268 ± 187 pg/日へと減少したが, 14日目と56日目に再び増加した (それぞれ 391 ± 250 pg/日, $365 \pm$

292 pg/日) (図7). 一方, 腎炎惹起時抗MCAF/MCP-1抗体単回投与群では尿中MCAF/MCP-1は3日目 2374 ± 715 pg/日, 6日目 560 ± 350 pg/日, 14日目 1242 ± 683 pg/日, 56日目 1611 ± 1093 pg/日と対照群と同様のパターンを示したが, いずれの日においても対照群より高値であった.

実験1において腎炎惹起時に抗MCAF/MCP-1抗体を投与することにより, 腎炎惹起3および6日目の蛋白尿減少, 組織学的改善および56日目の蛋白尿減少, 腎機能改善, 糸球体硬化の減少が得られた. しかし, 腎炎惹起14日目の蛋白尿には有意差を認めなかった. そこで, 腎炎惹起14日目の蛋白尿減少,

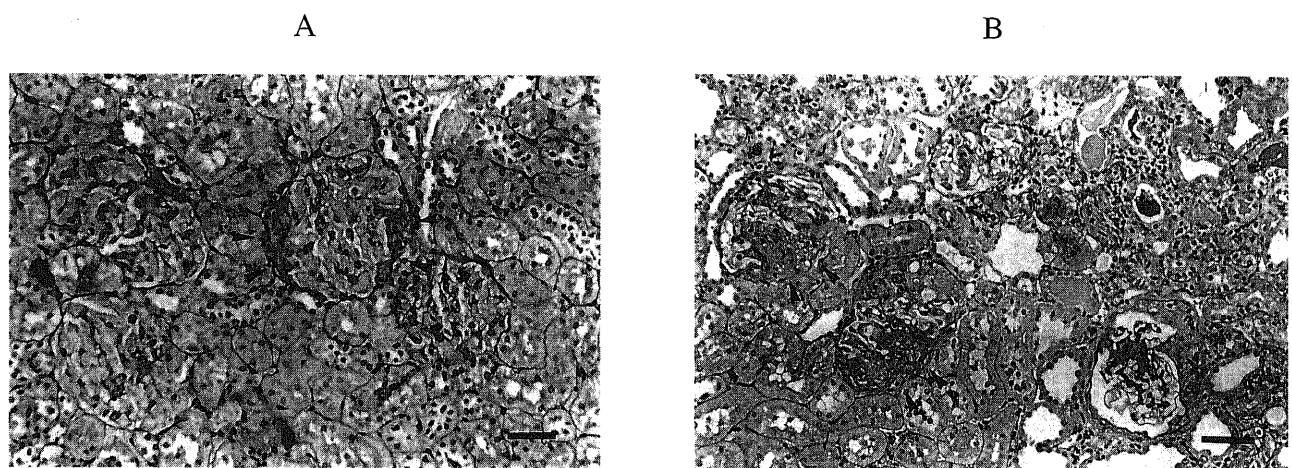


Fig. 6. Light micrographs of the renal tissues. Histopathological examination was performed using PAS-stained renal tissues obtained from nephritic rats treated with anti-MCAF/MCP-1 antibodies (A) or with the control IgG (B) on day 56. Arrowheads in panels A and B represent glomerular sclerotic changes. Original magnification is $\times 160$. Scale bar indicates $20 \mu\text{m}$.

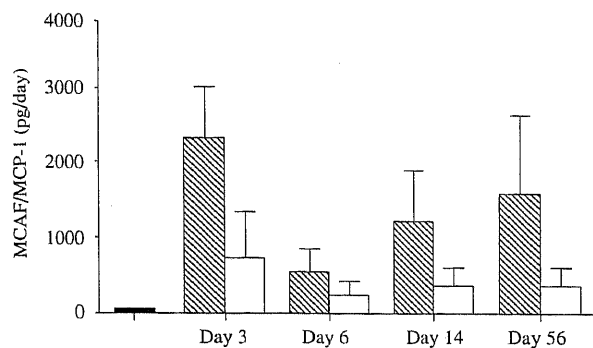


Fig. 7. Urinary excretion of MCAF/MCP-1. Results from normal rats (■), nephritic rats treated with control IgG (□), and those treated with anti-MCAF/MCP-1 antibodies (▨) are shown. Urinary excretion of MCAF/MCP-1 was not detectable in normal rats, where increased markedly on day 3 in both groups. Urinary excretion of MCAF/MCP-1 are much higher in rats treated with anti-MCAF/MCP-1 antibodies on day 3, 6, 14 and 56 as compared with rats treated with control IgG.

Table 3. Effects of anti-MCAF/MCP-1 antibodies administered after onset of nephritis on the crescentic formation occurrence of ED-1 and PCNA positive cells in glomeruli and urinary protein excretion on day 14

Clinical and pathological findings	Administration		
	Control IgG*	Anti-MCAF/MCP-1	
		On day 0 and 7	On day 0 and 7
Crescentic formation %	69.1 ± 2.0	$48.0 \pm 9.3^{\text{a}}$	67.3 ± 3.0
PCNA-positive cells cells/glomerulus	2.3 ± 0.4	3.2 ± 0.6	$4.2 \pm 0.3^{\text{b}}$
ED1-positive cells cells/glomerulus	4.1 ± 0.6	$2.9 \pm 0.5^{\text{d}}$	$8.1 \pm 0.6^{\text{c}}$
Urinary protein mg/day	59.4 ± 12.9	54.5 ± 18.8	57.3 ± 5.3

* Administered on day 0 and 7.

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

Statistical analyses are based on ANOVA test.

a) $P < 0.05$, compared to control IgG-treated rats.

b) $P < 0.01$, compared to control IgG-treated rats.

c) $P < 0.005$, compared to control IgG-treated rats.

d) $P < 0.001$, compared to treated with anti-MCAF/MCP-1 antibodies on day 7.

組織学的改善を目的に実験2を行った。

Ⅳ. 腎炎発症後の抗MCAF/MCP-1抗体投与の効果(実験2)

腎炎惹起時および腎炎発症後7日目の計2回抗MCAF/MCP-1抗体を投与した2回投与群の腎炎惹起14日目の半月体形成率(48.0±9.3%)は対照群(69.1±2.0%)に比較して有意に抑制された(表3)。また、腎炎発症後7日目のみ抗MCAF/MCP-1抗体を投与した後期投与群では半月体形成率は対照群と同様であり抑制は認められなかった。

腎炎惹起14日目の糸球体内のPCNAおよびED-1陽性細胞数は2回投与群と対照群との間に差を認めなかった。一方、後期投与群ではPCNAおよびED-1陽性細胞数のいずれもが対照群に比較して有意に増加した(表3)。

腎炎惹起14日目の蛋白尿は2回投与群および後期投与群でそれぞれ54.5±18.8mg/日、47.3±5.3mg/日であり、対照群の59.4±12.9mg/日に比較して蛋白尿改善効果を認めなかった(表3)。

考 察

これまで急性期あるいは活動期におけるヒト糸球体腎炎および実験腎炎モデル急性期において糸球体への白血球浸潤が観察され、その病態に重要な役割をはたすことが知られている^{20)~22)}。さらに、抗IL-1抗体や抗TNF- α 抗体がかかる白血球浸潤を抑制することが報告されているが²³⁾、いずれのサイトカインも直接の白血球走化作用はなく白血球浸潤には他の走化性因子の存在が予測されていた²⁴⁾。一方、培養メサンギウム細胞、内皮細胞、浸潤白血球はいずれも単球・マクロファージの走化性因子であるMCAF/MCP-1を産生し^{7)~9)}、かつ生体内においても炎症性サイトカイン(IL-1やTNF- α)の発現亢進がみられる腎炎モデルで腎固有細胞がMCAF/MCP-1を発現することが報告されている^{10)~12)}。さらに、本研究においてこれまでIL-1やTNF- α が重要なメディエーターであると判明しているWKYラット半月体形成性腎炎モデルで糸球体および間質細胞にMCAF/MCP-1が発現していることを免疫組織学的に確認した。くわえて、抗MCAF/MCP-1抗体単回投与によりED-1陽性単球・マクロファージ浸潤が約30%抑制された。以上の結果より本モデルにおいても腎局所で産生されたMCAF/MCP-1がED-1陽性単球・マクロファージ浸潤に重要な役割を果たしていることが確認された。しかし、今回の抗MCAF/MCP-1抗体によるED-1陽性単球・マクロファージ浸潤の抑制効果は完全ではなかった。この点に関し、まず第一に抗体投与量が不十分であった可能性は否定できないものの、これまで報告されている生体内での中和実験の成績からは抗体投与量は十分であったと考えられる。ところでIgA免疫複合体肺障害モデルにおいても、抗MCAF/MCP-1抗体は単球・マクロファージ浸潤を完全には抑制できなかったことから²⁵⁾、単球・マクロファージ浸潤にはMCAF/MCP-1のみならずIL-1やTNF- α で産生誘導されるMCP(monocyte chemoattractant protein)-2, MCP-3, RANTES(regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted), MIP(macrophage inflammatory protein)-1 α , MIP- β ²⁴⁾といったMCAF/MCP-1以外のケモカインの関与が予測され、かかる分子の役割の解明が今後の検討課題と考えられた。

抗MCAF/MCP-1抗体投与はED-1陽性単球・マクロファージ浸潤を抑制するのみならず3日および6日目の糸球体内PCNA陽性細胞数も減少させた。PCNAは細胞周期のG1後期からM

期にかけて急激に産生される蛋白で増殖細胞の指標であり²⁶⁾、ED-1陽性単球・マクロファージのみならず²⁷⁾腎固有細胞であるメサンギウム細胞や α 平滑筋陽性細胞にも発現することが報告されている²⁸⁾。今回観察された抗MCAF/MCP-1抗体によるPCNA陽性細胞数の減少は単球・マクロファージの浸潤のみならずかかる浸潤細胞の活性化をも抑制している可能性を示唆する所見と考えられる。ところで、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²⁴⁾にくわえて血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)や塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)といったメサンギウム細胞増殖因子の産生を促進することが知られている²⁷⁾²⁹⁾。今回の検討においてED-1陽性あるいはPCNA陽性細胞数にくわえて糸球体内総細胞数も減少したことは、かかるマクロファージ活性化抑制によるPDGF, bFGF産生の低下を介し糸球体メサンギウム細胞の増殖抑制をもたらした可能性も考えられる。これらの点から腎炎初期のMCAF/MCP-1を介したマクロファージの活性化はこれに引き続いて生じる腎固有細胞の活性化・増殖においても重要な因子であり、かかるMCAF/MCP-1の抑制は浸潤細胞のみならず腎炎時の腎固有細胞の過度の増殖抑制にも有効である可能性が示唆される。

ところで従来本モデルの特徴として報告されている²⁾³⁰⁾CD8陽性Tリンパ球の糸球体浸潤に関しては対照群と抗MCAF/MCP-1抗体投与群との間に差を認めなかった。これまでMCAF/MCP-1の試験管内におけるTリンパ球活性化が報告されているが³¹⁾、今回の検討からは少なくともこのモデルにおいてはMCAF/MCP-1はCD8陽性リンパ球の浸潤を規定する主な因子でないことが推測された。さらにCD8陽性T細胞数に変化はみられないものの蛋白尿の改善や組織学的な改善が得られたことより、このWKYラット抗糸球体基底膜抗体型腎炎におけるCD8陽性T細胞の役割についてはさらに検討が必要と考えられる。

本研究において注目すべき結果はWKYラット抗糸球体基底膜抗体型腎炎モデルへの抗MCAF/MCP-1抗体単回投与により、6日目までの蛋白尿を完全に抑制し、かつ56日目においても有意に蛋白尿を改善した点である。事実、電子顕微鏡観察においても浸潤細胞周囲を含む上皮細胞足突起の融合がほぼ完全に抑制されており抗MCAF/MCP-1抗体により上皮細胞の変化が抑制された可能性が考えられる。この機序としてMCAF/MCP-1は単球・マクロファージからのライソゾーム酵素の分泌やスーパーオキシドの産生を刺激すること²⁴⁾、さらに、これらの分泌物は基底膜の破壊に加えて直接内皮細胞および上皮細胞を障害し蛋白尿を惹起しうることが報告されており、抗MCAF/MCP-1抗体はかかる単球・マクロファージの活性化抑制を介して作用したと推測される³²⁾。ところで白血球浸潤を伴うウサギ急性糸球体腎炎モデルにおいても抗IL-8抗体が上皮細胞の足突起融合改善を伴った蛋白尿減少を生じることが報告されており¹⁹⁾、かかる事実は詳細な機序は不明であるもののケモカインが蛋白尿発現機序に直接的あるいは間接的に深く関与していることを示すものと考えられる。さらに腎炎惹起時の抗MCAF/MCP-1抗体単回投与により、このモデルで生じる56日目の蛋白尿、腎機能低下および糸球体硬化が抑制されたことは、早期のマクロファージ活性化抑制が長期的な腎機能保護をもたらす点で注目される所見である。ところで本実験において14

日目の蛋白尿は腎炎惹起時の抗MCAF/MCP-1抗体単回投与においては抑制されなかったが、半月体形成率は有意に改善された。糸球体障害時には残存糸球体において過剰濾過が加わる事による蛋白尿増加、メサンギウム細胞障害、糸球体硬化が促進される。本実験における14日目の半月体形成率の改善により、その後の蛋白尿、腎機能低下および糸球体硬化が改善される可能性が推測される。さらに、持続する蛋白尿自体あるいはそれに含まれるアルブミン、鉄・トランスフェリン、リポ蛋白、補体といった成分が直接的にあるいは、MCAF/MCP-1、エンドセリン-1、トランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor)- β 、活性酸素、ライソゾーム酵素などの生理活性物質を介して糸球体硬化および腎質障害を生じることが知られるようになり³³⁾³⁴⁾、蛋白尿そのものが腎疾患の共通進展因子であると考え、今回の結果は初期の蛋白尿の完全な抑制が長期にわたる腎機能保持に保護的に作用したことも推測される。

ところで本研究において尿中へのMCAF/MCP-1排泄は対照群に比べて抗MCAF/MCP-1抗体投与群で高値の傾向を示した。この点に関し腎炎惹起時に投与された抗MCAF/MCP-1抗体の血中半減期は約1週間であり(結果未発表)、初期にはMCAF/MCP-1/抗MCAF/MCP-1抗体複合体が尿中に排泄されたものを測定している可能性が否定できない。また、今回のELISA測定系では活性化MCAF/MCP-1に加えN末端の変化した活性の無いMCAF/MCP-1³⁵⁾をも測定しているため尿中MCAF/MCP-1値が腎炎の強さと相関しなかった可能性も否定できない。しかしながら、抗MCAF/MCP-1抗体投与により何らかのネガティブフィードバックを介し腎局所でのMCAF/MCP-1産生が増加した可能性も推測される。実際、抗MCAF/MCP-1抗体によるMCAF/MCP-1のmRNA発現増強も報告されており²⁹⁾、生体内で炎症早期に産生されたMCAF/MCP-1が新たなMCAF/MCP-1の産生を直接あるいは間接的に抑制するような機序があり、抗MCAF/MCP-1抗体がこのネガティブフィードバックを抑制したためむしろMCAF/MCP-1産生が増強した可能性が考えられる。この増強されたMCAF/MCP-1の作用、とくに修復機転への関与に関しては今後検討すべき課題と考えられる。

さらに抗MCAF/MCP-1抗体を含めた抗ケモカイン治療の臨床応用を考える上で注目すべき結果は、14日目の組織において腎炎惹起時および7日目の計2回抗MCAF/MCP-1抗体を投与しても抗MCAF/MCP-1抗体を全く投与しない対照群に比しED-1、PCNA陽性細胞の糸球体内への浸潤抑制、蛋白尿減少効果に差がなかった点と、7日目のみの後期投与ではED-1、PCNA陽性細胞の糸球体内への浸潤はむしろ増悪した点である。これは抗MCAF/MCP-1抗体を腎炎発症早期に投与することが腎炎抑制に非常に重要であることを示す所見であり、腎炎発症早期のMCAF/MCP-1を介した単球・マクロファージ浸潤、活性化が腎炎発症、進展に最も重要な働きをしていることを示唆している。抗糸球体基底膜型抗体によるラット半月体形成性腎炎は抗糸球体基底膜型抗体投与直後から好中球の浸潤を中心に腎炎が惹起され(第1相)、ラットの抗体産生、炎症細胞の浸潤や補体の活性を介して腎炎が増強する(第2相)。7日目のみの抗MCAF/MCP-1抗体後期投与では単球・マクロファージの浸潤・活性化が抑制されることによって第2相の腎炎増強の時期が遅れ、14日目にED-1、PCNA陽性細胞の増加を認めた可能

性がある。また、単球・マクロファージの浸潤・活性化にはMCP-2、MCP-3、RANTES、MIP-1 α 、 β などの他の因子も関与しており、腎炎発症後にMCAF/MCP-1の作用を抑制することによって、これら単球・マクロファージの浸潤・活性化に関与する他の因子の発現増強を誘導し、ED-1、PCNA陽性細胞の浸潤を増悪させるとも推測される。

本研究においてラット半月体形成性腎炎の発症・進展におけるMCAF/MCP-1を介した腎炎早期の単球・マクロファージの浸潤・活性化の重要性と、抗MCAF/MCP-1抗体を用いた抗ケモカイン療法の有用性が証明された。これは腎炎の適切な時期にケモカインであるMCAF/MCP-1を特異的に抑制することで最大限の効果が最小限の副作用のもとで得られる可能性を示す所見と考えられる。今後、MCAF/MCP-1をはじめとしたケモカインを標的とした抗ケモカイン療法が糸球体疾患の治療法として確立されることが期待される。

結 論

抗糸球体基底膜型抗体を用いて作製したラット半月体形成性実験腎炎に抗ラットMCAF/MCP-1ヤギポリクローナル抗体を投与することにより単球・マクロファージの浸潤・活性化に果たすMCAF/MCP-1の役割について検討し、以下の結論をえた。

1. 腎炎惹起時の抗MCAF/MCP-1抗体投与により、単球・マクロファージの浸潤・活性化が抑制され、腎炎早期の蛋白尿の完全な抑制と半月体形成の軽減を認めた。
2. 腎炎惹起時の抗MCAF/MCP-1抗体投与は腎炎惹起後56日目の糸球体硬化を改善し、腎機能も保持した。
3. 腎炎惹起3日目の糸球体、血管内皮細胞、尿管管上皮細胞においてMCAF/MCP-1発現が免疫組織学的に確認され、尿中MCAF/MCP-1の増加を認めた。
4. 腎炎惹起時および7日目の計2回の抗MCAF/MCP-1抗体投与は対照群と比較し半月体形成率を抑制したが、蛋白尿、ED-1およびPCNA陽性細胞数においては差を認めなかった。一方、腎炎発症後7日目の抗MCAF/MCP-1抗体投与においては組織学的改善はなく、かえってED-1ならびにPCNA陽性細胞の増加を認めた。

以上の結果より半月体形成性腎炎の発症・進展の早期にMCAF/MCP-1を介した単球・マクロファージが重要な役割をはたしており、抗MCAF/MCP-1抗体は単球・マクロファージの浸潤・活性化の抑制により腎障害を改善することが示された。

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医学部大学院医学系研究科衛生学松島綱治教授、金沢大学がん研究所分子薬理学向田直史助教授、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へ深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第28、29回米国腎臓学会(1995年, San Diego, 1996年, New Orleans), 国際腎臓学会(1997年, Sydney) および第39回日本腎臓学会総会(1996年, 倉敷)において発表した。

文 献

- 1) Churg J, Bernstein J, Glasscock RJ. Renal Diseases: Classification and Atlas of Glomerular diseases, 2nd ed, p133-135,

Igaku-shoin Ltd, Tokyo, 1995

- 2) Kawasaki K, Yaoita E, Yamamoto T, Kihara I. Depletion of CD8 positive cells in nephrotoxic serum nephritis of WKY rats. *Kidney Int* 41: 1517-1526, 1992
- 3) Nishikawa K, Guo YJ, Miyasaka M, Tamatani T, Collins B, Sy MS, McCluskey RT, Andres G. Antibodies to intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 prevent crescentic formation in rat autoimmune glomerulonephritis. *J Exp Med* 177: 667-677, 1993
- 4) Rollins BJ, Stier P, Ernst TE, Wong GG. The human homologue of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol* 9: 4687-4695, 1989
- 5) Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appela E, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear cells. *J Immunol* 142: 1956-1962, 1989
- 6) Matsushima K, Larrsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 169: 1485-1490, 1989
- 7) Brown Z, Strieter RM, Neild GH, Thompson RC, Kunkel SL, Westwick J. IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney Int* 42: 95-101, 1992
- 8) Rovin BH, Tan LC. LDL stimulates mesangial fibronectin production and chemoattractant expression. *Kidney Int* 43: 218-225, 1993
- 9) Schmouder R, Strieter RM, Kunkel SL. Interferon- γ regulation of human cortical epithelial cell-derived monocyte chemotactic peptide-1. *Kidney Int* 44: 43-49, 1993
- 10) Stahl RAK, Thaïss F, Disser M, Helmchen U, Hora K, Schloendorff D. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int* 44: 1036-1047, 1993
- 11) Tang WW, Feng L, Mathison JC, Wilson CB. Cytokine expression, up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, and leukocyte infiltration in experimental tubulointerstitial nephritis. *Lab Invest* 70: 631-638, 1994
- 12) Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest* 71: 536-542, 1994
- 13) Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, Takahashi Y, Sasaki T, Furuichi K, Segawa C, Hisada Y, Ohta S, Takasawa K, Kobayashi K, Matsushima K. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int* 49: 761-767, 1996
- 14) Yokoyama H, Wada T, Furuichi K, Segawa C, Shimizu M, Kobayashi K, Su S, Mukaida N, Matsushima K. Urinary levels of chemokines (MCAF/MCP-1, IL-8) reflect distinct disease activities and phases of human IgA nephropathy. *J Leukoc Biol* 63: 493-499, 1998
- 15) Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240: 1041-1043, 1988
- 16) Yoshimura T, Takeya M, Takahashi K. Molecular cloning of rat monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its expression in rat spleen cells and tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 504-509, 1991
- 17) Krakower CA, Greenspon SA. Localization of nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. *Arch Pathol* 51: 629-639, 1951
- 18) Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi K, Harada K, Naruto M, Su S, 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.
- 19) 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: 1135-1144, 1994
- 20) Wada T, Yokoyama H, Tomosugi N, Hisada Y, Ohta S, Naito T, Kobayashi K, Mukaida N, Matsushima K. Detection of urinary interleukin-8 in glomerular diseases. *Kidney Int* 46: 455-460, 1994
- 21) Camussi G, Tetta C, Bussolino F, Turello E, Brentjens J, Montrucchio G, Andres G. Effect of leukocyte stimulation on rabbit immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int* 38: 1047-1055, 1990
- 22) Mulligan MS, Johnson KJ, Todd III RF, Issekutz TB, Miyasaka M, Tamatani T, Smith CW, Anderson DC, Ward PA. Requirement for leukocyte adhesion molecules in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 91: 577-587, 1993
- 23) Ehido J, Go'mez-Chiarri M, Oriti'z A, Bustos C, Alonso J, Go'mez-Guerrero C, Go'mez-Garre D, Lo'pez-Armada MJ, PlazaGonzalez E. Role of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of glomerular diseases. *Kidney Int* 43: Suppl 39, S59-S61, 1993
- 24) Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55: 97-179, 1994
- 25) Jones ML, Mulligan MS, Flory CM, Ward PA, Warren JS. Potential role of monocyte chemoattractant protein 1/JE in monocyte/macrophage-dependent IgA immune complex alveolitis in the rat. *J Immunol* 149: 2147-2154, 1992
- 26) Kurki P, Vandelaan M, Dolbeare F, Gary J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 166: 209-219, 1986
- 27) Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC. Local macrophage proliferation in the progression of glomerular and tubulointerstitial injury in rat anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int* 48: 753-760, 1995
- 28) Johnson RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM, Protzl P, Gordon K, Gown AM. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. *J Clin Invest* 87: 847-858, 1991
- 29) Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaïss F,

- Helmchen UM, Stahl RA. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int* 51: 770-776, 1997
- 30) Nolasco F, Cameron JS, Harrley B, Coelho A, Hildreth G, Reuben R. Intraglomerular T cells and monocytes in nephritis: Study with monoclonal antibodies. *Kidney Int* 31: 1160-1166, 1987
- 31) Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3652-3656, 1994
- 32) Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, Adler S, Klebanoff SJ. New mechanism for glomerular injury: Myeloperoxidase-hydrogen peroxidase-halide system. *J Clin Invest* 79: 1379-1387, 1987
- 33) Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79: 319-326, 1987
- 34) Burton C, Harris K. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 27: 765-775, 1996
- 35) Zhang Y, Rollins B J. A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. *Mol Cell Biol* 15: 4851-4855, 1995

The Role of Monocyte Chemotactic and Activating Factor/Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Rat Experimental Crescentic Glomerulonephritis Kengo Furuichi, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Jusen Med Soc.*, **108**, 292 — 302 (1999)

Key words crescentic glomerulonephritis, rapidly progressive glomerulonephritis, MCAF/MCP-1, monocyte/macrophage, chemokine

Abstract

We investigated the pathophysiological roles of a potent macrophage chemotactic cytokine (chemokine), monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 (MCAF/MCP-1), in an animal model of crescentic glomerulonephritis. Administration of a small dose of nephrotoxic sera induced severe proliferative and necrotizing glomerulonephritis with crescentic formation leading to glomerulosclerosis in Wistar-Kyoto rats. To clarify the role of macrophage activation and infiltration in glomerulonephritis, we administered anti-MCAF/MCP-1 antibodies. Anti-MCAF/MCP-1 antibodies decreased urinary excretion of protein on days 3 and 6 to normal levels. Anti-MCAF/MCP-1 antibodies also decreased the number of macrophages in the glomeruli, crescentic formation and the fusion of the epithelial cell foot process in nephritic rats. Furthermore, anti-MCAF/MCP-1 antibodies remarkably reduced glomerulosclerosis and improved renal dysfunction as well as the amounts of proteinuria on day 56. MCAF/MCP-1 protein was detected immunohistochemically in the glomeruli, vascular endothelial cells and tubular tissue cells in the injured kidney, but not in the normal kidney. Urinary excretion of MCAF/MCP-1 significantly increased in nephritic rats, especially in those treated with anti-MCAF/MCP-1 antibodies as compared with normal rats or control rats treated with IgG. Furthermore, to clarify the effect of MCAF/MCP-1 on macrophage activation after the induction of glomerulonephritis, anti-MCAF/MCP-1 was administered on days 0 and/or 7. The serial administration of anti-MCAF/MCP-1 antibodies on days 0 and 7 did not reduce crescentic formation, PCNA- or ED-1-positive cells any more than a single administration of the antibody on day 0. The single administration of anti-MCAF/MCP-1 antibodies on day 7 increased PCNA- and ED-1-positive cells as compared with the administration of control IgG. These results suggest that MCAF/MCP-1 is an essential participant in the impairment of renal functions associated with crescentic glomerulonephritis, recruiting and activating macrophages in the early phase. Interception of MCAF/MCP-1 would appear to be a key future approach to the treatment of glomerulonephritis.