

# The role of chemokine in human nephritis and basic research of anti-chemokine therapy in experimental nephritis model

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-02-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Yokoyama, Hitoshi メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00056837">https://doi.org/10.24517/00056837</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAIJEN  
1998  
56

---

ヒト腎炎におけるケモカインの意義ならびに  
抗ケモカイン療法の基礎的検討

---

課 題 番 号 0 9 6 7 1 1 5 7

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金基盤研究(C)(2)研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 横山 仁  
(金沢大学・医学部附属病院)

## は し が き

本研究の背景：これまでわれわれはヒト糸球体腎炎とくにループス腎炎を含む各種糸球体・尿細管間質障害における異所性組織適合抗原 (MHC) classII あるいは接着分子の発現とサイトカインとくに $\gamma$ -interferon (IFN), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ との関連を検討してきた。その結果、ループス腎炎を代表とする活動性腎炎において障害部位である尿細管上皮細胞あるいは糸球体係蹄内皮細胞ならびにメサンギウム細胞上に全身性ならびに局所におけるサイトカイン産生と関連したMHC-classIIと接着分子の発現が増強することを明らかにした。近年、各種炎症における炎症性細胞の遊走が interleukin-8 (IL-8) あるいは monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1) などのケモカインによって惹起されることが次第に明らかとなり、炎症形成におけるケモカインの重要性が認識されてきた。しかし、腎糸球体あるいは尿細管間質における炎症時の好中球あるいはマクロファージの遊走・活性化におけるケモカインの関与については未だ不明な点が多い。そこで本研究の目的として各種ヒト腎炎におけるケモカインの動態をより詳細に検討することにより、ヒト腎炎におけるケモカインの役割を明らかとすることを臨床的に求めた。同時に抗糸球体基底膜抗体型腎炎実験モデルを用いて抗ケモカイン療法の有効性に関して基礎的な評価を行った。

### 「 研 究 組 織 」

研究代表者： 横山 仁 (金沢大学・医学部附属病院)

### 「 研 究 経 費 」

平成 9 年 度	1 , 7 0 0 千 円
平成 1 0 年 度	1 , 3 0 0 千 円
計	3 , 0 0 0 千 円

### 「 研 究 発 表 」

#### (1) 学会誌等

Yokoyama H, Takaeda M, Wada T, Ohta S, Hisada Y, Segawa C, Furuichi K, Kobayashi K:  
Glomerular ICAM-1 expression related to circulating TNF- $\alpha$  in human glomerulonephritis. Nephron 76: 425-433, 1997.

Segawa C, Wada T, Takaeda M, Furuichi K, Matsuda I, Hisada Y, Ohta S, Takasawa K, Takeda S, Kobayashi K, Yokoyama H: In situ expression and soluble form of P-selectin in human glomerulonephritis. Kidney Int 52: 1054-1063, 1997.

Yokoyama H, Wada T, Furuichi K, Segawa C, Simizu 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 Leuk Biol 63: 493-499, 1998.

Wada T, Furuichi K, Sakai N, Shimizu M, Segawa C, Kobayashi K, Mukaida N, Kasahara T, Matsushima K, Yokoyama H: Eotaxin contributes to renal interstitial eosinophilia. Nephrol Dial Transplant 14: 76-80, 1999.

(2) 口頭発表

Furuichi K, Yokoyama H, Wada T, Mukaida N, Matsushima K, Kobayashi K:  
INTERVENTION OF NEPHROTOXIC SERUM NEPHRITIS IN WKY RAT BY ANTI-MCAF/MCP-1 ANTIBODIES .

14th International Congress of Nephrology (Sydney), 1997.

Takasawa K, Yokoyama H, Takaeda M, Segawa C, Kobayashi K:  
GLOMERULAR ICAM-1 EXPRESSION RELATED TO CIRCULATING TNF- $\alpha$  IN HUMAN GLOMERULONEPHRITIS.

14th International Congress of Nephrology (Sydney), 1997.

Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Segawa C, Sakai N, Mukaida N, Matsushima K, Kobayashi K:  
THE DISTINCT EXPRESSION OF MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN (MIP)-1 $\alpha$  IN CRESCENTIC GLOMERULONEPHRITIS.

31th Annual Meeting of American Society of Nephrology (Philadelphia), 1998.

Yokoyama H, Wada T, Segawa C, Shimizu M, Hisada Y, Takeda S, Kobayashi K: HIGH ENDOTHELIAL VENULES LIKE VESSELS IN THE INTERSTITIAL LESIONS OF HUMAN GLOMERULONEPHRITIS.

31th Annual Meeting of American Society of Nephrology (Philadelphia), 1998.

Hitoshi Yokoyama and Takashi Wada: Cytokines and cellular activation in nephritis.  
Japan-European Nephrology Forum (Hakon), 1998.

(3) 出版物 (総説)

横山 仁: 医学と医療の最前線-腎疾患におけるケモカインと抗ケモカイン療法.  
日内会誌 86: 689-694, 1997.

横山 仁, 和田隆志: 腎炎におけるケモカインの役割.  
炎症と免疫 6: 102-108, 1998.

横山 仁, 和田隆志, 小林健一: 腎疾患とケモカイン.  
血液・免疫・腫瘍 3: 621-627, 1998.

## 「研究成果」

本研究の目的として1) 各種ヒト腎炎におけるケモカインの動態をより詳細に検討することにより、ヒト腎炎におけるケモカインの役割を明らかとする。その方法として各種ヒト腎炎における血中ならびに尿中ケモカイン測定と生検材料をもちいて腎におけるケモカイン発現を蛋白レベルならびにtranscriptレベルで検討する。2) 抗糸球体基底膜抗体型腎炎実験モデルを用いて抗ケモカイン療法の有効性に関する基礎的検討として各種単クローンあるいは多クローン型抗体を用いた抗ケモカイン療法の短期(2週以内)ならびに長期(8週以上)効果を検討することを計画した。以下に臨床的検討ならびに基礎的検討に関して報告する。

### 1. ヒト腎炎におけるケモカインならびに接着分子の臨床病理学的検討

ヒト腎炎におけるケモカイン動態の検討として、各種ヒト腎炎における血漿ならびに尿中interleukin(IL)-8ならびにmacrophage chemotactic activation factor (MCAF)を高感度免疫酵素抗体法(ELISA)により測定し、この経過を臨床所見ならびに副腎皮質ステロイドを含む各種治療と比較検討した。さらに腎生検材料をもちいて、ケモカインの腎における局在を蛋白レベルの発現は高感度免疫酵素抗体法による免疫組織学的に検討した。さらに、transcript (mRNA)レベルの発現はin situ hybridization法を用いて検討した。くわえて、ヒト腎炎におけるケモカイン動態の長期的検討ならびに接着分子との比較としてヒト腎生検材料を用いて、ケモカイン発現部位における各種接着分子(GMP-140, VCAM-1, ICAM-1)発現を免疫組織学的に確認し、長期観察と病態・治療との関連を比較検討した。

この結果、好中球浸潤を主体とする急性炎症を示す急性腎炎、IgA腎症の急性増悪時あるいは活動性ループス腎炎ならびに腎移植後の急性拒絶反応時に尿中IL-8濃度の上昇がみられる。さらにMCAF/MCP-1もループス腎炎(WHO III・IV型)ならびに高度の尿蛋白を伴う進行したIgA腎症あるいは急性間質性腎炎、移植拒絶反応において尿中濃度が上昇し、尿細管上皮を中心にmRNAならびに蛋白発現が確認された。このMCAF/MCP-1発現は尿細管間質病変ならびにCD68陽性単球/マクロファージの浸潤と正の相関を示した。さらに同一疾患でも亜群により尿中ケモカインの動態が異なり、IgA腎症を例にとると、肉眼的血尿を含めた急性増悪を繰り返す一群では、上気道感染症などを誘因として一過性の尿中IL-8濃度の増加を示し、この経過に一致して臨床的にも血尿の増悪などの活動性を認めた。さらに病理学的にはIL-8は糸球体糸系における管内性増殖ならびに白血球(好中球)浸潤と相関を示した。一方、糸球体病変とくにメサンギウムの硬化性病変が進行し、臨床的にも高度の尿蛋白ならびに腎機能低下を示す例ではむしろMCAF/MCP-1が経過とともに増加する。かかる事実は、腎におけるケモカイン発現が異なる疾患活動性(病理学的変化)を反映し、尿中ケモカイン測定が臨床的指標としても有用であることを示している(Yokoyama H, et al., J Leuk Biol 63: 493-499, 1998.) さらに、間質内の好酸球浸潤例において尿中Eotaxinの増加を認めた(Wada T, et al., Nephrol Dial Transplant 14: 76-80, 1999.)

細胞接着分子との関連では、糸球体におけるCD62p, ICAM-1発現と尿中IL-8ならびに血清TNF- $\alpha$ は白血球浸潤を伴う急性期糸球体障害において亢進し、これと平行した可溶性分子の血清レベルでの増加も認められた(Yokoyama H, et al., Nephron 76: 425-433, 1997., Segawa C, et al., Kidney Int 52: 1054-1063, 1997.)

## II. 抗ケモカイン療法の基礎的検討.

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<sup>1)</sup>。これまでにウイスター、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<sup>2, 3)</sup>。この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<sup>2)</sup>。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・活性化因子である 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<sup>4-6)</sup>。さらに、腎固有細胞であるメサンギウム細胞や尿細管上皮においても インターロイキン (interleukin, IL-1), 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - $\alpha$  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<sup>7-9)</sup>。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<sup>10, 11)</sup>。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<sup>12-14)</sup>。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

#### 1. 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<sup>15)</sup> 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 cDNA<sup>16)</sup> はリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) で刺激したラット脾臓細胞からRNAを抽出しRT-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pH7.5, 10mM トリス塩酸緩衝液で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pH7.5, 0.02Mリン酸ナトリウム緩衝液で溶出した。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、pH 7.5, 0.02Mリン酸ナトリウム緩衝液で濾過した。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pH 7.5, 0.02Mリン酸ナトリウム緩衝液で溶出した。えられた試料内のMCAF/MCP-1はSDS-PAGE解析によって同定した。最終的にえ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<sup>5, 16)</sup>。

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えた。免疫動物および正常動物から血清をえた後プロテインAカラム (Pharmacia-Biotech) を用いてIgG分画を精製した。

## 2. 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<sup>6)</sup> の報告に従ってラットの末梢単球を用いて測定した。8 $\mu$ mの孔を有するポリビニール ポリカーボネイ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 $^{\circ}$ C, 90分間反応させた。反応後にポリビニール ポリカーボネイ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。

## 3. 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<sup>17)</sup> の方法に従って分離した。え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。え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 $^{\circ}$ Cに加熱し補体を非働化した。

## 4. 抗糸球体基底膜抗体型腎炎モデルの作製

実験1. 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えた。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. 腎炎発症後の抗MCAF/MCP-1抗体の効果を確かめる目的で実験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。

## 5. 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<sup>18)</sup>.

$$\text{糸球体硬化スコア} = (0 \times N0 + 1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4) / 50$$

(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・アセトンで冷却した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 $\mu$ mに薄切した. 細胞増殖のマーカーとして抗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 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 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<sup>13)</sup>. 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.

#### 6. 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<sup>19)</sup>. 尿蛋白は24時間排泄量として表した. 血液尿素窒素 (blood urea nitrogen, 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.

#### 7. 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, マルチプレー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.

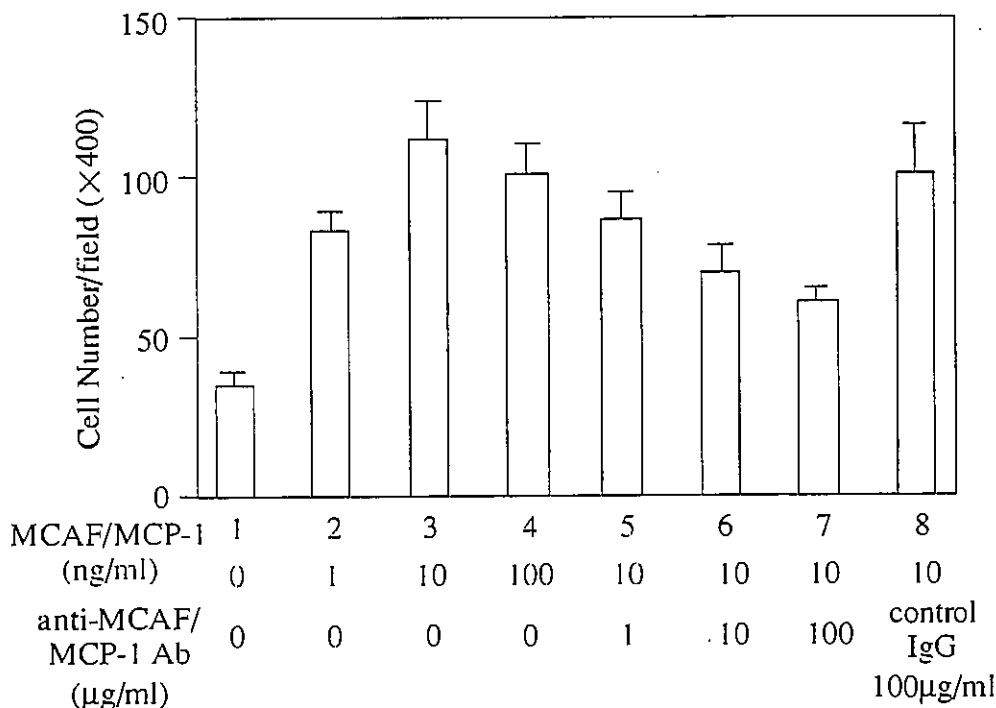
#### 8. 統計処理



各群間の比較は対応のないt検定, Wilcoxon signed rank 検定およびANOVA検定で行った. 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±標準誤差で示した.

成績

1. 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. 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 $\mu$ 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).



2. 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.

### 3. 実験1: 抗糸球体基底膜型腎炎惹起時の抗MCAF/MCP-1抗体単回投与による検討

(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, 炎症細胞浸潤を認めた (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. 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. 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. 糸球体内総細胞数, PCNA, ED-1陽性細胞数およびCD8陽性細胞の検討では, 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%抑制されたが、CD8陽性細胞浸潤の抑制は認められなかった(表1)。腎炎惹起14日目の検討では壊死性病変、糸球体内PCNA、ED-1陽性細胞数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の間に有意差を認めなかった(壊死性病変、抗MCAF/MCP-1抗体投与群、 $0.12 \pm 0.03$ ; 対照群、 $0.18 \pm 0.03$ ; PCNA陽性細胞数、抗MCAF/MCP-1抗体投与群、 $3.0 \pm 0.4$  /糸球体; 対照群、 $2.3 \pm 0.4$  /糸球体; ED-1陽性細胞数、抗MCAF/MCP-1抗体投与群、 $4.3 \pm 0.7$  /糸球体; 対照群、 $4.1 \pm 0.6$  /糸球体)。

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

	Normal rat	Day 3		Day 6	
		Control IgG	anti-MCAF Ab	Control IgG	anti-MCAF Ab
Crescentic formation %	0	$15.2 \pm 1.0$	$7.0 \pm 1.0$ <sup>b</sup>	$38.9 \pm 5.5$	$26.1 \pm 1.3$ <sup>a</sup>
Total cell number cells/glomerulus	$55.3 \pm 1.1$	$88.9 \pm 3.1$	$59.6 \pm 2.0$ <sup>b</sup>	$136.4 \pm 6.2$	$103.4 \pm 6.0$ <sup>a</sup>
PCNA-positive cells cells/glomerulus	$1.8 \pm 0.5$	$4.1 \pm 0.2$	$2.9 \pm 0.2$ <sup>b</sup>	$6.9 \pm 0.2$	$4.7 \pm 0.3$ <sup>b</sup>
ED1-positive cells cells/glomerulus	$0.8 \pm 0.1$	$10.1 \pm 0.2$	$7.2 \pm 0.1$ <sup>b</sup>	$11.7 \pm 0.4$	$9.0 \pm 0.2$ <sup>h</sup>
CD8-positive cells cells/glomerulus	$0.2 \pm 0.02$	$2.7 \pm 0.2$	$2.4 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.1$

Values are given as mean  $\pm$  SEM.

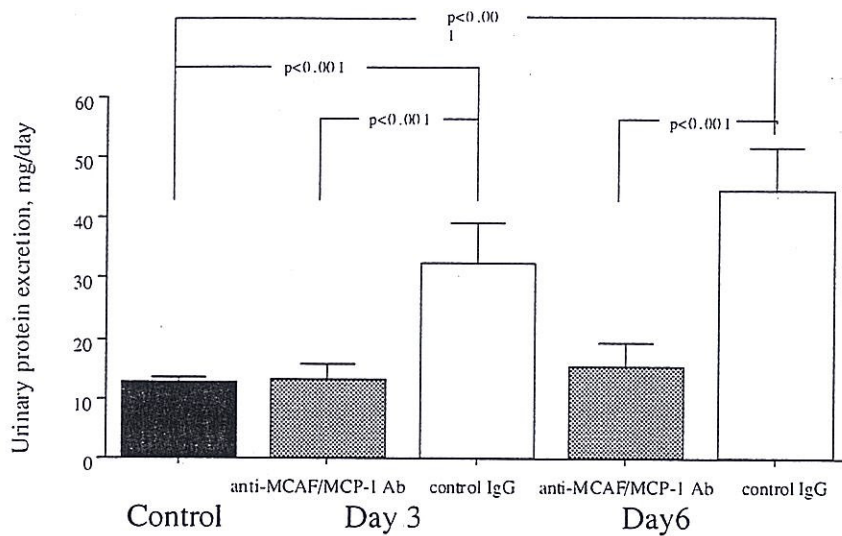
Statistical analyses are based on unpaired t-test and ANOVA test; a,  $P < 0.05$ ; b,  $P < 0.01$ , compared to control IgG-treated rats.

(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。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。

(3) MCAF/MCP-1の発現：腎炎惹起3日目の腎局所でのMCAF/MCP-1の発現を免疫組織学的に評価した。MCAF/MCP-1は糸球体内、血管内皮細胞、尿細管上皮細胞および浸潤単核球に陽性であった。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。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 $12.5 \pm 1.0$ 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、 $32.4 \pm 6.8$ mg/日、6日目、 $44.8 \pm 7.2$ 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、 $12.9 \pm 3.0$ mg/日、6日目、 $15.4 \pm 3.9$ mg/日、それぞれ、 $p < 0.001$ ) (図2)。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±24.8mg/日; 対照群, 59.4±12.9mg/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  $0.95 \pm 0.19$  と強い糸球体硬化を認めた. 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  $0.47 \pm 0.06$  と有意に改善された. 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. 対照群ではBUNの上昇, 24時間クレアチニ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腎機能の改善が確認された (表2) .

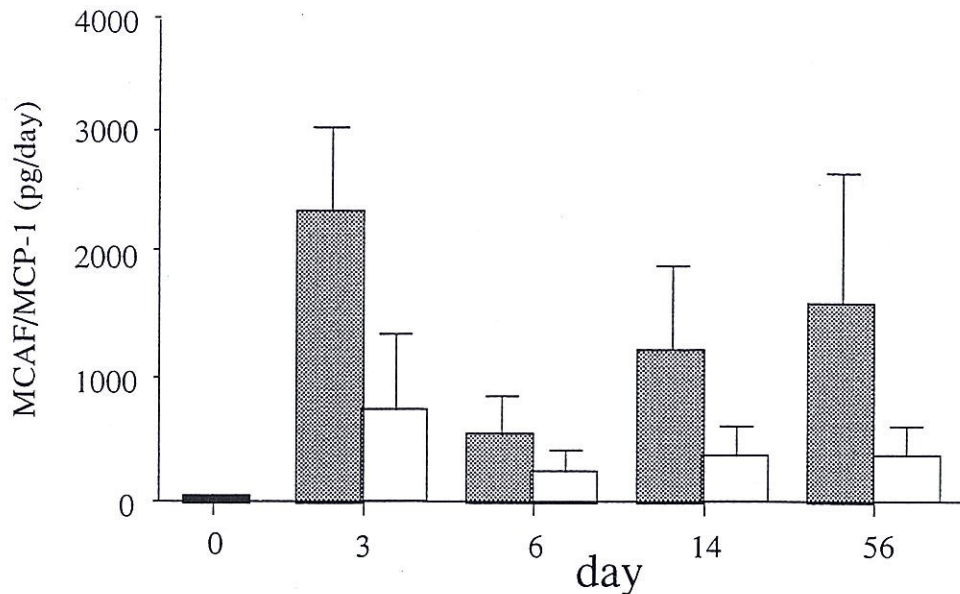
Table 2. Improvement of laboratory data and glomerulosclerosis on day 56 by anti-MCAF/MCP-1 antibodies.

	Administration on day 0	
	Control IgG	anti-MCAF
Urinary protein (mg/24 hours)	$173.7 \pm 22.4$	$63.5 \pm 33.2$ <sup>a</sup>
2-hour Ccr (ml/min)	$0.99 \pm 0.10$	$1.23 \pm 0.08$ <sup>b</sup>
Blood urea nitrogen (mg/dl)	$33.2 \pm 2.0$	$24.5 \pm 2.6$ <sup>a</sup>
Glomerular sclerosis (index/glomerulus)	$0.95 \pm 0.19$	$0.47 \pm 0.06$ <sup>a</sup>

Values are given as mean ± SEM.

Statistical analyses are based on unpaired t-test or Wilcoxon signed rank test: a,  $P < 0.05$ , b,  $p = 0.06$  compared to control IgG-treated rats.

(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 $785 \pm 588$ pg/日と増加し, その後 $268 \pm 187$ 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 $391 \pm 250$ pg/日,  $365 \pm 292$ pg/日) (図3) . 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 $2374 \pm 715$ pg/日, 6日目 $560 \pm 350$ pg/日, 14日目 $1242 \pm 683$ pg/日, 56日目 $1611 \pm 1093$ pg/日と対照群と同様のパターンを示したが, いずれにおいても高値であった.



実験1において腎炎惹起時に抗MCAF/MCP-1抗体投与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，組織学的変化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，組織学的改善を目的に実験2を行った．

#### 4. 実験2：腎炎発症後の抗MCAF/MCP-1抗体投与の効果

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（ $48.0 \pm 9.3\%$ ）は対照群（ $69.1 \pm 2.0\%$ ）に比較して有意に抑制された．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．

Table 3. Effects of anti-MCAF/MCP-1 antibodies on crescentic formation, ED-1 and PCNA positive cells in glomeruli and urinary protein excretion on day 14.

	control IgG	anti-MCAF/MCP-1 antibodies administration	
		on day 0 and 7	on day 7
Crescentic formation %	$69.1 \pm 2.0$	$48.0 \pm 9.3^a$	$67.3 \pm 3.0^b$
PCNA-positive cells cells/glomerulus	$2.3 \pm 0.4$	$3.2 \pm 0.6^d$	$4.2 \pm 0.3^c$
ED1-positive cells cells/glomerulus	$4.1 \pm 0.6$	$2.9 \pm 0.5$	$8.1 \pm 0.6$
Urinary protein mg/day	$59.4 \pm 12.9$	$54.5 \pm 18.8$	$57.3 \pm 5.3$

Values are given as mean  $\pm$  SEM.

Statistical analyses are based on ANOVA test: a,  $P < 0.05$ ; b,  $P < 0.01$ ; 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.

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。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 $54.5 \pm 18.8$ mg/日、 $47.3 \pm 5.3$ mg/日であり、対照群の $59.4 \pm 12.9$ mg/日に比較して蛋白尿改善効果を認めなかった(表3)。

### 討論

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<sup>20-22)</sup>。さらに、抗IL-1抗体や抗TNF- $\alpha$ 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<sup>23)</sup>、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<sup>24)</sup>。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<sup>7-9)</sup>、かつ生体内においても炎症性サイトカイン(IL-1やTNF- $\alpha$ )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<sup>10-12)</sup>。さらに、本研究においてこれまでIL-1やTNF- $\alpha$ 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<sup>25)</sup>、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- $\alpha$ で産生誘導される monocyte chemoattractant protein (MCP) -2,3, regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammatory protein (MIP) -1 $\alpha$ ,  $\beta$ <sup>24)</sup>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<sup>26)</sup>、ED-1陽性単球・マクロファージのみならず<sup>27)</sup>腎固有細胞であるメサンギウム細胞や $\alpha$ 平滑筋陽性細胞にも発現することが報告されている<sup>28)</sup>。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<sup>24)</sup>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<sup>27, 34)</sup>。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<sup>2, 29)</sup> 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<sup>30)</sup>、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えられたことより、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<sup>24)</sup>、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<sup>31)</sup>。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<sup>19)</sup>、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。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, TGF) - $\beta$ 、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間質障害を生じることが知られるようになり<sup>32, 33)</sup>、蛋白尿そのものが腎疾患の共通進展因子であると考えれば、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が推測される。

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 (unpublished data)、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。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<sup>34)</sup>、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 $\alpha$ 、 $\beta$ 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え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・活性化にはたす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、尿細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に差を認めたが、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、ED-1ならびにPCNA陽性細胞の増加を認めた。

#### 引用文献

- 1) Churg J, Bernstein J, Glassock 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, Larssen 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) Schmodder R, Strieter RM, Kunkel SL. Interferon-gamma regulation of human cortical epithelial cell-derived monocyte chemotactic peptide-1. *Kidney Int* 44: 43-49, 1993
- 10) Stahl RAK, Thaiss 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 KI, Matsushima K. Monitoring urinary level 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: 1135-114, 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- $\alpha$  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) 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

- 30) 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
- 31) 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
- 32) Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79: 319-326, 1987
- 33) Burton C, Harris K. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 27: 765-775, 1996
- 34) Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss 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

The role of monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in rat experimental crescentic glomerulonephritis

We investigated the pathophysiological roles of a potent macrophage (M $\phi$ ) 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 activation and infiltration of M $\phi$  in glomerulonephritis, we administrated anti-MCAF/MCP-1 antibodies. Anti-MCAF/MCP-1 antibodies decreased urinary excretion of protein on day 3 and 6 to normal levels. Anti-MCAF/MCP-1 antibodies also decreased the number of M $\phi$  in glomeruli, crescentic formation and the fusion of 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 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 anti-MCAF/MCP-1 antibodies treated rats as compared with normal rats, or control IgG treated rats. Furthermore, to clarify the effect of MCAF/MCP-1 on M $\phi$  activation after the induction of glomerulonephritis, we administrated anti-MCAF/MCP-1 on day 0 and/or 7. The serial administration of anti-MCAF/MCP-1 antibodies on day 0 and 7 did not reduce crescentic formation, PCNA- or ED-1-positive cells as compared with those of the single administration 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 control IgG treated rats. These results suggest that MCAF/MCP-1 essentially participates in the impairment of renal functions associated with crescentic glomerulonephritis by recruiting and activating M $\phi$  in the early phase. The intervention of MCAF/MCP-1 would be a key treatment of glomerulonephritis in future.

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

### III. まとめ

実験腎炎モデルにおけるケモカイン発現ならびに抗ケモカイン療法の基礎的検討として Wistar Kyotoラットにおける抗GBM抗体腎炎を用いて、抗MCAF/MCP-1抗体療法の効果を検討した。抗MCAF/MCP-1抗体を抗GBM抗体と同時投与することにより単球/マクロファージ浸潤の約25%減少と半月体形成率の抑制にくわえ、発症6日目までの蛋白尿抑制を確認した。さらに発症56日目の腎機能低下ならびに糸球体硬化がこの抗体初期投与により抑制された。一方、腎炎惹起7日目に抗MCAF/MCP-1抗体を初回あるいは追加投与した場合、発症後7日目のみの抗体投与群では腎炎惹起14日目における単球/マクロファージ浸潤数は対照群と比較して有意に増加した。これより腎局所で産生されたMCAF/MCP-1が、腎炎発症早期の単球・マクロファージ浸潤・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、早期の抗MCAF/MCP-1抗体により腎炎の進展が抑制したことよりケモカインを標的分子とする新しい腎炎の治療が示唆された。さらに、ヒト腎炎におけるケモカイン動態と接着因子の検討として各種腎炎におけるIL-8, MCAF/MCP-1, EotaxinとCD62p (P-selectin), ICAM-1を免疫組織化学ならびに高感度免疫酵素抗体法により尿あるいは血清(血漿)濃度を測定した。尿中MCAF/MCP-1はループス腎炎(WHO IV型)ならびに高度の尿蛋白を伴う進行したIgA腎症において上昇し、尿細管上皮を中心にmRNAならびに蛋白発現が確認された。さらに糸球体におけるCD62p, ICAM-1とIL-8発現は白血球浸潤を伴う急性期糸球体障害において亢進し、これと平行した可溶性分子の血清レベルでの増加が認められた。さらに間質内の好酸球浸潤例において尿中Eotaxinの増加を認めた。これよりヒトにおいてもケモカインあるいは可溶性接着因子の測定は臨床上有用と考えられた。

(横山仁, 日本内科学会雑誌 86:689-694, 1997., Yokoyama H & Wada T, Nephrol Dial Transplant14 [suppl 1]; 39-41, 1999)