

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790590
 研究課題名（和文）ヒトのクリオグロブリン血症性糸球体腎炎モデルマウスの作成
 研究課題名（英文）Establishment of mouse model of human cryoglobulinemic glomerulonephritis
 研究代表者
 伊藤 清亮（ITO KIYOAKI）
 金沢大学・附属病院・医員
 研究者番号：10467110

研究成果の概要（和文）：クリオグロブリン（Cryo）血症性糸球体腎炎のモデルマウスを作成することを本研究の目的とし、Cryo 血症患者より Cryo 活性を持つ IgM 型モノクローナル RF（Cryo+IgM mRF）産生ハイブリドーマを樹立し、Balb/c マウスに投与した。その結果、尿中アルブミンの増加が認められた。腎組織の検討では、管内増殖およびメサンギウム細胞の増殖、Cryo+IgM mRF の糸球体への沈着を認めた。腎組織の変化は軽度であったが、Cryo 血症性腎炎モデルマウス樹立の基礎となるデータが得られた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of our study is to establish a mouse model of cryoglobulinemic (Cryo) glomerulonephritis (GN). We established the hybridoma cell line producing IgM-kappa cryoglobulin with rheumatoid factor activity (Cryo+IgM RF) from a patient with Cryo GN. We administered Cryo+IgM RF to wild type Balb/c mice. Urinary albumin increased. Pathological analysis of kidney tissue showed mild endocapillary proliferation, mild mesangial cell proliferation, and deposition of Cryo+IgM RF in the glomeruli. These results provide basic data for the establishment of Cryo GN although renal pathological changes are mild.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：クリオグロブリン、糸球体腎炎、ハイブリドーマ、モデルマウス、リウマトイド因子

1. 研究開始当初の背景

クリオグロブリン血症性糸球体腎炎は、血

中に低温で沈降する免疫グロブリンが存在し、臨床的には蛋白尿、血尿、腎機能低下を

認め、組織学的には膜性増殖性糸球体腎炎の所見を呈する免疫複合体由来の腎疾患である。クリオグロブリンの構成成分により Type 1 から Type 3 に分類されているが、主に IgM から成るモノクローナル免疫グロブリン（リウマトイド因子活性を持つ）と、主に IgG から成るポリクローナル免疫グロブリンによりクリオグロブリンが構成される Type 2 が最も多い。更に、腎炎以外にも皮膚の紫斑、皮膚潰瘍、関節炎、末梢神経炎等、全身に血管炎によると思われる所見が認められ、免疫複合体病と考えられている。これまでに、マウス由来のクリオグロブリンを用いて樹立された動物モデルの報告はなされているが、ヒトの患者由来クリオグロブリンを用いた動物モデルは非常に少ない。

我々は、Type 2 クリオグロブリン血症性糸球体腎炎と診断した 1 例を経験した。本例はネフローゼ症候群から急速に腎機能低下を来とし、血液透析に導入されたが、治療とともに IgM リウマトイド因子（IgM RF）が著しく減少し皮疹の消失を認め、全身状態は安定した。我々は、急性期の皮膚浸潤 B 細胞と、治療後の末梢血 B 細胞の重鎖可変領域を比較し、①いずれも VH3-30 という同一クローン由来であり somatic hypermutation と intraclonal diversity を認める点、②急性期の皮膚浸潤 B 細胞と安定期の末梢血中の B 細胞を比較すると、最も優位なクローンはアミノ酸配列が数個異なる点を明らかにした。本例の病態解明のため、急性期の末梢血中よりクリオグロブリン活性を有する（Cryo+）IgM mRF を産生するハイブリドーマ株を樹立した。このハイブリドーマを用いることにより、ヒトクリオグロブリン血症性糸球体腎炎の発症機序の解明を行いたいと着想するに至った。

2. 研究の目的

ヒトクリオグロブリン血症性糸球体腎炎の病態及び発症機序を解明するために、我々が樹立したヒト由来 Cryo+IgM mRF を用いてクリオグロブリン血症性糸球体腎炎のモデルマウスを作成することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) クリオグロブリン活性を有するヒト型 IgM（Cryo+IgM mRF）の抽出、野生株ヒト型 IgG の精製

クリオグロブリン血症患者由来の Cryo+IgM mRF 産生ハイブリドーマ細胞をヌードマウス腹腔内に注入し、貯留した腹水よりクリオグロブリン活性陽性の IgM を抽出した。また、HiTrap Protein G（GE healthcare）を用い健常者ボランティアの血清より IgG を抽出、精製した。

2) Cryo+IgM mRF および IgG の野生株マウスへの投与

7-8 週齢の野生株 Balb/c マウス 4 匹を用いて実験を行った。Cryo+IgM mRF は 3 日間連続（Day 0, 1, 2）で 1.2mg ずつ尾静脈より静脈注射により投与した。IgG は Day 0 から Day 2 の間に総量 1.74~10.8mg を腹腔投与し、Day3 もしくは Day7 に組織の評価を行った。実験に用いたマウスは代謝ゲージ内で飼育され、連日蓄尿を行い、アルブミン尿の評価を行った。また、腎炎発症に寄与すると思われる炎症サイトカインが亢進した状態である IL-1 レセプターアンタゴニストノックアウトにおいても同様の検討を行った。

3) モデルマウスの腎臓の組織学的検討

屠殺後に腎臓を摘出し、ブアン固定（蛍光用）およびホルマリン固定（免疫染色用）を

行った。顕微鏡では PAS 染色と HE 染色を行いメサンギウム領域の拡大の有無、メサンギウム細胞増加の有無、炎症細胞の浸潤の有無、毛細血管内腔への沈着物の有無を検討した。

FITC 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体と FITC 標識マウス抗ヒト IgM モノクローナル抗体を用いて、腎組織におけるヒト IgG, IgM の沈着を蛍光抗体法で確認した。更に、マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体とマウス抗ヒト IgM 抗体を用いて酵素抗体法においても検討し、メサンギウム領域への沈着と糸球体の内皮下への沈着を確認した。

4) Fc 部分を置換したヒト・マウスキメラ抗体の作成

クリオグロブリン患者由来の Cryo+IgM mRF 産生ハイブリドーマ細胞の VH を特異的プライマーを用いてクローニングし、マウス IgM 型 Fc を組み込んだ発現ベクターに組み込み、Fc 部分をマウス型に置換したヒト・マウスキメラ抗体を作成した。

4. 研究成果

我々は、ヌードマウス腹腔内に IgM モノクローナル RF 産生ハイブリドーマ細胞を注入し貯留した腹水から得られたクリオグロブリン活性をもつ Cryo+IgM mRF を用いて、野生型 Balb/c マウスにクリオグロブリン血症性糸球体腎炎の誘発を試みた。

Albuwell M kit (Exocell Inc Philadelphia USA) を用いて野生型 Balb/c マウスに Cryo+IgM mRF および IgG を投与した後の尿アルブミン濃度の経過を評価した。その結果、4 例中 3 例で day2-3 をピークに尿中アルブミンの増加が認められたが、尿中アルブミン濃度についてはばらつきが多かった。これは、ELISA が安定していないことが一因と考えられた。

次に、HE 染色および PAS 染色を行い、マウスの腎組織を評価した。いずれのマウスもコントロールと比較して、糸球体には軽度の管内増殖およびメサンギウム細胞の軽度増殖が認められた (図 1)。

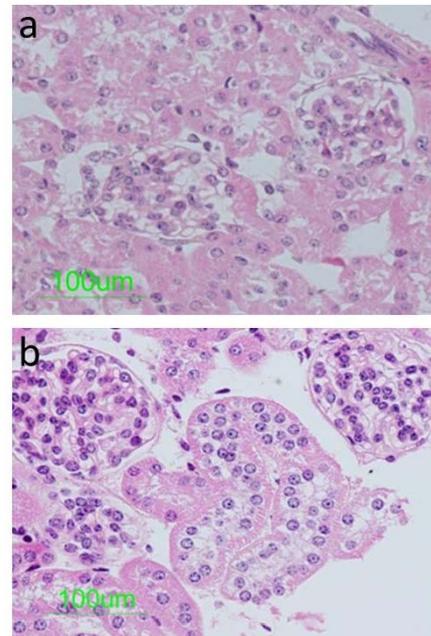


図 1: クリオグロブリンを投与したマウスでは、軽度の管内増殖およびメサンギウム細胞の増殖を認めた。a: コントロール IgM, b: クリオグロブリン

腎炎をより強く誘発するモデルを樹立するため、我々は以下の二つの方法を用いて、腎組織の評価を行った。

①腎炎発症に寄与すると思われる炎症サイトカイン (IL-1, TNF α , IL-6 など) が亢進した状態である IL-1 レセプターアンタゴニストノックアウトマウスを用いる方法

②抗体量を増やして野生型 Balb/c マウスに投与する方法

IL-1 レセプターアンタゴニストノックアウトマウスに Cryo+IgM mRF を 0.2-0.45mg ずつ静脈投与, ヒト野生型 IgG 総量 0.4-1.0mg を腹腔投与し, Day3-7 に組織の評価を行った。その結果、野生型 Balb/c マウスに通常量の Cryo IgM を静脈投与した結果と同様に軽度な

メサンギウム増殖が認められた。

抗体量を増やして野生型 Balb/c マウスに投与した。Cryo+IgM mRF を 5mg 静脈注射し、ヒト野生型 IgG を 2.5mg 腹腔内投与した。その結果、投与した Cryo+IgM mRF 及びヒト IgG は少量投与群では沈着は微弱であったが、大量投与群ではマウス糸球体に強く沈着しているのが認められた。腎炎所見については、大量投与群でも少量投与群と同等の結果であり、典型的な腎炎所見を誘発するには至らなかった。

コントロール群では、IgM および IgG の糸球体への沈着は認めなかったが、Cryo+IgM mRF を投与した群では、IgM 及び IgG の沈着を認め、大量投与群では、糸球体に強く沈着した。この所見はクリオグロブリン血症性腎炎において、クリオグロブリンの糸球体への沈着が腎炎発症に必要であることを示唆する所見と考えられた。典型的な腎炎が誘発されなかった理由として、ヒト型の Cryo IgM では、マウスの補体の活性化を誘発できない可能性やクリオグロブリンの投与回数や量の問題（より持続的なクリオグロブリンの投与が必要）が推定された。

そこで、我々は Cryo IgM の Fc 部分をヒト型からマウス型に置換したヒト・マウスキメラ抗体の作成を行った。まず、Cryo IgM 産生ハイブリドーマより mRNA を抽出し、Cryo IgM 特異的プライマーを用いて、VH をクローニングした。この VH をマウス IgM 用の発現ベクターである、34-3C IgM に組み込み、Cryo-mouse IgM (KR-01 mouse IgM) を作成した。さらに、我々は、Cryo IgM 産生ハイブリドーマより L 鎖のみを産生する変異株 (KR-01 L) をスクリーニングした。今後、KR-01 mouse IgM を KR-01 L 細胞に遺伝子導入し、Cryo IgM の Fc 部分をヒト型からマウス型に置換したヒト・マウスキメラ抗体を作成しマウスへ投

与することによって、より典型的なクリオグロブリン血症性糸球体腎炎を発症させることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

1. Kazunori Yamada, Mitsuhiro Kawano, Ryo Inoue, Hiroshi Fujii, Kiyoaki Ito, Ryoko Hamano, Yasushi Kakuchi, Masami Matsumura, Ichiro Koni, Akihiro Yachie, Masakazu Yamagishi. Somatic hypermutation and intraclonal diversity in monoclonal IgM rheumatoid factor in mixed cryoglobulinemia. World Congress of Nephrology, May 22-26, 2009, Milan Convention Center, Milan, Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 清亮 (ITO KIYOAKI)
金沢大学・附属病院・医員
研究者番号：10467110

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし