

講演

免疫病理学的視点と糸球体疾患

昭和大学医学部内科学講座（腎臓内科学部門）

柴田孝則

平成30年度昭和大学学士会特別講演会—医学部教授最終講義—

2019年3月16日 13:30～14:00 昭和大学病院入院棟地下臨床講堂

○司会 次の講演に移らせていただきます。内科学講座腎臓内科学部門 柴田孝則教授より、「免疫病理学的視点と糸球体疾患」と題し、ご講演を賜ります。柴田先生、よろしくお願ひいたします。

○柴田 それではどうぞよろしくお願ひします。

私の講演は、免疫病理学からみた糸球体疾患の成立機転やその制御に関する研究について、こんな考え方もあるんじゃないかということでお話したいと思います。元々、臨床免疫学に興味があって腎臓の免疫病理学の研究に入りました。

失礼して座ってやらせていただきます。本格的に研究に従事したのはマウスのクリオグロブリン(cryoglobulin: cryo)血症の研究からでした。マウスモデルでは、LPSの注射により、あるいはマラリアに感染させることによって、正常マウスにcryo血症を誘導することができます。また、MRL-lpr/lpr (MRL/lpr) マウスという自然発症自己免疫マウスにおけるcryo血症、そして、そのマウスからhybridoma作成技術によって得られたモノクローナルImmunoglobulin (Ig) G3によるcryo血症モデルがあります。

このようなマウスのcryo血症モデルの解析から、マウスではIgG3サブクラスがcryoの主要なIgであることがジュネーブ大学医学部病理学教室のProf. Izui 研究室の仕事で明らかになりました。当時、IgGのheavy chainの違いで4つに分かれるマウスIgGの中で、なぜIgG3だけがcryoに多いんだろうか?という点に大いに興味を持っていたのです。私が同研究室に飛び込んだのは丁度この時期にあたります。

このcryoの中でも私はMRL/lprマウスとそのマウスから由来したIgG3モノクローナル抗体(mAb)

に特化して研究を始めているのですけれども、既にこのマウスは多彩な自己免疫症候群を起こすということでよく知られておりました。このマウスそのものはポリクローナルなタイプのcryo血症を起こしてきますし、しばしばcryoと同時に解析されるrheumatoid factor (RF) も陽性で、いろいろな全身性自己免疫性疾患を起こしてきます。しかしながら、cryoとRFとの関係が明らかでなかったものですから、このマウス血清からcryoを取り除く前・後でRFがどのように変化するかをみてみました。そうしますと全血清を用い4℃でcryoprecipitationさせると、上清においてこのようにRFの活性はグーっと下がってしまうんですね。しかしながら、RFをはじめとする各種自己抗体が陽性でも自己免疫性病変を起こしてこないMRL以外の背景遺伝子をもつlpr geneのコンジュニックマウスではそのようなcryoprecipitable RFは存在しないということがわかりました。

ヒトSLEに見られる自己抗体が本当に組織病変を惹起するののかというのが疑問でしたから、そういったことを解析するための1つの手段として、当時いろいろなmAbを作っていたんですね。その中のMRL-lprマウス由来の6-19と名付けられたIgG3 mAbは、IgG2aに特異的なIgG3-κのRFで、それだけで*in vitro*でcryoを形成します。そして、正常マウスにトランスファーすると皮膚の血管炎と腎炎を起こしてきます。興味深いのは、cryo形成がIgG3同士のself-associationによるということですね。

その6-19産生hybridomaを正常マウスにトランスファーすると血中に6-19が増えてきます。そうすると肉眼的に明らかな皮膚の血管炎を起こしてきます。両側の外耳、それから鼻尖とか足趾ですね。

外耳の皮膚の組織所見はこのように非常に強い白血球破砕性血管炎を起こしているということがわかりました。

同じマウスの腎臓をみてみますと、6-19をトランスファー後、day 5あたりでこのような糸球体腎炎を呈し、その後、時間経過とともに炎症所見が強くなります。はじめはこういった増殖性の糸球体腎炎、それから day 8 のころにはループ腎炎にみられるような wire-loop 病変をはじめとした多彩な糸球体病変を起こしてきます。蛍光抗体法では、IgG3 が強く染まりそれから補体とフィブリンですね。電子顕微鏡では、このように subendothelial に electron dense deposits が沈着し、これが光顕の wire-loop lesion に相当します。

そこで、6-19の light chain を換えれば RF 活性を喪失することが想定されましたので、当時、30年前でしょうか、その頃ですのまだ genetic engineering の技術応用が困難でした。そこで light chain を換えてしまおうという発想で 6-19 の hybridoma ですね、この細胞と $\lambda 1$ light chain を産生する J-558 という myeloma cell line を用いて hybridoma を作るという試みを行いました。そうしますと、6-19 の heavy chain が $\gamma 3$ で、light chain が $\lambda 1$ の hybridoma ができたのです。その結果、RF 活性はなくなり cryo 形成能は保持した 6-19- $\lambda 1$ という IgG3 mAb ができました。その hybridoma をマウスにトランスファーすると、やはり、このように wire-loop lesion をきたす糸球体腎炎を起こしてきたというわけです。しかし、皮膚の血管炎は起こさない。このことから、結局、6-19 は RF 活性と cryo 形成能の両方があると皮膚血管炎と腎炎を起こす、ところが、light chain を $\lambda 1$ に換えたものですから RF 活性がなくなる、そうすると皮膚の血管炎は起きなくなるということがわかりました。その後、同研究室では heavy chain を $\gamma 1$ にスイッチした variant が作成されましたが、その IgG1 の variant は、RF 活性を保持していましたが cryo 形成能を喪失し、マウスに腎炎も血管炎も起こさないということがわかったのです。

マウスの IgG サブクラスは、IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 と 4 つに分類されますが、それまではそれぞれの補体活性化能とか Fc receptor との結合能とかには注目されていたんですけども、IgG3 では $\gamma 3$ heavy chain の物理化学的な特性、すなわち IgG3

同士で self-association を起こしクリオグロブリンを形成するという特性が新たに注目されるに至ったわけです。もちろんもう 1 つの要因として IgG3 の antigen binding specificity が重要ではありますが。

当時行っていた別の研究で、autoimmune hemolytic anemia (AIHA) についてお話したいと思います。NZB というマウスは自然発症の AIHA を起こすことが知られています。AIHA の発症機序を解析するために、NZB マウスからモノクローナル抗赤血球自己抗体 (anti-RBC mAb) を産生する異なる Ig isotype の hybridoma を数クローン作りしました。ここでは代表的ないくつかの mAb についてお話しますが、anti-RBC mAb を正常マウスにトランスファーすると、どのような病変が起きるかということ、血液学的にはいずれも重度の AIHA を起こしますけれども、これから提示するように、ある mAb ではマウスの脾臓が agglutination した赤血球で 8 割から 9 割が埋まってしまうというような現象が見られました。同じくこれは肝臓ですけれども、同様にこういった所に広範に agglutinated 赤血球で埋まっていますね。これが AIHA の 1 つの機序であることがわかりました。他の mAb では agglutinated 赤血球は見られず、特異な現象として肝臓における erythrophagocytosis が見られました。これが Kupffer 細胞で、これが細胞内に取りこまれた赤血球ですね、これがもうあっちこっちに見られるんですね。このようにしてもう 1 つの機序として erythrophagocytosis により AIHA をきたすということがわかりました。

In vitro でも erythrophagocytosis が起きるかどうかということで、マウスの腹腔から採取したマクロファージとそれぞれの異なる anti-RBC mAb で予め感作したマウス赤血球をインキュベーションすると、このように *In vivo* で erythrophagocytosis を起こすタイプの mAb の場合は、赤血球が Fc receptor を介してマクロファージに貪食されるんですね。先程 agglutination を起こすタイプとしてお見せした anti-RBC mAb の場合は全く貪食されないことから、2 つの機序の相異が *in vitro* でも明らかになりました。

ここから当教室で行った研究の中からいくつか紹介したいと思います。はじめに糸球体腎炎とマクロファージの話です。マクロファージが疾患の成立、

ないしは病変形成に重要な役割を担うことはマウス AIHA の場合にも示されたように明らかですね。そこで糸球体腎炎でマクロファージってというのはどれほど重要なのか? ということで、heterologous のラット GBM 抗血清 (nephrotoxic serum : NTS) を用いたラット馬杉腎炎 (NTS-nephritis) を用いて検討してみました。ラットのある種の系、Brown-Norway というラットを用いて NTS-nephritis を起こす実験においては、complete adjuvant を前処置した場合、このように激しい半月体形成性腎炎を起こす。中には、このような multinucleated giant cell, 多核の巨細胞を持った半月体形成性腎炎を起こすことがわかりました。これを免疫組織化学でみてみますと ED1 陽性細胞で充満していることから、マクロファージが dominant な半月体形成性の NTS-nephritis が惹起された、その発症にはマクロファージが重要だということがわかりました。

それに対しまして、今度は、WKY ラット、これは極めて微量な NTS で半月体形成性腎炎を起こす特殊なラットですけれども、この腎炎を tyrosin kinase inhibitor の imatinib でブロックできるかという実験をやっております。このように、imatinib を投与すると、こういった半月体形成がほとんど起きない。これを解析しますと、やはり ED1 です、ED1 陽性細胞が imatinib 群で抑制されています。これに対し imatinib 未投与群のほうは著しいマクロファージ浸潤を認めています。

ここから臨床の話になります。MRL-lpr マウスの IgG サブクラスの解析でその糸球体病変には IgG3 が重要だということがわかっていましたので、ヒトの SLE ではどのような IgG サブクラスが関与しているのかを解析してみようということで、特発性膜性腎症 (idiopathic membranous nephropathy : iMN) とループス腎炎 (lupus nephritis : LN) を対象に検討しました。というのは、iMN は細胞増殖がないし、LN は細胞増殖が特徴ですが、LN 中には細胞増殖が軽度で膜性変化が主体の膜性ループス腎炎 (membranous lupus nephritis : MLN) と増殖性病変が顕著なびまん性増殖性ループス腎炎 (diffuse proliferative lupus nephritis : DPLN) がありますから、iMN と MLN, DPLN との比較検討にちょうどよかったわけです。

これは iMN の糸球体における IgG の沈着ですけ

れども、この IgG サブクラスは何なのかということがまず 1 つの疑問でした。そこで iMN, MLN, それから DPLN です、これらを比べてみようと思いましたが、DPLN では IgG1 から IgG4 で、特に IgG1, IgG2, IgG3 がよく染まります。MLN でも同じでした。したがって、SLE では LN の組織型では IgG サブクラスの沈着に変わりはありません。iMN になりますと IgG1 と IgG4 で、特に IgG4 が dominant がかつ強く染まるということがわかりました。実際、これは典型例の IF 所見ですけれども、こちらが IgG4 で、IgG1 もいくらか染まります。

さて、IgG4 サブクラスと膜性腎症との関係に何があるのだろうか? ということです。いくつかの動物モデルから示唆されるように、やはり何らかの immunological background があるものと考えられました。そこで、Th1, Th2 バランスが関係あるかもしれない。それから IgG サブクラスの effector function によって違うのだろうかということ。それから IgG4 の特異性、対応する抗原ですね、それは何なのか? この特異性はその当時未知でしたから、これはなかなかアプローチが大変だということ、それ以外のところでアプローチしてみました。まず血清では IgG に占める IgG4 レベルのパーセンテージが iMN では高い。ところが、MLN や DPLN ではそうではなかったんです。そこで *in vitro* の仕事を進めたところ、iMN では spontaneous の cytokine 産生をみると、IFN- γ は正常コントロールと差はなく、IL-4, IL-10, IL-13 の Th2 系の産生が亢進しているという background でした。そこで、今度はそういった cytokine で刺激した時の IgG サブクラスの動態をみますと、IL-4 で刺激した時に IgG4 産生が亢進するというので、Th1, Th2 バランスからいうと、Th2 predominance だということになります。

そうこうしているうちに、iMN において糸球体での免疫複合体を形成する抗原が糸球体ポドサイト膜上のレセプター蛋白であるということがわかりました。これはアメリカのボストン大学のグループの仕事ですけれども、ポドサイト膜表面にある phospholipase A2 receptor (PLA2R) が膜性腎症の主要な責任抗原であるということがわかったのです。自己抗原である PLA2R を染めると、このように顆粒状に染まってきます。PLA2R と IgG はまったく同じように染まるということ、そしてこの IgG

サブクラスはIgG4 dominant だということで、われわれの考えていたiMNにおけるIgG4サブクラスの重要性と一致しました。

さて、わが国のiMNにおいて、PLA2Rがどの程度染まるのか、血中にPLA2Rに対する自己抗体がどの程度検出されるのかということを検討しました。まず抗原から染めてみました。そうすると、50%ぐらいは染まるんですね。二次性の膜性腎症ではまず、ほとんど染まらないんです。それに対して今度は、血清中の抗PLA2R抗体の陽性率の検討では、だいたい50%ぐらいで陽性ということがわかりました。欧米に比べますと少ないのですが、わが国のiMNでもPLA2R抗原が糸球体で染まり、PLA2Rに対する自己抗体が血中にあるということで、iMNは臓器特異的自己免疫病であるということをサポートする所見でした。また、血中抗PLA2R抗体陽性例では糸球体にIgG4がよく染まるし、IgG4の染色が強いという特徴を持っておりました。

最後に、わが国の慢性糸球体腎炎の中で最も多い疾患としてよく知られているIgA腎症に関する研究の話をしたいと思います。IgA腎症はこのようにメサンギウムにIgAが沈着するんですけれども、このIgAのサブクラスはIgA1かIgA2かということ、IgA1が主体なんですね。そしてIgA腎症の発症には糖鎖不全IgA1が重要だということがわかってきています。しかしながら、糸球体で糖鎖不全IgA1を染色したという論文は限られた報告しかありませんでした。最近、糖鎖不全IgA1に対するmAbを作成した人たちがいるのですが、われわれもそのmAbを使って糖鎖不全IgA1が本当に病変に関与しているかを検討してみようということにしました。

この論文はつい最近発表できたんですけども、このようにIgA腎症では組織学的な重症度が進むと糖鎖不全IgA1が強くと染まるということから、糖鎖不全IgA1が重要だということが、病変部位での検討で明らかになりました。他の糸球体疾患では染まらないのですが、ただ1つ、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病(Henoch-Schönlein purpura: HSP)の腎炎、HSP腎炎でも糖鎖不全IgA1が染まってきます。現在、これらIgA腎症とHSP腎炎という2つの疾患そのものの異同が問われておりますが、HSPにおける皮膚病変と糸球体病変との関連が今後の検討課題です。

というような訳で、「免疫病理学的視点と糸球体

疾患」というテーマで、動物モデルで得られた色々な免疫病理学的視点からヒトの糸球体疾患の成立機転に関する研究を中心にお話いたしました。糸球体疾患の制御に関する研究についてはまだまだですが、動物モデルでは新しい治療的なアプローチもわれわれの研究室でいくつか出てきています。ここを区切りに私自身は研究の第一線からは退きますが、今後は、当科の後輩が引き継いでくれるものと期待しています。ご清聴ありがとうございました。

○司会 ありがとうございます。記念の楯を小川医学部長より贈呈いたします。小川医学部長、贈呈と共に柴田先生へ一言お願いいたします。

○小川 柴田教授、ほんとにありがとうございました。柴田教授とは腎泌尿器で学生の講義はいつも一緒でした。柴田先生が作られるのは、いつも格調高い問題で、腎泌尿器科が学生にとって鬼門でした。平均点が低くなるので私がいかに泌尿器のほうで調整して易しい問題を作っていました。一見厳しそうですが、実は非常に優しい先生で、私が学生を不合格にしようかって言っても、いや通しましよよとおっしゃり、優しい先生でいらっしゃいました。また、物事をとても正確に見てらっしゃる先生で、教授会で私がちょっととちったりすると、すぐちゃんと指摘してくださって、いろいろご指摘いただき、すごい緻密な頭の先生でいらっしゃいました。腎臓内科には毎年いっぱい医局員が入っていますし、また、今後も講座は発展すると思います。先生の今後の活躍をお祈りしております。長い間ほんとうにありがとうございました。

○司会 続いて、教室より花束の贈呈をお願いします。

【本稿の終わりに】

本講演におけるマウスを用いた研究は、ジュネーブ大学医学部病理学教室のProf. Shozo Izui研究室で行った研究をもとにautoimmune pathologyの観点から構成したものです。Prof. Izuiと仲間達に深甚なる感謝の意を表します。当教室で行った糸球体疾患に関する基礎研究と臨床研究については、本講演の構成上、限られた研究しかご紹介できませんでした。何卒ご了承ください。最後に、今日まで診療、教育、研究で多くのご指導をいただいた当教室の諸先輩、一緒に仕事をしてきた教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。