

論文の内容の要旨

Clusterin is up-regulated in glomerular mesangial cells in complement-mediated injury

補体依存性糸球体メサンギウム細胞障害において
クラスタリンの発現は増加する

指導教官 後藤 淳郎助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

山田 耕永

糸球体腎炎の大半は免疫複合体の沈着によって引き起こされると考えられており、従来の研究により特に補体の活性化がその糸球体障害に重要な役割を果たすことが明らかにされている。このような場合補体は、その活性化の中間産物(C3a や C5a)が炎症のメディエーターとして働くこと、あるいはその最終産物である膜障害性複合体(C5b-9)が細胞を融解または活性化することにより、障害を引き起こしている。

Thy1 腎炎はメサンギウム増殖性糸球体腎炎のモデルとして、炎症性糸球体腎炎の発症機序解明に役立っている。このモデルラットは、ラット糸球体メサンギウム細胞膜上に発現している Thy1 抗原に対するポリクローナルあるいはモノクローナルな抗 Thy1 抗体を静注することで惹起され、抗体投与後約 1-2 日でメサンギウム領域の融解がおこり、続いてこれを補うように 4 日目ころからメサンギウム細胞の増殖とメサンギウム基質の増加がみられ、約 1 週間で細胞増殖がピークとなり以後メサンギウム細胞のアポトーシスによって細胞数が減少し、約 1 ヶ月で腎炎が回復するという可逆性の経過を辿る。Thy1 腎炎が補体依存性に生じるということは、山本らがコブラベノファクターを投与し C3 を不活化したラットでは Thy1 腎炎がほとんど起こ

らないこと、さらに Brandt らが先天的に C6 の欠損した PVG ラットに抗 Thy1 抗体を投与してもほとんど腎炎が惹起されないことにより示しており、Thy1 腎炎の発症には補体成分のうちとりわけ最終産物 C5b-9 が重要な役割を果たすことが分かっている。

このような不適切な補体の活性化から自己を守るため、生体は種々の補体調節蛋白による防御機構を備えている。補体調節蛋白には細胞膜に結合している膜結合型のもものと血中に存在する可溶型のものがある。このうち膜結合型の補体調節蛋白は糸球体細胞に豊富に存在することから従来より注目され、培養糸球体細胞や種々の動物モデルを用いた実験により腎炎における機能的な重要性が明らかにされてきた。一方、可溶型補体調節蛋白の糸球体腎炎における役割についてはほとんど知られていなかった。最近可溶型補体調節蛋白の一つである Factor H の欠損によりブタの膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN type II)が生じることが報告された。また他の可溶型補体調節蛋白であるクラスタリンについても、Fx1A 抗体を投与したラット(膜性腎症モデルラット)の分離腎にクラスタリン欠損血清を灌流すると蛋白尿の増加と糸球体での C5b-9 の沈着増加がみられることが示された。これらのことから可溶型補体調節蛋白と糸球体腎炎との関わりも重要であると考えられ、我々はこのクラスタリンに注目した。

クラスタリンは 1983 年にはじめて羊の精液から抽出された 40kDa の 2 つの異なる α サブユニットと β サブユニットからなる酸性糖蛋白質で、以来多くの研究者によりさまざまな種と組織で homologue が同定されている。この蛋白は大部分の臓器の主に上皮細胞に発現が認められ、特に精巣、精巣上体、肝臓、胃、脳での発現が多いことが知られている。クラスタリンはその体内分布と *in vitro* のデータからさまざまな機能をもっていると考えられ、可溶型補体調節蛋白としての補体調節機能 (C5b-7 に結合することで C5b-9 の形成を阻害する) 以外にも脂質輸送、精子の成熟促進作用、抗アポトーシス作用、cell interaction 促進機能などをもつことが分かっている。そしてこのクラスタリンは組織障害や組織の変性時に発現が増加することが知られており、糸球体腎炎のような腎疾患の他、アルツハイマーのような神経変性疾患、癌、心筋梗塞、動脈硬化など、さまざまな疾患において発現の増加が認められる。

糸球体腎炎におけるクラスタリンの発現に関しては、補体依存性の膜性腎症のような免疫複合体関与の糸球体腎炎の糸球体内で、C5b-9 とともにクラスタリンの

沈着が認められることが報告されている。さらに膜性腎症モデルラットの分離腎にクラスタリン欠損血清を還流させると、蛋白尿が増加することが示されている。これらのこととクラスタリンが C5b-9 の形成を抑制するという *in vitro* のデータから、糸球体腎炎で認められるクラスタリンは、補体調節蛋白として補体の攻撃から自己を守る役割を果たしているのではないかと考えられている。しかしこの糸球体で認められるクラスタリンが糸球体細胞で産生されたものなのか、流血中から糸球体へ移行したもののものかについては議論の多いところである。最近の *in vitro* の実験では、糸球体のメサンギウム細胞や上皮細胞をトロンビンで刺激すると、クラスタリンの mRNA が増加することが示されており、ある病的な状態下では糸球体細胞はクラスタリン産生を増加させるのではないかと推測されている。

このような観点から今回我々は、補体の攻撃により糸球体メサンギウム細胞が可溶性補体調節蛋白であるクラスタリンの産生を増加させるかどうかを *in vitro* と *in vivo* で検討した。まず *in vitro* で培養ラット糸球体メサンギウム細胞をポリクローナルな抗 Thy1 抗体である antithymocyte serum (ATS) 抗体で感作した後、補体成分として 5% 正常ラット血清入り Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養し (メサンギウム細胞膜に C5b-9 が挿入されてはいるがほとんどの細胞が壊れていない状態、すなわち C5b-9 による sublytic な刺激を加え)、次に 0.5% fetal calf serum (FCS) 入り DMEM で 0, 12, 24, 48, 72 時間培養後、クラスタリン蛋白発現の time course を調べるため培養上清を Western blot 法で検討したところ、刺激後 24 時間目をピークとするクラスタリン蛋白の発現増加を認めた。一方コントロールとして ATS 抗体で感作のみした場合、ATS 抗体感作なしに 5% 正常ラット血清入り DMEM のみで培養した場合、または DMEM のみで培養した場合には、クラスタリン蛋白の発現増加はみられなかった。またこのクラスタリン蛋白の発現増加が実際に C5b-9 による刺激によるものであることを確認するため、メサンギウム細胞を ATS 抗体で感作し、5% C6 欠損ラット血清入り DMEM で培養したところ (C5b-9 は形成されない)、クラスタリン蛋白の発現増加は認められなかった。さらに Northern blot 法により C5b-9 の刺激でメサンギウム細胞におけるクラスタリン mRNA が発現増加することも確認された。次に *in vivo* でラットにモノクローナルな抗 Thy1 抗体 (OX-7) を投与することで Thy1 腎炎を惹起し、抗体投与後細胞増殖がピークとなる 8 日目と腎炎回

復期である 29 日目の腎組織で Northern blot 法、in situ hybridization 法によりクラスタリン mRNA の発現を、免疫組織染色によってクラスタリン蛋白の発現を検討した。OX-7 を投与しなかったコントロール群に比べ、Thy1 腎炎 8 日目の糸球体ではクラスタリン mRNA の発現の増加がみられ、さらに多くの糸球体メサンギウム領域に C5b-9 の沈着と一致したクラスタリン蛋白の発現増加が認められた。このクラスタリン mRNA および蛋白の発現増加は 29 日目にも認められた。なおコントロールラットおよび Thy1 腎炎 29 日目の糸球体には C5b-9 の沈着はみられなかった。

以上、in vitro および in vivo で補体刺激が糸球体メサンギウム細胞のクラスタリン産生を増加させること、さらに Thy1 腎炎 8 日目の多くの糸球体メサンギウム領域にクラスタリンが C5b-9 と共存することを示した。従来から免疫複合体関与の糸球体腎炎の糸球体内で C5b-9 とともにクラスタリンの沈着がみられることが免疫染色すなわち蛋白レベルで示され(クラスタリン蛋白が血中から移行したものか、糸球体細胞で産生されたかは不明)、また最近 in vitro ではある条件下で培養糸球体メサンギウム細胞のクラスタリン mRNA の発現が増加することが知られているが、今回我々は in vivo で補体(C5b-9)依存性糸球体腎炎の糸球体メサンギウム細胞が、蛋白レベルだけでなく mRNA レベルでもクラスタリンの発現を増加させること、すなわち糸球体局所でのクラスタリンの産生が増加することをはじめて示した。そして in vitro で C5b-9 による刺激により培養糸球体メサンギウム細胞のクラスタリンの発現が増加することや Thy1 腎炎 8 日目の多くの糸球体メサンギウム領域にクラスタリンと C5b-9 が共存することから、このような糸球体腎炎における糸球体メサンギウム細胞のクラスタリン発現増加は、膜結合型補体調節蛋白とともに補体攻撃から糸球体メサンギウム細胞を防御するために重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。これまで糸球体腎炎において可溶性補体調節蛋白が糸球体細胞局所で過剰産生されるとの報告はなく、本研究は遺伝子組み替え型クラスタリンの投与や遺伝子導入による糸球体局所でのクラスタリン過剰発現によって糸球体腎炎を抑えるという新たな治療戦略を呈示するものとする。