

## 論文の内容の要旨

論文題目      **LipoxinA4** アナログによる抗 **GBM** 抗体腎炎モデルに対する腎炎抑制効果  
指導教官      藤田敏郎 教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 13 年 4 月入学  
医学博士課程  
内科学専攻  
氏名            大瀬 貴 元

[背景] 抗 **GBM** 抗体腎炎モデルは、実験腎炎動物モデルとして古くから利用されてきたモデルであり、免疫反応を介する腎炎モデルとして代表的なものである。ヒトの抗 **GBM** 抗体腎炎はその糸球体基底膜を構成する IV 型コラーゲンの  $\alpha 3$  鎖及び  $\alpha 4$  鎖の NC1 ドメインに対する自己抗体が形成されることで糸球体を中心とした細胞浸潤を伴う腎炎が起こることが知られている。実験動物モデルでは、動物から採取した糸球体基底膜を含む抗原物質で作成したポリクローナル抗体を、目的の動物に投与することで腎炎を惹起する。通常ウサギなどの動物で作成した抗体をマウスなどの異種に投与するため、病態は次の二つの時期に分けられることがこれまでの研究で知られている。まず抗体投与 1 時間後から、投与したウサギの抗体が標的であるマウスの糸球体基底膜を認識して炎症を惹起する。この炎症は通常抗体投与 2 時間後に好中球浸潤を中心とした最も強い炎症が起き、**acute phase, heterologous phase** などと呼ばれる。この炎症の後、糸球体基底膜に結合しているウサギ抗体を、異種と認識して攻撃するマウス自身の免疫反応が起こり、単球・マクロファージなどを中心とした炎症が惹起される。この時期は **late phase, autologous phase** と呼ばれる。一方、**LipoxinA4** はリポキシゲナーゼによって産生されるエイコサノイドの一種であり、炎症や血管でのイベントに伴って産生されることが知られており、

アラキドン酸が 15-, 5-, 12-リポキシゲナーゼなどの働きによって段階的に酸化されて産生され、産生される経路によって **LipoxinA4**, **aspirin-triggered LipoxinA4(ATL)**が存在する。この **LipoxinA4** はアラキドン酸カスケードの中では抗炎症作用を持つ数少ない物質として知られ、これまでに細胞の好中球の遊走・接着・内皮細胞を介した浸潤を抑制する効果が報告されている。体内に存在する **native** な **LipoxinA4** は速やかに代謝されることが知られており、これまで実験動物モデルに投与することが困難であったが、体内でも安定した動態を示す **LipoxinA4** のアナログが近年いくつか開発され、徐々に実験動物モデルでの抗炎症効果が報告されるようになってきた。これまでに **TNF $\alpha$**  投与による皮膚炎モデル、腎での虚血再還流モデルなどのモデルにおける **LipoxinA4** アナログの治療効果について報告が見られている。

今回の論文では、**aspirin-triggered LipoxinA4** のアナログの一つ、**15-epi-16-(para-fluorophenoxy)- lipoxinA4 methyl ester (15-epi-16-(FPhO)-LXA-Me)**, (**ATLa** : **aspirin-triggered LipoxinA4 analogue**) を使用してマウス抗 **GBM** 抗体腎炎モデルに対する治療効果について検討した。

**[方法]** **ATLa** 治療群では腎炎惹起 30 時間前から **ATLa** を 8 時間ごとに 4 回腹腔内投与した。ウサギ抗 **GBM** 抗体をマウスに投与し、2 時間後に腎組織を採取し、免疫組織染色で炎症細胞浸潤・炎症細胞による酸化・ニトロ化ストレスのマーカーであるチロシンのニトロ化を評価を行った。さらに、**ATLa** 投与により好中球浸潤が抑制された機序を検討するため、フローサイトメトリーで循環血液中の好中球の表面に発現する接着分子(**CD11b**)を評価した。

続いて **GeneChip** を用いて、コントロール群・腎炎惹起群・腎炎惹起+**ATLa** 投与群の 3 群について腎炎惹起 2 時間後での腎における **mRNA** の発現を解析した。さらにその結果を **realtimePCR** を用いて評価した。さらにこれらの結果から得られた、抗 **GBM** 抗体腎炎の **heterologous phase** における好中球浸潤と **IFN $\gamma$**  関連遺伝子の関係を調べるために **IFN $\gamma$**  欠損マウスを用いて抗 **GBM** 抗体腎炎を惹起し、炎症細胞浸潤を評価した。

**[結果]** 治療群では有意な好中球浸潤減少(0.440 vs 1.227 個/糸球体)とチロシンニトロ化の軽快を認めた。フローサイトメトリー解析した好中球表面上の **CD11b** の発現は、治療群でも変化が見られなかった。**GeneChip** による解析で **mRNA** は疾患群で 2 倍以上亢進する 54 個の遺伝子を抽出した。**IFN** により誘導される遺伝子が 18 含まれ、多くは **ATLa** による治療で発現が減少していた。4 遺伝子(**IRF1**, **PSMB9**, **TGTP**, **IGTP**)を選択し **realtimePCR** で解析を行い、**GeneChip** と同様の変化を確認した。好中球浸潤の抑制と **IFN** 関連遺伝子の抑制の関連を調べるために **IFN $\gamma$**  欠損マウスを用いて抗 **GBM** 抗体腎炎を惹起して組織の細胞浸潤を評価したが、惹起後 2 時間での好中球浸潤は野生型と有意

差を認めなかった。

**[結論]** ATLa 治療により好中球浸潤および酸化・ニトロ化ストレスのが抑制され、IFN により誘導される遺伝子の減少が認められた。今回使用した抗 GBM 抗体腎炎モデルは、これまで疾患早期では IFN $\gamma$  の関与はほとんど知られておらず、今研究においてはじめてその関与が示された。ノックアウトマウスを用いた検討では、本モデルにおける IFN $\gamma$  の誘導が、好中球浸潤の直接の原因ではないことが示され、mRNA の解析によって明らかとなった ATLa による IFN $\gamma$  関連遺伝子の抑制は、これ自体が好中球浸潤抑制の原因となっていないことが示唆された。