

主論文の要旨

**Growth factor midkine promotes NFAT-regulated
T cell activation and T_H1 cell differentiation
in lupus nephritis**

〔 成長因子ミッドカインはループス腎炎において NFAT を介した
T 細胞の活性化とヘルパー T 細胞 1 型への分化を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

増田 智広

【緒言】

ループス腎炎 (LN) は全身性エリテマトーデス (SLE) の予後を規定する重要な合併症である。その発症・病勢増悪には、遺伝的・環境的素因と併せて多彩なサイトカインやケモカインにより誘導されるヘルパーT (T_H) 細胞を含めた免疫機構が複雑に関与する。T_H1・T_H2・T_H17 細胞、制御性 T 細胞 (Treg) を含む T_H 細胞はそれら自身も様々なサイトカインを分泌し分化・増殖を繰り返すが、その一連の過程において Calcineurin (Cn) 依存的な核内転写の活性化を促す Nuclear factor of activated T cells (NFAT) は中心的な役割を果たす。それ故に、NFAT 誘導を示すシグナル伝達経路は LN に対する治療標的となる可能性を有する。

ミッドカイン (MK : gene name, *Mdk*) は、発生・腫瘍形成・炎症進展の分野で多彩な生理活性を示すヘパリン結合性成長因子で、正常腎では主に近位尿細管に、障害時にはメサンギウム細胞や糸球体血管内皮細胞においても発現が誘導される。これまでに腎臓学領域において MK は急性尿細管壊死、糖尿病性腎症の炎症進展過程や血管内皮細胞由来脱分極因子を介した高血圧症の増悪に寄与する事が報告されている。神経領域において、錫村らは実験的多発性硬化症 (MS) モデルにおいて MK が Interleukin (IL) -2 分泌の抑制を介して Treg の誘導を抑制・T_H17 細胞増殖を促し、最終的に MS の病勢悪化を呈する事を報告している。しかしながら、これまでに自己免疫疾患関連の腎障害における MK の関与についての報告はなされていない。

【目的】

本研究では TMPD (プリスタン) 誘導性 LN マウスを用いて、自己免疫疾患関連腎障害における MK の役割を明らかにする事により LN の発症・進行起序を解明し、MK の新たな治療標的としての可能性を探索する事を目的とする。

【方法】

8-12 週齢の雌の野生型マウス (*Mdk*^{+/+}) と MK 欠損型マウス (*Mdk*^{-/-}) に TMPD を 500 μL 腹腔内投与し、実験的 LN モデルを作成した。TMPD 投与 6 ヶ月後に血清・尿・腎臓・脾臓を採取し、それぞれ病理組織学的・分子生物学的に比較検証した。

【結果】

TMPD 投与後 6 ヶ月において、*Mdk*^{-/-}では *Mdk*^{+/+}と比して光顕所見にてメサンギウム細胞・基質の増殖を伴う腎糸球体障害が有意に抑制されていた (Figure 1A)。光顕所見と一致して、*Mdk*^{-/-}では蛍光免疫染色における IgG、C3 と電顕所見における electron dense deposit (EDD) の糸球体沈着は、特に上皮領域において著減を示した (Figure, 1B, 1C)。腎組織障害の程度と同様に *Mdk*^{+/+}は尿タンパク量・糸球体内 CD4 陽性 T 細胞 (CD4 細胞)・CD68 陽性マクロファージ数は有意に増加した (Figure1D, 1E)。特に、フローサイトメトリー法を用いた検証にて腎臓への T_H1 細胞の有意な組織浸潤が明らかとなった (Figure1F)。

脾臓について、*Mdk*^{+/+}に LN 発症後 MK の著明な発現増強を認めた (Figure2A)。腎臓における Profile と同様に *Mdk*^{+/+}において T_H1 細胞は有意に増加していたが、T_H2、T_H17 細胞、Treg などの他の T 細胞では両群間に変化を認めなかった。加えて、T 細胞の活性化を示す CD69 陽性 CD4 細胞は *Mdk*^{+/+}で有意に増加していた (Figure2B, 2C)。以上より、MK は活性化 T 細胞や T_H1 細胞の脾臓における分化・増殖及び腎組織浸潤を促し、LN の病勢増悪に寄与すると考えられた。

次に、*Mdk*^{+/+}あるいは *Mdk*^{-/-}由来の脾臓より分離した naïve CD4 細胞を抗 CD3/CD28 抗体を用いて活性化させ、T 細胞の分化・増殖機構における MK の役割を検証した。T 細胞の活性化過程において、培養上清中の MK タンパクは時間依存的に著増した (Figure3A)。その際、*Mdk*^{+/+}由来 T 細胞では CD69 陽性細胞の増加・核内における NFAT1 の発現およびその産生サイトカインである Interleukin (IL) -2 の上清中への分泌増加が認められた (Figure3B, 3C, 3D)。種々のサイトカイン刺激により naïve CD4 細胞を T_H1・T_H2・T_H17 細胞及び Treg にそれぞれ強制分化させると、*Mdk*^{+/+}由来 naïve CD4 細胞は *Mdk*^{-/-}由来細胞と比して T_H1 細胞への有意な分化・増殖を示した (Figure3E)。他の T_H2・T_H17 細胞及び Treg への分化能に両群間において有意な差を認めなかった。T_H1 細胞分化に関与する Interferon- γ / signal transducers and activator of transcription (STAT) 1 経路または IL-12/STAT4 経路系の関与が必須であるため、*Mdk*^{+/+}あるいは *Mdk*^{-/-}由来の naïve CD4 細胞を強制分化させ、STAT1 及び STAT4 の活性化について比較検証を行った。STAT1 のリン酸化は両群間で差を認めなかった一方で、STAT4 は *Mdk*^{+/+}由来細胞で有意な差を示した (Figure3F, 3G)。併せて、*Mdk*^{-/-}由来 naïve CD4 細胞にリコンビナント・ヒト MK タンパク (rhMK) を負荷すると *Mdk*^{+/+}由来細胞の場合と同様に STAT4 リン酸化増強を示した。

【考察】

本研究において、MK は CD4 細胞質より核内への NFAT1 移行および STAT4 のリン酸化を促進する事により CD4 細胞の活性化および T_H1 細胞分化に促進的に働く事を明らかにした。実際、自然発症型 SLE モデル・MRL/lpr マウスにおいても本研究と同様に腎臓と脾臓において MK 発現の増強が確認されている。一連の過程では、T 細胞受容体刺激により CD4 陽性 T 細胞は腎臓及び脾臓由来の MK 産生を促進し、この MK が核内転写因子 NFAT1 による T 細胞の活性化および IL-12/STAT4 経路の促進による T_H1 細胞への分化増殖を呈する vicious circle 形成を促す事が証明されたと考えられた (Figure4A, 4B)。

LN では IL-2 産生の著明な低下と共に Treg の分化・増殖能低下が病態形成に強く関与する事が明らかにされているが、本検証では Treg や Treg に制御される T_H17 細胞の分化能に有意な差を両群間に認めなかった。これは、錫村らの検証によって MK は IL-2 依存性に Treg 制御に関与する事が示唆されており、LN の病態による IL-2 産生の低下に寄与する結果と推測される。

現在、Cn 阻害薬は有効な LN 治療の一翼を担っているが、高血圧・高血糖・腎毒

性といった有害事象が治療の妨げとなっている。本研究によって、MK 阻害は Cn/NFAT 経路において Cn 発現に影響を与える事なく NFAT1 の転写活性を阻害し、LN に対する新たな治療戦略を構築する可能性を示した。

【結論】

MK は CD4 陽性 T 細胞において核内 NFAT1 の転写活性および IL-12/STAT4 経路の活性化を介して T 細胞の活性化および Th1 細胞分化・増殖を促す。