

主論文の要旨

**Urinary levels of the leukocyte surface molecule
CD11b associate with glomerular inflammation
in lupus nephritis**

（ ループス腎炎における尿中白血球表面分子CD11bと
腎糸球体炎症との関連 ）

名古屋大学大学院医学系研究科 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）

北川 章充

【緒言】

全身性ループスエリテマトーデス(SLE)に合併する糸球体腎炎(ループス腎炎、LN)は、SLE 患者の予後を決める重篤な合併症であるが、その診断・疾患活動性評価・治療方針決定には腎生検が必須である。しかし、患者の全身状態や年齢、十分な医療設備がないために腎生検を行えないことや侵襲性の大きさから頻回の腎生検の施行は困難であることより代替となる非侵襲的検査法が望まれている。

近年、好中球、マクロファージは糸球体腎炎発症時に腎糸球体に集積し、炎症を惹起・誘導することが明らかとなっている。本研究では、主に好中球やマクロファージに発現する細胞接着因子 Mac-1 の α 鎖である CD11b、および主に好中球に発現する免疫複合体(IC)認識分子である CD16b の尿中排泄とループス腎炎の組織学的疾患活動性との関連について検討した。

【方法】

・腎生検の組織学的評価

名古屋大学医学部附属病院およびその関連病院から集めた腎糸球体疾患 272 例(118 例の LN を含む)の腎生検組織を評価した。IgA 腎症(IgAN)、微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)、膜性腎症(MN)、糖尿病性腎症(DMN)、ANCA 関連血管炎(AAV)、LN の糸球体へ集積する CD11b 陽性細胞、好中球、マクロファージ数の評価、および LN においてはそれらと組織学的疾患活動性の相関を検討した。

・ELISA 法による尿中 CD11b、16b 測定

腎生検時尿中 CD11b(U-CD11b)、CD16b(U-CD16b)値を ELISA 法で測定し、上記患者群での差異、LN での組織学的活動性との関連について検討を行った。さらに、当施設における尿中 CD11b の検討結果を、群馬/埼玉大学で収集された LN44 例の尿検体で確認した。

・マウス腎炎モデルでの解析

糸球体腎炎惹起後の尿中 CD11b 上昇時期を同定するために、LN と同様の疾患発症機序を特徴とする nephrotoxic serum 投与糸球体腎炎マウス(NTS-GN)を使用し、尿、血清、組織の評価を行った。また、治療による尿中 CD11b 低下を評価するため、デキサメタゾン投与実験も行った。

・各種条件によるマウス好中球の CD11b の発現

糸球体に集積した CD11b 陽性細胞からの CD11b 遊離メカニズムを明らかにするため、まず免疫複合体認識に関わる Fc γ 受容体をモノクローナル抗体により架橋(Fc γ R cross-link)し、マウス好中球 CD11b、CD62L 発現をフローサイトメトリーにより解析した。次に、糸球体係蹄を、マウス好中球をマウス血管内皮細胞で覆った半透膜を介して通過させる細胞実験系で再現し、PMA による好中球活性化、TNF α による血管内皮細胞活性化、MIP-2 による好中球遊走刺激を行い、各刺激の有無によるマウス好中球上の CD11b 発現変化をフローサイトメトリーで解析した。

【結果】

・腎生検の組織学的評価

腎糸球体における CD11b 陽性細胞、好中球、マクロファージ集積は、IgAN、MCNS、MN、DMN で少数であったのと対照的に、AAV、LN においては有意に増加していた (Figure 1a-e)。さらに LN 組織病型による解析では、非細胞増殖性の classII や V で各白血球分画の糸球体集積数が少数であったのに対し、細胞増殖性の classIII で中等度に、classIV では高度に集積を認めた (Figure 1d,e)。また、LN での糸球体 CD11b 陽性細胞数は、組織学的活動性スコア (BAI) と相関した ($r=0.623$; Figure 1f)。

・ELISA 法による尿中 CD11b、16b 測定

尿中 CD11b は AAV と LN、特に LN の classIV で明らかな上昇を認めた (Figure 2a)。群馬/埼玉大学収集尿検体でも、classV と比較して classIII, IV で尿中 CD11b の有意な上昇を認めた (Figure 2b)。組織との相関については、尿中 CD11b は糸球体内 CD11b 陽性細胞 ($r=0.630$; Figure 2c)、BAI ($r=0.726$; Figure 2d) とともに強い相関を認めた。尿中 CD11b の治療後変化については、寛解に至った当施設コホート登録 LN 患者 17 例で尿中 CD11b は著明に減少しており (Figure 2e)、群馬/埼玉大学コホート登録患者 15 例では、治療後に尿中 CD11b の速やかな経時的低下を認めた (Figure 2f)。尿中 CD16b は、LN、特に classIV で上昇を認めたが、AAV やその他の疾患では上昇を認めなかった (Figure 3a)。また尿中 CD16b は、糸球体好中球数および BAI と弱い相関を認めるに留まった (Figure 3b,c)。

尿中 CD11b、尿中 CD16b の classIII、IV LN の鑑別能を評価するため ROC 曲線を描いたところ、尿中 CD11b の AUC は 0.916 と非常に高く、尿中 CD16b、尿中 CD163、尿中 MCP-1 (U-MCP-1)、蛋白尿、血清 Cr より優れていた (Figure 4)。

・マウス腎炎モデルでの解析

NTS-GN マウスモデルでは、血清 Cr の上昇や組織傷害、糸球体の CD11b 陽性細胞の増加が 7 日目で観察されたのに対し (Figure 5a-d)、尿中 CD11b は 14 日目で初めて排泄が確認された (Figure 5e)。また、デキサメタゾン治療による蛋白尿、腎障害、組織変化の改善に伴い、尿中 CD11b 排泄も低下した (Figure 5f-j)。

・各種条件によるマウス好中球の CD11b の発現

マウス好中球の CD62L と CD11b の発現に関しては、FcγR cross-link により CD11b は明らかな減少を認めたが、CD62L 発現に変化はなかった (Figure 6a,b)。また、膜通過モデルでの CD11b の発現は、TNFα や MIP-2 による影響は受けず、PMA 刺激を受け、かつ膜を通過したマウス好中球においてのみ CD11b 発現低下を認めた (Figure 6c-e)。

【考察】

本研究結果により、尿中 CD11b は活動性糸球体腎炎、特に LN での classIII と IV の診断能に優れたバイオマーカーであることが示された。尿中 CD11b の LN の classIII と IV に対する鑑別能が、尿中 CD16b や尿中 CD163 に比し優れていた理由

として、CD16b が好中球、CD163 がマクロファージに主に発現しているのに対し、CD11b はその両者に発現しており、腎糸球体炎症に関与する白血球分画を広範囲にカバーすることが考えられた。これまでヒト腎疾患や糸球体腎炎動物モデルにおいて、マクロファージの糸球体炎症へ関与は報告されていたが、本研究結果から、好中球も腎炎活動期に糸球体に集積し、同細胞由来の CD11b も尿中に排泄されうると推測された。また、CD11b の尿中漏出には白血球表面からの遊離が必須であるが、その条件としては、白血球が免疫複合体を認識し活性化状態にあること、内皮細胞間隙を通過することが必要だと示唆された。活動性ループス腎炎に対する尿中 CD16b の診断能は、他の尿中バイオマーカーより劣っていたが、ループス腎炎以外の糸球体疾患では有意な上昇を示さず、疾患特異性が高いと考えられた。そのため尿中 CD16b は AAV を含む他の糸球体疾患群との鑑別に有用かもしれない。

【結語】

本研究成果から、尿中 CD11b は LN の診断法としてだけでなく、経過中の治療効果判定を目的とした非観血的検査法として有用だと考えられた。また本診断法は、本邦の腎疾患治療現場のみならず、低い医療水準のため患者が正確に組織診断されることなく末期腎不全に陥るような発展途上国においても、尿検体を用いる診断法として期待できる。